Année 2016

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé (VAS)

présentée par

Fanny Ruhland

Préparée à l'Unité Mixte de recherche 6552 CNRS - EthoS
Laboratoire d'Ethologie Animale et Humaine
UFR - SVE

Etude comportementale des interactions entre une mère lycose errante, *Pardosa saltans* (Araneae), et son cocon

Thèse soutenue à Rennes le 9 Novembre 2016

devant le jury composé de :

Yves LECONTE
Directeur de Recherche, INRA Avignon / *rapporteur*

Thibaud MONNIN
Directeur de Recherche, CNRS Paris 5 / *rapporteur*

Anne-Marie CORTESERO
Professeur, Université de Rennes 1 / *examinateur*

Alain CANARD
Professeur, Université de Rennes 1 / *examinateur*

Yves CAUBET
Maître de Conférences, Université de Poitiers / *examinateur*

Frédéric YSNEL
Maître de Conférences, Université de Rennes 1 / *examinateur*

Marie TRABALON
Professeur / *directeur de thèse*

Sommaire

Introduction générale **1**

I. Comportement parental dans le règne animal **5**
I.1. Stratégies reproductives et soins parentaux 5
I.2. Dépense et investissement parental 8
I.3. Soins parentaux et reconnaissance de la progéniture 14
I.3.1. Identification des jeunes 15
I.3.2. Reconnaissance individuelle des jeunes 17
I.3.3. Protection et nourrissage des jeunes 18
II. Comportement maternel chez les araignées **20**
II.1. Modes de vie 20
II.2. Choix reproductifs et soins parentaux 24
II.2.1. Comportement maternel pendant la période de pré-émergence des jeunes 26
II.2.2. Comportement maternel pendant la période post-émergence des jeunes 28
II.3. Dépense et investissement maternels 29
II.4. Soins maternels et reconnaissance des jeunes 31
II.4.1. Modes de communication chez les araignées 31
II.4.1.1. La communication visuelle 31
II.4.1.2. La communication vibratoire 32
II.4.1.3. La communication chimique 33
II.4.1.4. Mécanorécepteurs et chémorécepteurs 34
II.4.2. Identification des cocons et des jeunes 37
II.4.3. Protection et nourrissage des jeunes 38
III. Problématique **40**

Modèle et cycle biologique **45**

I. Présentation de l'espèce **47**
II. Cycle biologique **48**
II.1. Cycle biologique de la mère 48
II.2. Développement embryonnaire et post-embryonnaire 49
III. Conclusion **51**

Chapitre 1 : Comportement, dépense et investissement maternels **53**

Article 1 **59**
I. Inroduction **60**
II. Materials and methods **62**
III. Results **66**
IV. Discussion **75**
V. Conclusion **78**

Article 2 **79**
I. Inroduction **80**
II. Materials and methods **82**
III. Results **86**
IV. Discussion **93**
V. Conclusion **96**

Chapitre 2 : Signaux chimiques et vibratoires **97**

Analyses chimiques des extraits biologiques : Méthodologie générale **103**
Article 3 **107**
I. Inroduction **108**
II. Materials and methods **109**
III. Results **113**
IV. Discussion **121**
V. Conclusion **124**

Article 4 **125**
I. Inroduction **126**
II. Materials and methods **127**
III. Results **131**

IV. Discussion **141**

V. Conclusion **143**

Article 5 **145**

I. Inroduction **145**

II. Matériels et méthodes **146**

III. Résultats **146**

IV. Discussion – Conclusion **149**

Discussion - Conclusion 151

I. Stades de développement et soins maternels **153**

I.1. Le comportement maternel varie-t-il au cours du temps ? 155

I.2. La mère dépense-t-elle beaucoup d'énergie lors des soins au cocon et aux jeunes ? 158

I.3. La mère a-t-elle un investissement écologique lors des soins au cocon ? 160

II. Facteurs impliqués dans les soins maternels **164**

II.1. Facteurs internes 164

II.2. Facteurs externes 165

Conclusion **169**

Bibliographie 171

Remerciements

Voilà l'heure des remerciements, passage obligatoire mais ô combien nécessaire après 3 ans de thèse.

Tout d'abord je tiens de tout cœur à remercier Marie Trabalon. Au cours de ces 3 ans vous avez été une formidable directrice de thèse, toujours prête à maniper, aller sur le terrain malgré vos charges de travaux annexes et à m'encourager à ouvrir mes horizons. Vos conseils, votre gentillesse et votre franchise m'ont permis de mener ma thèse à terme. Aussi, ma thèse est également un petit peu la vôtre, même si, malheureusement, c'est votre dernière. Mais votre rôle ne s'est pas seulement arrêté à celui de directrice, vous avez été ma deuxième maman ! Si, si ! Et je garde en mémoire nos souvenirs africains, anglais, Roscoffiens et embourbés ! Les chutes étaient belles et on ne s'est jamais perdues au final !

Merci à Alban Lemasson de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Merci aussi à tous les membres de l'UMR pour vos aides multiples et votre bonne humeur, que vous soyez Rennais ou Paimpontais !

Je remercie particulièrement Yves Leconte, Thibaud Monnin, Anne-Marie Cortesero, Alain Canard, Frédéric Ysnel et Yves Caubet d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Frédéric Ysnel, Alain Canard, et Julien Pétillon, merci d'avoir participé à mes comités de thèse et permis d'avoir fait avancer les réflexions autour du projet. Merci à mon tuteur Xavier Le Goff pour ses conseils et sa présence. Alain et Fred, les photos du Gabon resteront bien gardées !

Je remercie Stefan Schulz, Fernando Garcia, Lisa Ziesche, Jana Caspers, Christopher Grimm et Marylène Chollet-Krugler pour leur aide "expérimentale" et leurs conseils.

Merci à Ann Cloarec et Françoise Joubeau pour leurs relectures, quelles soient d'articles ou du manuscrit.

Merci à Nathalie, Céline et Christelle pour leur soins aux « petites » mygales. Vous croiser à l'animalerie était toujours un plaisir. Merci aussi à toi Anne pour les nombreux mots d'encouragements et l'aide à la vaisselle.

Les doctorants, post-doc et ATER ont été nombreux à me supporter. Pour ces discussions, ces franches tranches de rigolades et les Kinder, merci à Camille, Nadège, Vanessa (on continue la fonte), Laurine (tient bien la barre), Célin, Doro, Clémence (mon piou), Alice, Océane, Morgane, Mathilde. Et parce que ça fait beaucoup de filles et que tu fais

encore partie des « jeunes », merci Antoine pour ton efficacité dans le boulot mais aussi ta bonne humeur et ton empathie. Comment vais-je faire sans les carambars noirs maintenant ?

Violette et Cécile merci à vous deux ! Vous avez été des stagiaires exemplaires, je n'aurais pas pu rêver mieux ! Je vous souhaite bon courage pour la suite.

Sciences en Cour[t]s est une aventure indissociable de ma thèse. Certes il y a eu « le » court métrage mais ce que je retiens c'est surtout ces 2 années d'organisation en compagnie de personnes que je suis super heureuse de connaître, Coco, Sylvain, Jean, Seb, Aymeric, Gaëlle, Victo et tous les autres : SeC c'est magnifique, c'est fantastique, merci. Cinémathèse était aussi un sacré challenge mais je suis contente d'avoir participé à son lancement. Aline merci à toi, on se revoit à Paris.

Ma femme, même si en 3 ans les retrouvailles ont été rares, merci pour ton soutien à distance. Célia et Granny, tout pareil. Je sais qu'on ne s'est pas vu souvent mais vos petits mots et votre amitié étaient toujours là pour moi.

Merci à tous mes amis rennais et expatriés pour les fous rires, les pintes de Bonnet rouge, les danses endiablées, les déguisements épiques, la mise à niveau de ma culture cinématographique (ce qui n'était pas gagné d'avance). Donc merci merci à Dry, Jo et Marine, GG, Steph et son Nico, les Pouget et leur camion.

*Nana, la thèse aurait été beaucoup moins fun sans toi ! T'es toujours là et ce, même quand t'es pas là, mais t'es où ? Nos heures de conneries m'ont toujours fait un bien fou et je suis heureuse d'avoir partagée tant de choses avec toi, je ne peux même pas tout nommer (il faut laisser de la place au contenu scientifique) ! En plus de la thèse avec toi je suis devenue experte en pâtisserie et chansons pourries. Je te souhaite plein de courage et force pour la suite au Canada ! Et petite léchouille à petit p***, tu me manques. Nanygeek power.*

Je tiens également à remercier énormément Maman, Pôpa, Loulou, Mamy et toute ma famille qui me soutien toujours dans ce que j'entreprends et qui sont toujours intéressés lorsque je parle de mes petites bêtes. Je ne serai jamais arrivé jusqu'ici sans vos encouragements et votre foi en moi.

Comment remercier à sa juste valeur cet amoureux des canards. Tu crois toujours en moi et j'en suis toujours aussi surprise. Tu continues à me faire avancer. Merci.

Le savoir humain sera rayé des archives du monde
avant que nous ayons le dernier mot d'un moucheron.
Jean-Henri Fabre

Introduction générale

Ce mémoire de thèse constitue le travail d'approfondissement d'un programme de recherche sur le comportement parental manifesté par les araignées et plus particulièrement dans l'étude des signaux de communication échangés lors des soins à la progéniture pendant la période pré- et post-émergence. Le comportement est envisagé dans une perspective évolutive, car les trois questions posées dans le cadre de notre travail sont les suivantes :

1 – quels sont les différents actes moteurs susceptibles de traduire l'intensité du dialogue qui se développe entre une mère araignée et sa progéniture ?

2 – quelles sont les incidences des conditions du milieu externe (i.e. présence de proies, stade de développement de la progéniture) et du milieu interne (i.e. état énergétique, âge) sur le comportement maternel ?

3 – de quelle nature sont les signaux de communication impliqués dans l'induction et la régulation du comportement maternel ?

Le comportement parental faisant l'objet de notre travail est généralement caractérisé par la manifestation d'un comportement de soins apportés par les parents (mâle et/ou femelle) ou par les membres d'une caste spécialisée (ouvriers et/ou ouvrières) susceptible d'augmenter l'aptitude de la progéniture (Baerends, 1964 ; Chauvin, 1969 ; Richard, 1975). Dans le règne animal le comportement parental est, pour de nombreuses espèces, une partie nécessaire du cycle reproducteur. Le comportement parental s'observe dans toutes les classes de vertébrés (mammifères, oiseaux, poissons, amphibiens), et on le rencontre aussi isolément chez certains invertébrés (Tallamy, 2001 ; Nazareth & Machado, 2009), en particulier chez 16 lignées d'arthropodes (crustacés, arachnides, insectes). Les comparaisons phylogénétiques des comportements de soins aux jeunes permettent de tester les facteurs ayant conduit à la complexification des comportements parentaux au cours de l'évolution.

Le comportement parental n'apparaît chez l'adulte qu'à certaines périodes du cycle biologique de l'espèce et il est lié à un état physiologique en rapport avec la génétalité. Cet état physiologique se modifie à mesure que se déroulent les différentes phases de la reproduction et celles du développement de la progéniture. Il disparait quand les jeunes ont atteint un certain âge (variable selon les taxons et les espèces). Pour les **espèces ovipares**, le comportement parental comprend les soins donnés aux œufs fécondés puis éventuellement aux jeunes. Pour les **espèces vivipares**, le comportement parental se limite aux soins prodigués aux jeunes. L'apparition du comportement parental et de l'état physiologique qui le

sous-tend est contrôlée par des facteurs externes. Ces facteurs externes peuvent être la photopériode, l'alternance des saisons (sèches et humides), les changements de température, le cycle lunaire, les modifications dans la qualité et la quantité de la nourriture disponible et enfin de facteurs externes émanant de la progéniture elle-même. Le comportement parental évolue au cours du développement du (des) jeune(s) et la durée est variable selon les espèces : quelques jours (*i.e*. arthropodes, amphibiens, poissons) à quelques années (*i.e*. mammifères).

De manière très générale, les soins parentaux consistent d'une part à la prise en charge des zygotes au cours du développement embryonnaire et d'autre part aux soins directement portés aux juvéniles. Ainsi, on parle uniquement de « **soins à la ponte »** (ou **soins pré-émergence**) lorsque la mère (ou les parents) ménage(nt) à leurs petits encore dans l'œuf des conditions de développement propices : aménagement et entretien de terriers, de nids et de cocons qui servent de refuges, la constitution d'une réserve de nourriture ou l'oviposition à proximité d'une source trophique. La notion de soins à la ponte englobe donc les **conduites parentales qui précèdent l'éclosion** (Wilson, 1971 ; Perrone & Zaret, 1979). On parle de **comportement maternel post-émergence** lorsqu'un contact direct s'établit entre les parents et leurs jeunes après l'éclosion.

En fonction des efforts reproductifs fournis par les géniteurs, il est important de distinguer **les soins parentaux** et la **dépense parentale** de **l'investissement parental** (Clutton-Brock, 1991).

Les **soins parentaux** regroupent n'importe quelle manifestation du comportement parental susceptible d'augmenter la fitness de la progéniture. D'après Trivers (1972), l'investissement parental est « *any investment by the parent in an individual offspring that increases the offspring's chance of surviving (and reproducing) at the cost of the parent's ability to invest in itself or other offspring* ». Par conséquent,

- la **dépense parentale** correspond à la part de ressource parentale (e. g. temps, énergie) investie dans les soins parentaux apportés au(x) jeune(s). La dépense parentale relative correspond à la fraction des ressources parentales allouée aux soins parentaux. Cette dépense n'est pas forcément constante au cours du cycle reproductif.
- L**'investissement parental** est défini comme les conséquences des soins parentaux sur la portée actuelle (soins aux jeunes) et les portées futures. La dépense que les géniteurs effectuent peut avoir diverses conséquences pour leur survie et leur reproduction, à court, moyen ou long termes.

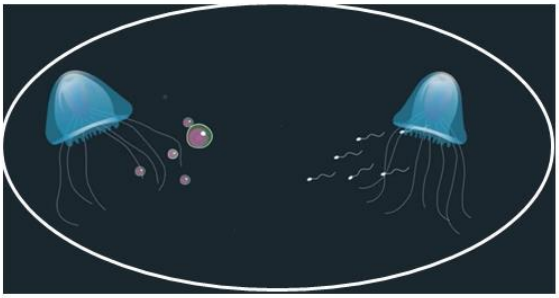
I. Comportement parental dans le règne animal

I.1. Stratégies reproductives et soins parentaux

D'un point de vue évolutif, il existe une tendance à l'augmentation de la durée des soins prodigués à la progéniture et à une diminution du nombre de jeunes depuis les groupes zoologiques les plus primitifs vers les plus évolués (Ridley, 1995 ; Clutton-Brock, 1991).

Chez certaines espèces, l'effort reproductif accompli par les géniteurs se limite à la production de gamètes et à la fécondation de l'œuf par les spermatozoïdes. Par exemple, les méduses ont une progéniture très nombreuse, mais ne s'en occupent pas (Harrison *et al.*, 1984 ; Heyward & Babcock, 1986 ; Schlesinger *et al.*, 2010). Beaucoup d'espèces se limitent à libérer dans l'eau des ovules et des spermatozoïdes qui se rencontrent et engendrent de nouveaux individus. Dans ce cas, le nombre de petits est très élevé, mais la probabilité de survie jusqu'à la maturité sexuelle est faible. Etant donné cependant que l'effort initial pour créer chaque petit est minime, la mort de l'un d'entre eux ne représente pas une grande perte, et la descendance est toujours assurée. Cette stratégie reproductive correspond à la **stratégie r** de reproduction décrite par Mac Arthur &Wilson (1967).

Chez d'autres espèces, les soins aux jeunes peuvent consister simplement à chercher ou



Méduses



Guêpe *Cerceris arenaria*

édifier un abri, pourvu ou non de nourriture, dans lequel seront abandonnés les œufs fécondés. Par exemple la guêpe primitive *Cerceris arenaria* pond dans une cavité qu'elle a construite, approvisionnée en proies paralysées (Willmer, 1985 ; Field, 1992). Après la ponte, elle rebouche la cavité et ne s'occupe plus de sa progéniture.

Chez d'autres, il comprend des soins parentaux parfois très longs qui peuvent s'effectuer à différents stades de développement de la progéniture (Tableau 1).

Tableau 1 : Stades auxquels peuvent s'exercer les soins parentaux.

Stades	Types de soins observés
Oeufs	Couvaison, retournement
	Protection (prédation inter et intraspécifique ; température)
	Incubation directe ou indirecte
Larves	Nourrissage (trophallaxie)
	Protection (prédation inter et intraspécifique ; température)
Jeunes	Nourrissage (gavage, régurgitation, trophallaxie, sécrétion spécifique, allaitement)
	Toilettage / Hygiène (cuticule, poils, plumes)
	Protection (prédation inter et intraspécifique)
	Education (à la prédation, sociale)

Ainsi les géniteurs peuvent intervenir dès la fécondation, par exemple en protégeant, oxygénant ou réchauffant les œufs, de façon à garantir un développement efficace de l'embryon. Chez la salamandre *Andrias japonicus* le mâle agite les œufs (Salthe, 1969 ; Kawamichi & Ueda, 1998) et chez certaines espèces d'urodèles les femelles les protègent de l'oophagie des conspécifiques (Duellman & Trueb, 1986). Chez d'autres taxons les œufs sont transportés lors de leur développement, c'est le cas de certains anoures ou de la femelle calmar *Gonatus onyx* (Crump, 1974 ; Seibel *et al.*, 2005).

La femelle d'une punaise, *Elasmucha betulae*, garde au revers d'une feuille de bouleau les œufs et plus tard les jeunes. Elle les protége des insectes prédateurs ou parasites et des moisissures. Si la feuille tombe ou se dessèche, elle n'abandonne pas sa progéniture. D'autres espèces nourrissent les petits après la naissance et les protègent également des prédateurs. Par exemple, le petit cachalot, *Physeter macrocephalus* ou *P. catodon*, à la naissance mesure 4 mètres et pèse plus de 500 kg. Il ne survit que grâce à sa mère, qui est, pendant 2 ans, sa seule source de nourriture et qui le protège des prédateurs comme l'orque (*Orcinus orca*), la fausse orque (*Pseudorca crassidens*) et la baleine pilote (Pitman *et al.*, 2001).



Punaise *Elasmucha betulae*



Cachalot *Physeter macrocephalus*

Parmi les soins les plus élaborés observés, on distingue l'offrande alimentaire, les soins du derme (ou cuticule), du plumage ou du pelage, l'élimination des matières fécales et autres déjections (ex : hygiène du nid), le camouflage (ex : couleurs des œufs), le transport à l'abri (transport des jeunes à l'intérieur ou à l'extérieur du corps du géniteur, ramassage occasionel des jeunes par la mère), de même que la surveillance, la défense et le pilotage des jeunes.

Chez d'autres espèces dotées de capacités d'apprentissage élevées, les parents transmettent aux petits des comportements particuliers, les instruisent et leur donnent des connaissances permettant de s'adapter et survivre dans un environnement changeant. Par exemple, la mère chatte *Felis silvestris* apprend la technique de chasse à ses petits (Mendi, 1988).



Chats *Felis silvestris*



Elephantidae

Les jeunes mammifères reçoivent une éducation sociale (Hinde & Spencer-Booth, 1967). Par exemple, les bébés éléphants dépendent de leur mère pendant 3-5 ans et cette période contribue à développer des relations sociales complexes dans l'unité familiale. Les mères soignent de façon différente les éléphanteaux mâles et femelles (Lee, 1986). Les mâles se nourrissent plus souvent mais quittent leur mère plus tôt ; les femelles restent plus proches de leur mère et s'engagent dans des interactions plus nombreuses avec elle. Les petits mâles quittent la famille pour interagir et jouer surtout avec des animaux qui ne sont pas de la famille alors que les femelles demeurent dans le cadre familial. Ces différences entrent dans le

processus de développement social précoce de ces animaux préparant aux contraintes de l'organisation sociale adulte.

Les espèces donnant des soins parentaux complexes font peu de petits et ont une grande probabilité de les amener à l'âge de la reproduction, grâce à l'aide que les géniteurs leur procurent. Cette stratégie reproductive correspond à la **stratégie K** de reproduction décrite par Mac Arthur & Wilson (1967). Et dans ce cadre, les soins parentaux peuvent augmenter la fitness de leur progéniture de 2 façons différentes : en augmentant la survie des jeunes et/ou en augmentant le succès reproducteur des jeunes. L'augmentation de la survie des jeunes peut s'effectuer lorsque les parents et les jeunes sont physiquement associés : gardiennage des jeunes (Zink, 2003), l'approvisionnement (Barba *et al.,* 1996 ; Eggert *et al.,* 1998) ou même en les protégeant d'éventuels prédateurs ou parasites (Croshaw & Scott, 2005). Les parents peuvent aussi augmenter le succès reproducteur des jeunes. Par exemple, lorsque les mères singes vervets (*Chlorocebus pygerythrus*) sont présentes dans le même groupe que leurs filles, celles-ci sont sujettes à moins d'agressions, un plus haut taux de gestation et plus d'enfants survivants (Fairbanks & McGuire, 1986).

I.2. Dépense et investissement parental

Chez la plus grande partie des espèces donnant des soins parentaux, les comportements parentaux sont le fait dans la majorité des cas d'un seul des parents, et plus rarement des deux. Le comportement des petits et celui de leurs parents sont déterminés par ces derniers, qui cherchent à préserver leurs propres intérêts. Les parents tendent à avoir un nombre de petits tel que, étant donné la probabilité de survie de chacun, l'un d'entre eux au moins se reproduise à son tour, assurant la descendance. C'est pour cela que les soins parentaux ne durent généralement pas jusqu'à la maturité sexuelle, mais seulement jusqu'au moment où est atteint un bon compromis entre le risque que les petits ne survivent pas seuls, et l'avantage pour les parents de pouvoir se consacrer à se reproduire et à donner des soins à une nouvelle portée.

Dans la majorité des cas, ce sont les femelles qui consacrent le plus de temps et d'énergie à chaque petit car elles ne peuvent pas en avoir beaucoup. En effet, la femelle produit un petit nombre d'ovules qui contiennent les matériaux nutritifs nécessaires au

développement de l'œuf après fécondation et cette production peut atteindre parfois jusqu'à 30 % de son poids total. Avec les mêmes ressources, les mâles produisent d'énormes quantités de spermatozoïdes (qui ne contiennent aucun élément nutritif) mais qui ne dépassent jamais 5 % de leur poids corporel, pour toute une saison de reproduction. Aussi les femelles ont-elles souvent le plus grand intérêt à augmenter la probabilité de survie de leur descendance en assurant seules les soins parentaux, comme par exemple chez les mammifères, où ce sont les femelles qui portent les embryons et sont présentes lorsque les jeunes naissent. Les mâles n'ont aucun contrôle direct sur la gestation et sur la naissance de leurs descendants.

Dans d'autres cas, ce sont les mâles qui se chargent des soins parentaux. L'investissement paternel peut exister chez bon nombre d'espèces (insectes, poissons, batraciens et oiseaux) et les mâles parentaux sont, presque sans exception, territoriaux, défendant un site que les femelles visitent pour s'accoupler et pondre. Par exemple, chez la grenouille dendrobate d'Amérique du Sud, *Dendrobates leucomelas*, les œufs sont gardés par le mâle, qui les porte sur son dos (Summers, 1992). Quelques jours après l'éclosion, le père dépose les têtards dans l'eau, où ils terminent leur croissance.



Dendrobates leucomelas



Syngnathus typhle

Dans ce système de mâles parentaux territoriaux, le coût reproducteur des soins parentaux disparaît presque complètement pour les mâles puisqu'en gardant leur territoire ils gardent aussi les œufs qu'ils ont fertilisés. Le territoire et la présence des œufs rendent les mâles attractifs pour d'autres femelles, augmentant encore leur succès reproducteur. Par exemple, les mâles *Syngnathus typhle* (pipefish) reçoivent les œufs de leurs femelles qui les placent dans leur poche incubatrice (Rosenqvist, 1990). Pendant la « gestation », le mâle fournit les éléments nutritifs et l'oxygène aux œufs fécondés durant plusieurs semaines,

période plus longue que celle nécessaire à la femelle pour produire une nouvelle ponte. Dans ce cas, le rapport bénéfice/coût est très favorable pour les soins paternels.

Cependant, lorsqu'un des parents ne réussit pas à garantir la survie d'un petit nombre de petits, l'autre participe alors aux soins. C'est le cas par exemple des oiseaux, qui dépensent beaucoup d'énergie pour produire et couver les œufs, et pour alimenter leurs oisillons jusqu'à ce qu'ils soient indépendants. La survie des jeunes, dans des conditions environnementales contraignantes, exige la présence du mâle aux côtés de la femelle. Le taux de survie des jeunes peut justifier l'avantage procuré par une stratégie d'assistance paternelle par rapport à l'abandon d'autres possibilités de copulation par le mâle. Par exemple les deux parents prennent soin de leurs larves chez les blattes xylophages ovipares *Cryptocercus punctulatus* (Cryptocercidé). Les femelles produisent en un seul épisode reproductif 75 œufs répartis entre 4 oothèques. Les soins aux jeunes durent 3 ans et comprennent la défense de la famille, le creusement du terrier, l'hygiène du nid et le nourrissage (Nalepa, 1984). Celui-ci est indispensable à la transmission des protozoaires symbiotiques qui digèrent la cellulose. Il se fait par trophallaxie (ingestion de fluide proctodéal) et par des sécrétions cuticulaires.



Blatte *Cryptocercus punctulatus*



Manchot empereur *Aptenodytes forsteri*

Chez le manchot empereur, *Aptenodytes forsteri* est la seule espèce d'oiseau où le mâle couve l'œuf seul pendant environ 60-70 jours (Jouventin, 1982). Lorsque le jeune éclot, la mère seule s'occupe de l'oisillon pendant environ 1 mois. Puis le couple va s'occuper du jeune à tour de rôle jusqu'au sevrage.

Il est donc admis que la production de soins parentaux chez de nombreuses espèces peut induire un coût pour les reproductions futures (Trivers, 1972 ; Clutton-Brock, 1991 ; Royle *et*

al., 2012). Les coûts associés au comportement de soin sont de nature différente selon le mode de vie et la quantité de soins apportés aux descendants (Humphrey, 1974 ; Nørgaard, 1951), ils sont donc difficiles à identifier et classifier. Les coûts apposés aux parents sont souvent en lien avec des ressources limitées de l'environnement, qui peuvent résulter d'un risque de prédation plus important, des rivaux, des parasites ou d'un manque de temps dans la reproduction.

Ainsi les **coûts non physiologiques (ou écologiques)** liés aux soins parentaux incluent l'augmentation du risque de prédation et de parasitisme, des dommages liés à la protection des jeunes ou encore une consommation de temps habituellement alloué à d'autres activités. Ainsi, les dépenses associées au temps et à l'énergie des parents manifestant des soins parentaux sont les ressources les plus utilisées dans les modèles théoriques (Royle *et al.,* 2012). L'allocation de plus de temps/énergie aux soins parentaux peut impliquer, pour les parents, moins de disponibilité pour leur propre maintenance, protection ou même pour celles des futures reproductions. L'effort parental est également corrélé positivement avec le risque d'infection (Knowles *et al.,* 2009). Par exemple, Nordling *et al.* (1998) observent, chez la femelle oiseau *Ficedula albicolis* prenant soin d'une grande couvée, un taux de parasitisme sanguin plus élevé que celles ayant une petite couvée. Cette augmentation du risque infectieux peut être due à une plus grande exposition au pathogène et/ou indirectement liée à un état physiologique réduit avec une diminution de l'immunocompétence. L'effort parental induit aussi une diminution de la fitness des parents par la présence d'une pression de prédation plus importante. Chez les invertébrés, il existe de nombreux cas où les parents qui transportent les œufs sont plus sensibles à la prédation (Reguera & Gomendio, 1999 ; Li & Jackson, 2003). Ce coût peut être lié à une diminution de la capacité des parents à s'échapper et/ou à une augmentation de la valeur énergétique des individus pour les prédateurs. En effet, de nombreuses études démontrent une diminution de la mobilité des parents prenant soin de leurs jeunes, notamment chez les mammifères (Schradin & Anzenberger, 2001), les poissons (Ghalambor *et al.,* 2004) et les reptiles (Cox & Calsbeek, 2010). Chez les oiseaux, Witter & Cuthill (1993) observent que les réserves énergétiques utilisées pour la production des œufs induit une diminution des réserves habituellement allouées au vol. Ce processus provoque une baisse dans la capacité de vol et donc une augmentation du risque de prédation.

Il existe également des **coûts physiologiques**, qui sont plus liés à l'allocation des ressources. Certains composés métaboliques permettent aux individus de stocker l'énergie assimilée *via* les ressources alimentaires : les macronutriments (l'eau, les protéines, les

glucides, les lipides, les acides nucléiques, les sels inorganiques et les vitamines). Les protéines sont utilisées comme constituants structuraux des tissus et comme enzymes. Elles peuvent aussi être utilisées comme source d'énergie après avoir été d'abord hydrolysées en acides aminés. Chez les arthropodes, elles varient au cours du développement des individus car elles participent à de nombreuses fonctions métaboliques comme par exemple le transport des lipides et la synthèse de la soie (Chapman, 1998 ; Vollrath, 1999 ; Duman *et al.*, 2004). Les glucides sont surtout utilisés comme des sources d'énergie chimique immédiatement disponibles (glucose-6-phosphate) ou mises en réserve (glycogène). Ces carbohydrates jouent un rôle important dans la croissance, la mue-métamorphose, l'activité reproductrice des individus (Jackson *et al.*, 2001 ; Meehan *et al.*, 2009 ; Taylor & Bradley, 2009 ; Chen *et al.*, 2010). Les lipides sont importants dans certains composants des tissus (membrane plasmique) et les gaines de myéline des axones. Les molécules lipidiques sont les acides gras, les monoglycérides, les triglycérides, les stérols et les phospholipides. Ces molécules de lipides sont utilisées comme réserves d'énergie concentrées (les graisses) par l'organisme lors de déprivation alimentaire (Paine *et al.*, 1971 ; Casas *et al.*, 2005). Chez les arthropodes certaines molécules lipidiques sont des précurseurs aux hormones impliquées dans le contrôle des mues-métamorphoses (Hennen, 2006).

L'allocation de ces différentes molécules est soumise à un trade-off. De petites quantités de substances non-énérgétiques et non synthétisées par l'organisme sont également soumises à un trade-off entre des fonctions compétitrices. C'est le cas par exemple des acides aminés, caroténoïdes, vitamines, minéraux. Par exemple, chez certaines espèces de poissons et d'oiseaux, les caroténoïdes augmentent la fécondité et les soins parentaux produits au détriment de leur fonction d'immunité et de défenses antioxydantes (Pike *et al.*, 2007 ; Tyndale *et al.*, 2008 ; Morales *et al.*, 2009 ; Pérez-Rodríguez, 2009). Les soins parentaux sont favorisés uniquement lorsque le bénéfice apporté à la fitness des parents prodiguant des soins surpasse les coûts associés à ces soins. De nombreux modèles apportent les preuves d'un trade-off entre le succès reproducteur actuel et futur. Les coûts et les bénéfices associés aux soins parentaux déterminent donc directement le pattern de soins apportés aux jeunes. Alonso-Alvarez & Velando (2012) ont décrit une hypothèse reliant les méchanismes liés aux soins parentaux et la maintenance somatique chez l'ensemble des taxons produisant des soins aux jeunes (Fig. 1). Cette representation schématique implique un lien entre les ressources disponibles (nourriture) et le métabolisme expliquant le trade-off entre les reproductions actuelles et futures.

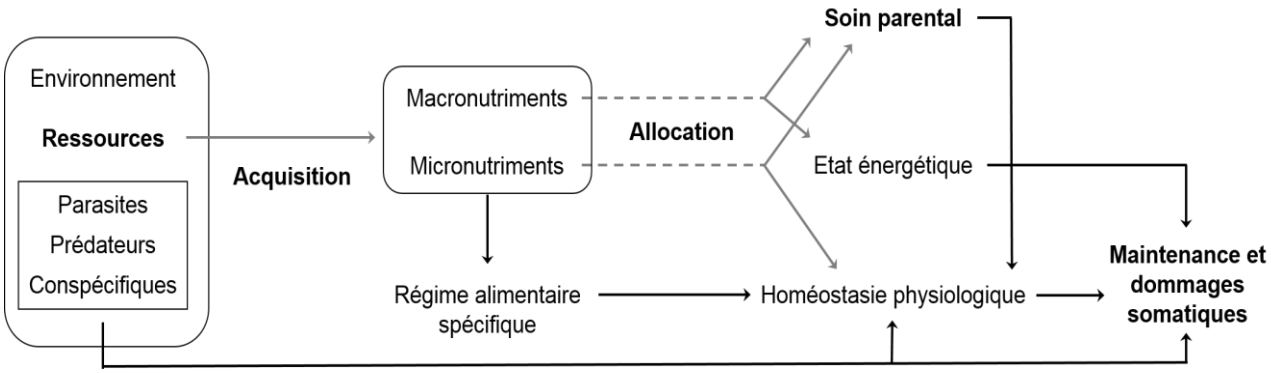


Figure 1 : Représentation schématique du modèle théorique reliant les soins parentaux à la maintenance somatique (d'après Alonso-Alvarez & Velando, 2012).

Les facteurs environnementaux comme la disponibilité en nourriture, le risque de prédation et de parasitisme, la compétition intraspécifique ou encore les conditions physiques imposent des coûts dans l'acquisition de macronutriments et micronutriments. Les facteurs environnementaux peuvent donc affecter l'homéostasie physiologique *via* les nutriments mais également directement. Les soins parentaux peuvent ainsi causer des dommages somatiques directs *via* la maintenance physiologique.

En résumé, l'investissement parental est tout ce que fait un parent pour accroître la probabilité qu'un descendant survive jusqu'à la reproduction, ce qui, en contrepartie, limite ses possibilités d'avoir d'autres descendants (Tableau 2). Les soins parentaux sont une forme d'altruisme. Les parents investissent dans leur progéniture aux dépens de leur propre survie. Le rôle des sexes dans les soins parentaux varie d'une espèce à l'autre selon des facteurs écologiques et physiologiques que l'on ne comprend que partiellement. Trois hypothèses distinctes ont été avancées pour expliquer la prévalence des **soins maternels** par rapport aux soins paternels (Gross & Shine, 1981 ; Alcock, 1998) : la faible fiabilité de la paternité par rapport à la maternité, l'ordre de libération des gamètes et l'association avec les jeunes.

Tableau 2 : Investissement parental en relation avec les stratégies de type r et K d'après la théorie de Mac Arthur et Wilson (1967).

Investissement parental en relation avec les	**Stratégies reproductrices**	
	De type r	**De type K**
Caractères Individuels :		
- Maturation	Rapide	Lente
- Reproduction	Précoce	Tardive
- Vie	Courte	Longue
- Effort reproductif	Important	Modéré
- Utilisation de l'énergie	Intense	Efficiente
- encéphalisation	Réduite	Importante
Caractères de la Famille :		
- portée	Nombreuse	Peu nombreuse
- intervalle entre portées	Court	Long
- descendants	Nombreux	Peu
- mortalité infantile	Forte	Faible
- soins parentaux	Peu	Importants
Caractéristiques de la Population :		
- exploiteurs	Opportuniste	Consistants
- colonisateurs	Dispersant	Occupants stables
- taille de la population	Variable	Stable
- compétition	Relâchée	Serrée
Caractéristiques du système social :		
- Organisation sociale	Peu	Elaborée
- altruisme	Peu	Variable

I.3. Soins parentaux et reconnaissance de la progéniture

Dans bon nombre de cas, les parents doivent être sélectifs dans la distribution des soins, s'ils veulent les investir au mieux pour leurs descendants. Ils doivent alors pouvoir reconnaître leurs jeunes lorsqu'il existe des risques de confusion. Chez toutes les espèces qui prennent soin de leur progéniture, l'évolution a mis au point un système de communication familiale plus ou moins complexe, qui accroît les chances de survie des jeunes.

I.3.1. Identification des jeunes

Pour que les parents puissent s'occuper de leur progéniture, il est indispensable qu'ils puissent identifier celle-ci en tant qu'objet de soins. Chez les espèces solitaires et prédatrices, ce préalable au comportement parental est d'autant plus important que les petits risqueraient à chaque instant de mourir dévorés. On peut penser que, parmi les mécanismes qui assurent les régulations au sein d'un groupe sub-social (*i.e.* mère – jeunes), figurent au premier chef les modes de communication. Des indices produits par un individu se déplaçant dans son environnement de façon passive peuvent être perçus et permettre la mise en place de certains comportements intra- ou interspécifiques. Cependant, lorsqu'une information transmise volontairement est détectable et analysable par des structures sensorielles spécialisées, nous ne parlons plus d'indices mais de signaux (Lloyd, 1983). La communication peut donc être définie comme un échange d'informations par l'intermédiaire d'un canal, sous forme de signaux, entre un émetteur et un récepteur. Dans la littérature éthologique, le « signal » est un terme qui désigne les unités d'un système de communication animale.

Les œufs et les juvéniles des espèces à comportement parental sont ainsi dotés par l'évolution de signaux d'identification spécifiques, qui stimulent le comportement de soin des parents, et éventuellement inhibent leur comportement alimentaire. La nature de ces signaux peut être olfactive, visuelle ou acoustique, selon l'espèce. Chez les insectes parentaux, ces signaux sont habituellement chimiques. Par exemple, la femelle du forficule (*Labidura riparia*) ne s'occupe des œufs qu'elle vient de pondre que s'ils sont porteurs des signaux caractéristiques de son espèce, sécrétés dans ses propres voies génitales (Vancassel *et al*., 1987).



Forficule *Labidura riparia*



Goéland *Larus argentatus*

Les oiseaux, comme par exemple le goéland *Larus argentatus*, identifient leurs œufs en tant qu'objets de couvaison à certaines caractéristiques de forme ou de couleur, puis leurs oisillons à leurs motifs colorés et à leurs vocalisations spécifiques, sur la base de critères plus ou moins stricts selon l'espèce (Baerends & Drent, 1970). Chez la plupart des mammifères, ce sont à la fois l'odeur et les vocalisations spécifiques des nouveau-nés qui déclenchent et entretiennent le comportement parental des adultes (Poindron & Lévy, 1990 ; Rolls, 1994).

En règle générale, les signaux émis par la progéniture ne sont pas significatifs pour l'adulte si ce dernier n'est pas dans l'état physiologique associé à la reproduction. Par exemple la femelle d'*Hemichromis bimaculatus* (poisson cichlidé) reconnaît ses œufs à leur odeur et les incube dans sa bouche pendant quelques semaines (Hersher *et al.*, 1963). Elle ne manifeste ce comportement qu'après avoir pondu. Si on lui présente des œufs de son espèce à tout autre moment, elle les avale.

Le comportement parental peut être déclenché chez quelques espèces par la simple présentation d'œufs ou de petits de l'espèce. Ainsi les couinements des souriceaux nouveau-nés déclenchent l'activité de soin parental chez tout adulte de la même espèce (mâle ou femelle) quels que soient son état physiologique et l'époque de l'année (Sayler & Salmon, 1971). Les recherches ont montré que le comportement parental est activé sous contrôle hormonal par l'accouplement, la fécondation, la ponte ou la parturition, ou la présence des jeunes de l'espèce.

I.3.2. Reconnaissance individuelle des jeunes

Pour toute espèce à comportement parental, il existe un système de reconnaissance spécifique de la progéniture. Si les jeunes sont fixés à demeure dans un abri, nid ou terrier (**espèces nidicoles**), les parents peuvent se contenter de les reconnaître spécifiquement pour les soigner correctement.

De manière générale, les insectes sociaux, les poissons et les oiseaux qui s'occupent de leurs œufs sont incapables de les distinguer de ceux d'autres membres de leur espèce. Par exemple, la reconnaissance du couvain par les ouvrières fourmis n'est pas un processus spontané mais résulte d'un apprentissage de l'environnement social (Jaisson, 1974). Ainsi les ouvrières qui élèvent leurs larves à l'intérieur d'un édifice colonial ne les distinguent pas de larves provenant d'autres colonies (Jaisson, 1975). Les jeunes n'acquièrent l'odeur caractéristique de la colonie qu'après leur nymphose, lorsqu'elles commencent à se déplacer et participent au toilettage social et aux échanges alimentaires au sein de la colonie (Errard, 1986 ; Jaisson, 1991).



Fourmis *Messor sp.*



Kangourou *Macropus rufus*

La femelle *Macropus rufus* (kangourou roux) ne commence à reconnaître olfactivement son petit que lorsqu'il sort de la poche marsupiale et la suit vers l'âge de huit mois (Fisher *et al.*, 2002). Les souris femelles reconnaissent individuellement leurs souriceaux à leur odeur, puis à leurs cris suite à une imprégnation parentale lors de la mise bas (Sayler & Salmon, 1971).

En revanche, si les petits sont plus mobiles et viennent à se mélanger à d'autres jeunes lors de leurs déplacements (**espèces nidifuges**), alors les adultes ont intérêt, évolutivement parlant, à distinguer leur progéniture de celle des voisins (Lévy *et al.*, 2004 ; Corona & Lévy, 2015). Par exemple, une brebis ou une biche refusent de faire téter tout autre petit que le leur

parmi la multitude des jeunes du troupeau. Elles sont imprégnées de l'odeur caractéristique de leurs petits et les ont imprégnés de son odeur personnelle à la naissance.

D'un point de vue adaptatif, les parents, capables de soigner préférentiellement leurs propres jeunes, ont en moyenne un meilleur succès reproducteur que ceux qui s'occupent indistinctement de leur progéniture et de celle des voisins, si ce n'est pas réciproque. Dans ces conditions, la sélection naturelle doit favoriser les individus capables de reconnaître et de soigner sélectivement leur progéniture, et en retour, les jeunes capables de reconnaître et de s'orienter vers leurs parents. Ainsi les mammifères et les oiseaux qui se rassemblent en grandes colonies à l'époque de la reproduction reconnaissent individuellement leurs juvéniles. Chaque parent reconnaît sa progéniture à ses signaux individuels distinctifs, comme par exemple l'odeur et les bêlements dans le cas du phoque *Phoca vitulina* (Sauvé *et al.*, 2015), les vocalisations dans celui des pingouin *Alca torda* (Insley *et al.*, 2003).

I.3.3. Protection et nourrissage des jeunes

L'une des principales fonctions du comportement parental est la protection des jeunes face aux divers dangers de l'environnement. Cette protection est fortement accrue grâce à la **communication familiale**. Ainsi chez de nombreux mammifères, l'odeur de la mère exerce sur les jeunes un effet attractif et calmant, ce qui les empêche de s'égarer loin d'elle ou loin de l'abri familial. Lorsqu'ils se déplacent en famille, beaucoup d'oiseaux et de mammifères gardent le contact grâce à des vocalisations baptisées « **appels de cohésion** ». Quelques espèces ont amélioré leur système de protection des jeunes par l'institution de protection collective (les crèches), où tous les petits d'une colonie sont rassemblés pour lutter contre le froid (ex : les manchots) ou contre les prédateurs (ex : les flamants roses). Mais les adultes n'ont de relation et de communication directe qu'avec leur propre progéniture. Chaque adulte reconnaît son ou ses petits à leur voix (et réciproquement), et les nourrit exclusivement dans la multitude de la crèche (Jouventin *et al.*, 1999 ; Jouventin & Aubin, 2002).





Crèche chez les Manchots empereurs et les Flamants roses

Les parents sont généralement capables de signaler un danger à leurs petits à l'aide de signaux d'alarme (cris d'alarme). Ces derniers y réagissent soit en se cachant (*i.e.* les mangoustes, les lapins, les renards, les marmottes), soit en rejoignant ou en poursuivant leur parent (i.e. les herbivores, les primates), selon l'espèce et son mode de vie. Par exemple la fuite queue dressée de la biche ayant perçu l'odeur d'un prédateur incite son faon à la poursuivre. Le signal d'alarme parental et la réaction des petits constituent une adaptation étho-écologique.

Les signaux de communication sont également utilisés par les parents qui nourrissent leurs jeunes. Chez les coléoptères nécrophores, le mâle et la femelle *Nicrophorus sayi* enfouissent le cadavre d'une proie dans un réduit souterrain (Chinery, 2012). Ils façonnent le cadavre en une grosse boule de viande, activant le processus de décomposition des protéines avec leurs sécrétions salivaires. En parallèle, la femelle dépose dans un couloir latéral des œufs dont l'éclosion aura lieu juste au moment où la nourriture sera complètement liquéfiée. Par ses stridulations, la femelle appelle alors les larves fraîchement écloses, prend du liquide dans sa bouche et les nourrit l'une après l'autre. Les nouveau-nés mammifères localisent le mamelon de leur mère grâce au signal chimique qui s'y trouve localement sécrété (Corona & Lévy, 2015). Ce signal stimule également leur comportement de tétée. La mère facilite cette activité en s'immobilisant dans une posture *ad hoc*.

II. Comportement maternel chez les araignées

II.1. Modes de vie

Une grande majorité des 35 000 espèces d'araignées connues présentent un mode de vie **solitaire**. Toutes les études qui ont décrit la biologie des araignées mettent en parallèle leur mode de vie solitaire et leur nature prédatrice (Buskirk, 1975; Riechert, 1984; Smith & Riechert, 1984; Jackson & Brassington, 1987; Clark & Jackson, 1994, 1995). Les femelles n'interagissent avec les mâles que lors de la reproduction, elles ne s'occupent pas directement des jeunes, mais peuvent les tolérer sur leur territoire pendant un court laps de temps. Les araignées solitaires sont presque toutes territoriales (sauf certaines vagabondes) et la zone défendue se limite à la toile pour les araignées qui tissent, ou à l'espace proche (quelques centimètres carrés) autour de la position de retraite qui peut être un terrier, un tube végétal ou soyeux, ou encore une anfractuosité rocheuse. Elles s'approvisionnent en nourriture par différentes techniques : soit elles chassent leur proie (araignées vagabondes), soit elles les capturent grâce à une toile (araignées fileuses).

Chez les araignées, on pourrait penser qu'un comportement social est rare au vu des mutiples comportements aggressifs et actes de cannibalisme qui se produisent entre individus d'une même espèce. Cependant, malgrè leur vie solitaire bien connue, des patterns sociaux résultant de relations intraspécifiques plus ou moins complexes ont émergé de multiples fois au cours de l'évolution. Ces patterns sociaux sont souvent associés à des comportements parentaux, en particulier maternels; en effet le comportement paternel n'est pas observé chez les araignées car les mâles meurent souvent rapidement après l'accouplement (Gillepsie, 1990 ; Foelix, 2011). Ainsi les comportements maternels sont caractérisés par différentes formes de soins et l'évolution de ces comportements est similaire à celui des stades de socialisation, notamment *via* la formation d'un nid commun et une complexité croissante dans les soins aux jeunes comme chez d'autres espèces ectothermiques (invertébrés, poissons, amphibiens et reptiles) et endothermiques (oiseaux et mammifères). Chez les araignées, nous pouvons observer 4 stades de socialité en relation avec la complexité du comportement social entre les individus (du plus simple au plus complexe) : grégaire, subsocial, parasocial et social (Fig. 2).

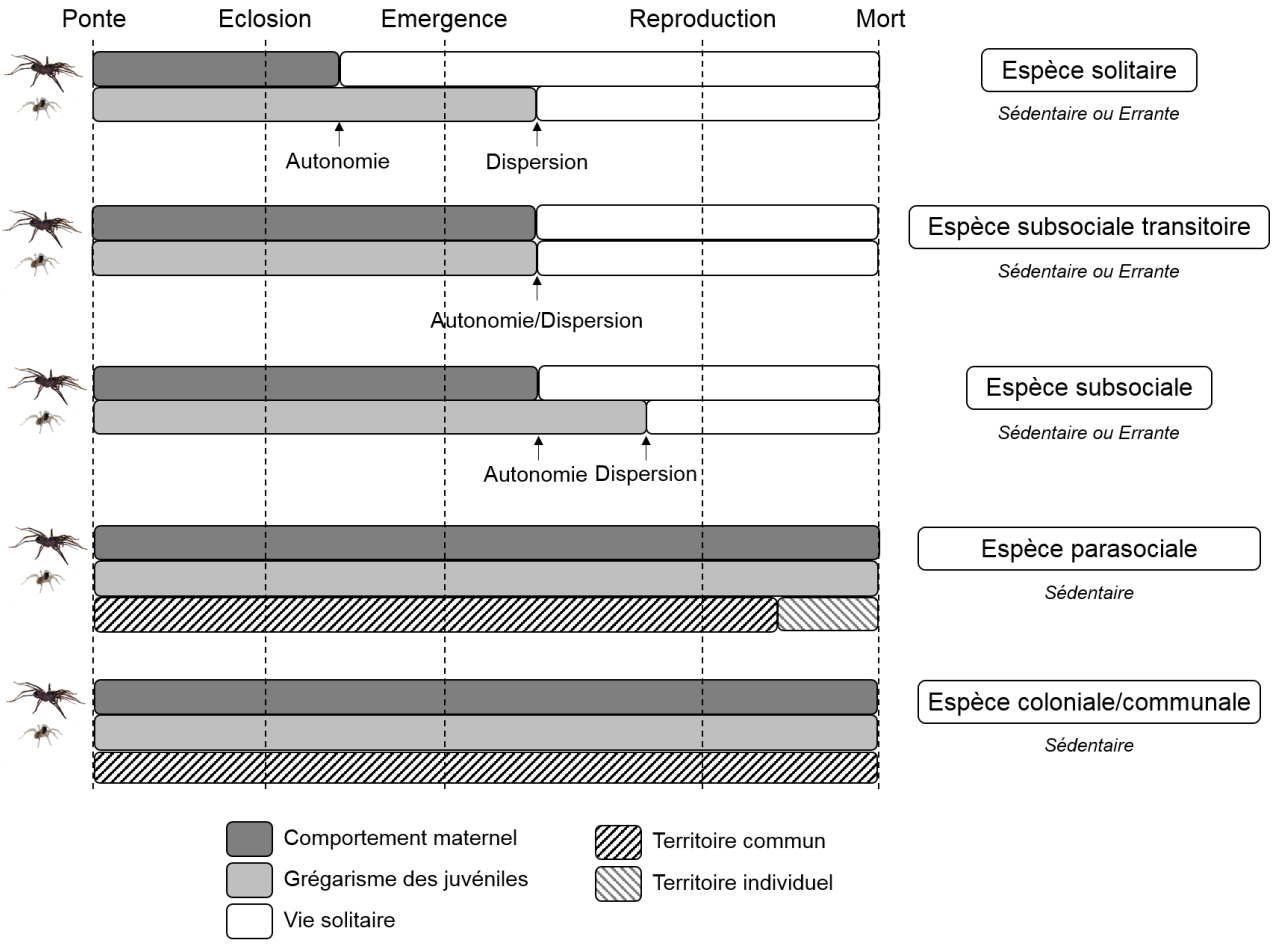


Figure 2 : Schéma représentant les différents types de socialité chez les araignées en fonction du comportement des mères, des jeunes et de leur territorialité.

La communication intraspécifique (facteurs chimiques en particulier) joue un rôle majeur dans la mise en place du **grégarisme social**. Elle permet l'attraction mutuelle entre individus de la même espèce. Cette interattraction profite à l'ensemble de la population, que ce soit au niveau de la dispersion des individus, de l'acquisition des ressources ou de la résistance à la prédation. Ces caractéristiques grégaires sont maintenues car elles diminuent le coût énergétique alloué à la reproduction ou à leur survie. Ce grégarisme est retrouvé chez de nombreuses espèces d'araignées et il est présent chez tous les jeunes de premier stade pendant une période plus ou moins longue selon les espèces (Krafft *et al.*, 1986 ; Toyama, 1999 ; Kim, 2000). Par exemple les jeunes de *Tegenaria atrica* (Agelenidae), après l'émergence, se regroupent à proximité des restes du cocon en une boule compacte pendant une semaine (Trabalon *et al.*, 1996). Puis cet agrégat devient moins compact et les jeunes se déplacent

progressivement sur la totalité de la toile maternelle. Au cours de la 3ème semaine, les jeunes sont capables de capturer de petites proies et des comportements agressifs commencent à apparaître entre eux. La dispersion des jeunes et le passage à la vie solitaire s'effectue vers la 4ème semaine post-émergence.

Les espèces subsociales ont été décrites d'après la formation durable de groupes mère-jeunes. Les espèces pour lesquelles les femelles gardent les jeunes seulement jusqu'à leur dispersion sont considérées comme des espèces **subsociales transitoires** (Bristowe, 1971 ; Foelix, 2011 ; Yip & Rayor, 2014). Les mères manifestent 4 types de soins : la construction du cocon, son gardiennnage, parfois l'ouverture du cocon permettant aux jeunes d'émerger et le gardiennage des jeunes jusqu'à leur dispersion. Les mères ne manifestent pas d'activité de nourrissage mais un comportement de tolérance sociale (absence de cannibalisme). Par exemple la femelle *Tegenaria atrica* reste au voisinage de son cocon pendant toute la période d'incubation des œufs (30 jours) et jusqu'à l'émergence des jeunes (Trabalon, 2011). Après l'émergence des jeunes, la mère reste avec eux sur sa toile jusqu'à leur dispersion (30 jours). Durant cette période, elle continue à manifester des comportements de capture de proies et de défense de la toile, mais n'apporte pas de soins particuliers aux jeunes, comme un transport actif de proie ou un nourrissage. Il arrive cependant que la femelle abandonne quelques proies à demi-consommées à partir desquelles les jeunes en pré-dispersion prennent leurs premiers repas. Malgré les bénéfices retirés par les jeunes de ces soins maternels, ces espèces subsociales transitoires sont souvent considérées comme des espèces solitaires.



Coelotes terrestris Entrée du nid Cocon

Chez les autres groupes subsociaux, les jeunes restent ensemble avec les parents au-delà de l'âge auquel ils commencent à se nourrir mais se dispersent avant leur propre reproduction (Yip & Rayor, 2014). Ce type de groupement a été qualifié d'organisation "sociale-maternelle" (Burgess & Uetz, 1982). Dans ce type d'interaction, des femelles ayant un mode de vie généralement solitaire modifient leur comportement lorsqu'elles sont en présence de

leur jeunes (Roland *et al.*, 1996). Par exemple chez *Coelotes terrestris*, tant que la mère est vivante, les jeunes peuvent rester groupés. Ils ne se dispersent qu'à la mort de celle-ci. Chez d'autres espèces, les jeunes restent sur la toile de la mère, même après sa mort, pendant un certain laps de temps (Kulmann, 1972). Ce phénomène est intéressant, car on passe au cours du temps de relations mère-jeunes à des relations jeunes-jeunes qui sont alors comparables à celles qui existent au sein d'une société permanente.

Les espèces parasociales (territoriales). Il s'agit en fait de simples regroupements temporaires d'individus en fonction d'un facteur biotique ou abiotique du milieu (ressources alimentaires, substrats rares, microclimat). Par exemple pour *Metepeira spinipes*, espèce normalement solitaire, l'abondance en proies potentielles permet une diminution des distances interindividuelles, ce qui entraîne la juxtaposition de toutes les toiles individuelles. Mais dans ce regroupement ou colonie, les individus conservent leur toile individuelle, leur tolérance mutuelle est précaire, et la capture des proies s'effectue individuellement en règle générale (Uetz, 1986).



Metepeira spinipes



Nephila sp.





Chez *Nephila clavipes* (Rypstra, 1986), la réduction des distances interindividuelles entraîne le chevauchement des toiles de capture. Ainsi, les fils de soutien de ces toiles sont interconnectés et peuvent même être communs aux différents individus. Face à l'absence apparente de structure sociale organisée chez ces espèces parasociales, on peut toutefois remarquer que le regroupement d'individus s'accompagne toujours d'une diminution du comportement agonistique. Ainsi, une araignée peut se déplacer sur la toile de capture de sa

voisine, ou tisser sa propre toile en s'appuyant sur celle de sa voisine, sans engendrer de comportement agonistique chez celle-ci.

Les espèces coloniales et communales. On connaît actuellement une vingtaine d'espèces (sur les 35 000 répertoriées) où des centaines d'individus vivent ensemble, sur le même domaine vital, de façon permanente. En général, ces espèces tissent des toiles non géométriques et ne sont pas territoriales, c'est-à-dire que chaque individu du groupe peut se déplacer librement et interagir régulièrement avec des congénères sur toute la surface de la toile. Le tissage de cette toile s'effectue en commun. Aucune hiérarchie ne semble exister dans de telles sociétés. Toutes les espèces sociales permanentes appartiennent au groupe des araignées fileuses, comme par exemple *Agelena consociata* (Agelenidae).



Agelena consociata (Gabon)





Cocons et toile d'une colonie d' *Agelena consociata*

II.2. Choix reproductifs et soins parentaux

Chez les araignées annuelles, les femelles pondent quelques semaines après la copulation. Chez les araignées pérennes, un long intervalle de temps peut séparer la ponte de la copulation. La ponte peut s'effectuer en une seule fois, mais le plus souvent elle est fragmentée. Des intervalles de temps très variables d'une espèce à l'autre séparent les pontes partielles. Par exemple *Brachypelma albopilosum* (Theraphosidae) ne pond normalement qu'une fois par an ; *Tegenaria atrica* (Agelenidae), jusqu'à huit fois en 4 mois. Le nombre

des pontes dépend de l'espèce mais aussi de l'abondance de la nourriture et accessoirement de la température.



Brachypelma albopilosum



Tegenaria atrica

Le comportement maternel des araignées peut être découpé en deux périodes distinctes en relation avec le développement des jeunes : la période de pré-émergence et la période post-émergence des jeunes. En effet, chez les araignées, **l'éclosion** apparaît alors que les jeunes sont encore incomplètement développés. Ils sont peu mobiles et ne peuvent capturer de proies. Pour parachever leur développement, ils doivent rester à l'intérieur du cocon durant une période variable selon les espèces et les conditions de développement. Pendant cette période, chez de nombreuses espèces, les jeunes se nourrissent à partir d'œufs non viables à l'intérieur du cocon (Juberthie, 1964 ; Kaston, 1970 ; Mansour *et al.*, 1980).

Les jeunes émergent du cocon après 1 ou 2 mues juvéniles. Ils restent quelque temps étroitement groupés (phase grégaire chez toutes les espèces). Durant cette période, les jeunes métabolisent leurs réserves vitellines et se dispersent après avoir réalisé leur 1ère ou 2ème mue post-émergence (Bristowe, 1939 ; Burch, 1979). La vie grégaire des jeunes araignées d'espèces solitaires peut se prolonger plusieurs mois comme chez certaines araignées terricoles (*Nemesia*) mais, en règle générale, elle ne dure que quelques jours (i.e. Lycoses) ou quelques semaines (i.e. Agélénides). En effet après une ou deux mues post-émergence, les jeunes, soumis à un brusque changement de tropisme, se dispersent dans toutes les directions et deviennent solitaires. Le groupe mère-jeunes (ou groupe sub-social) disparait.

II.2.1. Comportement maternel pendant la période de pré-émergence des jeunes

En règle générale, les œufs sont déposés dans un sac de soie (ou cocon). Exceptionnellement, les œufs peuvent être simplement agglutinés entre eux sans enveloppe protectrice (i.e. *Pholcus*). La construction du cocon permet une protection particulièrement importante dans le 1er stade de développement, période où les œufs sont plus susceptibles d'être parasités. Parfois, il peut y avoir formation de sac collectif de ponte. Ainsi les femelles *Araneus bandelieri* se réunissent pour tisser en commun une grande enveloppe de soie réunissant les différents cocons. Certaines espèces protègent leur cocon en le camouflant à l'aide de soie *stabilimenta* (Herberstein *et al.*, 2000), de morceaux de débris (Barrantes, 2007), de feuilles (Moya *et al.*, 2010) ou en le colorant (Barrantes *et al.*, 2013).

Dans de nombreuses espèces d'araignées la femelle limite les soins à la progéniture à la confection du cocon, livré ensuite à lui-même, mais après avoir placé les cocons dans un abri naturel (Turnbull, 1973). Cependant chez certaines espèces à toiles non géométriques et même quelques espèces vagabondes, après la construction du cocon, les mères restent à proximité ou même en contact étroit avec leur cocon. Ce comportement est désigné sous le terme de « **gardiennage du cocon**».



Ponte d'une araignée *Pholcus*





Exemples de gardiennage du (des) cocon(s)

Ce gardiennage du cocon est commun chez de nombreuses familles, notamment chez les *Lycosidae*, *Pisauridae*, *Oxyopidae*, *Ctenidae*, *Sparassidae*, *Salticidae*, *Theraphosidea*, *Araneidae* (Yip & Rayor, 2014). Ce comportement n'est pas exprimé chez certaines espèces

possédant des périodes sociales longues et coopératives ; il ne serait donc pas associé à de hauts niveaux de socialité (Christensen, 1984 ; Downes, 1992).

Certaines femelles attachent leur cocon à leurs chélicères (*Scytodidae, Pholcidae, Pisauridae*) ou à leur filières (*Lycosidae*), alors que d'autres les placent dans une retraite constituée de soie (*Salticidae, Sparassidae, Clubionidae, Thomisidae*).



Ces 2 types de gardiennage ont été respectivement définis par Smiseth *et al.* (2012) comme « egg-brooding » et « egg attendance ». La mise en place du comportement de gardiennage semble chronologiquement liée à la ponte dans la mesure où l'adoption du cocon n'est effectuée que par des femelles ayant pondu. Une telle relation a été mise en évidence chez de nombreuses familles d'araignées (Palmgren, 1944 ; Bonnet, 1946 ; Engelhardt, 1964 ; Hirschberg, 1969 ; Buckle, 1971 ; Vannini *et al.*, 1986).

Le gardiennage du cocon a pour fonction première de maintenir une température et une hygrométrie idéales au bon développement des jeunes (Nørgaard, 1951 ; Shear, 1970 ; Bristowe, 1971 ; Bradoo, 1973 ; Humphreys, 1974). Ainsi quelques espèces de genres *Lycosa* et *Stegodyphus* exposent leur cocon au soleil et le font tourner entre leurs pattes sous toutes ses faces. La présence de la mère à proximité du cocon permet une protection contre d'éventuels prédateurs et de nombreux auteurs ont pu mettre en évidence cet intérêt écologique (Pollard, 1984 ; Fink, 1986 ; Horel & Gundermann, 1992 ; Viera & Romero, 2008). Le gardiennage du cocon permet également de prévenir le cocon d'éventuels attaques de parasites (Lubin, 1974) et de fongiques (Horel & Gundermann, 1992 ; Li *et al.*, 1999, Li, 2002). Par exemple les observations, tant au laboratoire que sur le terrain, montrent que *Coelotes terrestris* (Amaurobiidae) reste au contact étroit avec son cocon tout au long de la phase d'incubation (Assi-Bessekon, 1997). Cependant la présence seule de la mère ne suffit pas et les mécanismes permettant cette protection restent encore imprécis.

Une autre fonction a été attribuée à la présence de la mère près de son cocon chez certaines espèces : l'élargissement et l'ouverture du cocon afin de permettre l'émergence des jeunes (Randall, 1977; Fujii, 1977; Vannini *et al.*, 1986). Différentes hypothèses ont été posées quant aux nombreux mécanismes internes (changements hormonaux de la mère) et/ou externes (informations provenant des jeunes en développement) permettant l'ouverture du cocon au moment adéquat (Viera *et al.*, 2007a). Par exemple, chez l'araignée *Pardosa hortensis* (Vannini *et al.*, 1986), l'ouverture du cocon par la mère semble dépendre d'un mécanisme endogène sans doute mis en route au moment de la ponte. Ce processus est modulé semble-t-il par des informations émanant des jeunes enfermés dans le cocon. Chez certaines araignées l'absence de la mère à ce moment charnière induit une mort de l'ensemble des jeunes piégés à l'intérieur du cocon (Krafft & Horel, 1980 ; Stiles & Coyle, 2001 ; Willey & Alder, 1989 ; Viera *et al.*, 2007b).

II.2.2. Comportement maternel pendant la période post-émergence des jeunes

Dans le cas de certaines espèces, l'activité de gardiennage du cocon est complétée par des soins complexes prodigués aux jeunes après leur émergence. La forme la plus commune de soins parentaux se résume en une courte période post-émergence durant laquelle les jeunes sont plus ou moins gardés par la mère. Par exemple chez les araignées errantes, les mères lycoses laissent leurs jeunes monter sur leur abdomen après l'émergence pour pouvoir les transporter lors de leurs déplacements (Higashi & Rovner, 1975). Les jeunes restent fixés à la mère et sont ainsi transportés par elle (*phorésie familiale*) jusqu'à la mue post-émergence.



Phorésie familiale chez une lycose

Chez *Pisaura mirabilis*, au moment de l'émergence, la mère entoure le cocon d'une enveloppe de soie beaucoup plus lâche (toile pouponnière) pour maintenir les jeunes après émergence sous sa surveillance et jusqu'à la période de dispersion (Bristowe, 1971).





Mère araignée *Pisaura mirabilis*

Les jeunes de *Holocnemus pluchei* vivent un certain temps dans les structures soyeuses de la mère, sans qu'ils soient pour autant soignés par celle-ci, ce qui entraîne une économie d'énergie en termes de production de soie pour les jeunes (Jakob, 1991). Les mères ne manifestent pas de comportement de soins à la progéniture (i.e. nourrissage, toilettage). La fonction de la mère pendant cette période reste encore floue même si la défense maternelle contre les prédateurs reste l'hypothèse privilégiée.

II.3. Dépense et investissement maternels

L'état physiologique des individus étant composé d'une multitude de constituants (lipides, protéines, carbohydrates, hormones …) ayant chacun des fonctions métaboliques précises, nous pouvons penser que certains jouent un rôle dans différentes étapes de l'investissement maternel. Cependant la quantification des coûts directement associés à l'expression de comportements parentaux chez les araignées reste difficile à évaluer et donc très peu étudiée.

Il est clair que la ponte et la construction d'un cocon en soie sont très coûteuses pour une femelle. Les femelles déposent du vitellus en 2 étapes dans les œufs : lors de leur formation et juste après la copulation. Ce deuxième dépôt est directement lié aux ressources alimentaires disponibles, il ne sera donc plus disponible pour une deuxième ponte (Foelix, 2011). Si un cocon est enlevé à la mère, celle-ci produit rapidement un cocon additionnel pour

pallier ce manque (Fink, 1986; Gundermann *et al.,* 1997; Marques *et al.,* 1998; Kim *et al.,* 2000; Toyama, 2003). Mais ce deuxième cocon contient moins d'œufs et le succès reproducteur est moindre. Il existe donc un trade-off physiologique entre produire des descendants et en prendre soin (Winkler, 1987 ; Cerda & Wolf, 1993 ; Royle *et al.,* 2012).

De plus, l'état physiologique des femelles peut être directement affecté par leur investissement parental, par exemple lors du comportement de tolérance sociale (inhibition du comportement agressif) face aux jeunes ou lors du processus de nourrissage des jeunes par régurgitation alimentaire (Salomon *et al.,* 2005 ; Trabalon, 2011). La mère *Coelotes terrestris* pendant toute la période grégaire de ses jeunes maintient son activité prédatrice. Cette activité est sous l'influence des stimulations provenant des jeunes car elle s'accroît régulièrement au cours de leur développement (Krafft *et al.,* 1986 ; Gundermann *et al.,* 1988). Par conséquent, l'augmentation de l'activité prédatrice devrait entraîner une augmentation des dépenses énergétiques de la mère. Cette hypothèse n'a jamais été étudiée.

Chez d'autres espèces, les femelles présentent des dépenses énergétiques adaptées à des métabolismes faibles comparables à des périodes de « diapause ». Par exemple la femelle *Bracypelma albopilosum* (Theraphosidae), après la ponte et la construction de son cocon, s'arrête progressivement de s'alimenter et s'enferme dans un terrier fermé par des couches épaisses de soie pendant environ 3 mois (Trabalon, observations personnelles). Pendant toute la période de gardiennage du cocon puis de garde des jeunes, la mère immobile ne manifeste que des comportements de toilettage et d'hydratation du cocon, puis un comportement d'ouverture du cocon permettant aux jeunes d'émerger. La mère ne sort du terrier pour s'alimenter à nouveau qu'après la dispersion de ses jeunes, vers l'âge de 15 jours. L'adaptation comportementale de la mère lui permet de diminuer ses dépenses énergétiques et de préserver son stock d'énergie pour lui permettre de survivre pendant plusieurs mois de jeûne. Aucune étude n'a été réalisée pour analyser l'impact de ce jeûne sur l'état énergétique de ces mères araignées qui vivent sur leurs réserves énergétiques pendant la période de soins maternels.

II.4. Soins maternels et reconnaissance des jeunes

II.4.1. Modes de communication chez les araignées

Ces dernières années, les concepts développés au niveau de la communication chez les Insectes ont favorisé les travaux sur les araignées, montrant chez ces dernières la diversité, la plasticité et la complexité de leurs moyens de communication. Les araignées utilisent de manière générale des signaux vibratoires (sonores ou tactiles), tacto–chimiques et visuels (Krafft, 1982; Witt & Rovner, 1982 ; Trabalon, 2000). Elles exploitent également les fils de soie qu'elles sécrètent en tant que moyen de communication, soit en y associant des phéromones, soit comme vecteurs de signaux vibratoires. Les signaux vibratoires et chimiques sont généralement privilégiés aux signaux visuels car beaucoup d'espèces sont actives la nuit.

II.4.1.1. La communication visuelle

Les araignées tisseuses de toiles n'utilisent que rarement leur sens de la vision et sont capables de capturer leurs proies dans le noir absolu. Cependant, certaines araignées utilisent la vision; par exemple, *Araneus sexpunctatus* peut détecter de subtils changements d'intensité lumineuse (Homann, 1947), ce qui lui permet de sortir de sa retraite lorsque l'intensité lumineuse décroît à la tombée de la nuit. Certaines araignées sédentaires comme par exemple les agélenides, les lycosides et les theraphosides (Fig. 3) ont des systèmes visuels capables de percevoir des différences de luminosité, d'ultraviolets ou de lumière polarisée (Magni, 1966 ; Land & Nilsson, 2002 ; Neuhofer *et al.*, 2009 ; Herberstein, 2011).

Seules certaines espèces d'araignées comme les salticides et les lycosides (Jackson, 1977) utilisent la communication visuelle dans les relations intraspécifiques. Ces espèces ont un mode de vie solitaire ou sub-social et la vue est utilisée pour chasser, défendre le territoire et rechercher un partenaire sexuel (Foelix, 2011). Leurs yeux latéraux dont le très grand angle visuel leur permet de percevoir des mouvements fins de l'environnement.

La communication visuelle (i.e. Forster, 1982), qui participe au développement des comportements reproducteur et agonistique chez les araignées, peut se résumer en trois étapes successives. La première, assez brève en général, consiste en des évènements gestuels dits "primaires" lors de la rencontre entre deux individus ; ces premiers mouvements auraient une fonction de reconnaissance spécifique. La deuxième est constituée d'évènements gestuels qui favorisent ou empêchent l'approche. La troisième étape consiste en des événements gestuels clôturant un conflit entre deux individus.

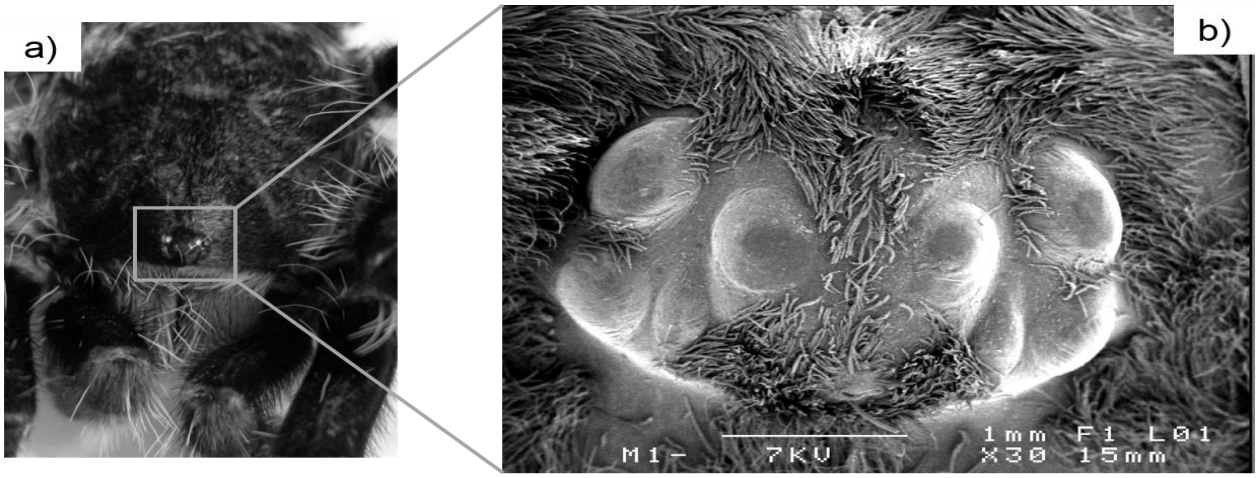


Figure 3 : Morphologie des yeux d'une mygale Brachypelma albopilosum (Theraphosidae) : a) vue dorsale du prosoma et des yeux ; b) microscopie éléctronique à balayage des yeux

II.4.1.2. La communication vibratoire

Les insectes mis à part, les araignées possèdent l'un des plus vastes systèmes de communication accoustico-vibratoire. Les phénomènes vibratoires peuvent être transmis en milieu liquide, gazeux ou solide et les araignées utilisent ces différents canaux de transmission de façon plus ou moins importante. Les ondes vibratoires émises par les individus peuvent avoir une composante acoustique, qui n'est pas nécessaire à la perception de l'araignée. Actuellement, nous connaissons 2 méthodes de production sonore (i.e. Uetz & Stratton, 1982; Barth, 1982; Krafft, 1982) :

- Par des **organes stridulants**. Ces organes, de formes très variées, se situent en divers endroits du corps, là où il peut y avoir frottement de 2 pièces chitineuses. Une araignée peut émettre des sons en frottant soit son abdomen contre son céphalothorax, soit un appendice

contre un autre (patte contre patte, pédipalpe contre patte, chélicère contre pédipalpe ou chélicère contre chélicère), soit un appendice contre son abdomen, soit entre eux des segments opposés d'un même appendice. Ces organes peuvent être présents chez les femelles mais ils ont été prioritairement décrits chez les mâles de nombreuses espèces.

- Par **percussion** d'un substrat en tapotant de son pédipalpe ou de son abdomen sur le substrat sur lequel elle se situe. Selon la résonance du substrat, en particulier lorsqu'il s'agit de feuilles sèches, des tambourinages avec les pédipalpes, des coups d'abdomen peuvent être audibles. Ce type d'émission sonore est signalé surtout pour les mâles *Pisauridae, Salticidae* et *Lycosidae*. Les araignées fileuses sont capables de différencier divers ébranlements affectant leur construction soyeuse. Les vibrations engendrées par une proie suscitent le comportement prédateur alors que celles dues à l'arrivée d'un congénère sont à l'origine de comportements différents : soit agonistiques soit tolérance sexuelle ou sociale (Leborgne, 1986; Schmitt *et al.,* 1993 ; Pourié & Trabalon, 1999).

II.4.1.3. La communication chimique

De nombreux travaux éthologiques montrent que les araignées utilisent la communication à distance et au contact *via* des signaux chimiques déposées sur la soie et/ou sur la cuticule (Tietjen & Rovner, 1982).

La soie est recouverte de composés lipidiques (hydrocarbures, alcools, esters, cétones, acides carboxyliques, triglycérides) qui la protègent des agressions extérieures comme l'humidité qui modifie les propriétés physiques de la soie ; ils peuvent aussi être à l'origine des propriétés antifongiques et antibactériennes (Schulz, 1997). Des études montrent que ces composés interviennent dans la communication intraspécifique et ils ont été étudiés en particulier dans le cadre du comportement sexuel (Watson, 1986 ; Schulz & Tolf, 1993a, b ; Schulz, 1997 ; Prouvost *et al.*, 1999b). Ainsi il a été montré que certains de ces composés lipidiques entraînent une augmentation du comportement exploratoire, l'apparition d'un comportement d'orientation mais aussi de cour chez les mâles adultes (Hegdekar & Dondale, 1969 ; Dijkstra, 1976, Blanke, 1975a, b ; Dondale & Hegdekar, 1973). Ces composés (phéromones sexuelles) permettraient aux mâles de trouver rapidement une femelle conspécifique et d'identifier son état de réceptivité sexuelle. Seule, à notre connaissance, une étude a été réalisée sur l'identification des composés chimiques présents sur la toile des

femelles en période de gardiennage du cocon ou de ses jeunes (Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). L'étude montre que les composés lipidiques déposés par la mère *Coelotes terrestris* sur sa toile varient qualitativement et quantitativement au cours du temps. Les jeunes grégaires utilisent ces signaux de la mère soit pour rester groupés soit pour se disperser et sélectionner un nouveau site pour construire leur propre toile (Trabalon & Assi-Bessekon, 2008).

D'autres observations montrent l'existence de phéromones de contact associées à la cuticule des araignées (Kaston, 1936 ; Suter *et al.*, 1987, 1989 ; Dondale & Hegdekar, 1973 ; Trabalon *et al.;* 1997 ; Prouvost *et al.*, 1999b). En effet, la cuticule est recouverte d'une sécretion lipidique formant une cire constamment renouvelée (Lockey, 1988). Ces cires cuticulaires contiennent des mixtures complexes de composés polaires (esters, glycérides, acides gras, stérols, alcools et aldéhydes) et apolaires, majoritairement des hydrocarbures (alcènes et alcanes méthylés ou non). La diversité des molécules produites et leurs variations autant qualitatives que quantitatives dans les mélanges composant ces cires, permettent aux araignées de les utiliser dans le cadre de la communication comme chez les autres arthropodes. La production des composés chimiques cuticulaires varie pendant toute la vie de l'araignée. Ces composés permettent de favoriser la reconnaissance de l'état de réceptivité sexuelle (Trabalon *et al.*, 1988 ; Prouvost *et al.*, 1999b), l'état physiologique (i .e. vierge, accouplée, maternante), l'âge (i.e. jeune grégaire ou solitaire) des congénères (Trabalon *et al.*, 1996 ; 1998), l'espèce et la colonie d'origine (Bagnères *et al.*, 1997 ; Pasquet *et al.*, 1997 ; Trabalon *et al.*, 1997).

II.4.1.4. Mécanorécepteurs et chémorécepteurs

Les récepteurs cuticulaires des araignées, comme chez les autres invertébrés, sont des neurones sensoriels primaires, responsables à la fois de la réception de l'information et de son transfert. Ils ne sont pas organisés en tissus comme certains organes de vertébrés, mais forment une juxtaposition d'unités indépendantes, les **sensilles**. Les sensilles sont des unités morphologiques et morphogénétiques indépendantes, mais les cellules nerveuses d'une même unité n'ont pas forcément des fonctions identiques. Généralement une sensille se compose d'un petit nombre de cellules nerveuses (environ 20) entourées de 3 cellules accessoires

(Barth, 1982; Foelix, 2011). Ces cellules nerveuses (neurones bipolaires) peuvent appartenir à plusieurs modalités : chémorécepteur et mécanorécepteur. Ces récepteurs ne sont pas organisés en organes complexes. Quelques-uns sont répartis de manière régulière, ce qui peut avoir une signification fonctionnelle comme chez les soies mécanoréceptrices qui fournissent une représentation somatotopique des stimuli. La densité des mécanorécepteurs sur les pédipalpes des femelles *Tegenaria atrica* (Agelenidae) est significativement supérieure à celle observée chez les mâles (Prouvost *et al.,* 1999a). D'autres sont concentrés sur certaines zones du corps, cette concentration variant en fonction du sexe de l'individu. Par exemple, chez *T. atrica* les chémorécepteurs sont arrangés en ligne longitudinales et situés en particulier sur la face ventrale du tarse de la 1ère paire de pattes et sur la face dorsale du pédipalpe (Vallet *et al.,* 1994, 1998 ; Prouvost *et al.,* 1999a). La densité des chémorécepteurs est significativement supérieure chez la femelle au niveau du pédipalpe (Prouvost *et al.,* 1999a). Les femelles araignées sont donc mieux équipées que les mâles dans l'analyse des signaux vibratoires et chimiques de par la densité plus importante des chémorécepteurs au niveau des pédipalpes.

Les araignées n'ont pas d'organe purement auditif comme les insectes. Deux types de mécanorécepteurs ont incontestablement un rôle dans la perception des phénomènes vibratoires : les trichobothries et les fentes sensorielles. Les araignées perçoivent les sons aériens avec leurs trichobothries et les vibrations diffuses par les fentes sensorielles disséminées sur tout le corps. Les trichobothries sont majoritairement présentes sur les pattes, ces longues soies permettent de percevoir les vibrations de l'air (Foelix, 2011). Elles sont constituées d'un poil très fin inséré par une articulation souple dans une cupule, perpendiculairement à l'axe des pattes, sur leur surface supérieure (Fig..4a). les vibrations de l'air perçues par les trichobothries jouent un rôle dans la détection et la localisation des proies (Trabalon, 2000 ; Barth, 1982).

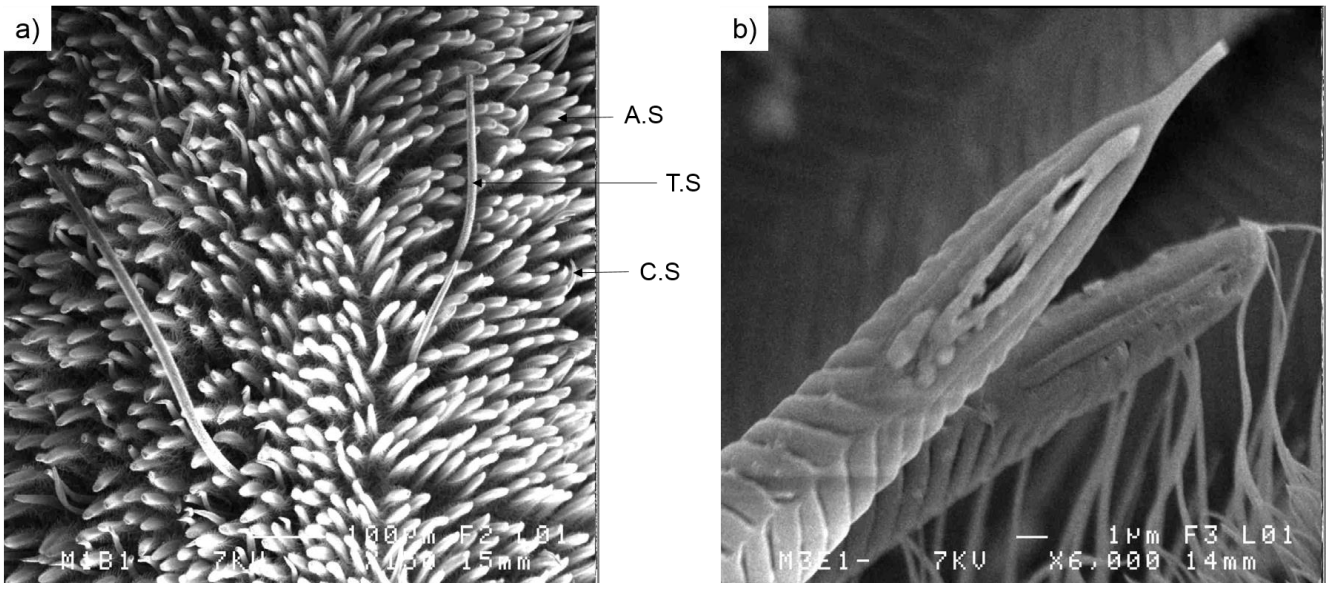


Figure 4 : Microscopie éléctronique à balayage du tarse de la première paire de pattes d'un mâle Brachypelma albopilosum (Theraphosidae). a) vue ventrale du tarse : A.S., soie adhésive, T.S., sensille mécanoréceptrice (trichobotrie), C.S., sensille chémoréceptrice ; b) extrémité d'une sensille olfactive.

Les fentes sensorielles se présentent sous la forme de fente correspondant à un amincissement de la cuticule. Selon qu'elles sont isolées ou groupées, elles sont appelées organes en fente simple ou organes lyriformes. Certaines fentes peuvent avoir un rôle proprioceptif et d'autres sont sensibles aux phénomènes vibratoires transmis par les milieux solides ou gazeux (Barth, 1982 ; Trabalon, 2000).

Les sensilles chémoréceptrices sont localisées en particulier sur les pièces buccales, les pattes (prétarses en particulier) et les pédipalpes (Foelix, 1970 ; Dumpert, 1978, Kronenstedt, 1979). On distingue deux types de chémorécepteurs : les olfactifs et les gustatifs. Les olfactifs sont des récepteurs de contact situés dans la partie distale des appendices. Ces sensilles sont courbes (en forme de S) et présentent une perforation cuticulaire ou « wall pores » (Fig. 4b). Les sensilles gustatives ont un pore terminal et sont sensibles aux sels et aux acides aminés. Ces sensilles sont fonctionnelles dès la sortie du cocon chez *Tegenaria atrica* (Agelenidae) et leur nombre augmente au cours des mues successives jusqu'au stade adulte (Vallet *et al*., 1998).

II.4.2. Identification du cocon et des jeunes

Quelques études se sont intéréssées aux capacités des femelles araignées à reconnaître leur propre cocon et leurs propres jeunes face à des conspécifiques. Par exemple, les femelles sédentaires *Anelosimus crassipes* et *Portia labiata* sont capables de reconnaître leur propre toile, cocon et jeunes (Ito & Shinkai, 1993 ; Clark & Jackson, 1994). D'après Krafft (1982) quatre mécanismes interviendraient dans la reconnaissance du cocon :

1 - des indices tactiles basés sur les charactéristiques physiques du cocon ;

2 - des indices chimiques associés à la soie recouvrant le cocon ;

3 - des indices chimiques associés à la toile sur laquelle repose le cocon ;

4 - la location géographique du cocon.

Le cocon serait donc reconnu en priorité grâce aux signaux chimiques présents sur la toile et à la surface du cocon. Cette hypothèse est renforcée par des expériences réalisées par Buckle (1971). Il a lavé avec de l'alcool des cocons de l'araignée *Clubiona kulezinskii* gardés par leurs mères et suite à ce lavage il a constaté que les mères ne s'occupaient plus de leur cocon. Cette reconnaissance du cocon pourrait provenir préférentiellement de la présence d'alcanes sur la soie et la cuticule des individus. Ces composés sont peu influencés par les conditions d'élevage et sont génétiquement déterminés (Grinsted *et al.,* 2011).

Cependant quelques travaux laissent penser que la reconnaissance mutuelle entre une mère araignée et ses jeunes n'existe pas (Engelhardt, 1964). Ainsi, les mères sédentaires *Loxcosceles gaucho* sont incapables de reconnaître leur propre progéniture (Japyassù *et al.,* 2003).Les araignées errantes comme les lycoses ne montrent également aucun lien entre la mère et le cocon ou les jeunes transportés. En milieu naturel, il est possible d'observer des femelles transportant, accrochés à leurs filières des coquilles d'escargots, des petites graines ou cailloux, parfois des crottes de lapins (Locket & Marsh, 1957 ; Bristowe, 1971 ; Fujii, 1980). Par ailleurs, les jeunes délogés du dos maternel y remontent dès qu'ils le peuvent, mais ils grimpent aussi sur l'abdomen d'une autre femelle de la même espèce (Engelhardt, 1964 ; Higashi & Rovner, 1975).

En ce qui concerne les jeunes, des études sur *Tegenaria atrica* ont montré que les femelles adultes, quel que soit leur état physiologique, montrent une tolérance maternelle vis-à-vis de jeunes grégaires (conspécifiques et sympatriques), ainsi le groupe mère-jeunes chez

ces araignées ne constitue pas un groupe familial fermé (Pourié & Trabalon, 1999). Ces mêmes résultats ont été observés chez *Coelotes terrestris* : les mères adoptent et nourrissent des jeunes grégaires étrangers (Assi-Bessekon, 1992). Ces comportements maternels ne sont observés qu'avec des femelles en période de soins post-émergence ou post-dispersion, et ne sont pas observés avec des jeunes en post-dispersion. Les femelles sont capables de reconnaître *via* des signaux chimiques cuticulaires et vibratoires, le stade de développement des jeunes homospécifiques (Pourié & Trabalon, 1999). Par contre les jeunes grégaires *Amaurobius ferox* sont tués et mangés par la mère *Coelotes terrestris*, ce qui implique que les signaux portées par les deux types de jeunes sont différents et bien distingués par les mères (Assi-Bessekon, 1992).

II.4.3. Protection et nourrissage des jeunes

Chez plusieurs espèces, les soins parentaux incluent l'approvisionnement des jeunes qui peut alors revêtir des formes multiples. Ainsi certaines espèces assurent l'alimentation de leur progéniture en capturant les proies qui sont rapportées au nid (Kaston, 1965 ; Shear, 1970 ; Brach, 1976 ; Lubin, 1982).

Les femelles *Coelotes terrestris* approvisionnent leurs jeunes en leur apportant, dans la galerie de soie, des proies capturées au niveau de la collerette de la toile (Krafft *et al.*, 1986). L'étude du comportement maternel d'approvisionnement en proies chez cette espèce montre qu'il est totalement piloté par les jeunes mais il met également en évidence la grande flexibilité comportementale de la mère. Il est en effet possible, en séparant momentanément la mère de sa portée puis en la réunissant à nouveau avec elle, de faire passer, sans transition, son comportement maternel au niveau non maternel, et *vice versa*. La rapidité du phénomène le différencie nettement des activités parentales étudiées chez les vertébrés (Rosenblatt & Snowdon, 1996 ; Lehrman, 1965 ; Poindron & Lévy, 1990) ainsi que chez certains invertébrés (Vancassel *et al*., 1987 ; 1984). En effet, chez ces modèles les comportements de soins sont basés sur la coexistence de 2 systèmes indépendants mais distincts, l'un endogène, lié à l'état hormonal de la mère, l'autre exogène, lié à des informations émanant de la progéniture.

L'apport en proies peut être complété ou remplacé par une alimentation par régurgitation (Kullmann & Zimmermann, 1975 ; Stefani *et al.,* 2011) ou par une ponte d'œufs

trophiques (Seibt & Wickler, 1987 ; Gundermann *et al.*, 1991 ; Kim & Roland, 2000). Chez les araignées, l'existence d'un phénomène de régurgitation nourricier de la mère aux jeunes a été prouvée à l'aide de radio-isotopes dans deux familles, les théridionides et les eresides (Kullmann *et al.*, 1975). Par exemple lorsqu'une femelle *Theridium saxatile* attrape une proie, elle avertit ses jeunes en remuant les fils de sa toile pour qu'ils se cachent. Lorsqu'elle a maîtrisé sa proie, elle les appelle à l'aide de vibrations émises par la soie et lorsque les jeunes lui demandent de la nourriture *via* des contacts avec les pédipalpes, elle régurgite la nourriture qu'elle a mâchée. Chez les araignées qui vivent dans des nids communautaires, comme *Stegodyphus sarasinorum* (Eresides), les jeunes à l'éclosion ne mangent pas mais s'agglutinent autour de leur mère qui les nourrit par trophallaxie (Nawabi, 1974). Les femelles tolèrent et nourrissent les jeunes qui ne leur appartiennent pas mais font partie de la colonie. Le matériel régurgité consiste en un mélange de nourriture prédigérée et de cellules intestinales maternelles qui subissent une lyse partielle. Chez *Coelotes terrestris*, environ 20 jours après la ponte du 1er cocon et 6 jours avant son émergence, la femelle élabore un second cocon à proximité immédiate du premier. Ce 2ème cocon (cocon trophique) est systématiquement dévoré par les jeunes issus du 1er cocon dans les jours qui suivent leur émergence (Gundermann *et al.*, 1991).

Enfin la mère elle-même peut servir de source de nourriture aux jeunes (Bristowe, 1971 ; Kullmann, 1975). La consommation de la mère par ses jeunes a été observée chez une dizaine d'espèces appartenant à plusieurs genres (Bristowe, 1971 ; Cloudsey-Thompson, 1968 ; Kullmann, 1972). Certaines espèces liquéfient certains de leurs organes par digestion interne et constituent de la sorte des réserves de nourriture (Nawabi, 1974). La consommation peut également résulter d'une action directe des jeunes sur la mère comme cela semble être le cas chez *Amaurobius fenestralis* et *A. ferox* chez lesquelles la mère est dévorée immédiatement après la 1ère mue post-émergence (Tahiri *et al.*, 1989 ; Kim & Horel, 1998 ; Schneider, 2002).

III. Problématique

Une étape cruciale dans l'étude du comportement maternel est d'identifier, de décrire et d'évaluer l'importance des différents facteurs qui sont à l'origine du développement et participent au fonctionnement de ce comportement. On peut distinguer plusieurs types de facteurs :

Les facteurs innés : les recherches en neurosciences depuis 2000 ont permis d'identifier de nombreux éléments innés, tant instinctifs que physiologiques ou autonomes, qui peuvent participer directement ou indirectement à la réalisation appropriée du comportement parental. Ces éléments sont des hormones et des neuromédiateurs qui contrôlent le comportement parental (Lormée *et al.,* 1999 ; Dobrakova *et al.,* 2010), des phéromones et des circuits olfactifs qui permettent la reconnaissance du milieu familier/non-familier, des réflexes qui permettent l'exécution motrice et optimisent le comportement; et enfin les récompenses/renforcements qui permettent le développement de la motivation et optimisent la réalisation du comportement parental.

Les facteurs acquis, qui sont appris au cours du développement de l'organisme et des interactions avec l'environnement. Ils permettent la reconnaissance des congénères, la motivation (en particulier le contact physique) et la socialisation parentale c'est-à-dire être capable d'émettre, d'échanger et de comprendre des informations sociales qui permettent la protection des jeunes (Hepper, 1991). Ces éléments qui nécessitent un apprentissage sont les éléments les plus difficiles à coder génétiquement. Ils nécessitent également l'existence innée de représentations mentales de l'individu et de ses jeunes qui ne peuvent être codées que dans des zones complexes du système nerveux. En fonction des connaissances neurobiologiques actuelles, le codage inné de telles capacités cognitives est difficilement explicable chez les vertébrés, et encore plus chez les invertébrés.

Nos connaissances sur les facteurs impliqués dans l'apparition et le maintien du comportement maternel chez les araignées sont faibles, tout comme les coûts liés à la dépense maternelle pendant cette période de reproduction. De plus, les modalités sensorielles intervenant dans le comportement maternel semblent être riches et complexes mais sont très peu étudiées dans le cadre du gardiennage du cocon. Par ailleurs les études des signaux de communication échangés entre une mère et ses jeunes grégaires ont été réalisées sur des

espèces sédentaires et tisseuses de toile. Aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent dans le cadre du comportement maternel pendant la période de gardiennage du cocon. C'est pour ces différentes raisons que, dans le cadre de cette thèse, nous avons axé notre travail sur l'étude éthologique du comportement de gardiennage du cocon et nous avons abordé l'étude des signaux émis par le cocon susceptibles d'être impliqués dans l'apparition et le maintien du comportementent maternel chez des femelles errantes. Nos hypthèses de travail sont résumées dans la figure 5.

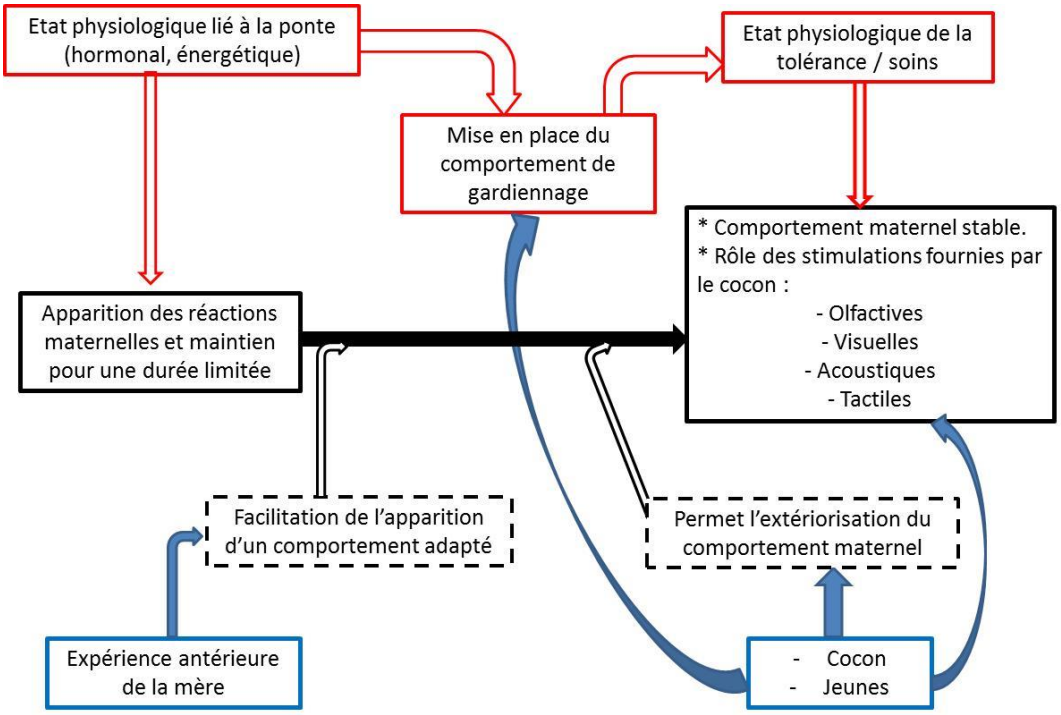


Figure 5 : Hypothèses de travail sur l'établissement du comportement maternel chez une araignée. En noir : succession des phases ; en bleu : facteur nerveux et comportementaux ; en rouge : facteurs physiologiques.

Ce travail de thèse comprend 2 parties basées sur 5 publications scientifiques issues de notre travail de recherche :

Dans le **chapitre 1**, nous étudions le comportement maternel, l'activité de prédation et de locomotion des femelles araignées depuis la ponte et la construction du cocon jusqu'à la dispersion des jeunes. Nous effectuons une étude de l'état énergétique (lipides, protéines et carbohydrates) des mères pendant la période de transport du cocon et des jeunes.

Puis nous testons l'effet de la perte du cocon sur le comportement des mères qui viennent de construire leur 1er cocon et des mères qui ont une expérience, depuis 15 jours, dans le comportement de « soin à son cocon ».

Ce travail a donné lieu à deux publications :

Article 1 : **Ruhland, F**., Pétillon, J. & Trabalon, M. (2016). Physiological costs during the first maternal care in the wolf spider *Pardosa saltans* (Araneae, Lycosidae). ***Journal of Insect Physiology***. (sous presse).

Article 2 : **Ruhland, F.,** Chiara, V. & Trabalon M. (2016) Age and egg-sac loss determine maternal behaviour and locomotor activity in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). ***Behavioural Processes.*** (sous presse).

Dans le **chapitre 2**, nous abordons l'étude des composés lipidiques présents à la surface du cocon et sur la cuticule des mères et nous analysons leurs variations au cours du temps.

Nous effectuons également des tests comportementaux pour analyser l'effet de la perte de signaux vibratoires et/ou chimiques sur le comportement d'adoption et de gardiennage d'un cocon par les mères.

Ce travail a donné lieu à 2 publications (en cours de soumission) et à des résultats préliminaires qui permettront ultérieurement de rédiger une nouvelle publication :

Article 3 : **Ruhland, F.,** Schulz, S. & Trabalon M. Do wandering wolf spiders' egg-sacs emit signals perceived by mothers? Behavioural and chemical approach (en preparation).

Article 4 : **Ruhland, F.,** Schulz, S. & Trabalon M. Variations of cocoon external lipids during wolf spiderlings' development (en preparation).

Article 5 (Résultats préliminaires) : **Ruhland, F.,** Schulz, S. & Trabalon M. Les composés lipidiques présents à la surface du cocon sont-ils présents sur la cuticule de la mère ?

Le modèle biologique choisi pour notre étude est une araignée européenne errante, *Pardosa saltans* (*Araneae*, *Lycosidae*). Le cycle de reproduction de cette espèce n'a jamais été décrit dans la littérature. Il est pourtant nécessaire de connaître son cycle, et en particulier le cycle de développement des zygotes, afin d'identifier au mieux les informations pouvant être transmises par les jeunes pour stimuler les soins maternels. Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons effectué dans un premier temps une étude du cycle biologique caractéristique de *P. saltans* au laboratoire.

Modèle et cycle biologique

I. Présentation de l'espèce

L'araignée *Pardosa saltans* est une *Araneae* faisant partie de la famille des Lycosides. Le genre des *Pardosa* est représenté au Nord de l'Europe par 39 espèces. Ce sont des espèces cryptiques majoritairement errantes. Cette espèce a longtemps été cachée sous la forme de *Pardosa lugubris* et n'a été décrite qu'en 2000 par Töpfer-Hofmann.

Elle est répandue en Europe occidentale et son habitat naturel peut être côtier dans le sud de la Norvège, dans une végétation basse sur les marges de terrains agricoles et dans des forêts mixtes (Aakra *et al.*, 2016) ou sur la litière de feuilles en milieu forestier en Europe continentale (Nentwig *et al.*, 2016) (Fig. 6). C'est une espèce thermophile qui est toutefois retrouvée dans des milieux ombragés afin déviter les températures excessives. Elle est de taille moyenne (6 mm pour la femelle et 5 mm pour le mâle) et a un cycle de vie annuel.

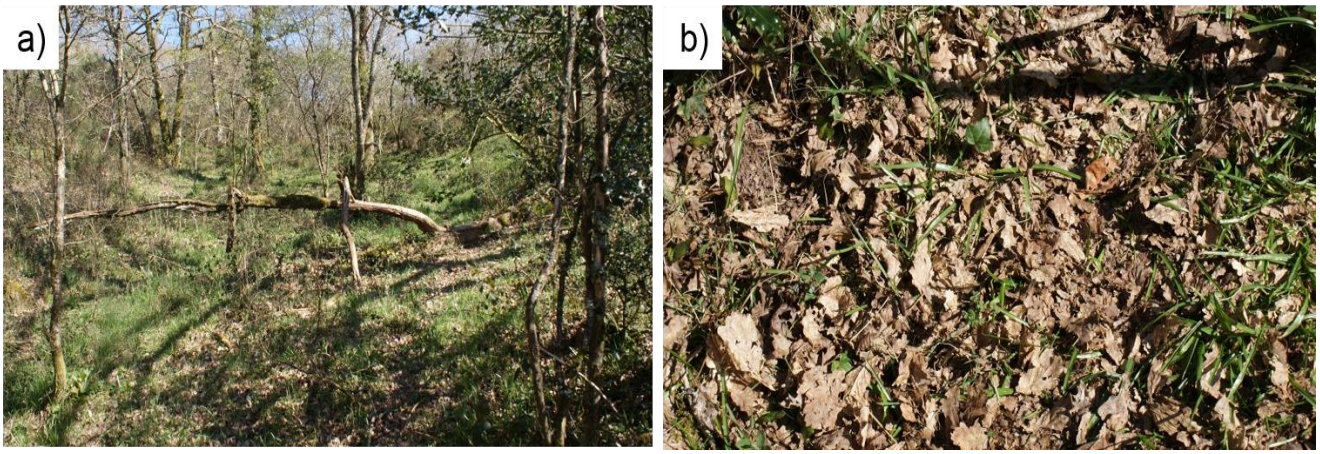


Figure 6 : Habitat naturel forestier de l'araignée Pardosa saltans en europe continentale (forêt de Paimpont, Ille et Vilaine, France). a) forêt plus ou moins ombragée ; b) litière (photos : Cécile Gazel.

Le développement des araignées dépend d'un certain nombre de facteurs abiotiques, comme la température et l'humidité, et biotiques, comme la nutrition (Vollrath, 1987 ; Li & Jackson, 1996). Sous nos latitudes, la période de reproduction commence au printemps et dure jusqu'à la fin de l'été. En Bretagne, les adultes sortent vers Avril-Mai et meurent vers Septembre-Octobre. Seuls les jeunes survivent aux saisons froides en hivernant dans des

zones abritées sous la litière. Pendant cette période, le sexe des individus n'est pas déterminable visuellement. Pendant l'automne et l'hiver, les jeunes subissent plusieurs mues en passant par différents stades de tailles intermédiaires, et arrivent au stade sub-adulte (dernier stade juvénile) à la fin de l'hiver/début du printemps. C'est à ce stade que les organes copulateurs des mâles apparaissent (mais ne sont pas fonctionnels) et qu'il est alors possible de sexer les individus. Si la température est favorable, les araignées sub-adultes effectuent leur mue imaginale, et il y a apparition de l'activité sexuelle dès la fin de l'hiver dès que les organes sexuels sont matures. Les adultes deviennent alors très mobiles et se déplacent à la surface de la litière à la recherche d'un partenaire sexuel.

II. Cycle biologique

Le cycle biologique d'une espèce est la période qui s'écoule d'une génération à la suivante. Cette notion ne recouvre pas les mêmes événements chez les Arthropodes et chez les Vertébrés. Chez les Vertébrés, la croissance est progressive et, sauf chez les Amphibiens chez lesquels une métamorphose marque le passage de la vie de tétard à celle d'adulte, la vie des jeunes ne diffère pas de celle des adultes de manière radicale. La durée de vie d'adulte est variable selon les espèces, mais la longévité des Vertébrés dépasse en général un cycle annuel. Chez les Arthropodes, la vie se déroule par étapes, les mues, et la croissance est discontinue. La vie larvaire diffère par bien des caractères de la vie imaginale. La vie d'adulte est souvent brève, surtout chez les araignées *Aranae*. L'araignée adulte, dans les régions tempérées du moins, ne vit qu'une saison. Ces différences de cycle de vie entre les Arthropodes et les Vertébrés font que la répartition des périodes d'activité ne répond pas aux mêmes normes dans ces deux embranchements.

II.1. Cycle biologique de la mère

Nos observations au laboratoire, en milieu contrôlé (20 ± 2°C ; 57 % d'humidité relative ; photopériode : 8-20 h), montrent que les femelles pondent environ 15 jours après la copulation. La femelle construit une coque de soie basale sur laquelle elle pond les œufs entourés d'une substance collante (le cément). Elle recouvre ensuite rapidement les œufs d'une deuxième coque de soie qu'elle soude à la première formant ainsi le cocon lenticulaire.

Après avoir coloré le cocon d'un pigment bleu-grisâtre, la femelle attache son cocon au niveau de ses filières et commence à le transporter. Le transport du cocon dure environ 30 jours et correspond à la période de « **gardiennage du cocon** » (ou soin à la progéniture pré-émergence). Il est important de remarquer l'apparition d'une bande blanche de soie sur tout le pourtour du cocon âgé d'environ 15 jours. Cette bande blanche est constituée d'une couche de soie moins épaisse et plus lâche.

A la fin de la période de gardiennage du cocon, la femelle détache le cocon et aide les jeunes à émerger en déchirant la soie à l'aide de ses chélicères au niveau de la bande blanche. Les jeunes, dès l'émergence hors du cocon, grimpent sur l'abdomen de la femelle (grâce aux soies présentes sur ses pattes). La femelle les transporte pendant 5 à 6 jours (*phorésie familiale*) et cette période correspond à la période de « **gardiennage des jeunes** » (ou «soin à la progéniture post-émergence »). Cette période dure environ 7-8 jours. Les mères pondent une 2ème fois environ 10 jours après la dispersion des jeunes et meurent quelques jours après la dispersion des jeunes issus du 2ème cocon.

II.2. Développement embryonnaire et post-embryonnaire

Le développement des zygotes-jeunes s'effectue à l'intérieur du cocon et il est divisé en 2 phases : une phase constituée d'une **période embryonnaire** à l'intérieur de l'œuf et du cocon et une phase de développement, après l'éclosion, correspondant à une **période post-embryonnaire** à l'intérieur du cocon.

Pendant la période embryonnaire, les embryons passent par 3 phases successives :

- la phase primordiale : elle va de la fécondation de l'ovule à la formation de la plaque germinative, et se caractérise par la segmentation de l'œuf et par la genèse des feuillets.

- la phase de métamérisation : pendant laquelle la bandelette germinative se segmente. Chaque segment développe les composants morphologiques d'un métamère (sacs coelomique, neuromère, appendices). L'embryon, encore allongé, présente un aspect « annélidien ».

- la phase de l'inversion : c'est une phase dynamique au cours de laquelle la bandelette germinative se scinde en deux pour se réunir à la partie dorsale du vitellus. La zone abdominale s'incurve à 90° et, à la fin de cette phase, l'embryon a pris un aspect « aranéen ».

Pendant la période post-embryonnaire, après l'éclosion, l'araignée élabore son architecture définitive.

Notre étude des cocons pondus par les mères *P. saltans* sous les conditions du laboratoire montre que le cocon de 1-2 heures contient des œufs sphériques très riches en vitellus et centrolécithes (Fig. 7A). Chaque œuf est entouré de deux enveloppes : une membrane ovulaire interne et un chorion externe.

Cinq jours après la ponte, à l'intérieur des oeufs, **des embryons de stade 1** (fermeture de la région opisthosomale) sont visibles (Fig. 7B).

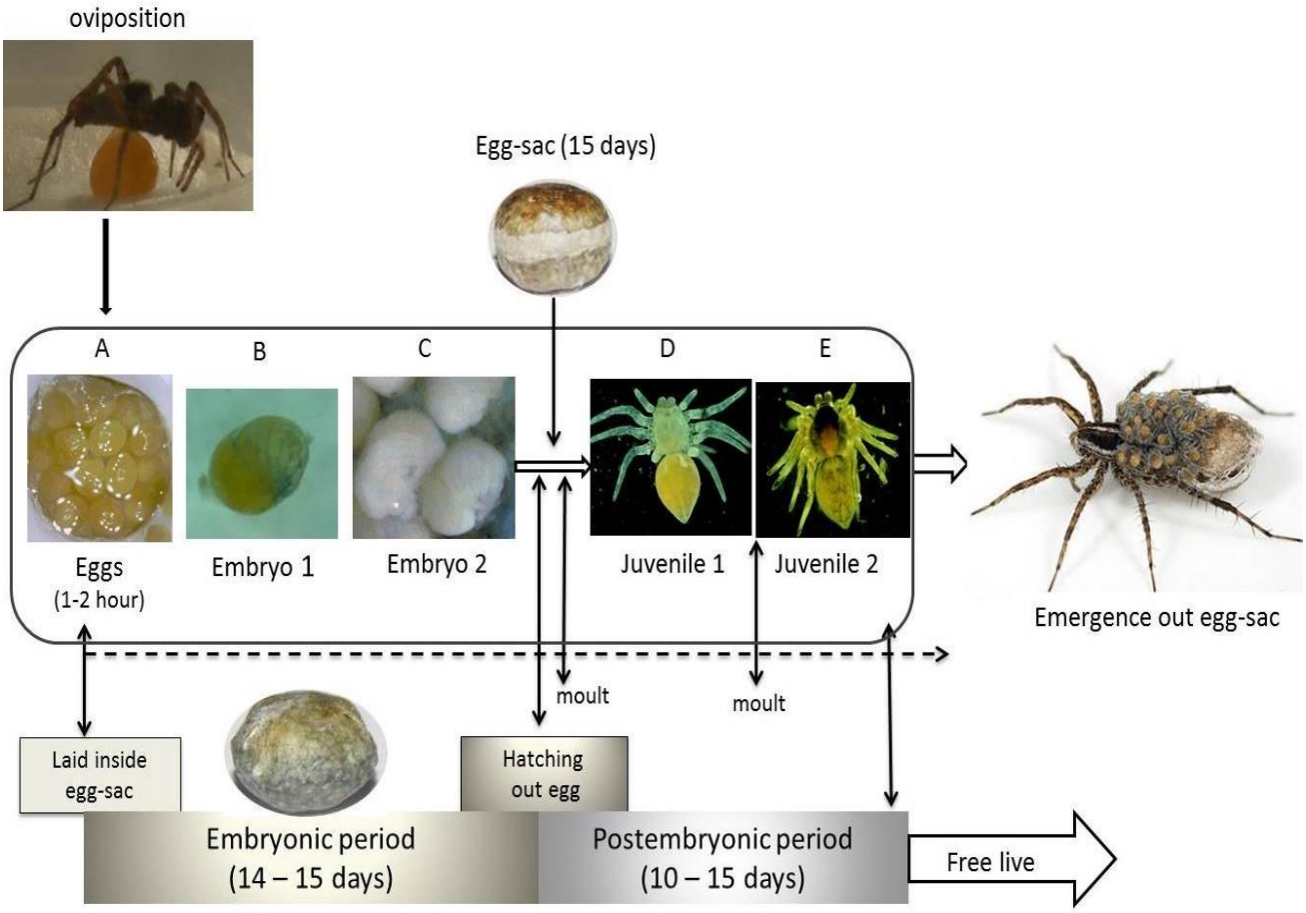


Figure 7 : Cycle biologique des développements embryonnaire et post-embryonnaire de Pardosa saltans (Lycosidae) jusqu'à l'émergence du cocon sous des conditions de laboratoire (Ruhland et al., soumis).

Dix jours après, l'œuf contient un **embryon de stade 2** : prosoma plus compact et yeux visibles (Fig. 7C). Ces **embryons de stade 2** éclosent après 15 ± 1 jours d'incubation. Le **développement embryonnaire** dure donc environ 14-16 jours. Il est intéressant de remarquer que l'éclosion des embryons coïncide avec la période d'apparition de la bande blanche de soie sur toute la circonférence du cocon.

Le **développement post-embryonnaire** dure environ 10 à 15 jours et est caractérisé par la présence de jeunes mobiles à l'intérieur du cocon. Ils effectuent 2 mues à l'intérieur du cocon. La première mue a lieu 2 à 3 jours après l'éclosion et les embryons deviennent des **juvéniles de stade 1** (Fig. 7D). Ces juvéniles contiennent encore beaucoup de réserves vitellines, ils sont peu mobiles et leur cuticule est transparente et dénuée de tout poil sensitif. La seconde mue forme **les juvéniles de stade 2** et a lieu 5 à 6 jours après l'éclosion (Fig. 7E). La cuticule de ces juvéniles devient plus chitineuse et pigmentée. Ces jeunes possèdent, à ce stade, de nombreux poils sensoriels et leurs yeux sont très développés. Ils sont beaucoup plus mobiles que les juvéniles de stade 1 : les pattes sont également plus chitinisées et donc plus fonctionnelles afin de leur permettre de se déplacer suffisemment pour émerger. En effet, c'est à ce stade (environ 4 à 6 jours après l'éclosion) que les jeunes vont émerger du cocon et grimper sur l'abdomen de la femelle. Les juvéniles de stade 2 forment un **groupe grégaire** compact et vivent sur leurs dernières réserves vitellines pendant toute la période où ils sont transportés par leur mère.

Les jeunes, âgés de 5-6 jours, ne sont plus transportés, mais restent groupés près de leur mère. Ils effectuent une 1ère mue post-émergence (**juvenile de stade 3**) à l'âge de 6-7 jours. Après la mue, ces jeunes de stade 3 tuent et mangent leur 1ère proie car leurs réserves vitellines sont épuisées et se dispersent rapidement dans la litière.

III. Conclusion

L'ensemble de nos observations sur *P. saltans* élevées dans des conditions abiotiques (température et lumière) et des conditions biotiques (nourriture) stables au cours de l'année, montrent que le développement de *P. saltans* est similaire à de nombreuses espèces de lycoses décrites par d'autres chercheurs (Vachon, 1957 ; Canard, 1987 ; Foelix, 2011). Le

développement des jeunes araignées réalisé à l'intérieur du cocon est très complexe. Notre étude nous permet de segmenter les différents stades de développement et ainsi d'identifier l'ontogenèse du comportement maternel en fonction du stade de développement des embryons à l'intérieur des oeufs ou après éclosion à l'intérieur du cocon. Nous pouvons en effet penser que la femelle adapte son comportement en fonction du stade de développement des jeunes à l'intérieur du cocon. Cette adaptation comportementale pourrait venir de son propre cycle interne (hormonal et état énergétique, temps passé avec le cocon) ou d'informations transmises par les embryons ou les juvéniles depuis l'intérieur du cocon. De plus, la période d'éclosion semble être un moment clé dans le cadre des interactions qui peuvent exister entre la mère et son cocon car en plus d'une modification physique de ce dernier (apparition de la bande blanche), il marque le passage entre des embryons immobiles à des juvéniles plus ou moins mobiles. Nous émettons donc l'hypothèse que les comportements de soins exprimés par la femelle devraient être extrêment différents entre la période de l'oviposition et celle de l'éclosion des jeunes. C'est pourquoi, notre étude s'intéresse plus particulièrement à la période correspondant à celle de l'éclosion des jeunes à l'intérieur du cocon (cocon de 15 jours).

CHAPITRE 1

Comportement, dépense et investissement maternels

Article **1**

Physiological costs during the first maternal care in the wolf spider *Pardosa saltans* (Araneae, Lycosidae)

Fanny Ruhland[1], Julien Pétillon[2,], Marie Trabalon[1]

1- Université de Rennes 1, UMR-6552 CNRS EthoS, Rennes, France

2- Université de Rennes 1, EA 7316 Biodiversité et Gestion des Territoires, Rennes, France

Key-words: maternal investment, energetic cost, biochemical status, spider, lycosid

J. Insect Physiol. (sous presse)

Article **2**

Age and egg-sac loss influence maternal behaviour and locomotor activity of wolf spiders (Araneae, Lycosidae)

Fanny Ruhland, Violette Chiara, Marie Trabalon

Université de Rennes 1, UMR-6552 CNRS EthoS, Rennes, France

Key-words: maternal care, mobility, development status, arachnids, *Pardosa saltans*

Behavioural Processes (sous presse)

Les bénéfices apportés par l'expression de soins parentaux (augmentation du fitness des jeunes) sont souvent accompagnés de coûts pour les parents qui les expriment (Trivers, 1972 ; Clutton-Brock, 1991 ; Royle *et al.*, 2012). Ces coûts peuvent prendre différentes formes comme une pression de prédation et de parasitisme plus élevée due aux multiples modifications comportementales accompagnant les soins, ou encore de grandes dépenses énergétiques (Humphrey, 1974 ; Nørgaard, 1951). La quantification des coûts alliés aux soins maternels chez les araignées est difficile à évaluer et donc reste peu étudiée.

Les araignées errantes ayant un mode de vie de type subsocial temporaire pendant la période de soins parentaux, comme les lycoses, n'approvisionnent pas leurs jeunes. Ce qu'elles dépensent en énergie lors de la prédation et ce qu'elles ingèrent sert uniquement au maintien de leur propre système métabolique (Nyffeler, 2000). Les modifications de leur état physiologique, et plus précisément énergétique, lors de l'expression des soins parentaux sont donc uniquement liées aux coûts associés au comportement de gardiennage du cocon puis des jeunes.

Par ailleurs, certains auteurs ont observé que les femelles apportent différents types de soins au cocon comme par exemple la rotation régulière de celui-ci à l'aide des pattes ou des palpes, ou l'ajout de soie (Eason, 1964 ; Lubin, 1974 ; Krafft, 1981). Nous pouvons penser que des soins différents sont apportés par la mère en fonction du stade de développement des embryons ou des juvéniles ; et plus particulièrement pendant la fin du développement embryonnaire, au moment de l'éclosion.

Les objectifs de ce chapitre sont donc :

(1) de décrire et quantifier de manière précise le comportement maternel en fonction de l'âge du cocon afin de montrer l'existence d'une ontogenèse comportementale lors du gardiennage du cocon.

(2) De faire une évaluation des réserves énergétiques des mères pendant toute la période de soins maternels (en présence du cocon puis des jeunes).

(3) D'observer le comportement locomoteur et exploratoire de la femelle *P. saltans* lors du transport du cocon et après la perte de celui-ci.

(4) De tester la force du maintien du comportement de gardiennage.

Pour cela, dans une première étude (**Article 1**) nous avons décrit le comportement maternel général exprimé par les femelles, mais également leur comportement de prédation et leur état énergétique pendant toute la période de gardiennage du cocon et la période de soins aux jeunes.

Dans une deuxième étude (**Article 2**) nous nous sommes plus particulièrement intéressées à la période de gardiennage du cocon. Nous avons ainsi décrit l'activité locomotrice des mères en présence du cocon, évalué de manière précise l'ontogenèse du comportement maternel, mais aussi testé la force de son maintien.

Article **1**

Physiological costs during the first maternal care in the wolf spider *Pardosa saltans* (Araneae, Lycosidae)

Abstract

Many arachnids like other terrestrial arthropods, provide extensive maternal care. Few studies have quantified the underlying physiological costs of maternal care. We investigated how maternal care affects the free-moving wolf spider's (*Pardosa saltans*) energy requirements. We described in detail their basic reproduction biology (i.e. carrying cocoon and young) and we evaluated the variation in the females' energy reserves during maternal care. Our results show that mothers guard eggs until hatching and then guard their spiderlings for 27-30 more days. Laboratory observations indicated that spiderlings start leaving the maternal abdomen gradually 5-7 days after hatching. Females carry an egg sac (cocoon) that can weigh up to 77 % of their post-reproduction weight and carry young that weigh 87-100 % of their body mass. Females lost weight over time despite regular food intake, while carrying cocoon and young; but their weights increased gradually during the dispersal of young. The contributions of proteins, glucose and triglycerides to maintain females' energy were calculated. Their energetic state varied during maternal care, in particular lipid levels declined, during the care of spiderlings when the females' predatory behaviour was inhibited. Our results show that the maternal care provided by *P. saltans* females is particularly costly physiologically, during the 30 days following egg sac formation and development of spiderlings, even when food is available.

I. Introduction

Parental care is a trait that has evolved independently in many animal orders, from invertebrates to mammals. However, maternal care inflicts energetic and temporal costs, and can increase the risk of infection and predation, particularly for nesting or brooding parents (Cerda & Wolff, 1993; Kight & Ozga, 2002; Royle *et al.*, 2012). Costs imply a reduction of the number of offspring other than those that are currently receiving care (i.e. parental investment, Trivers, 1972), whereas benefits are increased fitness of the offspring currently being cared for (Clutton-Brock, 1991). Energy and time are the resources most commonly used in theoretical models to exemplify the currencies traded between different priorities. Allocation of more energy/time to parental duties is thought to reduce the energy/time available for self-maintenance and hence for future offspring. Energy acquisition and allocation are complex traits affected by different factors, and are therefore difficult to evaluate.

The terrestrial arthropod orders presenting the most developed examples of parental care include insects (Wilson, 1971; Eickwort, 1981; Tallamy & Wood, 1986) and arachnids (Foelix, 2011). Two common features of maternal care among spiders are the energetic investment for the production of eggs and their wrapping in a protective silk case (cocoon). Members of many spider families guard their egg-sac and the newly emerged spiderlings (Bristowe, 1971; Foelix, 2011), this behaviour is called "transient subsocial" behaviour (Yip & Rayor, 2014). Nevertheless, spiders' maternal care varies between species, as it has often derived from multiple ancestors (for thomisids, see Ruch *et al.*, 2015), and includes the so-called "extended maternal care". So, maternal care in other spiders includes provisioning the young with prey or with trophic eggs (Evans *et al.*, 1995; Gundermann *et al.*, 1988), regurgitating digested material (Kullmann & Zimmermann, 1975) and matriphagy (e.g. Eresid *Stegodyphus lineatus* mothers committing suicide: Schneider & Lubin, 1977).

Spiders can allocate nutrients to their offspring either to maintain nutritional homeostasis or to modify their body composition (Edgar 1971a, b). Quantification of spiders' maternal care costs is difficult and has been poorly examined in terms of a common currency (i.e. energetic state). Spiders ingest a large proportion of the food they kill and, like other carnivorous arthropods, their growth efficiency is high. Lipids and carbohydrates are the

primary metabolic fuel compounds (Paine, 1971; Casas *et al.,* 2005). In particular, lipids constitute highly efficient energetic stores that can sustain metabolism during periods of food restriction (Wilder, 2011). For example when prey nutrient composition varies, *Pardosa prativaga* (Lycosidae) does not adjust its metabolism to maintain its body composition constant. To prepare the opportunistic feeding spiders for long periods of food deprivation, the lipids are stored efficiently (Jensen *et al.,* 2010). Recently, we showed that spiders' aggression levels during the foraging period were positively correlated with the lipid concentrations in the hemolymph (Trabalon, 2011). Lipid levels are hypothesized to have evolved as a regulatory factor of female spiders' predatory and agonistic behaviours. However, no data are available concerning variations of lipid levels related to maternal behaviour (spinning cocoon, caring for offspring…). Although much less is known about spiders' carbohydrate metabolism, we do know that some species are able to digest and benefit from significant amounts of carbohydrates. In particular, recent reports show that some highly active wandering spiders search for and ingest carbohydrates that can increase their growth, reproduction and survival rates (Vogelei & Greissl, 1989; Jackson *et al.,* 2001; Meehan *et al.,* 2009; Taylor & Bradley, 2009; Chen *et al.,* 2010). Authors have identified glucose as the principal carbohydrate present in the hemolymph of spiders (Stewart & Martin, 1970; Schartau & Leidescher, 1983; Barron *et al.,* 1990) and glycogen present in much higher quantities in spiders' storage tissues (Foelix, 2011). Many arthropods can also store protein as storage hexamers in their hemolymph or fat body (Telfer & Kunkel, 1991). Proteins account for more than 50 % of the dry mass of most cells.

Here we address a central life history theory question concerning the costs of maternal care during transient subsocial behaviour. Spiders' transient subsocial behaviour includes three stages: guarding the egg-sac, opening the egg-sac, and guarding the first instar spiderlings once they have left the egg-sac (Yip & Rayor, 2014). As female wolf spiders (Lycosidae) present these three aspects of subsocial behaviour, this family is an excellent model to study maternal care. Free-moving lycosid species (e.g. genus *Pardosa*) attach their egg-sacs to spinnerets and females carry them until the young hatch. Furthermore, mother does not supply the young with prey, so energetic variations observed in the mother will only be due to maternal effort in transport the brood. Moreover, as *Pardosa sp.* are very active (Fujii, 1977, Gertsch, 1979) their energy requirements are probably higher than those of sit-and-wait or burrow-dwelling species (e.g. Walker *et al.,* 1999). Gertsch (1979) and Nyffeler (2000) reported that, while carrying young, mothers' hunting activities are normal.

Conversely, some authors (Hallander, 1970; Higashi & Rovner, 1975; Samu *et al.*, 1999) suggest that adult females' predatory behaviour is inhibited during maternal care to prevent the young from being eaten (mistaken for prey) by their mother if they fall off her back. In addition, lycosids are known to present phenotypic plasticity, as for example reproduction trade-offs when facing high physiological costs (e.g. Hendrickx *et al.*, 2003; Wilder & Rypstra, 2008; Pétillon *et al.*, 2011).

Among lycosids, we selected the free-moving wolf spider, *Pardosa saltans* (Töpfer-Hofmann 2000) as a model species. This wolf spider was described in 2000; the biology of this species has not been studied yet. Our aim was three-fold: first to describe this species' maternal behaviour; second to analyse its locomotor and predatory behaviour during females' first maternal cycle; and third, to evaluate the contributions of protein, glucose and lipids to the maintenance of female *P. saltans'* energy. The production of a cocoon (structurally and chemically complex), egg-sac care and care of offspring are all energetically expensive and time-consuming (Edgar, 1971b; Foelix, 2011). We thus expected 1) a loss of weight and a reduction of activity over time, especially after eggs had hatched (e.g. Samu *et al.*, 1999); and 2) different patterns of energy compounds over time as they are involved in different metabolic pathways (lycosids: Foucreau *et al.*, 2012).

II. Materials and methods

II.1. Ethics statement

Our research conformed to legal requirements and guidelines established for the treatment of animals in research (Animal Behaviour, 2006) using invertebrate species and caring for them using accepted ethical standards in the laboratory. The species used for the experiments are not endangered or protected.

II.2. Spider collection and rearing

Pardosa saltans spiders live in forests, woodlands and copses and sometimes nearby grasslands and hedgerows. They seem to be largely restricted to old and ancient woodland sites, where many can be seen running over the ground in open clearings as well as in the shade of the litter (Hendrickx *et al.*, 2001; Pétillon *et al.*, 2011). Copulation and maternal behaviours can be observed from April to September. Two peaks of reproduction are usually observed: one in late spring – early summer, and a second in the autumn (unpublished data). Our subjects were young adult females and were captured during the copulation period in a forest near the Paimpont biological station (property of the University of Rennes 1; France; 48°00'05.67" North, 2°13'46.65" West) in April-June 2014. Females were kept individually in circular terrariums (10 cm diameter x 5 cm high) without any substrate and were kept at 20 ± 1°C, with 57 ± 1 % relative humidity under a L:D, 14:10 h photoperiodic cycle. All females were checked at least twice a day (morning and evening) to record oviposition.

II.3. Experimental groups and maternal behaviour

One experiment evaluated maternal care in relation to weight, cocoon size and number of young carried (n = 100 females), and a second experiment analyzed changes of females energetic state during the maternal cycle (n = 100 females). All individuals were monitored in the laboratory before mating until spiderlings dispersed. Spiders were fed every other day *ad libitum*, with either cricket larvae (*Acheta domestica and Nemobius sylvestris*) or adult flies (*Drosophila melanogaster*). Observations of maternal behaviour (oviposition, egg-sac construction, egg-sac care and care of offspring), predatory and locomotor activity were recorded in their terrarium. Subjects' activities were recorded with a Canon HD (HG20) camcorder from 8.00 to 19.00 under natural light. Females were monitored from 8.00 to 19.00h in the laboratory before first oviposition until spiderlings hatched. Locomotor activity was analyzed using Swiss-Track software (4.0.0) with the nearest neighbour tracking method. The coordinates of females were recorded every 12 images per second and then transformed using R software (R 3.0.2). A movement lasting less than 1 second was not recorded.

Distances covered by subjects are in cm / min. The times when the cocoon was formed, offspring emerged and dispersed were recorded.

II.4. Weight, cocoon size, number of offspring

Cocoons' sizes and weights were recorded: just after oviposition, construction and attachment of egg-sac (day 0 = C0) then after 5 (C5), 10 (C10), 15 (C15) and 20 (C20) days of transport by the mother. Spiderlings weights were recorded just after the young emerge from the egg sac (Y0) then after 2 (Y2), 4 (Y4), 6 (Y6) and 8 (Y8) days. Mothers' weights were recorded every five days after lay and every two days after emergence of spiderlings until dispersion of young (Y8).

All spiders were transferred individually into an Eppendorf tube (1.5 mL) stored and were anesthetized by chilling at 7°C for 5 min. Mothers were separated from the cocoon or spiderlings on micrographs. Female cocoons and spiderlings were weighed using a Sartorius electronic balance (± 0.01 g; Palaiseau, France). All spiderlings climbing on the body of their mother were weighed grouped, then counted. Egg sacs were measured on micrographs. The equation for an oblate spheroid, $V= 4/3\pi(ab^2)/8$, where a = equatorial and b = polar diameters of the egg-sac (in mm ± 0.1), was applied to calculate final volume of egg-sacs. After being weighed and measured, cocoons and young were returned to their appropriate mother in their terrarium. All spiders survived anesthesia and they were separated from their mother and egg-sac for less than 5 min (this brief period of separation precluded stressing mothers and spiderlings, and did not impact females' nutritional status: mothers foraged and fed normally after the test).

II.5. Maternal behaviour and energetic state

To assess energetic state changes, 100 mothers were divided randomly into ten groups of 10 females each: just after oviposition, construction and attachment of the cocoon (day 0 = C0), and after 5 (C5), 10 (C10), 15 (C15) and 20 (C20) days carrying a cocoon, just after hatching of offspring (Y0), and after 2 (Y2), 4 (Y4), 6 (Y6) and 8 (Y8) days after hatching.

All these females were transferred individually into an Eppendorf tube and were freeze-killed at -18°C. Mothers were separated from their cocoon or spiderlings on micrographs. After being weighed, each female was mixed in 50 µl of water, homogenised (5 min) and vortexed for 30 min and centrifuged at 10,000 rpm, for 10 min at -5°C. Two aliquots (10 µl / aliquot) of supernatant were taken to assay carbohydrates and proteins. Lipids from the homogenate sample were extracted with 200 µl of methanol (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), vortexed for 30 min and centrifuged at 10,000 rpm, for 10 min at 4°C. The pellets were discarded and the supernatant was aliquoted for further analyses. We analysed each sample in triplicate and then calculated the ratio of lipids, proteins, and carbohydrates by wet mass.

II.5.1. Quantification of glucose

The concentration of glucose in a 10 µl homogenate sample was determined using a colorimetric method after enzymatic oxidation in the presence of glucose oxidase (Glucose-test, Randox, Crumlin, Co, Antrim, UK). The hydrogen peroxide formed reacted in the presence of peroxidase with phenol and 4-aminophenazone to form a red-violet quinoneimine dye as the indicator. We divided the levels of glucose by fresh weight to obtain concentrations in µg/g.

II.5.2. Quantification of proteins

Total protein content in a 10 µl biological sample was determined according to Bradford's method (1976) with a Coomassie protein assay kit (Thermo Scientific, Cergy Pontoise, France) using bovine serum albumin as the standard. We divided the levels of proteins by fresh weight to obtain concentrations in µg/g.

II.5.3. Quantification of triglycerides

Total triglycerides in a 10 µl biological sample were measured with a colorimetric method (Triglycerides-test, Randox, Crumlin, Co. Antrim, UK). The triglycerides were determined after enzymatic hydrolysis with lipases. The indicator was a quinoneimine formed from hydrogen-peroxide, 4-aminophenazone and 4-chlorophenol under the catalytic influence

of peroxidase. We divided the levels of triglycerides by fresh weight to obtain the concentrations in µg/g.

II.5.4. Energetic equivalent of proteins, carbohydrates and lipids

We estimated the total calories provided by different energy substrates (carbohydrates, proteins and lipids) using the conversion factors given by Beningher and Lucas (1984) and applied to arthropods (Heras *et al.*, 2000; Garcia-Guerrero *et al.*, 2003, Laino *et al.*, 2013). The conversion factors were: 4.3 kcal/g for protein, 4.1 kcal/g for carbohydrate and 7.9 kcal/g for lipid.

II.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using STATISTICA 6.0 for WINDOWS (Statsoft Inc.). As all our data satisfied the requirements for parametric statistics, mothers' weights, cocoon volumes and offspring's weights were analyzed using one-way ANOVAs with repeated measures. Other data (glucose, proteins, and lipids) were analyzed using one-way ANOVAs. When differences between means were significant at the $P \leq 0.05$ levels, post-hoc Tukey's (HSD) tests were applied. Linear regressions assessed variations of biochemical variables over time during the maternal care cycle. Results are expressed as means ± SE.

III. Results

We estimated females' energy costs related: weight of cocoon and spiderlings carried during a maternal care cycle; variations of glucose, protein and triglycerides levels.

III.1. Female behaviour

Soon after copulation (14 ± 1 days) females laid 35 ± 10 eggs (n = 100) and immediately after oviposition females started to construct an egg-sac. Females carried their cocoon attached to their spinnerets until hatching, and cocoon guarding lasted 22 ± 2 days. On day C15 (± 1 day) a white seam appeared all around the grey-bluish cocoon. When spiderlings were ready to hatch the female spiders tore their cocoon to let the spiderlings emerge. The females rotated their egg sac with their legs and palps and cut the egg sac along the white seam with their chelicerae. Once the cocoon has been torn apart, the young started to emerge and climb onto their mother's back. Mother carried spiderlings for 7 ± 1 days.

Pardosa saltans females moved around actively in the terrarium (mean: 19.4 ± 2.9 cm/min; Table 3) while carrying a cocoon; periodically they removed their egg-sac from the spinnerets, turned it round and then reattached it. They periodically rubbed their sac with water to hydrate it. Females' locomotor activity decreased during the last days of cocoon care until 4± 1 days after hatching of spiderlings (Table 4). Their locomotor activity increased during the last period of young care.

The females foraged and fed during the entire cocoon care period, they consumed 2-3 prey every two days until C15, then 1-2 prey every two days until the young hatched (Table 3). Females did not feed while carrying young (4 ± 1 days), but then fed again at a rate of 2 prey/day (6-8 days) (Table 4).

Table 3: Mother behaviour during cocoon care; weights and volumes of cocoons carried by Pardosa saltans mothers in relation to the age of cocoon (n = 100). Results were compared at each age using ANOVA and post-hoc Tukey's (HSD) tests: different letters indicate a significant difference (C0 vs C15: p = 0.05; C0 vs C20: p = 0.02; C5 vs C15: p = 0.04; C5 vs C20: p = 0.005); NS = not significantly different

	Mother behaviour		Cocoon	
Days after oviposition	**Locomotor activity** (cm / min)	**Prey captured** (/ 2 days)	**Weights** (mg)	**Volumes** (mm^3)
0	19.5 ± 1.9	2 - 3	17.5 ± 1.0	13.2 ± 0.5^a
5	19.7 ± 2.2	2 - 3	17.7 ± 1.1	12.6 ± 0.8^a
10	18.2 ± 1.8	2 - 3	16.6 ± 1.0	13.8 ± 0.5^a
15	19.4 ± 2.1	2 - 3	16.4 ± 1.1	14.9 ± 0.8^b
20	19.2 ± 2.2	1 - 2	17.6 ± 1.4	15.9 ± 1.4^b
Mean	19.4 ± 2.9^{NS}	2	16.8 ± 0.5^{NS}	14.1 ± 0.4

III.2. Offspring

III.2.1. Cocoon volume and weight

Under laboratory conditions, egg-sacs weighed 17.5 mg and were spherical- lenticular shaped (13.2 mm^3) on C0 (Table 3). Cocoon weights did not change significantly during cocoon care period ($F_{(9,90)}$ = 2.44, p = 0.06), but their volume increased significantly ($F_{(9,90)}$ = 3.09, p = 0.02) up to: 15.9 mm^3 on C20 (Table 3).

III.2.2. Spiderlings

Emergence of spiderlings (Y0) and climbing onto the female's body lasted approximately 12 ± 1 hours. The spiderlings covered all the female's abdomen, about half of her cephalothorax, forming a dense aggregate during 4 ± 1 days. During this period, young's

locomotor activity was low. During the next two days, the spiderlings gradually dismounting from the mother (36 % at 4-5 days and 75 % at 6-7 days) but remained close to her (Table 4). Their locomotor activity increased gradually and their aggregation became less dense; they molted at that time (7 ± 1 old-day). After molting, 61 % of spiderlings started to catch small prey, they occupied all the terrarium, moving away one from the other and led a free life away from their mother from day 8 ± 1 onwards. This period is called dispersal of the young and solitary life away from the mother.The weight of spiderlings on their mother's body was 20 ± 1 mg on Y0 when 35 ± 5 young were on her (Table 4). Weights of spiderlings carried by a mother decreased significantly over time ($F_{(9,90)}$ = 5.03, $p < 0.0001$) as their numbers decreased due to dispersal ($F_{(9,90)}$ = 2.81, $p < 0.04$).

Table 4: Mother behaviour was observed in vivarium during young care and in relation to the age of the young. Weights of spiderlings carried by Pardosa saltans mothers (n = 100) in relation to the age of the young after hatching. Number of spiderlings aggregated on the mother's abdomen, number of young dismounted from mother but stay close to her and number of young dispersed in relation to the age of the young. Weights and number of young were compared at each age using ANOVA and post-hoc Tukey's (HSD) tests: different letters indicate a significant difference at p < 0.05.

Days after hatching	Mother behaviour		Weights	Number of young		
	Locomotor activity (cm / min)	Prey captured (/ day)	of young carried (mg)	Aggregated on the mother	Dismounted from mother	Dispersed
0	< 3.6 ± 1.2	0	20.2 ± 1.1[a]	35.1 ± 2.5[a]	0	0
2	< 3.6 ± 1.2	0	19.2 ± 1.3[a]	29.2 ± 2.5[b]	0	0
4	< 3.6 ± 1.2	0	14.4 ± 1.5[b]	24.8 ± 4.0[b]	13.4 ± 1.3[a]	0
6	14.7 ± 2.1	1-2	4.8 ± 0.3[c]	8.4 ± 2.7[c]	26.7 ± 1.8[b]	0
8	15.4 ± 2.5	1-2	4.6 ± 0.2[c]	6.5 ± 1.7[c]	6.2 ± 1.4[c]	22.1 ± 2.3

III.3. Physiology

III.3.1. Mothers' weights

Mothers' body weights (n = 100) changed significantly during the maternal care period ($F_{(9,90)}$ = 5.03, p < 0.0001; Fig. 8). Females weighed 31.5 ± 1.9 mg at the end of oviposition (C0). Body weight had decreased significantly after carrying a cocoon for 10 days (23.4 ± 0.8 mg; Tukey test: C0 vs C10: p = 0.001; C5 vs C10: p = 0.01) but then did not vary. While guarding young, mothers' body weights did not decrease significantly after carrying spiderlings for 2 days (19.2 ± 1.3 mg; Tukey test: Y0 vs Y2: p = 0.138) and gradually increased on Y8 when spiderlings were dispersing (25 ± 0.8 mg; Tukey test: Y2 vs Y8: p = 0.02).

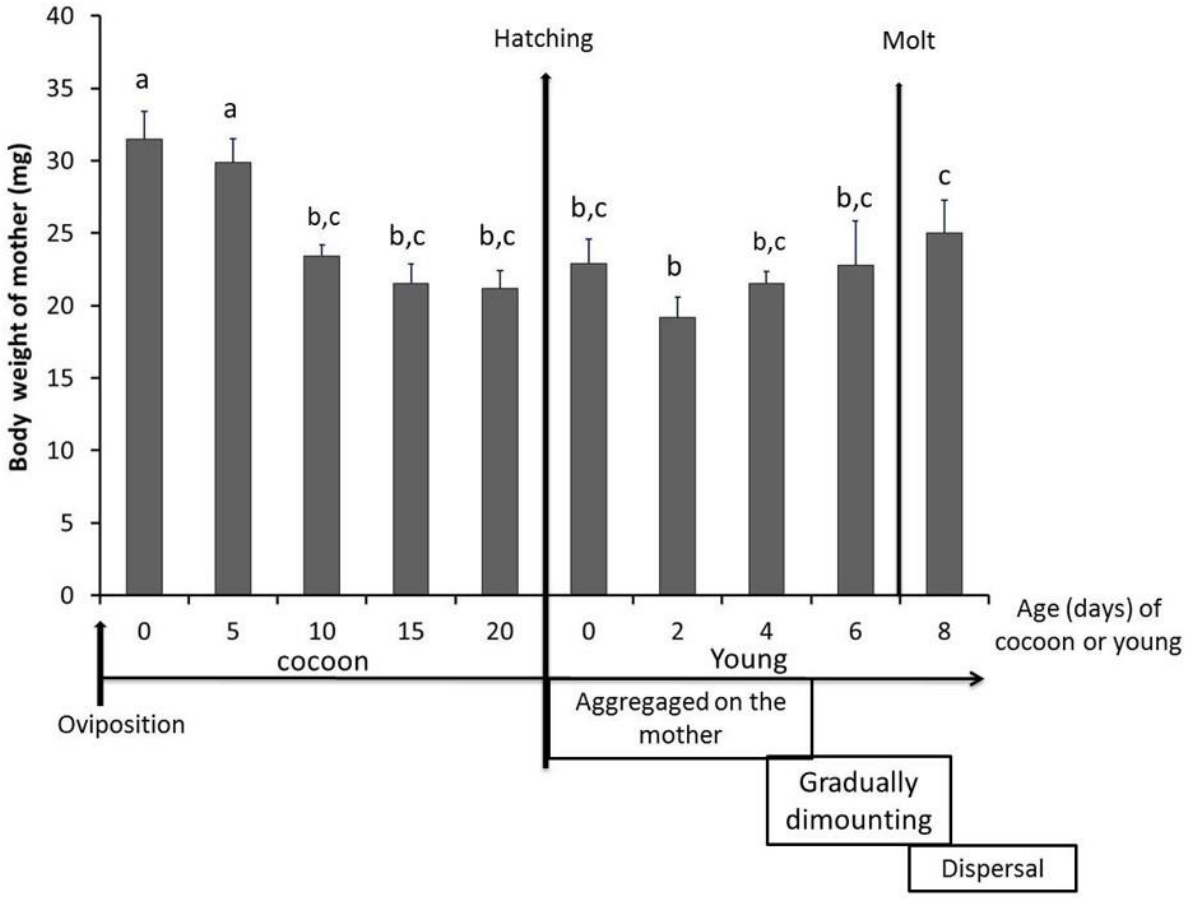


Figure 8: Weights of Pardosa saltans mother in relation to the age of their cocoon and of their young (n = 100). Weight for each instar was compared using ANOVA and post-hoc Tukey's (HSD) tests: different letters indicate a significant difference at p < 0.05.

III.3.2. Glucose levels in females' bodies

Glucose levels varied significantly during the maternal cycle ($F_{(9,90)}$ = 4.17, p = 0.0002; Fig. 9A). Glucose levels in the females' bodies averaged 0.095 ± 0.011 µg/g after oviposition. They were significantly lowest during the first days carrying a cocoon, but then increased until the end of this period (C15 and C20), i.e. 0.152 ± 0.021 µg/g (Tukey test: C0 vs C15: p = 0.034; C0 vs C20: p = 0.016). During spiderlings care, glucose levels decreased significantly until Y4: 0.048 ± 0.011 µg/g (Tukey test: Y0 vs Y2: p = 0.015; Y0 vs Y4: p = 0.004). Glucose levels during dismount and dispersal of young did not differ from the levels observed just after oviposition: 0.108 ± 0.007 µg/g (Tukey test: C0 vs Y6: p = 0.842; C0 vs Y8: p = 0.655). A linear regression showed no direct relationship between the values of calories provided by glucose and the variation of total calories in the females' bodies (n = 100; $F_{(9,90)}$ = 0.934, p = 0.353; Y = - 6.877x+0.010; R^2 = 0.201).

III.3.3. Protein levels in females' bodies

Protein levels varied significantly during the maternal care period ($F_{(9,90)}$ = 7.79, p < 0.0001 ; Fig. 9B). Mean protein levels averaged 5.89 ± 0.33 µg/g after oviposition. Protein levels decreased significantly between C0 and C10: 4.08 ± 0.27 µg/g on C10 (Tukey test: C0 vs C5: p = 0.003; C0 vs C10: p = 0.0002) then increased significantly until the end of cocoon care: 6.01 ± 0.23 µg/g on C20 (Tukey test: C10 vs C15: p = 0.0005; C10 vs C20: p < 0.0001). During spiderlings care, protein levels were lowest (4.31 ± 0.34 µg/g) and did not vary during this period (Tukey test: Y0 vs Y2: p = 0.167; Y0 vs Y4: p = 0.206) or during the dismount and dispersal period (Tukey test: Y0 vs Y6: p = 0.565; Y0 vs Y8: p = 0.127). A linear regression showed a direct relationship between the values of calories provided by proteins and variations of total calories in the females' bodies (n = 100; $F_{(9,90)}$ = 12;57, p < 0.0001 ; Y = 555.555x+0.396; R^2 = 0.617).

III.3.4. Triglycerides levels in females' bodies

Triglycerides levels varied significantly during the maternal cycle ($F_{(9,90)}$ = 6.58, p <0.0001 ; Fig. 9C). After oviposition (C0), triglycerides levels averaged 1.63 ± 0.18 µg/g and increased at C5 (Tukey test: C0 vs C5: p = 0.02). During cocoon care, triglycerides levels remained stable until the end of this period (Tukey test: C5 vs C20: p = 0.66). After spiderlings had hatched, triglycerides levels decreased significantly: 1.52 ± 0.19 µg/g on Y0 *vs* 0.51 ± 0.16 µg/g on Y6 (Tukey test: Y0 vs Y6: p = 0.001), then increased significantly during dispersal of the young (Tukey test: Y6 vs Y8: p = 0.009). A linear regression showed a direct relationship between the values of calories provided by triglycerides and variations of total calories in the females' bodies (n = 100; $F_{(9,90)}$ = 18.71, p < 0.0001; Y = -562.432x+0.594; R^2 = 0.781).

III.3.5. Energetic equivalence

The caloric content of the female bodies (n = 100) decreased significantly during the maternal cycle ($F_{(1.98)}$ = 350.09, p < 0.0001; Y = - 1.863x +46.275; R^2 = 0.535; Fig 10A). Just after oviposition and construction of the cocoon (Fig. 10B), the caloric content of proteins, triglycerides and glucose was 42 cal/mg wet mass. The energy equivalent of which is represented almost completely by proteins (61 %), triglycerides (38 %) and glucose (1 %). During cocoon care, the caloric content of the females' bodies did not change significantly during 10 days (Tukey test: C0 vs C5: p = 0.36; C0 vs C10: p = 0.26; C5 vs C10: p = 0.84), then increased significantly during C15 (Tukey test: C10 vs C15: p = 0.02) and remained stable until the end of this period (Tukey test: C15 vs C20: p = 0.94). However, the caloric content of their bodies decreased significantly during care of spiderlings (Fig. 10A), reaching 23.3 cal/mg wet mass after carrying young for 6 days (Tukey test:Y0 vs Y6: p < 0.0001) energy equivalent of which was mainly due to proteins (76 %).

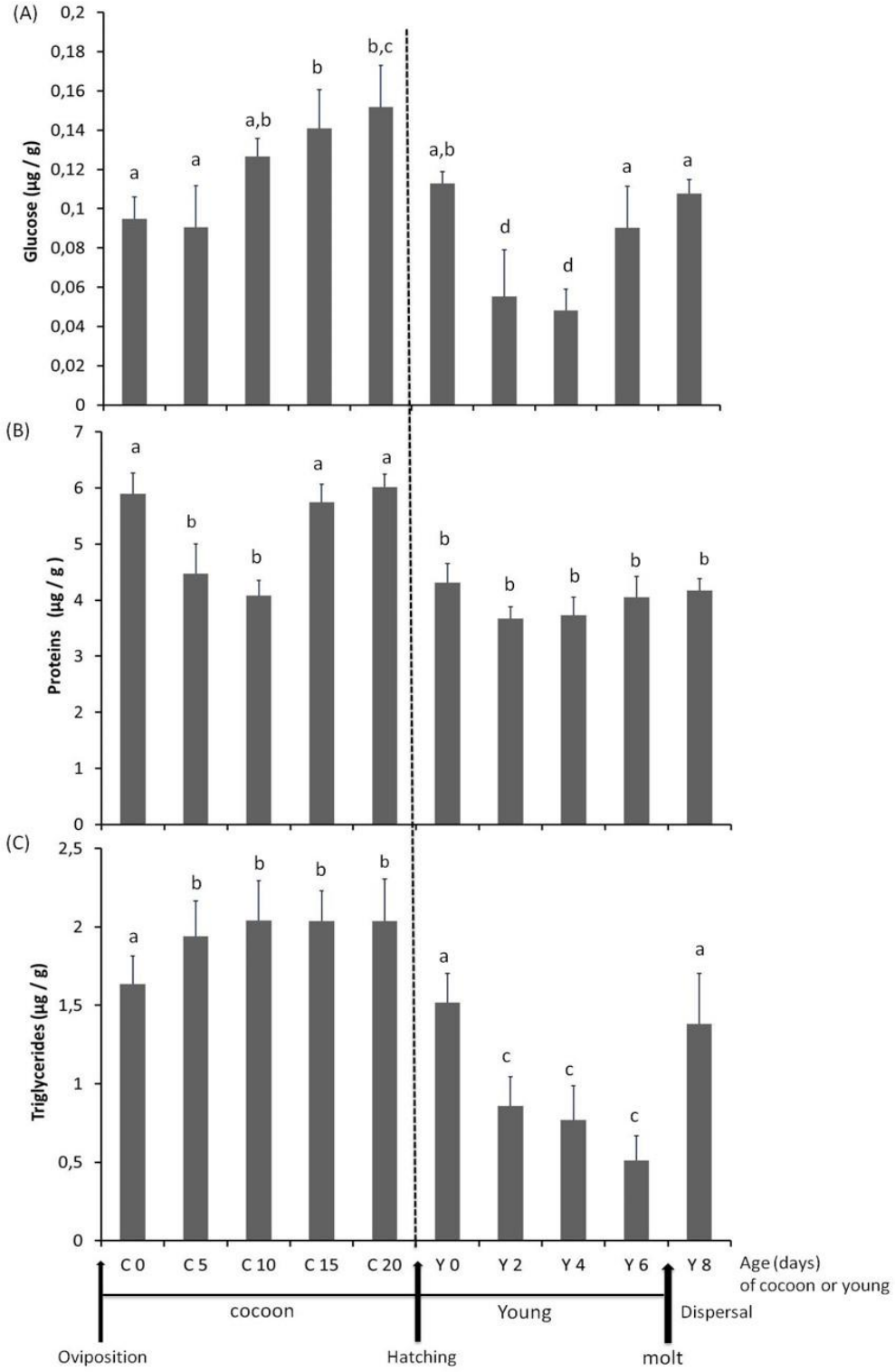


Figure 9: Body concentrations of glucose (A), proteins (B) and triglycerides (C) in Pardosa saltans mothers in relation to the age of their cocoon and of their young (n = 100). The average levels for each instar were compared using ANOVA and post-hoc Tukey's (HSD) tests: different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

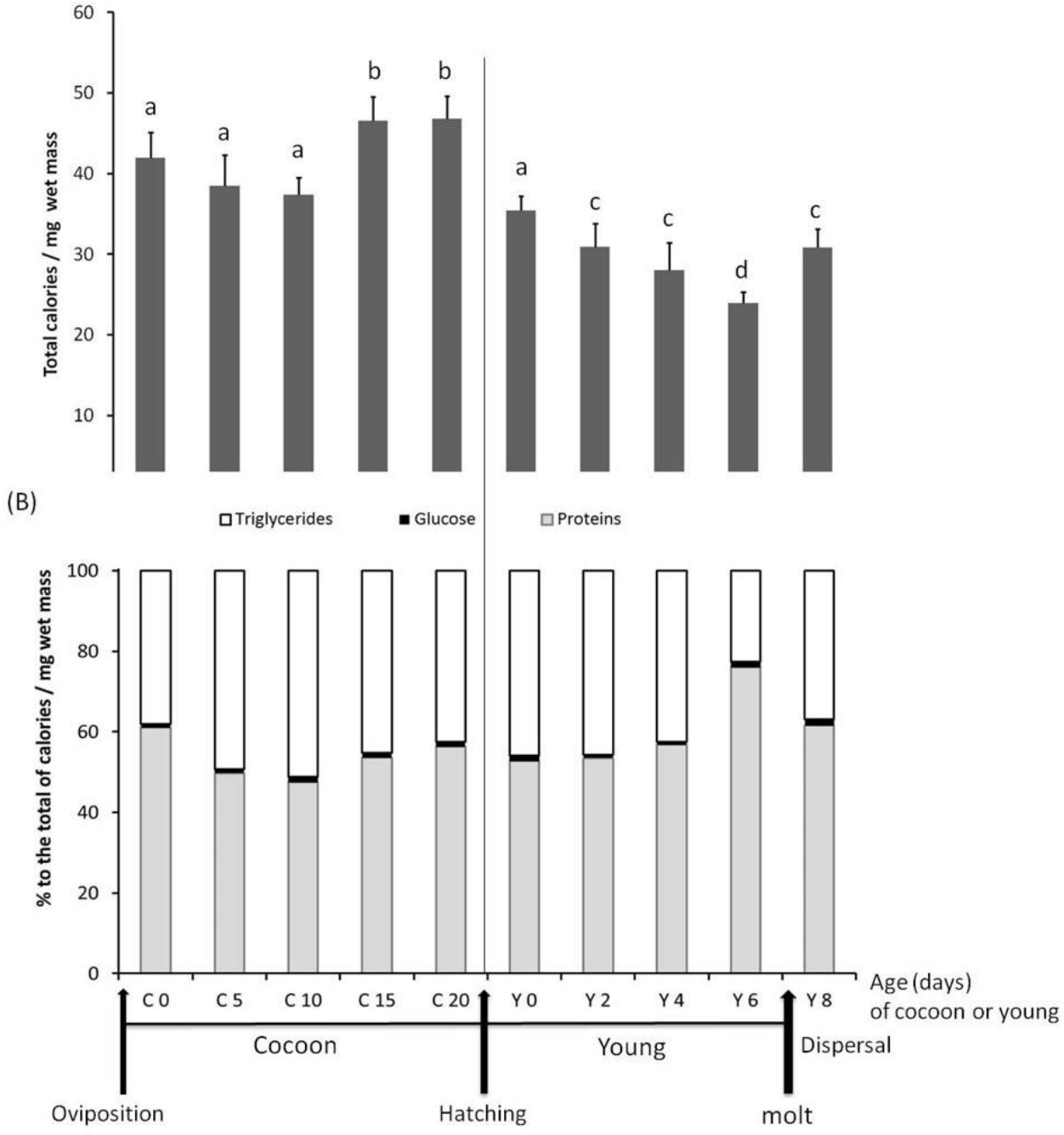


Figure 10: Calories provided by proteins, triglycerides and glucose in Pardosa saltans mothers in relation to the age of their cocoon and of their young (n = 100). (A) Total calories/mg wet mass. (B) Total calories/mg wet mass in percent. The average levels for each instar were compared using ANOVA and post-hoc Tukey's (HSD) tests: different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

IV. Discussion

IV.1. Maternal care

Wolf spiders' maternal care is considered to be characteristic of this family (Eason, 1964, 1969; Eason & Whitcomb, 1965; Wise, 1993; Bonte *et al.*, 2007). *Pardosa saltans'* maternal behaviour can be divided into several stages: construction, transport, care and perforation of the egg-sac; and care of spiderlings after they emerged from the egg sac. *P. saltans* females carry their egg-sacs and spiderlings for five weeks.

Our observations showed that *P. saltans* females took two hours to construct an egg-sac in the laboratory, and that it occurred at least 15 days after mating. *P. saltans'* egg-sac construction (egg laying, covering the eggs, freeing the egg-sac, turning the seam and shaping the egg-sac and attaching the egg-sac) is similar to that of other spiders (Whitcomb, 1962; Eason, 1964). An important facet of *P. saltans* females' maternal care was their colored egg-sac. Why females deposit pigments on their cocoon remains to be investigated. We hypothesizes that these pigments play a protective role against external microorganisms, as for example, a fungicide, or an insecticide, or a camouflage as Craig (2003) and Barrantes *et al.* (2013) suggested. Egg-sacs remain attached to the spinnerets for about 20-25 days and mothers open their egg-sac to facilitate the emergence of their young, as do other spiders (Whitcomb *et al.,* 1966). Our observations showed that spiderlings are carried by mother for about a week, i.e. as long as do *P. monticola* (Bonte et al., 2007) and *P. lugubris* (Higashi & Rovner, 1975; Oelbermann & Scheu, 2002), but spiderlings dismounted gradually at day 2, and most young (75 %) no longer carried by the mother at day 6 but stay close to her. The dispersal of the spiderlings occurred after second molt (days 7-8) and solitary life started away from the mother.

IV.2. Costs of maternal care

During cocoon care, females' weights decreased, in particular after carrying a cocoon for 10 days. This decrease of females' mass has never been reported. During this period female's *P. saltans* manifested a high level of locomotor and foraging activity. During their activities, spiders use hydrostatic pressure for the extension of their appendages and maintaining a posture and regulated endogen temperature (spiders are ectothermal - poikilothermic species; i.e., body temperature varies with environmental temperature, but endogen temperature can be regulated behaviorally). These activities increasing metabolic activity (Carrel & Heathcote, 1976; Anderson & Prestwich, 1982), we hypothesize that this mass decrease is related to high energy expenditure which is not completely compensated by food intake and water.

Under our laboratory conditions and in the presence of food, female *P. saltans* moved and fed while carrying their cocoon, as do other *Pardosa sp.* (Nyffeler, 2000). In contrast to other free-moving wolf spiders that feed their offspring in their nests (Kim *et al.,* 2000; Salomon *et al.,* 2005), *P. saltans* females that carry spiderlings on their abdomens do not feed them (Bonte *et al.,* 2007). In agreement with other authors (Hallander, 1970; Higashi & Rovner, 1975; Samu *et al.,* 1999) our results show that the presence of a large number of young in the mother's back prevented *P. saltans* females' predatory behaviour. We hypothesize that the female does not forage in order to not loose spiderlings aggregated on her back. The female resumes her predatory behaviour before the dispersal of the young on day 6-7 and the mother can discriminate between her own young and prey. In sedentary spiders, the weight/mobility of spiderlings are not the only factors controlling the mother's agonistic behaviour towards spiderlings on her web, as vibratory and tactochemical information plays an important role in modulating agonistic behaviour between mother and spiderlings (Pourié and Trabalon, 1999). So, it would be interesting to study the different mechanism involved in the recognition of young by the wolf spider mother with vibratory and chemical bioassay during dismounting and dispersal period.

Very little is known about the role of dietary essential ingredients for the nutrition of spiders (Stanley-Samuelson *et al.,* 1988; Craig *et al.,* 2000; Grandison *et al.,* 2009; Pollierer *et al.,* 2010). The high protein and relatively low lipid and carbohydrate contents of carnivores' diets suggests that spiders, like other carnivores, rely on catabolism of amino acids and

gluconeogenesis to supply a significant proportion of their energy (Eisert, 2011). After oviposition, females' energetic state consisted of 61 % proteins, 38 % triglycerides and 1 % glucose. This energetic state varied during cocoon care and spiderlings care. Authors (Ford, 1977; Anderson & Prestwisch, 1982; Prestwisch, 1983a, b) showed that spiders can elevate their metabolic rates during various activities (predation, web or eggs production), but increases of respiration and metabolic rates are relatively lower than those of other animals. *P. saltans* females moved about and foraged actively in their terrarium during the first 10 days of carrying a cocoon. This motor activity is associated with a decrease in protein and an increase in glucose levels. Although females' locomotor activity decreased during the last days of cocoon care, they continued to forage actively and their protein as well as glucose levels increased. Our results showed that protein, triglycerides and glucose levels were highest when females produced a cocoon and pierced their cocoon to enable spiderlings to emerge. This could mean that these spiders are very efficiently in their preparation for the period of fasting during young care and/or that there are waiting for their stores to full before opening the cocoon. To test these hypothesis we could propose 22-25 age-old cocoons to females who have not been feed since the oviposition (lowest metabolites rates), and see if she can open the cocoons rapidly to let the spiderlings hatch. In parallel, a control group made of females without feed from the oviposition to the hatching of spiderlings could be observed, to see if they have the same physiological variations.

Triglycerides, are stored until they reach their maximum (around day 5) and their main energy reserve, were not affected by the presence of a cocoon, their levels remained stable and significantly high during the 20 days females carried a cocoon. In the meantime, proteins are depleted, which could mean that they are used to fuel energetic needs for foraging or for lipogenesis. When triglyceride stores are full and probably also when glycogen stores are full, protein catabolism stops and proteins are stored. All this metabolic activity is reflected in the increasing protein and glucose levels. These observations indicate that females had a sufficient supply of nutrients and that they did not need to use their stock of triglycerides for energy during egg-sac care.

While caring for their offspring, *P. saltans* mothers were not very active and did not forage in their terrarium, as other spiders (Hallander, 1970; Higashi & Rovner, 1975; Samu *et al.*, 1999). Taking the high energy cost of active foraging into account, mothers' mobility during this period is in accordance with their energy balance (but see Bonte *et al.*, 2007). This slowdown of activity allowed females to reduce their basal metabolism and to tolerate wide

fluctuations in food resources, as suggested by previous authors (Ito, 1964; Miyashita, 1968; Anderson, 1974; Ford, 1977; Anderson & Prestwich, 1982; Tanaka & Ito, 1982; Prestwisch, 1983a, b; Stoltz *et al.*, 2010). The transition from cocoon to offspring care is thus associated with the suspension of foraging supported by a lowering of metabolism (glucose levels drop). This period of fasting is associated with depletion of triglyceride stores and to some extent protein stores. Therefore, triglycerides are a good source of energy for wandering *P. saltans* females as for other arthropods (Arrese & Soulages, 2010), according to previous observations of other wolf spiders during reproduction (Wilder *et al.*, 2010).

As spiderlings gradually leave their mothers' abdomen, mothers increased their locomotor activity, as do *P. monticola* (Bonte *et al.*, 2007) and returned to foraging. These behavioral modifications is associated with a low number of spiderlings on her back and females' energetic stocks increase as they start to forage regularly that is reflected by an increase in glucose levels on day 6 which strongly impacts triglycerides stores at day 8.

V. Conclusion

Our results show that *Pardosa saltans'* maternal care resembles that of other Lycosids. Maternal care implies a considerable energetic effort to produce as well as to transport offspring. Mothers compensate this energetic effort by modifying their foraging and locomotor activities. Female spiders meet their energy demands through an increase of food intake and not by a sacrifice of their own structural tissues or corporal reserves (lipids and proteins) during cocoon care. When caring for their young, our experimental females used their tissues extensively to fuel the energy demands of maternal behaviour although they were fed *ad-libitum*. Lipids contribute to maintain energy and to compensate the decrease of foraging when carrying young. So, due to these behavioural and physiological plasticity and adaptations, the levels of calories decrease weakly during the reproduction period. The costs of such energy-intensive maternal care remain largely unknown but *P. saltans* spiders are a good biological model to study maternal care allocations of time and energy differ between care of eggs and offspring.

Article **2**

Age and egg-sac loss influence maternal behaviour and locomotor activity of wolf spiders (Araneae, Lycosidae)

Abstract

Wolf spiders' (Lycosidae) maternal behaviour includes a specific phase called "egg brooding" which consists of guarding and carrying an egg-sac throughout the incubation period. The transport of an egg-sac can restrict mothers' exploratory and locomotor activity, in particular when foraging. The present study details the ontogeny of maternal behaviour and assesses the influence of age of egg-sac (or embryos' developmental stage) on vagrant wolf spider *Pardosa saltans* females' exploration and locomotion. We observed these spiders' maternal behaviour in the laboratory and evaluated their locomotor activity using a digital activity recording device. Our subjects were virgin females (without egg-sac) and first time mothers (with her egg-sac) who were divided into three groups. The first group of mothers were tested on the day the egg-sac was built (day 0), and the females of the other two groups were tested 10 or 15 days after they had built their egg-sac. We evaluated the effects of the presence and the loss of egg-sac on mothers' activity. *Pardosa saltans* females' behaviour depended on mothers' physiological state and/or age of egg-sac (developmental stage of embryos). Virgin females' behaviour was not modified by the presence of an egg-sac in their environment. Mothers' reactions to the presence, the loss and the recovery of their egg-sac varied during the maternal cycle. Maternal behaviour changed with age of egg-sac, but the levels of locomotor activity of mothers with egg-sacs was similar to those of virgin females. Loss of egg-sac modified the maternal behaviour and locomotor activity of all mothers; these modifications were greater on "day 15" when embryos had emerged from eggs. All mothers were able to retrieve their egg-sacs and to re-attach them to their spinnerets.

I. Introduction

Either one or both parents in many different groups of animals take care of their fertilized eggs (see Clutton-Brock, 1991; Royle *et al.*, 2012). This is a necessity for most oviparous endotherms as well as some ectotherms as it helps control offspring's abiotic and biotic environmental factors (water balance, thermoregulation, and to protect them from predators and parasites) (Nørgaard, 1951; Humphrey, 1974). Egg care is uncommon among terrestrial arthropods, perhaps because parents are seldom able to protect their young effectively, and selection favours the production of a large number of eggs (Lardies *et al.*, 2004; Tallamy & Wood, 1986 ; Tammaru *et al*., 2002). Arthropods' egg care can be divided into two types: egg attendance and egg brooding (Smiseth *et al.*, 2012). Egg attendance occurs when parents remain with their eggs at a fixed location, usually the oviposition site, after eggs have been laid. Egg brooding is a form of parental care when parents carry their eggs after laying. Egg brooding could offer more advantages than egg attendance when parents breed in unpredictable environments because brooding would then allow parents to move about more freely while still caring for their eggs (Smiseth *et al.*, 2012).

Some members of the Thomisidae, Pisauridae, Salticidae, and Lycosidae spider families (Bristowe, 1958; Eason, 1964, 1969; Peck & Whitcomb, 1970; Rovner *et al.*, 1973; Whitcomb & Eason, 1964) brood eggs and thus increase offspring fitness by providing protection against egg predators (Nørgaard, 1956; Kaston, 1965; Shear, 1970; Kullmann, 1972; Eberhard, 1974; Brach, 1976; Gertsch, 1979; Buskirk, 1981), parasitism (Lubin, 1974), and optimal thermoregulation conditions for their development (Bradoo, 1973; Humphreys, 1974; Nørgaard, 1951, 1956; Vlijm *et al.*, 1963). Furthermore, parents' costs may be lower for brooding than for attending because brooding parents can forage more easily while still caring for their eggs. However, the additional mass of eggs usually restricts locomotion and, consequently decreases foraging efficiency and increases predation risk (Kight & Ozga, 2002). Thus, maternal investment of egg-carrying species such as wolf spiders increases with time, incurring metabolic and ecological costs. Reports on the conditions of onset, maintenance and extinction of maternal care of egg-sacs suggest complex interactions between internal factors (mothers' physiological state) and external factors (i.e. stimulations from the embryos) (Bonnet, 1946; Nørgaard, 1956; Krafft & Horel, 1980; Vannini *et al.*,

1986; Horel & Gundermann, 1992; Roland *et al.,* 1996). The commonly held view is that arthropods' maternal behaviour is the stereotyped expression of a genetic programme. While some lycosid females refuse an egg-sac when they have not yet oviposited (Palmgern, 1944), virgin *Schizocosa ocreata* females adopted an egg-sac offered and reared the spiderlings that emerged from it as if they were their own (Wagner, 1995). This indicates that induction of maternal care is possible in spider as in vertebrates.

Females wolf spiders' (Lycosidae) egg brooding can be divided into the following stages: construction of sac (or cocoon), care of egg-sac, perforation of egg-sac, and transport of spiderlings after their emergence from the cocoon (Vlijm *et al.,* 1963; Eason, 1964; Whitcomb & Eason, 1967; Randall, 1977; Gertsch, 1979; Wise, 1993; Dolejš *et al.,* 2010; Foelix, 2011). While egg-sacs are being carried embryos develop into eggs, and then they hatch from the egg as partly developed pre-larvae (Vachon, 1957). They moult at least once (larva or juvenile stage) before leaving the egg-sac (Canard, 1987). No reports describe the ontogeny of maternal behaviour after egg-sac building and none have studied the effects of the developmental stage of eggs on vagrant mothers' exploratory and locomotor activities. Moreover, the locomotor activity of free-moving members of the genus *Pardosa* (Lycosidae) is important (Fujii, 1977; Gertsch, 1979), they forage on the ground and in the leaf litter of a wide variety of terrestrial habitats (Nyffeler *et al.,* 1994; Wise, 1993). Mothers trail their egg-sacs behind them attached to their opisthosoma (or abdomen) or their spinnerets for several weeks. In their natural environment, an egg-sac can become detached when a female forages and moves about actively. A female can search for her egg-sac after losing it (Colancecco *et al.,* 2007; Culley *et al.,* 2010; Fujii, 1980; Wagner, 1995) and can reattach it after she has found it (Colancecco *et al.,* 2007; Culley *et al.,* 2010; Eason, 1964; Foelix, 2011). However, mothers' exploratory behaviour and locomotor activity after losing and reattaching her egg-sac are undocumented.

We questioned whether egg-sac brooding is strictly programmed (through autonomous maturational processes) with oviposition, or is influenced by external factors (as stimuli from offspring). We hypothesized 1) that maternal behaviour cannot be accounted for by spontaneous endogenous changes (oviposition), but that it is induced and maintained by stimulations from the egg-sac that would depend on its age (embryos' developmental stage); 2) that mothers' exploratory and locomotor activities when searching for a lost egg-sac would vary during the maternal care period. We compared the behavioural sequences, exploratory and locomotor activities, under laboratory conditions, of vagrant wolf spiders, *Pardosa*

saltans mothers (Töpfer-Hofmann 2000) between unloaded spiders (virgins) and spiders with egg-sacs (mothers). We expected 1) that behavioural patterns would change after oviposition and construction of egg-sac, and that maternal care and locomotor activity would change in relation to age of egg-sac; 2) that after loss of egg-sac, mothers' exploratory and locomotor activities, recovery and rehanging of egg-sac would differ in relation to the time they had already invested in maternal care (mothers with older egg-sacs would search longer for it).

II. Materials and methods

The spiders of the genus *Pardosa* account for the largest number of lycosid species in Europe and are the most abundant and common genus. *Pardosa saltans* was described in 2000, but its biology and behaviour have not been studied and its maternal behaviour has never been described. No observations of females' locomotor activity have been made during the maternal period. Females become very conspicuous from May or June onwards, when they begin carrying around their egg-sacs. Females can reproduce twice, but invest most during the first cycle, in summer, whereas in autumn egg-sacs, if any, are lighter (although with larger eggs) (personal observations, unpublished data). Our observations, restricted to the laboratory, show that egg-sacs remain attached to the maternal spinnerets by silk threads for about 25 days. The fact that, while carrying egg-sacs, females continue to be mobile while feeding (unpublished data) makes them ideal models to study trade-off between maternal behaviour and locomotor/foraging activity.

Our *Pardosa saltans* female subjects were virgin adults collected during the copulation period and captured in a forest near the biological station of Paimpont (University of Rennes 1 propriety; France; 48°00'05.67" North, 2°13'46.65" West) during April-May 2015. Females were kept individually in circular terrariums (10 cm diameter x 5 cm high) with water and without soil, and were bred at 20 ± 1°C, 56 ± 1 % relative humidity under a L:D, 8:20 h photoperiodic cycle. Spiders were fed every three days *ad libitum* with juvenile crickets (*Acheta domestica)* alternating with adult flies (*Delia radicum*). All mated females were checked at least twice a day (morning and evening) to record oviposition.

II.1. Embryos' developmental stage in relation to age of egg-sac

In order to see if characteristics of the egg-sac are modified during the ontogeny different measurements were done. To measure egg-sacs, they were removed rapidly with a brush from mothers with a "Day 0" (n=10), "Day 10" (n=10), or "Day 15" (n=10) cocoon. Cocoons were weighed (Sartorius electronic balance, ± 0.01 g; Palaiseau, France), measured on micrographs and then the egg-sacs were opened. Eggs were counted in the cocoon on "day 0", embryos' developmental stage was assessed in the cocoon on "day 10" and on "day 15". The equation for a probate spheroid, $V = 4/3\ \pi\ (ab^2)$, where a = length and b = width of the egg-sac (in mm), was applied to determine the volume of egg-sacs.

II.2. Maternal behaviour sequences during egg brooding in terrarium

The behaviour of 20 mothers in their terrarium was recorded: just after oviposition, construction and attachment of the egg sac ("Day 0"), after 10 days ("Day 10"), after 15 days of egg-sac care ("Day 15"), and when young emerged from their egg-sac. All behaviours displayed by the mothers in their brooding terrarium were recorded: auto-centred behaviours and those involving their egg-sac. All observations were made ten minutes per hour per state during daytime (between 8.00 and 19.00 hours) in natural light and were recorded using a Canon HD (HG20) camera.

II.3. Exploratory behaviour and locomotor activity of females in a novel environment

Two experimental groups were observed in a glass arena (10 cm diameter and 5 cm high): 14 "virgin" young females (not mated) were controls and 57 "mothers with an egg-sac"

during the first maternal care cycle on “Day 0” (n = 19), on “Day 10” (n = 19), and then on “Day 15” (n = 19). All subjects were observed during the same period of day (between 8.00 and 12.00 hours) under natural light. All females were given one fly the day before the experiment and tested the following day only if the prey had been consumed (so that the activity observed was exploration of the novel environment and not foraging). Two of arenas were used simultaneously so we could pair subjects with different physiological states, combining all possibilities (virgin/mother, “day 0”/“day 10”, “day 0”/“day 15”, “day 10”/“day 15”, etc). This methodological precaution aimed to counteract effects of changes in temperature and humidity on the spiders’ behaviour. To eliminate bias due to the positions of the arenas, we alternated the physiological groups between sides between trials. The arenas were washed with water then ethanol (70 %) between trials to eliminate any possible intraspecific cues that could influence activity. All the behaviours observed in the terrariums (self-centred and involving egg-sac) were recorded in this novel environment. We monitored spiders’ exploratory and locomotor activities during each trial. The coordinates of females were recorded every 12 frames / second using a Canon HD (HG20) camera and an automated video-based, digital-data collection system (Swiss-Track software 4.0.0 with the nearest neighbour tracking method). We measured surface explored (percentage) and distance covered (cm / min) with the R software (R 3.0.2). Distance covered was calculated every 4 frames per second. When distances covered were less than 3.33 mm / sec they were not taken into account.

Three tests assessed females’ activities:

- *Test 1: during egg-sac carrying*

A subject, either a virgin or a mother with her egg-sac was placed in the centre of the arena under a vial (1.5 cm diameters) 1 min before the test started. The vial was removed and the subject was allowed 5 min to habituate to the arena prior to data collection. After this period, the spider’s activity was monitored for 10 min.

At the end of a test, all spiders (virgins and mothers with egg-sac) were anesthetized in the arena by chilling at 5°C for 5 min. Egg-sacs were removed from their mothers rapidly with a brush. Egg-sacs were transferred individually into a vial and stored at room temperature. Virgins and mothers woke up after 1 min at room temperature and were placed under a vial in the centre of the arena just before test 2.

- *Test 2: after the loss of egg-sac*

Mothers without their egg-sac and virgin spiders (to assess the effects of anaesthesia and manipulation) were tested following the same procedure as for test 1. The spider's activity was monitored for 10 min. Then, at the end of test 2, the egg-sac was placed in the arena opposite the female, 3 cm away. Virgin females were tested with a 15-day old "unknown egg-sac" (to assess the influence of females' physiological state on egg-sac acceptation) and mothers were tested with their own egg-sac. To evaluate the efficiency of egg-sac search and the rapidity to return to the normal situation (egg-sac attached to the spinnerets) we recorded: time taken by females to find their egg-sac, durations of egg-sac manipulation (time between first contact and manipulation of cocoon with a leg or a pedipalp, and first contact with abdomen) and egg-sac hanging (time between contact of egg sac with abdomen and attachment to spinnerets). When a female had not contacted or attached her egg-sac after 30 min, the egg-sac was considered "not retrieved".

- *Test 3*: *after hanging of egg-sac*

Females' exploratory and locomotor activities were recorded for 10 min after they had retrieved their egg-sac.

At the end of test 3, all mothers with their egg-sac were replaced in their terrarium until emergence of spiderlings.

II.4. Statistical Analysis

Data are expressed as means ± SE. Statistical analyses were performed using R software (3.0.2) (R Core Team, 2013). Differences were estimated using analyses of variance (one-way ANOVA with repeated variable). Surface area explored were divided by 100 and then converted to √ arcsine proportions to normalize data before an ANOVA was computed. When differences between means were significant at the $p < 0.05$, and a posteriori Tukey's (HSD) tests established the inter-group comparison. Frequencies of behaviours were analysed using χ^2 tests and a Bonferroni's correction was applied. In all cases, the differences were considered significant at $p < 0.05$.

III. Results

III.1. Embryos' developmental stage in relation to age of egg-sac

Soon after copulation (14 ± 1 days) and immediately after oviposition (44-23 eggs; 35 ± 10 eggs), the females started to construct then attach their egg-sac to their spinnerets (Fig. 11). Under our laboratories conditions, after 10 days incubation, embryos, at the first pre-larva stage (with incomplete extremities and yolk reserves) were visible in eggs. After 15 days, a white seam appeared all round the grey-bluish egg-sac and 2nd stage pre-larvae (segmented legs and poor mobility) started to hatch from the egg. Weights (15.29 ± 0.77 mg**)** and volumes (13.97 ± 0.37 mm^3**)** of cocoons on days 0, 10 and 15 were similar ($F_{2,43}$ = 2.26 p = 0.07 and $F_{2,43}$ = 1.84, p = 0.18).

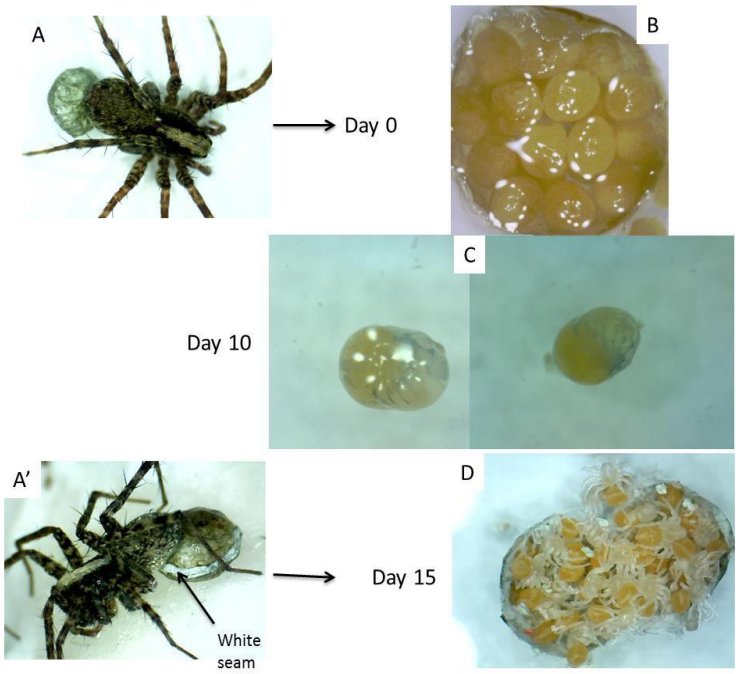


Figure 11: Mother Pardosa saltans with a 0-day old and a 15-day old egg-sac (A and A'). Embryonic development in relation to age of egg-sac: (B) egg stage; (C) pre-larva stage in 10-day old eggs; (D) pre-larva out of the egg after 15 days of development.

III.2. Maternal behaviour during egg-sac care in terrarium

After oviposition and while carrying their egg-sac, females' behaviours included raising and lowering one of their first pair of legs (= "waving"), passing a leg or a pedipalp between their chelicera (= "grooming"), hitting the ground with their first pair of legs (= "hitting"), putting their egg-sac under their cephalothorax attached to an abdominal fold so that their pedipalps and first and third pairs of legs could be in contact with the egg-sac (= "egg sac under cephalothorax"), detaching their egg-sac from their spinnerets and turning it with their pedipalps and first and third pairs of legs (= "egg-sac manipulation") (cf. movie files, supplementary data). When spiderlings started to hatch their mothers assisted their emergence: females then rotated their egg-sac with their legs and palps and cut the seam of the egg-sac with their chelicerae. As the egg-sac was torn apart, the young started coming out and climbing onto their mother's back.

III.3. Test 1: Influence of egg-sac age on females' exploratory behaviour and locomotor activity in a novel environment

The exploration of a novel environment by mothers "with an egg-sac" varied significantly with the age of their cocoon (χ^2 = 108.8, df = 8, $p < 0.0001$). On "Day 0" mothers only "waved" and "groomed" their legs and pedipalps (Fig. 12A). These females' behaviour did not differ from that of "virgins". Mothers on "Day 10" expressed significantly more "waving" and manifested "hitting" activity. Only mothers on "Day 15" expressed two behaviours involving their egg-sac: placing "egg-sac under cephalothorax" and "egg-sac manipulation".

Both virgins and mothers walked preferentially close to the periphery of the arena (Fig. 13C). Mothers carrying an egg-sac raised their opisthosoma during exploration, gathering their legs more closely under themselves. Mothers' locomotor activity did not vary significantly during the egg-sac care period and was similar to that of virgin females (distance covered: $F_{3,67} = 0.68$, $p = 0.51$; surface explored: $F_{3,67} = 0.85$, $p = 0.47$) (Fig. 13A and 13B). Distances covered by mothers with an egg-sac ranged from 16.5 to 19.2 cm/min, and mothers explored approximately 40-50 % of the arena surface.

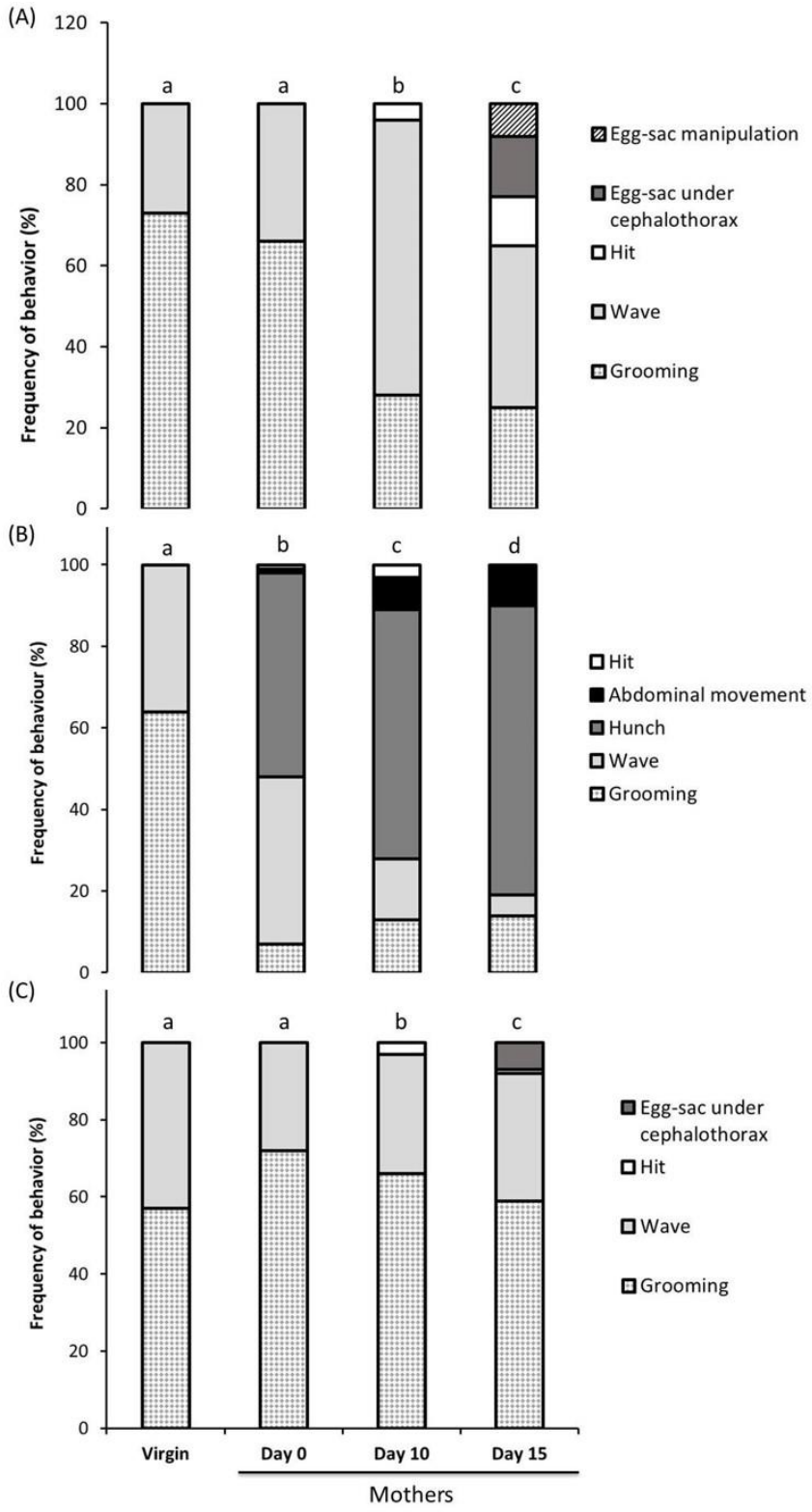


Figure 12: Pardosa saltans spiders' behaviour (in frequencies) during exploration: (A) virgins (n = 14) and mothers carrying a 0-, 10- or 15-day old egg-sac (n = 57); (B) virgins and mothers after egg-sac loss; (C) virgins and mothers after contact and hanging of egg-sac. Frequencies were compared using χ^2 tests: different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

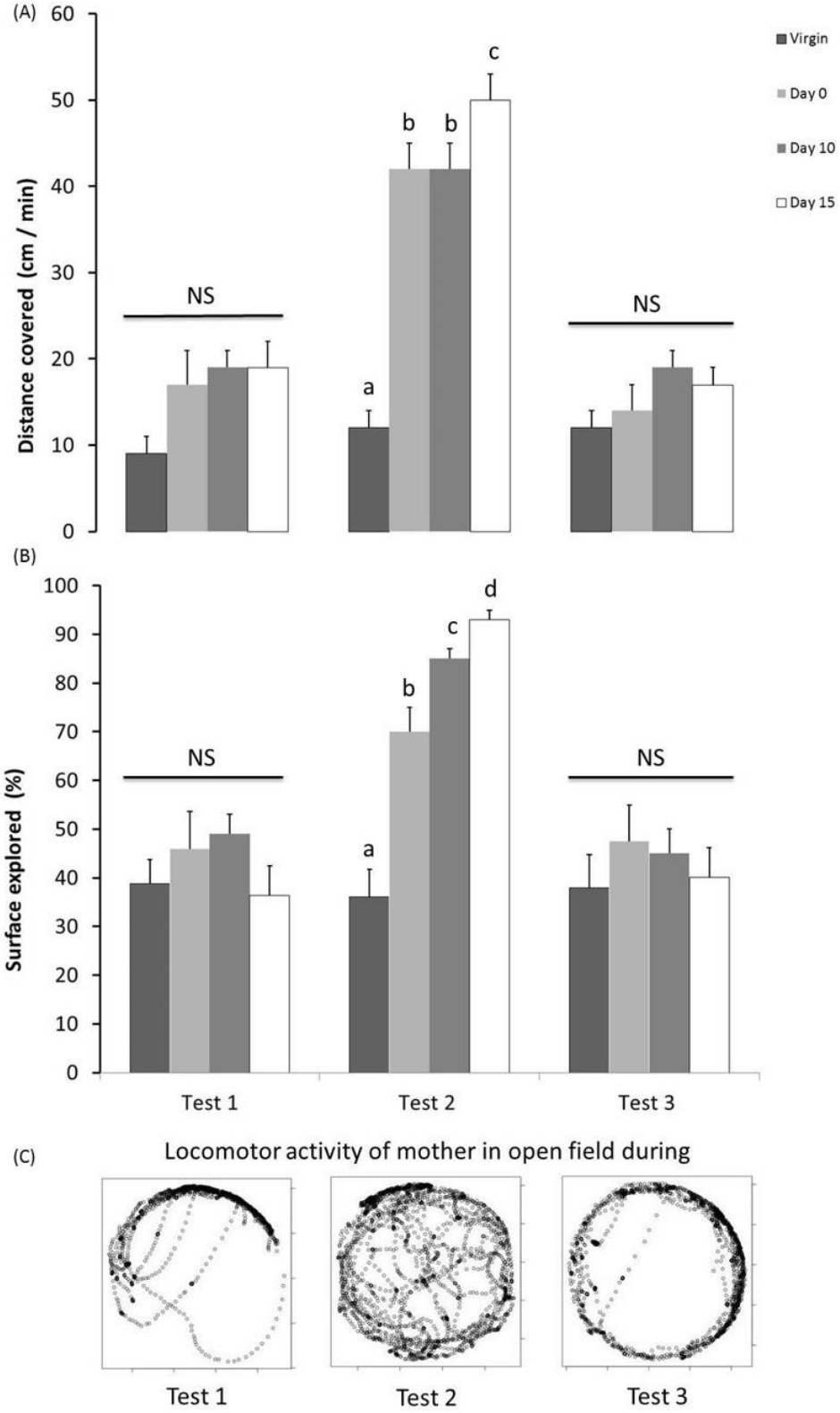


Figure 13: Latencies to egg-sac retrieval (sec), duration of egg-sac manipulation (sec), and latency of egg-sac hanging (sec) (n = 57). Latencies were compared using ANOVAs: different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

III.4. Test 2: Females' activity after loss of egg-sac in relation to age of egg-sac

Mothers modified their behaviour significantly after losing their egg-sac ("Day 0" : χ^2= 97.12, df = 5, p < 0.0001; "Day 10" : χ^2= 99,55, df = 5, p < 0.0001; "Day 15" : χ^2= 143,06, df = 5, p < 0.0001); the females' reactions to this loss varied with age of egg-sac (χ^2= 3813, df = 6, p < 0.0001) (Fig. 12B). Mothers on "Day 0" and on "Day 10" expressed "hitting" and two new activities: females hunched their legs and palps under themselves staying in maximum contact with the ground (="hunch") and made lateral movements of their abdomen (="abdominal movement"). Mothers on "Day 15" also expressed "hunch" and "abdominal movement" but not "hitting". "Hunch" was the motor act expressed the most frequently (50-71 %) by the mothers after egg-sac loss. Mothers on "Day 0" made significantly fewer "abdominal movements" and "waved" more than on "Day 10" and "Day 15" (p < 0.0001). Mothers "waved" (p = 0.043) and "hit" significantly more frequently on "Day 10" than on "Day 15" (p < 0.0001).

While exploring, mothers without an egg-sac maintained their opisthosoma in a straight line in relation to their prosoma and parallel to the substratum, as did virgins. All mothers moved significantly more than did virgin females (distance covered: $F_{(3,67)}$ = 27.29, p< 0.0001; surface explored: $F_{(3,67)}$ = 22.65, p < 0.0001) (Fig. 13A and B). Mothers covered similar distances on "Day 0" and on "Day 10", but on "Day 10" mothers explored significantly larger surfaces than on "Day 0" (p = 0.005). Mothers moved and explored significantly more on "Day 15" than on "Day 0" (p = 0.04) and "Day 10" (p < 0.001). Furthermore, the mothers' locomotor patterns were modified during this test: from straight displacements when they had an egg-sac attached to their spinnerets (test 1), their trajectories winding more after losing their egg-sac Fig. 13C).

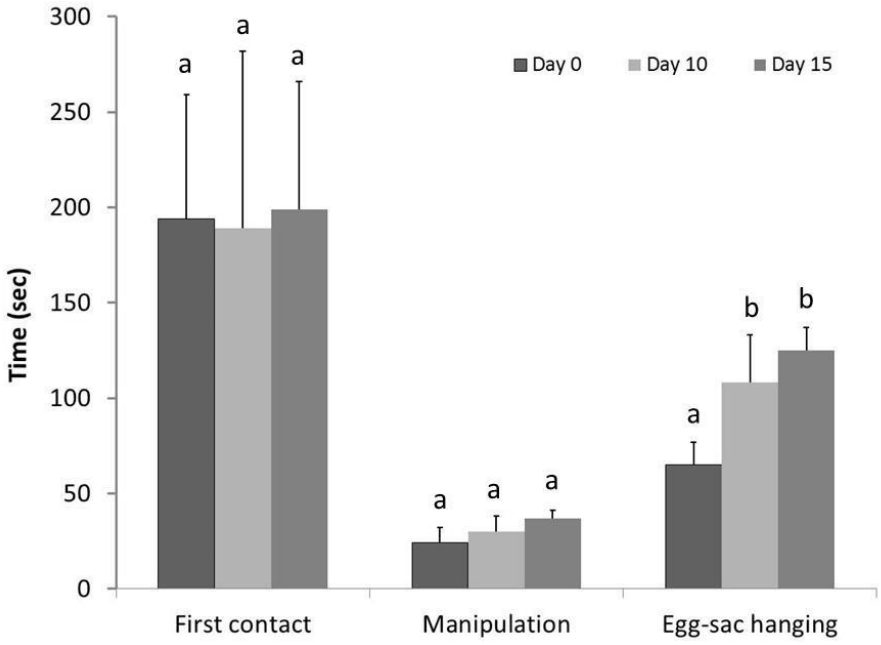


Figure 14: Locomotor activity of virgins (n = 14) and mothers (n = 57) carrying their egg-sac (Test 1), after lost their egg-sac (Test 2) and after egg-sac hanging (Test 3): (A) distances covered by spiders (cm/min) during the 3 tests; (B) surface explored (%) during the 3 tests; (C) locomotion pattern of a mother during the 3 tests. Distances covered and surfaces explored were compared using ANOVAs: different letters indicate a significant difference at p < 0.05, NS = not significantly different.

III.5. Test 3: Females' activity before and after hanging egg-sac in relation to age of egg-sac

After introduction of their egg-sac in the arena, mothers did not go directly to their egg-sac but followed winding trajectories until either their palps or one of their first three pairs of legs randomly contacted it. Delays to contact egg-sac and manipulate it did not differ significantly between mothers on "Day 0", "Day 10" and "Day 15": mothers recovered and contacted the egg-sac after 197 ± 46 sec ($F_{2,54}$ = 0.004, p = 0.95) and manipulated the egg-sac for 30 ± 4 sec ($F_{2,54}$ = 0.46, p = 0.64) (Fig. 14). Mothers hung their egg-sacs significantly more rapidly on "Day 0" than on the other days ("Day 0": 65 sec; "Day 10" and "Day 15": 108-125 sec; $F_{2,54}$ = 3.12, p = 0.05).

Females' recovery reactions did not vary with age of egg-sac (χ^2 = 9.71, df =5, p = 0.084) (Fig. 12C). However, experiencing loss modified significantly mothers' behaviour after cocoon hanging (χ^2 = 18.89, df =8, p = 0.01). "Day 0" mothers expressed the same behaviours after hanging as in test 1. "Day 10" mothers behaviours were similar to those during test 1 but their frequencies differed significantly (χ^2 = 26.85, df =4, p = 0.001). "Day 15" mothers "groomed" more than during test 2 (χ^2 = 137.37, df =5, p = 0.0001). "Day 15" mothers did not manipulate their egg-sac during test 3 like they did in test 1.

Mothers' locomotor activity following egg-sac hanging did not vary with age of egg-sac (distance covered: $F_{(3,67)}$ = 1.47, p < 0.23; surface explored: $F_{(3,67)}$ = 0.67, p < 0.57) (Fig. 13A and 13B). Their locomotor activity was then similar to that observed before loss of egg-sac during test 1 ($F_{3,67}$ = 1.47, p = 0.23) and was significantly lower than during test 2 ($F_{3,67}$ = 37.40, p < 0.0001). Mothers carrying an egg-sac raised their opisthosoma during exploration, gathered their legs more closely under them, and their displacements were straight similar to those observed during test 1 (Fig. 13C).

The fact that virgin females' behaviour (χ^2 = 0.43, df =3, p = 0.93) and locomotor activity did not vary significantly between tests (distance covered: $F_{(3,39)}$ = 0.85, p < 0.47; surface explored: $F_{(3,39)}$ = 1.03, p < 0.59), showed that anaesthesia and/or manipulations related to the experiment did not influence spiders' behaviour or locomotor activity. Moreover, none of the virgin females manipulated or hung "a live unknown" egg-sac.

III.6. Maternal care until emergence of young

Mothers in their terrarium carried their egg-sac attached to their spinnerets until spiderlings hatched and egg-sac guarding lasted 25 ± 2 days. When spiderlings were ready to hatch the female spiders opened their egg-sac to let the spiderlings emerge. Young emerged from all test egg-sacs (n = 57).

IV. Discussion

IV.1. Behaviour and locomotion during cocoon care

Our observations show that two behavioural acts are common to virgin and mother *P. saltans*: "waving" and "grooming". These behaviours are probably not related to cocooning, but to exploration of the environment (Eason, 1969; Escalante *et al.*, 2015; Hebets *et al.*, 1996; Miller & Miller, 1987; Papke *et al.*, 2001; Roberts & Uetz, 2004; Rundus *et al.*, 2015). Only mothers with "day 10" and "day 15" egg-sacs hit the ground with their first pair of legs. This "hitting" behaviour is an exploration act developed by mothers and could be a vibratory stimulus for embryos. The cocoon is never in contact with the ground during mothers' locomotor activity. Thus embryos might not perceive vibrations transmitted by the ground. However, we suppose that "hitting" enables vibrations due to the percussion of legs to be transmitted to the egg-sac through the opisthosoma. These vibrations could enhance the development of embryos' sensory organs (Barth, 2015; Foelix, 2011). Mothers with "day 15" cocoons manifested previously unobserved behaviours oriented towards their egg-sac: they placed their egg-sac under their cephalothorax, detached it from their spinnerets and manipulated it with their third pair of legs. Egg-sac manipulations appeared on "day 15", when mobile embryos (2^{nd} stage pre-larvae) produced vibrations which could stimulate cocoon manipulations as reported for other spiders (Krafft, 1981; Lubin, 1974; Viera *et al.*, 2007b). These egg-sac manipulations are considered maternal care, and appear progressively with age of cocoon and more precisely after hatching of the embryo in the egg-sac. We suppose that stimuli emitted by mobile embryos (cf. movie files, supplementary data) in the egg-sac, together with mothers' physiological changes, are necessary to maintain and develop maternal care as for other species (Palmgern, 1944; Horel & Gundermann, 1992; Krafft & Horel, 1980; Culley *et al.*, 2010).

Our results show that females' horizontal locomotor activity was not modified by the presence of an egg-sac and that the age of a cocoon did not influence locomotion. *Pardosa saltans* mothers' and virgin females' locomotor activities were similar, only moving round the periphery of the arena and their locomotion was straight. This locomotion is possible for mothers carrying an egg-sac due to a modification of the position of their legs and of the

protraction / retraction ratios, as for *P. tristis* (Moffett & Doell, 1980). Nevertheless, females carrying an egg-sac adopted a more elevated stance than did virgin spiders like *P. tristis* (Moffett & Doell, 1980). Raising their opisthosoma when an egg-sac is attached may protect the egg-sac from injury in rough terrains where these spiders live, and it may keep their egg-sac out of the way of their back legs.

IV.2. Behaviour and locomotion after cocoon loss

Cocoon loss affected the behaviour and the locomotion pattern of all mothers. Their locomotor activity increased, covering about 40 to 50 cm/min and they explored the arena completely following winding trajectories. The fact that virgins' behaviour and locomotor activity were not modified after anaesthesia and/or manipulations related to the tests shows that modifications of mothers' behaviour and locomotion were related to egg-sac loss. After egg-sac loss, mothers developed two new behaviours: "hunching" and "abdominal movements". The spiders are known to use multimodal cues, such as vibratory and chemical signals, to orientate in their environment. For example, they broadcast vibratory signals with specific movements hitting the ground with their first pair of legs, palps or opisthosoma (Bonnet, 1946; Seyfart & Barth, 1972). Furthermore, mothers' "abdominal movements" recall spiders' chemical marking during sexual or foraging exploration (Tietjen, 1977). We suggest that mothers who had lost their egg-sac expressed these two behaviours to detect the lost egg-sac, and/or to explore a larger surface.

As these modifications increase the efficiency of mothers' exploration, they could be associated with searching. This "searching" behaviour was observed from the first day of cocooning and its frequencies increased with age of cocoon. Embryos' normal development and emergence must be facilitated by their mother, so loss of egg-sac means death of offspring. All spider species can produce additional egg sacs if their previous egg-sac is removed (Fink, 1987; Marques *et al.*, 1998; Stefani *et al.*, 2011a; Toyama, 2003). Females have the physiological ability to produce additional eggs, but may be limited in the number of offspring they can care for without negatively impacting their residual fitness. A mother who has just produced a cocoon has spent a great deal of energy and she cannot produce another one rapidly. So it is advantageous for her to find her egg-sac. Females' metabolic and

ecological costs for egg-sac carrying are high (Eason, 1964; Fujii, 1977; Gertsch, 1979; Li & Jackson, 2003). Mothers' maternal effort increases with age of egg-sac due to their previous overall investment in maternal care and egg-sac carrying. That is why searching varied with egg-sac age, increasing with time spent with an egg-sac.

IV.3. Behaviour and locomotion after discovery of the cocoon

When the egg-sac had been found, all the mothers attached their egg-sac after touching it. None of the virgin females attached an egg-sac. This confirms that maternal behaviour is linked to the act of oviposition (Opell, 2001; Horel & Gundermann, 1992; Wagner, 1995). Ortega-Escobar (2011) observed that *Lycosa tarantula* can see fixed contrast differences. If *P. saltans'* vision is similar to that of *L. tarantula*, females should be able to locate the grey-bluish egg-sac on a white surface even if is immobile. However, *P. saltans* mothers moved about randomly in the arena instead of going directly to their cocoon, suggesting that their visual system differs from that of *L. tarantula* and is not used in this case.

When mothers touched their cocoons with their palps or first three pairs of legs, they immediately grasped it between their legs and began to manipulate it. We suppose that during this contact they perceive tactochemical stimuli as do other spider species (Barth & Schmitt, 1991; Fujii, 1980). Durations of this manipulation did not vary significantly among mothers. We hypothesize that the egg-sac emits chemical cues that stimulate manipulation to maintain contact with the mother. Every mother attaches her cocoon directly to her spinnerets after this manipulation, contrary to *Pardosa tristis* (Moffett & Doell, 1980). "Day 0" females did this faster than the others. We noted that it was harder to separate cocoons from their mothers on "day 15" and "day 10" than on "day 0". We hypothesize that longer the attachment period the more care spiders take to attach older egg-sacs to their spinnerets. Weight and volume of egg-sacs did not vary with age, but maternal effort and overall investment were more important when egg-sacs were older. So females with "day 10" and "day 15" egg-sacs probably attach them with more care (more silk and better technical skills). Mothers' locomotor activity and behaviour after attachment were similar to those before loss. This similarity supports the previous hypothesis predicting that the behaviour observed during loss of egg-sac is

searching. However, “day 15” mothers did not detach and manipulate their cocoons contrary to before the loss. This could be explained by the fact that they had just attached it.

V. Conclusion

Wolf spiders’ egg-sac carrying and maternal behaviour appeared to be chronologically linked to females’ physiological state and maybe age of cocoon. Mothers manipulate their cocoon only after carrying it for at least 10 days. Mothers do not change their locomotor activity when their egg-sac is attached to their opisthosoma, but when they lose their egg-sac they modify their locomotor activity and behaviour so as to retrieve it. All mothers display this behaviour and its expression is linked to the age of the cocoon (or maternal time). Behaviour involving a cocoon appeared to be elicited by new stimuli from the egg-sac acting to maintain and develop maternal care. Further studies are necessary to verify that mother wolf spiders are able to recognize the developmental stage of the egg-sac, and to investigate stimuli (vibration or chemical) used during this maternal ontogeny.

CHAPITRE 2

Signaux chimiques et vibratoires

Article **3**

Do wandering wolf spiders' egg-sacs emit signals perceived by mothers? Behavioural and chemical approach.

Fanny Ruhland[1*], Stefan Schulz[2], Marie Trabalon[1]

1 - Université de Rennes 1, UMR-6552 CNRS EthoS, Rennes, France

2 – Technical Univeristy Braunschweig, Institute of Organic Chemistry, Braunschweig, Germany

Keywords: kin recognition, chemostimuli, lycosid, *Pardosa saltans*

(en préparation)

Article **4**

Variations of cocoon external lipids during wolf spiderlings' development.

Fanny Ruhland[1*], Stefan Schulz[2], Marie Trabalon[1]

1 - Université de Rennes 1, UMR-6552 CNRS EthoS, Rennes, France

2 – Technical Univeristy Braunschweig, Institute of Organic Chemistry, Braunschweig, Germany

Keywords: lipids, lycosid, *Pardosa saltans*

(en préparation)

Article **5**

Identification des composés cuticulaires des femelles.

(résultats préliminaires)

Nous venons de voir que le comportement maternel de *Pardosa saltans* inclut une phase spécifique appellée “egg brooding” qui consiste à transporter et prendre soin d’un cocon tout au long de la période d’incubation. Le transport du cocon peut restreindre le comportement exploratoire et locomoteur des mères, en particulier lorsqu’elles sont en phase de prédation. Nous avons détaillé l’ontogenèse du comportement maternel et identifié l’influence de l’âge du cocon (ou état dévelopemental des embryons) sur l’exploration et la locomotion des mères errantes. Le premier groupe de mères a été testé le jour où le cocon était formé (jour 0), et les mères des deux autres groupes ont été testés 10 ou 15 jours après la construction du cocon. Nous avons évalué les effets de la présence du cocon et de sa perte sur l’activité des mères. Nos résultats montrent que le comportement des femelles *P. saltans* est dépendant de l’état physiologique des mères et/ou de l’âge du cocon. Le comportement des femelles vierges n’est pas modifié par la présence d’un cocon dans leur environnement. Les réactions des mères à la présence, la perte et la récupération de leur cocon varient au cours du cycle maternel. Le comportement maternel change avec l’âge du cocon, mais l’activité locomotrice des mères transportant un cocon est similaire à celui des femelles vierges. La perte du cocon modifie le comportement maternel et l’activité locomotrice de toutes les mères. Ces modifications sont plus importantes avec des cocons âgés de 15 jours lorsque les jeunes ont émergé des œufs. Toutes les mères *P. saltans* sont capables de retrouver leur cocon et de le ré-attacher à leurs filières.

Nos résultats indiquent également qu’il existe, chez les araigénes errantes produisant des soins parentaux, une ontogenèse du comportement maternel au cours de la période de gardiennage du cocon. Il existe ainsi des mécanismes entraînant une plasticité du comportement maternel. Il est donc possible que l’initiation mais surtout le maintien et la complexification des comportements de soins résultent d’une interaction entre des méchanismes endogènes (i.e. acte d’oviposition) et externes (i.e. stimuli de la part des embryons).

Les araignées utilisent les composés lipidiques présents sur la soie ou sur la cuticule comme signaux dans le cadre des interactions sociales (dans les groupes grégaires, sub-sociaux, et sociaux) et reproductives (sexuelles et parentales) (Schulz, 1997 ; Prouvost *et al.*, 1999b ; Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). D’autres auteurs ont observé que des embryons, présents dans un cocon fixé sur une toile, émettent des signaux vibratoires qui sont perçus par la femelle (Viera *et al.*, 2007c). Les signaux vibratoires et/ou chimiques émis par les jeunes à

travers le cocon peuvent donc être utilisés par la mère pour modifier son comportement de soin.

Dans notre étude, nous avons réalisé des observations comportementales et des analyses chimiques.

Objectifs :

(1) identifier les composés lipidiques présents à la surface de la cuticule des mères et sur la soie de leurs cocons ; puis regarder la variation qualitative et quantitative de ces composés au cours du cycle de développement.

(2) identifier le rôle combiné de quelques composés lipidiques et signaux vibratoires dans certains processus comportementaux

Pour cela, dans une première étude (**Article 3**) nous avons étudié la capacité des femelles à reconnaître l'apparentement des cocons, la viabilité des jeunes au stade pré-émergence et nous avons identifié les composés lipidiques présents sur la soie, à la surface des cocons.

Dans une deuxième étude (**Article 4**) nous avons analysé les variations des composés lipidiques présents à la surface des cocons en fonction du stade de développement des jeunes. Dans cette seconde expérience, nous avons également étudié l'interaction entre des indices endogènes (bio-rythme de la femelle) et exogènes (chimiques et vibratoires) dans l'expression du comportement d'ouverture du cocon par la femelle.

Enfin dans une dernière expérience (**résultats préliminaires**), nous avons identifié et analysé la variation des composés lipidiques présents sur la cuticule des mères au cours de la période de gardiennage du cocon. La composition des extraits cuticulaires maternels est comparée à celle des extraits provenant de la soie du cocon d'âges différents afin de savoir si les composés lipidiques présents chez les mères sont comparables à ceux de leurs cocons.

Analyses chimiques des extraits biologiques
Méthodologie générale

I. Extraction des produits chimiques

L'extraction des produits chimiques des mères et du cocon a été réalisée dans 200 µl de methanol pendant 10 minutes à 20°C puis les extraits ont été evaporés sous azote gazeux, et congelés à sec à -28°C.

II. Identifications chimiques par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires individuelles de chaque composé présent dans l'échantillon analysé. Cette méthode permet de recueillir des informations sur sa nature, sa composition et même sa structure.

L'extrait biologique avant l'analyse par SM subit une ionisation afin de séparer les différents types d'ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Une accélération puis une séparation des ions sous vide poussé permet au détecteur de convertir le courant ionique en courant éléctrique, il peut alors déterminer le rapport masse/charge des ions et donc leur nature. Les molécules sont alors identifiables par leur composition en un certain nombre de particules ionisées possédant un rapport masse/charge et une intensité exprimée en pourcentage de la particule la plus fréquemment retrouvée. Le spectre de fragmentation de la molécule peut être représenté par un histogramme dont la hauteur des barres est proportionnelle à l'abondance des ions. Les spectres obtenus peuvent alors être comparés à ceux déjà répertoriés dans une banque de données informatique afin de déterminer le composé chimique présent.

Ici afin d'identifier les produits chimiques présents à la surface des cocons et des cuticules des mères, les extraits ont été dissous dans 400µL de dichlorométhane puis à nouveau séchés sous azote. Les échantillons ont ensuite été dilués dans 10 µL de dichlorométhane, puis 4µL de l'extrait dilué ont été dérivatisés avec 20 µL de N-methyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) pendant 60 minutes à 60°C. Cette dérivatisation est une silylation qui permet à des composés très polaires d'être transformés afin d'être élués plus facilement et ainsi détéctables à des températures raisonnables de décomposition. Les échantillons dérivatisés ont ensuite été séchés sous azote avant l'ajout de 10µL de dichlorométhane. Chaque échantillon (1 µL) a été analysé à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-SM 1890A) équipé d'une colonne HG-5 (30 m, 0 ,25 mm). La température du GC était fixée à 120°C pendant 5 minutes, puis augmentait de 10°C/min jusqu'à 320°C avant de rester en isotherme pendant 60 minutes.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le **Professeur S. Schulz** (Braunschweig, Allemagne).

III. Quantification des composés chimiques par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie permet de séparer les constituants d'un mélange d'une phase liquide ou gazeuse homogène. Le principe repose sur les équilibres de concentration des composés présents, entre les deux phases non miscibles, dont l'une emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, mobile, se déplace au contact de la phase stationnaire. L'entraînement à des vitesses différentes des composés présents dans la phase mobile conduit à leur séparation.

Les échantillons analysés ont été dissous dans 50 µL de dichlorométhane. Chaque extrait (2 µL) a été injecté sous forme liquide dans un injecteur à 250°C qui permet de vaporiser l'échantillon et d'amener le flux gazeux en tête de colonne. Nous avons utilisé le mode sans diviseur (splitless) afin de détecter le plus de composés possibles dans nos extraits dilués. La colonne permet de séparer les différents constituants du mélange, ici nous avons utilisé une colonne capillaire de silice apolaire CP-Sil-5CB (30 m de long et 0.32 mm

diamétre; Chrompack, Les Ulis, France). L'hélium entraîne les différentes molécules qui seront plus ou moins adsorbées dans la colonne en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. La désorption est facilitée par une montée en température progressive du four qui contient la colonne capillaire, programmée de 120 à 320°C à raison de 10°C/minute et un isotherme de 10 minutes. A la sortie de la colonne les produits entrent dans un détecteur, ici nous avons utilisé un détecteur à ionisation de flamme (FID) chauffé à 250°C. Celui-ci utilise une flamme d'hydrogène brûlant dans un excès d'oxygène. Les composés organiques donnent lieu à la formation d'ions. En présence d'un champ électrique, ces ions peuvent être captés sur une électrode de collecte, et on peut ainsi mesurer le courant électrique après amplification, car le courant produit réellement est très faible. La réponse du détecteur est liée à la température de la flamme et dépend des différents débits de gaz (gaz vecteur, hydrogène et air pour la flamme). Il faut souligner que le détecteur à ionisation de flamme est un détecteur massique, le signal est donc proportionnel à la quantité de produit.

Un chromatogramme est obtenu grâce au niveau de dépolarisation électrique. Nous pouvons ainsi observer une succession de pics représentant chacun un produit constituant le mélange injecté. Un intégrateur couplé au chromatographe intègre la surface de chaque pic. Celle-ci est proportionnelle à la quantité du produit représentée par le pic.

Article **3**

Do wandering wolf spiders' egg-sacs emit signals perceived by mothers? Behavioural and chemical approach.

Abstract

This study investigates proximal cues which elicit cocoon recognition and stimulate cocoon care by *Pardosa saltans* wandering wolf spider (Töpfer-Hofmann 2000). We evaluated mothers' adoption behavior in the presence of own or unfamiliar, viable or unviable 15 day-old cocoons. Females' *P. saltans* adopt and carry unfamiliar cocoons as if they were their own, and do not discriminate between viable and unviable cocoons when adopting them (15 day-old cocoons). Unviable cocoons are abandoned only the end of the juvenile development period when spiderlings are due to emerge from the cocoon. We investigated the cues emitted by cocoons and perceived by mothers by presenting them cocoons deodorized by different polarity solvents. Polar and apolar compounds appeared involved in maternal care stimulation. We present the first characterisation of silk polar lipids on the surface of a spider's cocoon. We analysed extracts of cocoons to evaluate the relative amounts of chemostimuli perceived by mothers. The cocoon surface extracts were composed of a mixture of alcohols, hydrocarbons (*n*-alkanes), fatty acids, methylesters and monoglycerides. Glycerides of fatty acids, sterol (cholesterol) and *n*-pentacosane were the main compounds of the lipid extract of 15 day-old cocoons.

I. Introduction

Most spiders enclose their eggs in some form of silk cocoon (Turnbull, 1973; Foelix, 2011). This structure permits embryonic development, but many factors can affect the enclosed eggs and spiderlings, including thermal stress, fungal attacks, predator or parasite attacks and water loss. Arthropods' silk is composed of fibroin protein and is covered by a lipid wax. Chemical cues from silk are used by predators and parasites to recognize their prey/hosts (Bekkaoui & Thibout, 1993; Donzé *et al.,* 1998). Various sedentary web-building spiders use web silk lipids as a pheromone source for group living, mating and dispersion of offspring (Schulz, 1997; Prouvost *et al.*, 1999b; Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). Most of the lipids are likely to be present on the silk fiber, but the fact that prolonged extraction yields larger amounts of lipids may indicate involvement of core fibers. Although they play an important role, the chemical compounds on the cocoon surface have never been identified and analysed.

Stimuli enabling vertebrate females to recognize their own kin are well documented (Fletcher & Michener, 1987). More recently, authors focused their attention on whether and how arthropod females discriminated between their own and unfamiliar eggs. Thus, some spiders can discriminate their own cocoon and spiderlings from conspecifics (Clark & Jackson, 1994, Japyassu *et al,* 2003), while others cannot (Horel & Gundermann, 1992; Viera *et al.,* 2007b, Culley *et al.,* 2010). Some authors suggested that cocoon discrimination by spiders is mediated by one or more of four cues: 1- tactile, based on cocoon characteristics, 2- chemical, associated with the silk on the cocoon surface, 3- chemical, associated with the web where the cocoon is attached, 4- geographical location on the female's web (Krafft, 1982). Most mothers who are able to recognize kin are web-building spiders, the web emitting multiple proximal cues used by females. However, Colancecco *et al.* (2007) observed that the females of a wandering spider (*P. milvina)* can distinguish between freshly removed and previously removed cocoons, suggesting possible cues (chemical and tactile) used by females to control the development of their cocoon.

Female wolf spiders' (Lycosidae) maternal care includes the following stages: construction of egg-sac (or cocoon), care of egg-sac, perforation of egg-sac, and transport of spiderlings after their emergence from the cocoon (Vlijm *et al.* 1963; Eason 1964; Whitcomb & Eason 1967; Randall, 1977; Gertsch, 1979; Wise, 1993; Dolejš *et al.*, 2010; Foelix, 2011).

While egg-sacs are being carried embryos develop into eggs, and then they hatch from the egg as partly developed pre-larvae (Vachon, 1957). They moult at least once (larva or juvenile stage) before leaving the egg-sac (Canard, 1987), at this stage the juveniles move freely inside the cocoon. Mothers carrying a cocoon or spiderlings continue to forage on the ground and in the leaf litter in a wide variety of terrestrial habitats (Nyffeler *et al.,* 1994; Wise, 1993). Mothers trail their egg-sacs behind them attached to their opisthosoma (or abdomen) or their spinnerets for several weeks. In their natural environment, egg-sacs can become detached when a female forages and moves about actively. A female can search for her egg-sac after losing it (Colancecco *et al.,* 2007; Culley *et al.,* 2010; Fujii, 1980; Wagner, 1995) and can reattach it after she has found it (Colancecco *et al.,* 2007; Culley *et al.,* 2010; Eason, 1964; Foelix, 2011).

Our aim was four-fold to evaluate: 1) if wandering female wolf spiders, after losing their cocoon, can adopt and take care of a unfamiliar cocoon the same way that their own; 2) if mothers can detect the viability of their cocoon; 3) cues emitted by the cocoon are used by mothers to detect the viability or unviability of a cocoon; 4) lipids are present on the cocoon surface. We selected the free-moving wolf spider, *Pardosa saltans* (Töpfer-Hofmann, 2000) as our model species, as its females can complete 2-3 successively reproduction cycles before dying. The development of young inside a cocoon under laboratory conditions lasts between 25 and 30 days. 15 days after oviposition prelarvae hatch from the eggs and, after one moult, become first instar larva (unpublished data). All our experiments were realized with 15 day-old cocoons and with females during their first reproduction cycle. We predicted that 1) mothers would modify their behaviour after finding an unfamiliar cocoon; 2) the state of spiderlings (alive or dead) in a cocoon would influence mothers' relationship with their cocoon; 3) their behaviour would vary in relation to the signals emitted by the cocoon (chemical and vibratory); and 4) cocoons would contain a complex mixture of lipids.

II. Materials and methods

II.1. Ethics statement

Our research conformed to the legal requirements and guidelines established for the treatment of animals in for research (Animal Behaviour, 2006) using for invertebrate species

and their careing for them using accepted ethical laboratory standards in the laboratory. The species used for the experiments are neither endangered and nor protected.

II.2. Spider collection and rearing

Pardosa saltans spiders live in forests, woodlands and copses and sometimes nearby grasslands and hedgerows. They seem to be largely restricted to old and ancient woodland sites, where many can be seen running over the ground in open clearings as well as in the shade in the litter. Copulation and maternal behaviours can be observed from April to September. Two peaks of reproduction are usually observed: one in late spring – early summer, and a second in the autumn (unpublished data). Our subjects were young adult females and were captured during the copulation period in a forest near the Paimpont biological station (property of the University of Rennes 1; France; 48°00'05.67" North, 2°13'46.65" West) in April-June 2016. Females were kept individually in circular terrariums (10 cm diameter x 5 cm high) without any substrate and were kept at 21 ± 1°C, with 56 ± 1 % relative humidity under a L:D, 14:10 h photoperiodic cycle. All females were checked at least twice a day (morning and evening) to record oviposition. Females were monitored in the laboratory before first oviposition and until spiderlings hatched. Spiders were fed every other day *ad libitum*, with either cricket larvae (*Acheta domestica* and *Nemobius sylvestris*) or adult flies (*Drosophila melanogaster*).

II.3. Experimental groups and maternal behaviour

Mothers (N=101) with 15 day-old cocoons during their first maternal care cycle were observed in glass arenas (10 cm diameter and 5 cm high). All individuals were observed during the same period of day (between 8.00 and 12.00) under natural light. All females were given one prey two days before the experiment and tested the following days only if the prey had been consumed. Two arenas were used simultaneously so we could pair subjects with different cocoon treatments, combining all possibilities. This methodological precaution aimed to counteract effects of changes in temperature and humidity on the spiders' behaviour.

To eliminate any bias due to the positions of the arenas, we alternated the experimental groups between sides and between trials. The arenas were washed with water then ethanol (70%) between trials to eliminate any possible intraspecific cues that could influence activity. Each mother was placed individually in the centre of an arena under a vial (1.5 cm diameter) 1 min before a test started. The vial was removed and the subject was allowed to move for 5 min to habituate to her new environment. Then, subjects were anesthetized by chilling at 5°C for 5 min. Cocoons were removed from their mothers rapidly with a brush. Cocoons were transferred individually into a vial and randomly distributed between eight experimental groups:

- "**Live control**": cocoon stored at room temperature for 10 min before being presented to its own mother (n = 15).

- "**live unfamiliar**": cocoon stored at room temperature for 10 min before being presented to another mother (n = 15).

- "**freeze killed**": cocoon freeze-killed at -18°C for 5 min, then stored at room temperature for 5 min before being presented to its own mother (n = 15).

- "**deodorized**": cocoon deodorized for 5 min in 500 µl of one of the following solutions: methanol (MeOH; n = 10), dichloromethane (CH_2Cl_2, n=15), pentane (C_5H1_2; n = 9), methanol + dichloromethane, V:V (MeOH-CH_2Cl_2; n = 10) or methanol + pentane, V:V (MeOH-C_5H_{12}; n = 12), then stored at room temperature for 5 min before being presented to its own mother.

Mothers without their cocoon woke up under a vial placed in the centre of an arena. A cocoon was placed in the arena 3 cm from the test female. Mothers were tested randomly with a cocoon from one of the experimental groups (live control, live unfamiliar, freeze killed, deodorized).

Latency of first contact with the cocoon, duration of cocoon manipulation (time between first contact with cocoon and first contact of cocoon with spinnerets) and cocoon hanging (time between contact of cocoon with abdomen and its attachment to spinnerets) were recorded. When a female had not contacted or attached her cocoon after 30 min, the cocoon was considered "not adopted". The subjects were then replaced in their terrarium with their cocoon hang, their maternal behaviour was observed and time until spiderlings hatched or cocoon was abandoned were recorded. Abandoned cocoons were opened and viability of spiderlings was estimated.

II.4. Chemical composition of cocoons

Chemical composition of 15 day-old cocoons was assayed (N=10). Each cocoon was soaked in 200 µl methanol (MeOH) for 10 minutes to extract its constituents. The samples were dried under nitrogen (N_2) and then dissolved in 50 µl of dichloromethane with 1.52 µg/µl of *n*-tetradecane as internal standard. Each extract was analyzed by gas chromatography (GC) on an Agilent 7820A equipped with a CP-Sil-5CB WCOT apolar capillary column (30m, 0.32mm diameter; Chrompack, Les Ulis, France), and a flame ionization detector. Temperature was programmed from 120°C to 320°C at 10°C/min. For each GC sample, peak areas were obtained by integration, and for each peak the results were expressed as weighs (ng). Only clearly defined peaks were retained to characterize profiles and for quantitative analyses (surface greater than 0.05% of the total).

Identification of the total extract was based on a pooled sample of 5 15-day-old cocoons. The individuals were put in 200µl of MeOH for 10 minutes at 20°C, then after N_2 evaporation 400µl of dichloromethane were added. After drying and addition of 10 µl of dichloromethane, 4µl of samples were derivatised with 20µl of MSTFA (Silylation) for 60 minutes at 60°C. The derivatised samples were then dried with N_2 before addition of 10µl of dichloromethane. Samples were analyzed using a GC-MS consisting of a GC 1890A system equipped with an HG-5 column (30m, 0.25mm). The GC oven temperature was set at 120°C for 5 minutes, then increased by 10°C/min to 320°C before stabilising at 320°C for 60 minutes. Peaks were obtained by integration and the results are expressed as % and as micrograms of compounds per total cocoon extract.

The compounds were identified by comparing their mass spectra and GC retention times to those of authentic standards.

II.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Statview 5.0 for WINDOWS (SAS Institute Inc.). As all our behavioural data satisfied the requirements for parametric statistics, they were

analysed within treatments using Kruskall-Wallis and multi-range comparisons, and between tests using Mann-Whitney U-tests when differences between means were significant at $P \leq 0.05$ levels. Results are expressed as means ± SE.

III. Results

III.1. Behavioural tests

Maternal behaviour: latencies until contact (df = 7, H = 15.352, p = 0.032), manipulation durations (df = 7, H = 29.148, p = 0.0001), and times taken to hang cocoon (df = 7, H = 28.301, p = 0.0002) varied with type of cocoon (control, unfamiliar, freeze killed or deodorized) (Fig. 15).

III.1.1. "Live control vs unfamiliar" and "live control vs freeze killed"

Mean latencies to contact and manipulate "control" or "unfamiliar" or "freeze killed" cocoons did not differ significantly between (Fig. 15A and B): "control and unfamiliar" (Z = 0.456, p = 0.648 and Z = 1.811, p = 0.07, respectively) or "control" and "freeze killed" (Z = 0.124, p = 0.900 and Z = 0.726, p = 0.47, respectively). Mean durations for cocoon hanging did not differ significantly between "control" and "unfamiliar" (Z = 1.157, p = 0.247) or between "control" and "freeze killed" (Z = 0.518, p = 0.604) (Fig. 16C). Only one "unfamiliar" cocoon was not hung by one female (Table 5).

Mothers (80 - 86 %) opened "control" and "unfamiliar" cocoons (Table 5) and times until spiderlings hatched did not differ significantly between "control" and "unfamiliar" cocoons (Z = 1.79, p = 0.065). Only 20 % of the test mothers abandoned the "unfamiliar" cocoon, a rate similar to that of the control mothers. All the spiderlings in the abandoned cocoons were dead at either the prelarval or juvenile stage.

None of the mothers opened "freeze killed" cocoons (100%), thus none of the spiderlings from the "freeze killed" cocoons hatched (Table 5). The mothers abandoned "freeze killed" cocoons on average 32 days after hanging, a duration that is similar to the durations before females opened "control" and "unfamiliar" cocoons. All the spiderlings in abandoned cocoons were dead at the prelarval stage, characteristic of the 15-day developmental stage.

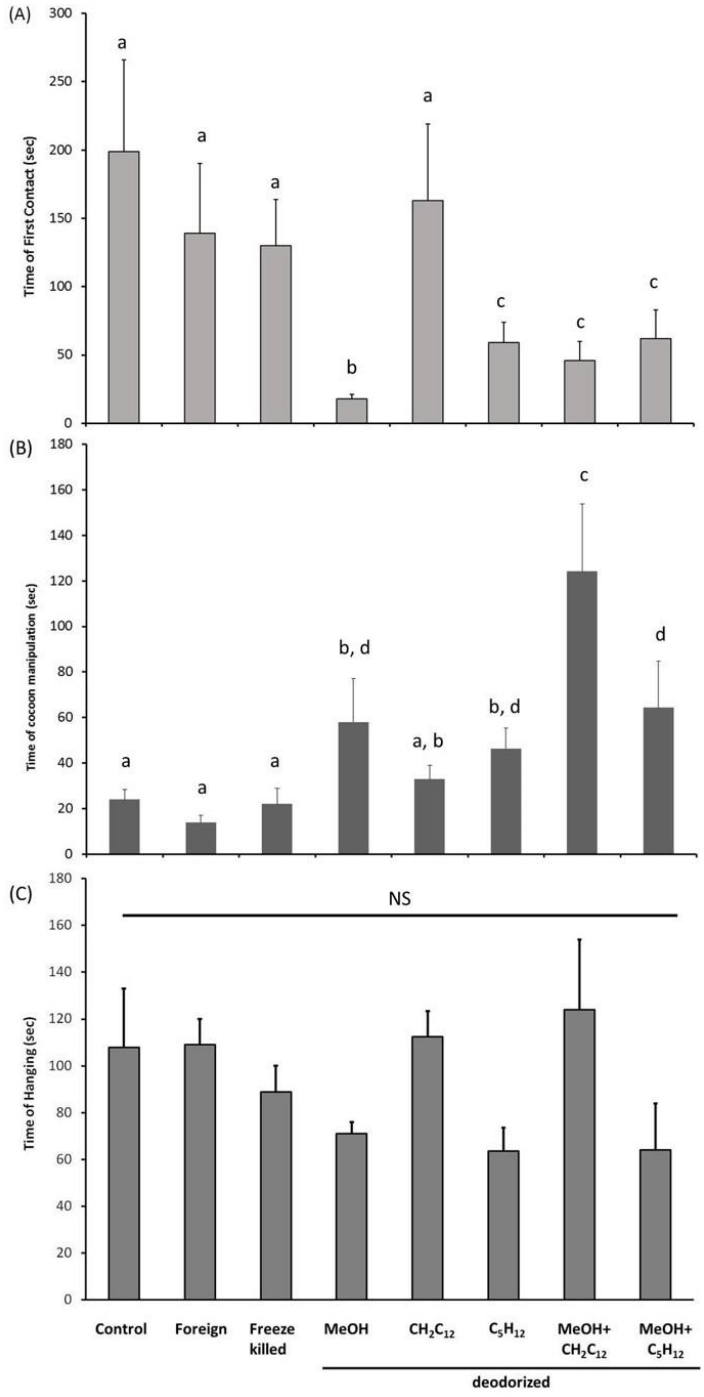


Figure 15: Mothers' cocoon recovery behaviour in relation to experimental conditions: (A) Time until mother make first contact with cocoon (seconds); (B) Time between contact and manipulation of the cocoon (seconds); (C) Time until mothers hung the cocoon to their spinnerets (seconds). Data were compared using Kruskall-Wallis tests followed by Mann-Whitney post-hoc tests: different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$; NS: non-significant.

Table 5: Mothers' cocoon recovery behaviour in relation to cocoon status: frequency of hanging to spinnerets and abandonment of cocoons (frequency and latency); frequency of opening behaviour of the cocoon by the mother allowing spiderlings to emerge and age of spiderlings at emergence (days). n=number of cocoons tested.

Cocoon Groups	Hanging	Abanonment		Emergence	
	% (n)	% (n)	Days	% (n)	Days
Live:					
- control	100 (15/15)	20 (3/15)	33.3 ± 3.2	80 (12/15)	37.5 ± 0.8
- unfamiliar	93 (14/15)	21 (3/14)	43.0 ± 3.5	86 (12/14)	35.2 ± 0.8
Freeze dead	100 (15/15)	100 (15/15)	31.8 ± 1.5	0 (0/15)	-
Deodorized:					
- MeOH	100 (10/10)	0 (0/10)	-	100	31.8 ± 0.1
- CH_2Cl_2	100 (15/15)	100 (15/15)	29.1 ± 0.9	0	-
- C_5H_{12}	100 (10/10)	100 (10/10)	29.9 ± 2.7	0	-
- MeOH + CH_2C_{l2}	60 (6/10)	100 (6/6)	18.0 ± 0.8	0	-
- MeOH+C_5H_{12}	67 (8/12)	100 (8/8)	16.0 ± 0.6	0	-

III.1.2. "control *vs* deodorized"

Females contacted "deodorized" cocoon significantly faster than "control" cocoons (group mean: 78 ± 17s vs 199 ± 67s; Z = 2.028, p = 0.042); manipulated these "deodorized" cocoons significantly more (group mean: 60 ± 8s vs 30 ± 4s; Z = 2.538, p = 0.011); but latencies until hanging did not differ significantly (group mean: 144 ± 18s vs 100 ± 24s; Z = 1.493, p = 0.136) (Fig. 15).

III.1.3. Comparisons of the effect of deodorizing solvents

Females contacted a “MeOH” deodorized cocoon significantly more rapidly than other “deodorized” cocoons (i.e. “MeOH *vs* CH_2CL_2”: Z = 2.105, p = 0.045; “MeOH *vs* C_5H_{12}”: Z = 2.821, p = 0.012) (Fig. 15A). Manipulation durations of “deodorized” cocoons varied in relation to solvent (H = 14.541, p=0.006; Fig. 15B). Thus, females manipulated “MeOH + CH_2Cl_2” cocoons for significantly longer than the other “CH_2CL_2” deodorized cocoons (i.e. “MeOH + CH_2Cl_2” vs “CH_2CL_2”: Z = 3.989, p = 0.0007). Only 60-67 % of the females hung cocoons deodorized with mixture of the organic solvents “MeOH + CH_2Cl_2 or MeOH + C_5H_{12}” (Table 5). Time until hanging a “deodorized” cocoon varied with solvent (H = 23.410, p = 0.0001; Fig. 15C). Thus times until hanging a “CH_2CL_2” cocoon were significantly longer than for a “MeOH” cocoon (Z = 2.812, p = 0.01) or a “C_5H_{12}” cocoon (Z = 2.919, 0.008) and females took longer to hang cocoons deodorized with a mix of two solvents (i.e. “MeOH + CH_2Cl_2” were the longest to hang).

All the mothers (100%) opened their “MeOH” cocoon to help the young to hatch 32 days after oviposition, duration similar to that for “live control” and “live unfamiliar” cocoons (Table 5). None of the other mothers with other “deodorized” cocoons opened them and time until they were abandoned differed significantly between solvents (H = 28.749, p < 0.0001: Table 5). Mothers with “MeOH + CH_2Cl_2 or MeOH + C_5H_{12}” cocoons abandoned those 2-3 days after hanging and abandoned “CH_2Cl_2 or C_5H_{12}” cocoons 14-15 days after hanging. All the spiderlings in the abandoned cocoons were dead at the prelarval stage characteristic of 15-day development.

III.2. Lipid composition of cocoon extracts

GC-MS analyses of the total methanol extract from 15-day old cocoons revealed a mixture of 22 lipid compounds (Fig. 16A). These compounds can be divided into 5 groups based on their chemical family: alcohols, fatty acids, hydrocarbons, methylesters and monoglycerides (Fig. 16B).

Alcohols. This group represented 2.6% of the total extract and is constituted of a long chain of carbons between C20 and C24 aliphatic alcohols and two sterols. Cholesterol is the major constituent of this group accounting for 1.4 µg/µl of cocoon extract (Table 6).

Fatty acids. This group contained the most volatiles components and accounted for approximately only 0.55 % of the total extract. Three saturated free fatty acids were identified: 15:0, 16:0 and 18:0 (Table 6). Stearic acid was the major component of this group accounting for 0.35 µg/µl of cocoon extract.

Hydrocarbons. This group represented 1.41 % of the total cocoon extract and contained three *n*-alkanes: n-C13, n-C15 and n-C19 (Table 6). The *n*-pentacosane was the major component of this group accounting for 1.2 µg/µl of cocoon extract.

Methylesters. This group included C18:0 and C20:0 methylesters and accounted for only 0.36 % of the total extract (Table 6).

Monoglycerides. This group contained 7 compounds formed between C14 and C20 and accounted for approximately 95% of the total extract (Table 6). The 1-hexadecanoic acid glyceride, 1-octadecanoic acid glycerides and the 2-hexadecanoic acid glyceride were the major components of the total cocoon extract (Table 6, Fig. 17).

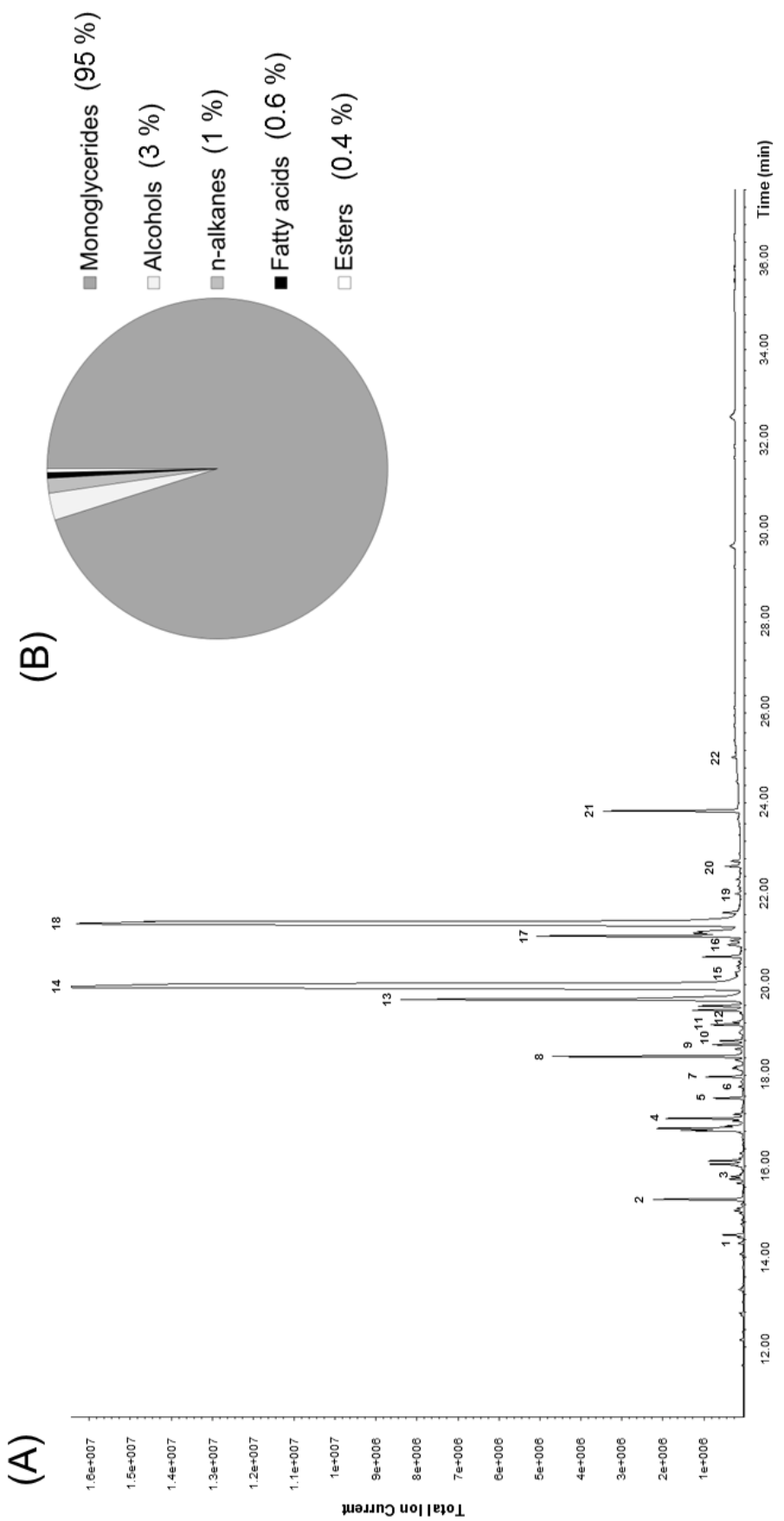


Figure 16: Lipid compounds of the surface silk of 15-day old Pardosa saltans cocoons extracted with methanol.

(A): Gas chromatogram and (B): relative amounts (n = 5 cocoons).

Table 6: Identification and quantification of the wax components of methanol eluate of the surface of 15 day-old P. saltans cocoons surface (n=5 cocoons).

Compounds	Carbons	Peak N°	R.T. (min)	Percentage composition	Quantity (µg/µL)
Alcohols					
1-Eicosanol TMS	C20	7	17,873	0,0815	0,088
1-Heneicosanol	C21	9	18,682	0,3093	0,332
1-Heneicosanol TMS	C21	10	18,766	0,5495	0,590
1-Tricosanol TMS	C23	15	20,274	0,0601	0,065
1-Tetracosanol TMS	C24	16	20,98	0,1973	0,212
Sterols :					
Cholesterol TMS	C27	21	23,838	**1,3066**	**1,403**
β-Sitosterol TMS	C29	22	25,023	0,0605	0,065
Fatty Acids					
Pentadecanoic acid TMS	C15	1	14,301	0,0583	0,063
Hexadecanoic acid TMS (palmitic)	C16	2	15,265	0,1669	0,179
Octadecanoic acid TMS (stearic)	C18	4	16,831	0,3238	0,348
Hydrocarbons : *n*-alkanes					
Tricosane	C13	5	17,502	0,1490	0,160
Pentacosane	C15	11	19,12	**1,1206**	**1,204**
Nonacosane	C19	19	22,011	0,1396	0,150
Methyl Esters					
Methyl octadecenoate (stearate)	C18	3	15,772	0,2149	0,231
Methyl Eicosatetraenoate	C20	6	17,753	0,1469	0,158
Monoglycerides					
1-Tetradecanoic acid glyceride DiTMS	C14	8	18,421	1,4834	1,593
1-Pentadecanoic acid glyceride TMS	C15	12	19,177	0,2753	0,296
2-Hexadecanoic acid glyceride TMS	C16	13	19,678	**12,2531**	**13,161**
1-Hexadecanoic acid glyceride DiTMS	C16	14	19,956	**42,1126**	**45,233**
2-Octadecenoic acid glyceride DiTMS	C18	17	21,077	4,1284	4,434
1-Octadecanoic acid glyceride DiTMS	C18	18	21,353	**34,6615**	**37,230**
1-Eicosanoic acid glyceride DiTMS	C20	20	22,616	0,2011	0,216

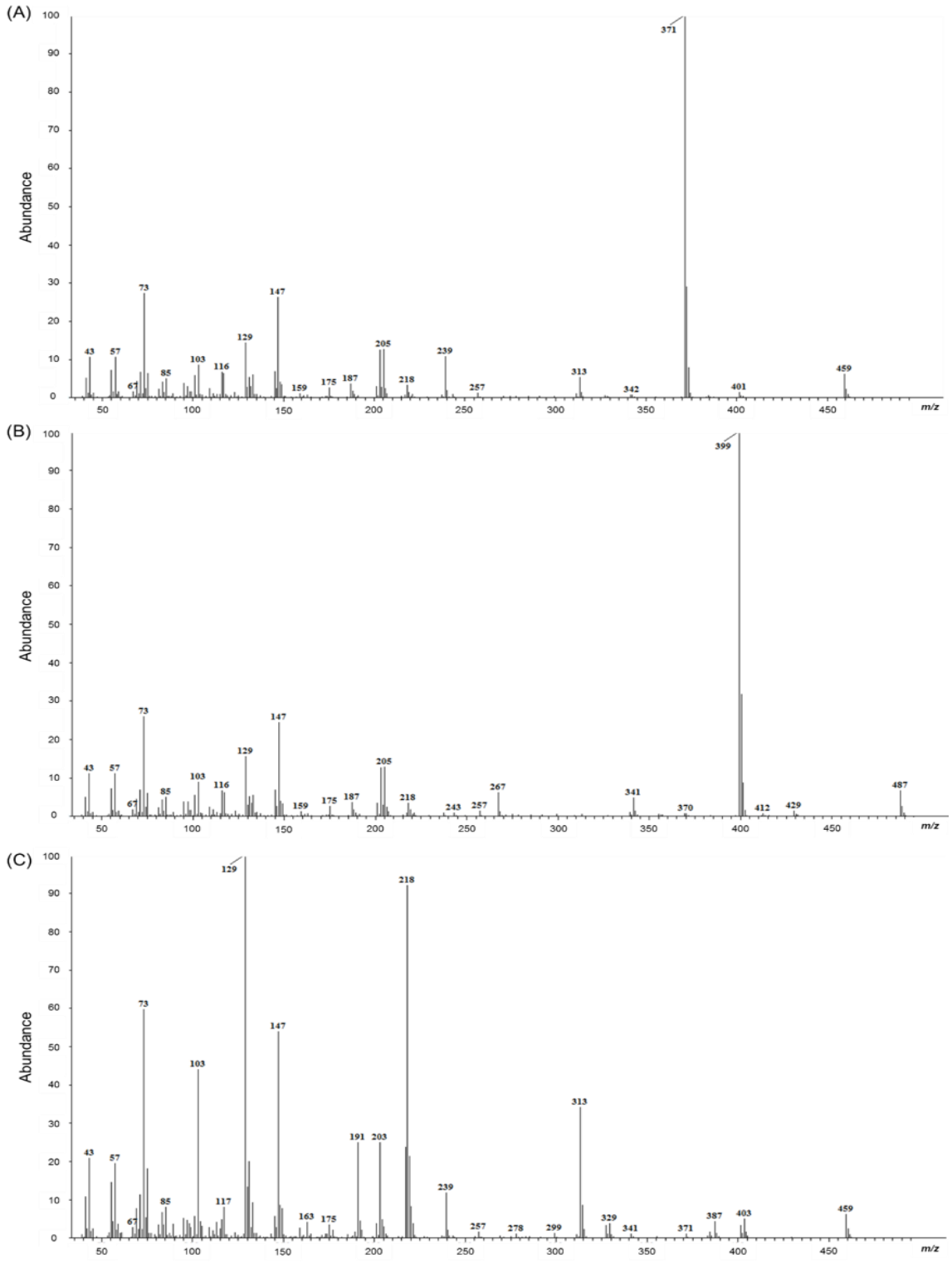


Figure 17: Lipid compounds of the surface silk of 15-day old Pardosa saltans cocoons extracted with methanol. Mass spectra (A) 1-hexadecanoic acid glyceride DitMS (compound 14 in table 6); (B) 1-octadecanoic acid glyceride DiTMS (coumpound 18 in table 6); (C) 2-hexadecanoic acid glyceride TMS (compound 13 in table 6).

IV. Discussion

IV.1. Cocoon recognition.

Our results showed that *Pardosa saltans* females' maternal behaviour varied in relation to cocoon status. When mothers loose their cocoon, they contact it when they find it and manipulate it with their legs and palps before hanging it again on their spinnerets. When mothers find a unfamiliar cocoon of the same age as their own, their behaviour is similar (contact, manipulation and hanging), and adopt it and open it as their own cocoon about 30 days after oviposition to allow spiderlings to emerge and to climb on their back. Adoption does not modify latency to open the cocoon and thereby the emergence of the spiderlings. Thus *P. saltans* mothers are unable to distinguish their own cocoon from an unfamiliar cocoon like other wandering and web-building spiders (Ghione *et al.*, 2003; Japyassú *et al.*, 2003; Viera *et al.*, 2007b; Culley *et al.*, 2010).

IV.2. Detection of spiderlings' viability

Mothers' behaviour (contact, manipulation, and hanging) with "freeze killed" cocoons was similar to that with live cocoons. All our test females adopted 15-day old cocoons containing dead embryos (cf. "freeze killed" groups). This suggests that they are not able to detect the viability of a cocoon when they manipulate it. Only 20 % of our *P. saltans* females abandoned their own cocoon or an unfamiliar cocoon after 30 days without manifesting any opening behaviour, these cocoons contained only undeveloped embryos or dead young. Mothers carrying these unviable cocoons continued maternal care until the possible date of spiderlings' emergence (30 days old) and abandoned them without manifesting any opening behaviour. The energy costs of a reproduction cycle are important, so if egg-sac characteristics (absence of fungi or bacteria, clean and fresh silk) were the predominant factors influencing maternal care decisions, *P. saltans* mothers, confronted with a non-viable egg-sac, should prefer to abandon it and begin a second reproduction cycle. Culley *et al.* (2010) observed that *P. milvina* mothers preferred conspecifics' freshly removed cocoons to

their anciently removed cocoons. They suggested that this distinction could be due to the presence of fungi or bacteria, and/or a lack of fresh silk pheromones on the surface of the older cocoons. Our "freeze killed" cocoons had not had time to develop any of these types of surface differences compared to live cocoons before being used for our experiments.

Otherwise, our results indicate that *P. saltans* females detect egg-sac viability as do other species (i.e. *Loxosceles gaucho*: Japyassú *et al.*, 2003) but only at the end of post-embryonic development, just before emergence of spiderlings. The females seem to be unable to detect the viability of a cocoon at any precise time, for example when young hatch inside the cocoon, but could detect its viability by the duration of development and in particular when spiderlings are due to emerge. Thus, we hypothesise that just before emergence young emit communication signals from inside their cocoon (vibrations and/or chemicals) perceived by their mother through the silk protection to stimulate her opening behaviour. The abandonment of "freeze killed" cocoons would be linked to the absence of these communication signals emitted by the juveniles. Authors observed that young web-building spiders emit vibrations inside their cocoon at the end of their development, vibrations which are perceived by their mother through her web (Viera *et al.*, 2007b). No such information exists concerning wandering spiders, so to test our hypothesis we must investigate whether young in 30 day-old cocoons emit vibrations inside the cocoon.

Furthermore, deodorizing cocoons with organic solvents with different polarities had different effects on mothers' behaviour and on cocoon viability. These solvents can affect the mechanical proprieties and shrink the silk to various degrees (Shao *et al.*, 1999). So, mothers' behaviour in the presence of dead "MeOH + CH_2Cl_2" or "MeOH + C_5H_{12}" cocoons or "freeze killed" cocoons differed. The females manipulated them more and took longer to hang them. About 40 % of the mothers in the presence of mix-solvent "deodorized" cocoons did not hang them. Mothers who hung these cocoons abandoned them rapidly (about 1-3 days after hanging). These differences between mothers can be explained by the absence of detection of certain chemical signals (polar and apolar) emitted by the cocoon. All the mothers hung a cocoon "deodorized" with one solvent (pentane or dichloromethane) but they abandoned it 15 days later (30 days after oviposition) without manifesting any opening behaviour, as with "freeze killed" cocoons. Thus, the chemical apolar compounds removed by these solvents are not those used by mothers to stimulate their maternal care when they find a cocoon. Manual opening of these abandoned cocoons revealed that pentane and dichloromethane crossed the silk protection and liquefied the eggs; thus all the embryos were dead, as in "freeze killed"

cocoons. The absence of vibrations emitted by the young at the emergence time support our conclusions for “freeze killed” cocoons. Furthermore, contrary to “freeze killed” cocoons, cocoons “deodorized” with pentane and dichloromethane contained liquefied eggs and so should emit different chemical signals compared to naturally dead prelarvae. It would be interesting to analyse the chemical compounds emitted by cocoons with naturally dead prelarvae to compare with signals emits by cocoons “deodorized” with pentane and dichloromethane.

Authors showed that methanol has the similar consequences on breaking strength and break elongation as water (Shao *et al.,* 1999). All our test mothers contacted the methanol-deodorized cocoons very rapidly and opened these cocoons to allow the young to emerge. So methanol did not cross the silk protection of the cocoon and did not kill the embryos, contrary to the other solvents tested (pentane and dichloromethane). So the behavioural modifications observed with methanol “deodorized” cocoons were due to the chemical modifications of cocoons and not their viability. As the majority of the chemical compounds removed by methanol are polar, we hypothesised that, in the absence of these compounds, females detected better the apolar compounds present on the cocoon surface. This could explain why the females contacted methanol “deodorized” cocoons faster than the other cocoons.

IV.3. Polar compounds on the cocoon surface

The methanol extracts contained only exogenous lipids present on the cocoon surface. Monoglycerides and sterols were the most abundant on the cocoon. Glycerides are esters formed from glycerol and fatty acids. The major glycerides in our extracts were monoglycerides formed from palmitic acid (1-hexadecanoic acid glyceride DiTMS and 2-hexadecanoic acid glyceride TMS) and stearic acid (1-octadecanoic acid glyceride DiTMS). Monoglycerides are primarily used as surfactant, usually in the form of emulsifiers. Sterols were represented by cholesterol and β-sitosterol. Cholesterol is the base of numerous polar molecules, in particular in the production of steroid hormones (i.e. ecdysteroids present in arthropods). We hypothesised that monoglycerides and alcohols (sterols) could be used as a protection layer (mechanical or hydrophobic) linking the silk fibers of cocoon; and could protect the cocoons from desiccation. The structure of β-sitosterol is similar to that of

cholesterol and is a phytosterol. This compound could probably come from the abiotic environment because as spiders are carnivorous it could not come from their diet. The other compounds were a mix of fatty acids and their methylesters; some hydrocarbons were detected in low quantities.

V. Conclusion

Pardosa saltans females are able to adopt unfamiliar conspecific cocoons, and take care of their own dead cocoon. The cocoon guarding cycle seems to be stereotyped from the oviposition. Mothers abandon unviable cocoons only at the end of a period corresponding to the duration of development of young inside the cocoon characteristic of their species. Conversely, if silk characteristics (absence of fungi and bacteria, clean and fresh silk) were predominant, both unviable and viable egg-sacs should seem similar. However our results suggest that egg-sac recognition is based on chemical recognition linked to the silk as well as to vibrations emitted by the young from inside the cocoon. Our results show, for the first time, that certain polar and apolar chemical compounds are used by females to stimulate maternal care. It could be interesting to studies more precisely the role of chemical compounds identified on the cocoon surface and the vibrations emitted by the young from the inside at different time of the development on maternal behaviour.

Article **4**

Variations of cocoon external lipids during wolf spiderlings' development.

Abstract

This study presents the first characterisation of the silk lipids of a spider's cocoon. Wolf spiders' maternal behaviour is complex and involves guarding their cocoon for several weeks, they can retrieve it if they lose it, and so cocoons must emit fundamental cues to ensure their correct development. These cues are associated with cocoon silk. We assessed qualitative changes in lipid content and composition of cocoon silk in relation to the development of *Pardosa saltans* wolf spider juveniles. Gas chromatography-mass spectrometry of their cocoon silk revealed 70 different lipid compounds. The compounds were aliphatic alcohols, glycerides (mono- and diglycerides), fatty acids and their methylesters containing from 13 to 29 carbon atoms. Our study revealed for the first time the presence of palmytoylethanolamide, ethanolamines and phytosterol (β-sitosterol and campesterol) on cocoon silk. Qualitative and quantitative changes occurred during the embryonic period, as some polar compounds such as diglycerides, ethanolamines, palmytoylethanolamides disappeared while hydrocarbons appeared, whereas, latter, fatty acids disappeared during the post-embryonic period. Qualitative and/or quantitative changes could play a role in tactochemical communication between mothers and their cocoon. However mothers do not modify their behaviour in relation to the developmental stage of their cocoon. Mothers' behaviour seems to be linked to both internal (mothers' biorhythm) and external mechanisms (signals from the cocoon).

I. Introduction

Two maternal care traits are common to all spiders: energetic investment in the production of eggs and wrapping them in a protective silk case (egg-sac or cocoon). Egg care can be divided into two types: egg attendance and egg brooding (Smiseth *et al.,* 2012). Egg attendance occurs when parents remain with their eggs at a fixed location after eggs have been laid (sedentary web-building spiders). Egg brooding is a form of parental care when parents carry their eggs after laying (wandering spiders). Contrary to species that abandon their cocoon after construction, some spider species guard their cocoon until spiderlings are ready to emerge and then have to open it with their chelicerae to allow spiderlings to emerge (Kürpick, 2002, Viera *et al.,* 2007b).

Studies suggest that cocoon discrimination by mother spiders is mediated by tactile stimuli based on cocoon characteristics and/or chemicals associated with the silk on the cocoon surface and/or to the web where the cocoon is attached (Krafft, 1981). In fact, sedentary and wandering mothers are regularly in contact physically with their cocoon, allowing them to perceive tactochemical and vibratory stimuli. Studies show that silk and web play a role in pheromone transmission (Schulz, 1997). Silk pheromones can be produced by silk glands (Schulz, 2004) or can have a cuticular origin, and be applied to the silk only during web construction (Trabalon *et al.,* 2005) and perhaps during cocoon construction. The main compounds of silk and web are lipids, generally long-chain aliphatic hydrocarbons and fatty acids, as well as, in smaller amounts, methyl esters, long-chain aliphatic alcohols and aldehydes, glycerides, and cholesterol (Schulz, 1997, 2004; Trabalon & Bagnères, 2010). These lipid compounds protect from damaging factors such as humidity, which modifies the physical proprieties of silk. It these compounds are also responsible for silk's antifungal and antibacterial properties and play a role in sexual and parental communication (Schildknecht *et al.,* 1972; Schulz & Toft, 1993a, b; Schulz, 1997; Prouvost *et al.,* 1999b; Trabalon *et al.,* 1996, 1997; Papke *et al.,* 2000, 2001; Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). Polar lipids on silk webs and silk-bound are used by wandering solitary *Tegenaria atrica* males to detect receptive females during the reproduction period (Prouvost *et al.,* 1999b). The presence of polar compounds on their mothers' silk web induces young subsocial *Coelotes terrestris* to disperse (Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). However, the chemical composition of the surface silk of spiders' cocoons has not yet been analysed.

Spiderlings hatch inside the cocoon after the embryonic period and then their post-embryonic development occurs (Canard, 1987; Foelix, 2011). During this post-embryonic period spiderlings moult and are mobile inside the cocoon and this mobility can elicit the emission of signals (vibratory) through the silk protection which can be perceived by females in addition to tactochemical signals (Krafftj 1981; Lubin, 1974). However, studies investigating the emission of these signals focused on sedentary web-building spiders (Viera *et al.,* 2007b) and as we know, no studies have investigated the emission of these signals by wandering spiders.

Pardosa sp. wolf spiders are wandering spiders that brood their eggs for 20 to 40 days (Eason, 1964). When carrying their cocoon over uneven terrains, mothers can lose their cocoon. A female can search for her egg-sac after losing it (Colancecco *et al.,* 2007; Culley *et al.*, 2010; Fujii, 1980; Wagner, 1995) and can reattach and manipulate it after she has found it (Colancecco *et al.,* 2007; Culley *et al.,* 2010; Eason, 1964; Foelix, 2011). Physical and tactochemical contact with cocoon during manipulation could enable mothers to recognize their cocoon before hang it to their spinnerets (Colancecco *et al.,* 2007; Culley *et al.,* 2010).

The aims of this study are 1- to evidence candidate cues for cocoon recognition by identifying the polar lipids present on the silk cocoon surface of wandering *Pardosa saltans* wolf spiders' cocoons; 2- to evaluate cues inducing behavioural variations during guarding by quantifying compounds in relation to cocoon age (embryonic and post-embryonic developmental stage); 3- to evaluate the effects of unfamiliar cocoons at different developmental stages on mothers' behaviour in relation to their bio-rhythm.

II. Materials and methods

II.1. Ethics statement

Our research conformed to legal requirements and guidelines established for the treatment of animals in research (Animal Behaviour, 2006) using invertebrate species and caring for them using accepted ethical standards in the laboratory. The species used for the experiments is not endangered or protected.

II.2. Spider collection and rearing

Pardosa saltans spiders live in forests, woodlands and copses and sometimes nearby grasslands and hedgerows. Their habitat seem to be largely restricted to old and ancient woodland sites, where many can be seen running over the ground in open clearings as well as in the shade of the litter. Copulation and maternal behaviour can be observed from April to September. Two peaks of reproduction are usually observed: one in late spring – early summer, and a second in the autumn (unpublished data). Our subjects were young adult females were captured during the copulation period in a forest near Paimpont biological station (property of the University of Rennes 1; France; 48°00'05.67" North, 2°13'46.65" West) in April-June 2016. Females were kept individually in circular terrariums (10 cm diameter x 5 cm high) without any substrate and were kept at 21 ± 1°C, with 56 ± 1 % relative humidity under a L:D, 14:10 h photoperiodic cycle. All females were checked at least twice a day (morning and evening) to record oviposition. Spiders were monitored in the laboratory from before laying until spiderlings dispersed. Spiders were fed every day *ad libitum,* with either cricket larvae (*Acheta domestica and Nemobius sylvestris*) or adult flies (*Drosophila melanogaster*).

II.3. Chemical composition of cocoons

The chemical compositions of 0- (C0: egg stage), 5- (C5: 1st pre-larva instar), 10- (C10: 2nd pre-larva instar), 15- (C15: spiderlings hatch) and 20- (C20: mobile juveniles) day-old cocoons were assessed (n=100). Each cocoon was soaked in 200 µL methanol (MeOH) for 10 minutes to extract its constituents. The samples were dried under nitrogen (N_2) and then dissolved in 50 µL dichloromethane with 1.52 µg/µL of *n*-tetradecane as an internal standard. Each extract was analysed by gas chromatography (GC) on a Agilent 7820A equipped with a CP-Sil-5CB WCOT apolar capillary column (30m, 0.32 mm diameter; Chrompack, Les Ulis, France), and a flame ionization detector. Temperature was programmed from 120°C to 320°C at 10°C/min. For each GC sample, peak areas were obtained by integration, and for each peak the results were expressed as weights / µL extract injected (ng/µL). Only clearly defined

peaks were used for profile characterisation and quantitative analyses (surface greater than 0.05% of the total).

Identification of the total extract of each cocoon group was achieved from a pooled sample of 5 cocoons / group. The individuals were put in 200µL MeOH for 10 minutes at 20°C then, after N_2 evaporation 400 µL dichloromethane were added. After drying and addition of 10 µL dichloromethane, 4 µL of the samples were derivatised with 20 µL of MSTFA (Silylation) for 60 minutes at 60°C. The derivatised samples were then dried with N_2 before adding 10µL dichloromethane. Samples were analysed using a GC-MS consisting of a GC 1890A system equipped with a HG-5 column (30 m, 0.25 mm). The GC oven temperature was set to 120°C for 5 minutes and then increased by 10°C/minute to 320°C before remaining at 320°C for 60 minutes. The peaks were obtained by integration and the results are expressed as % of compounds per total cocoon extract. The compounds were identified by comparing their mass spectra and GC retention times to those of authentic standards.

II.4. Experimental groups and maternal behaviour

Mothers (M0 and M15; n=60) with respectively 0- (C0: egg stage) and 15- (C15: spiderlings hatch) day-old cocoons during their first maternal care cycle were observed in a glass arena (10 cm diameter, 5 cm high). All spiders were observed during the same period of day (between 8.00 and 12.00) under natural light. All females were given one prey two days before the experiment and tested only if the prey had been consumed. Two arenas were used simultaneously so we could monitor simultaneously subjects with different experimental cocoons combining all possibilities. This methodological precaution aimed to counteract effects of changes in temperature and humidity on spiders' behaviour. To eliminate any bias due to the positions of the arenas, we alternated the experimental groups between sides and between trials. The arenas were washed with water then ethanol (70 %) between trials to eliminate any possible intraspecific cues that could influence activity behaviour. The mothers were placed individually in the centre of the arena under a vial (1.5 cm diameters) 1 min before a test started. The vial was removed and the subject was allowed to move about for 5 min to habituate. Then, the females were anesthetized by chilling at 5°C for 5 min. Cocoons

were removed from their mothers rapidly with a brush. Cocoons were transferred individually into a vial and randomly distributed to four experimental groups:

- "**Control M0-C0**": 0-day-old cocoons stored at room temperature for 10 min before a test with its own M0 mother (n = 12)

- "**Control M15-C15**": 15-day-old cocoons stored at room temperature for 10 min before a test with its own M15 mother (n = 15)

- "**Adoption M0-C15**": 15-day-old cocoon stored at room temperature for 10 min before a test with a M0 mother (n = 15)

- "**Adoption M15-C0**": 0-day-old cocoon stored at room temperature for 10 min before a test with a M15 mother (n = 15)

Mothers without their cocoon were placed under a vial in the centre of the arena. One cocoon was placed in the arena 3 cm from the female. Mothers were assigned randomly to one of experimental groups (control: "M0-C0" or "M15-C15", adoption: "M0-C15" or "M15-C0").

Latency until first contact with cocoon, manipulation duration (time between first contact with cocoon and first contact of cocoon with abdomen) and cocoon hanging (time between contact of cocoon with abdomen and its attachment to spinnerets) were recorded. When a female had not contacted or attached her cocoon after 30 min, the cocoon was considered "not adopted". The females were then replaced in their terrarium with their experimental cocoon and latencies until mothers opened the cocoon spiderlings emerged or the cocoon was abandoned were noted.

II.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statview 5.0 for WINDOWS (SAS Institute Inc.). As all our behavioural data satisfied the requirements for parametric statistics, they were analysed using Kruskall-Wallis tests. When differences between means were significant at the $P \leq 0.05$ levels, Mann-Whitney post-hoc tests were applied. A PLS-DA (Partial Least Squares – Discriminant analysis) analysis was conducted on chemical compound concentrations. Results are expressed as means ± SE.

III. Results

III.1. Chemical composition of cocoons

III.1.1. Identification of lipid compounds

GC-MS analyses revealed that total methanol extracts from cocoon silk consisted of a mixture of 70 different polar and apolar compounds (Fig. 18 and Table 7). Our chemical analysis data could be divided into 7 groups according to chemical family: alcohols, fatty acids, hydrocarbons, methylesters, glycerides, ethanolamines and one palmitoyethanolamide (Fig. 19 and Table 8); these groups were present at different rates, the major groups were glycerides, alcohols and fatty acids.

Glycerides. 19 monoglycerides and 11 diglycerides were present in the total extracts of cocoons. Monoglycerides include between C14 and C20 fatty acids. This group constituted about 87.3 ± 4.3 % of the total extract (Table 7); 1-hexadecanoic acid glyceride, 1-octadecanoic acid glycerides and 2-hexadecanoic acid glyceride were the major components of cocoon total extracts (Table 7).

Alcohols. This group represented 8.0 ± 2.6 % of the total extract and included long carbon chains with between C16 and C29 aliphatic alcohols and three sterols (cholesterol, campesterol and β-sitosterol) (Fig. 19A and B).

Fatty acids. This group reprsented only 2.8 ± 1.6 % of the total extracts and included six saturated free fatty acids from 14:0 to 18:0 (Table 7). Stearic acid was the major component of this group.

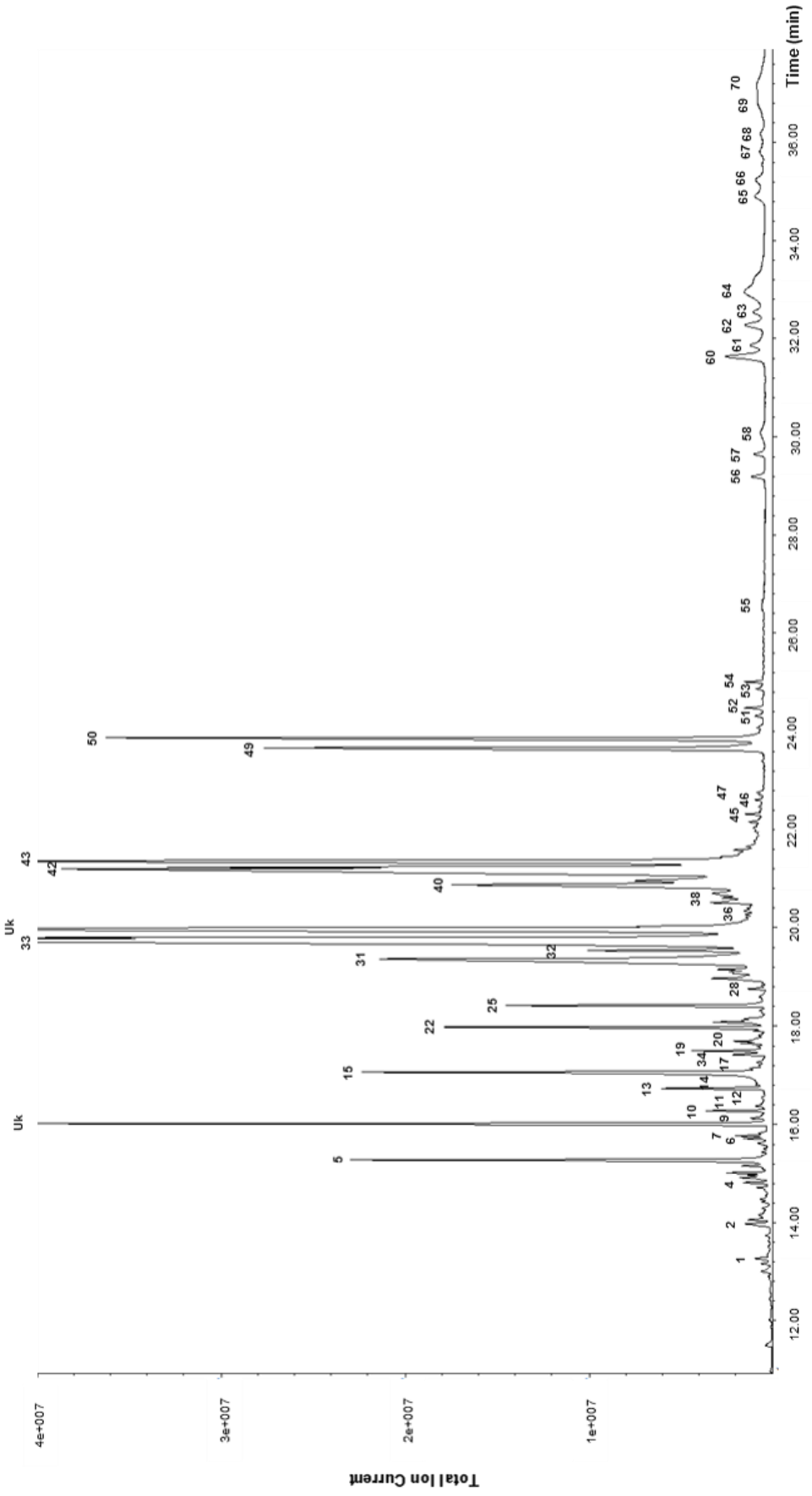


Figure 18: Gas chromatogram of silk lipid extract with methanol of the surface of 0 day-old Pardosa saltans cocoons (n = 5

Table 7: Identification and relative proportions of chemical compounds of total extracts of P. saltans cocoons (n=25 cocoons): + = trace, ++ = minor compound, +++ = major compound.

1	Tetradecanoic acid TMS	14	+
2	Pentadecanoic acid TMS	15	+
3	Methyl hexadecanoate	16	+
4	1-Hexadecanol TMS	16	+
5	**Hexadecanoic acid TMS**	16	+++
6	Methyl octadecadienoate	18	+
7	Methyl octadecenoate	18	+
8	Methyl Octadecanoate	18	+
9	Palmitoylethanolamine	?	+
10	1-Octadecanol TMS	18	+
11	Octadecanoic acid DiTMS	18	+
12	**Octadecenoic acid TMS**	18	+++
13	**Octadecyl acetate**	18	+++
14	1-Dodecanoic acid glycerid DiTMS	12	+
15	Octadecanoic acid TMS	18	+
16	1-Nonadecanol TMS	19	+++
17	Methyl Eicosatetraenoate	?	+
18	Tricosane	13	+
19	Octadecadienoic acid ethanol amide	?	+
20	Octadecenoic acid ethanol amide	?	+
21	9-Octadecenoic acid ethanolamide	?	+
22	1-Eicosanol TMS	20	++
23	2-tetradecanoic acid glyceride DiTMS	14	+
24	Tetracosane	14	+
25	Eicosyl acetate	14	+
26	1-Tetradecanoic acid glyceride DiTMS	22	+
27	1-Heneicosanol	14	++
28	1-Heneicosanol TMS	21	++
29	Pentacosane	21	+
30	1-Pentadecanoic acid glyceride TMS	15	+
31	**2-Hexadecanoic acid glyceride DiTMS**	15	+++
32	1-Docosanol TMS	22	++
33	2-Hexadecanoic acid glyceride TMS	16	+
34	**1-Hexadecanoic acid glyceride DiTMS**	16	+++
35	1-Hexadecanoic acid glyceride TMS	16	+
36	1-Tricosanol TMS	23	+
37	Heptacosane	17	+
38	1-Heptadecanoic acid glyceride DiTMS	17	+
39	1-Tetracosanol TMS	24	++
40	2-Octadecenoic acid glyceride DiTMS	18	+
41	1-Octadecenoic acid glyceride DiTMS	18	++
42	1-Octadecanoic acid glyceride DiTMS	18	+
43	1-Octadecanoic acid glyceride TMS	18	+
44	Nonacosane	19	+
45	1-Hexacosanol TMS	26	++
46	1-Eicosanoic acid glyceride DiTMS	20	+
47	Hexacosyl acetate	28	+
48	1-Octacosanol TMS	28	+++
49	**Cholesterol**	27	+++
50	Cholesterol TMS	27	+
51	Campesterol	28	+
52	Campesterol TMS	28	+
53	β-Sitosterol	29	++
54	β-Sitosterol TMS	29	+
55	Diglyceride 1	?	+
56	1.2-Bis(hexadecanoic acid) glyceride TMS	16	+
57	1.3-Bis(hexadecanoic acid) glyceride TMS	16	++
58	Bis(hexadecanoic acid) glyceride	16	+
59	Hexadecanoic acid octadecanoic acid glyceride TMS	16	+
60	Diglyceride 2	?	+
61	Diglyceride 3	?	+
62	Diglyceride 4	?	+
63	Diglyceride 5	?	+
64	Hexadecanoic acid octadecenoic acid glyceride	16	+
65	Diglyceride 6	?	+
66	Diglyceride 7	?	+
67	Diglyceride 8	?	+
68	Diglyceride 9	?	+
69	Diglyceride 10	?	+
70	Diglyceride 11	?	+

Table 8: Identification and quantification of the wax compounds of methanol eluate of the surface of P. saltans 0 and 15 day-old cocoons (n=10 cocoons). Results are expressed as ng/µl ± SE.

Compounds	C0 (ng.µL)	C15 (ng/µL)
Alcohols		
1-Hexadecanol TMS	637 ± 145	-
1-Octadecanol TMS	1,285 ± 361	-
1-Eicosanol TMS	376 ± 65	54 ± 15
1-Heneicosanol TMS	176 ± 76	50 ± 13
1-Tricosanol TMS	-	-
1-Tetracosanol TMS	-	21 ± 7
1-Docosanol TMS	126.7 ± 51	-
1-Hexacosanol TMS	109 ± 17	-
Sterols		
Cholesterol TMS	**6,072** ± 1,753	**429** ± 235
Campesterol TMS	**181** ± 41	-
β-Sitosterol TMS	308 ± 90	43 ± 12
Glycerides		
1-Dodecanoic acid glycerid DiTMS	257 ± 86	-
1-Tetradecanoic acid glyceride DiTMS	-	335 ± 56
2-Hexadecanoic acid glyceride DiTMS	**73** ± 42	**11** ± 7
2-Hexadecanoic acid glyceride TMS	**320** ± 112	**48** ± 18
1-Hexadecanoic acid glyceride DiTMS	**1,385** ± 422	**43** ± 13
1-Hexadecanoic acid glyceride TMS	29 ± 9	-
2-Octadecenoic acid glyceride DiTMS	-	19 ± 5
1-Octadecanoic acid glyceride DiTMS	47 ± 17	18 ± 5
1,2-Bis(hexadecanoic acid) glyceride TMS	111 ± 37	-
1-Eicosanoic acid glyceride DiTMS	-	21 ± 6
Diglyceride 1	9 ± 2	-
Esters		
Methyl Eicosatetraenoate	-	76 ± 26
Methyl octadecadienoate	64 ± 10	-
Methyl octadecenoate	91 ± 15	186 ± 41
Hexacosyl acetate	12 ± 8	
Octadecyl acetate	**267** ± 90	-
Eicosyl acetate	**1,007** ± 161	-
Ethanolamines		
Octadecadienoic acid ethanolamine	35 ± 21	-
Octadecenoic acid ethanolamine	429 ± 76	-
Fatty Acids		
Tetradecanoic acid TMS (myristic)	351 ± 59	335 ± 56
Pentadecanoic acid TMS	380 ± 87	37 ± 31
Hexadecanoic acid TMS (palmitic)	**210** ± 30	**26** ± 7
Octadecenoic acid TMS	**2,065** ± 425	**75** ± 28
Octadecanoic acid TMS (stearic)	82 ± 37	58 ± 18
Fatty Acids Amide		
Palmitoylethanolamide	17 ± 12	-
Hydrocarbons: *n*-alkanes		
n-Tricosane	-	121 ± 30
n-Pentacosane	-	611 ± 150
n-Nonacosane	-	150 ± 23

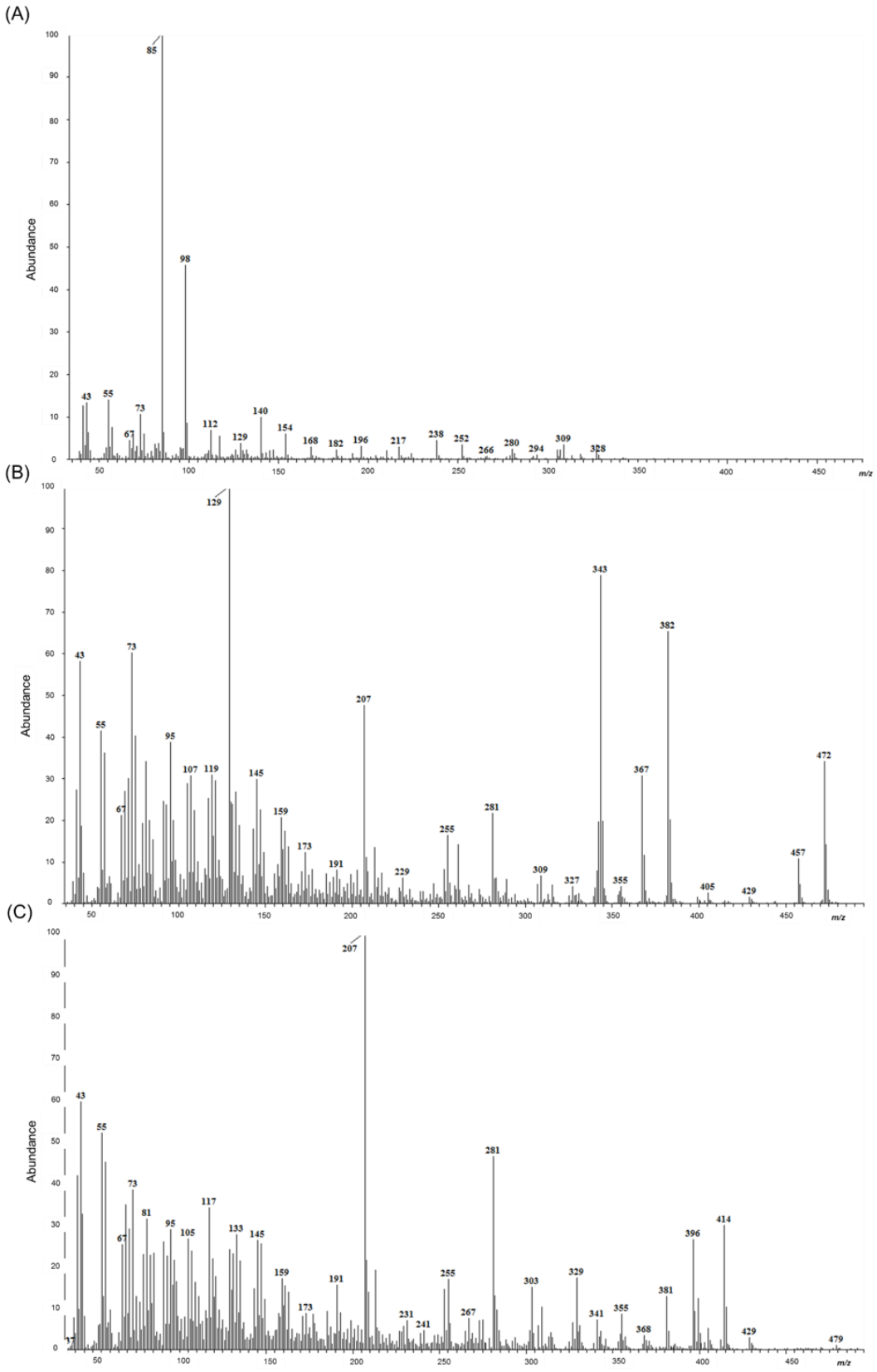


Figure 19: Mass spectra (A) Campesterol TMS (compound 52 in table 1); (B) β-Sitosterol TMS (compound 54 in table 1); (C) Palmitoylethanolamine (compound 9 in table 1) from P. saltans cocoons.

The other groups of compounds were present in significantly lower quantities.

Methylesters. This group represented 0.9 ± 0.6 % of the total extracts of cocoons and included C16:0 to C22:0 methylesters.

Hydrocarbons. This group represented 0.7 ± 0.2 % of the total extracts of cocoons and five *n*-alkanes were identified: *n*-C13 to *n*-C19 (Table 7).

Ethanolamines. This group represented 0.2 ± 0.1 % of the total extracts of cocoons. Three compounds were identified linked to oleic acid (Fig. 19C).

Palmitoyethanolamide (PEA). This compound was present in low quantities (0.04 % of total extracts of cocoons) and only in C0 cocoons.

III.1.2. Compounds on the surface of C0 and C15 cocoons

We found neither four monoglycerides (2-tetradecanoic acid glyceride DiTMS, 1-tetradecanoic acid glyceride DiTMS, 1-pentadecanoic acid glyceride TMS and hexadecanoic acid + octadecanoic acid glyceride TMS), nor one alcohol (1-heneicosanol), nor any of the all *n*-alkanes on C0 cocoons (Table 8).

The chemical composition of C15 cocoons differed significantly from that of C0 cocoons. The following compounds were no longer present on the surface of C15 cocoons: one fatty acid (octadecanoic acid DiTMS), 6 monoglycerides (2-hexadecanoic acid glyceride DiTMS, 1-heptadecanoic acid glyceride DiTMS, 1-octadecanoic acid glyceride TMS, 1,2-bis(hexadecanoic acid glyceride TMS, 1,3-bis(hexadecanoic acid) glyceride TMS, hexadecanoic acid + octadecenoic acid glyceride), 3 alcohols (1-octadecanol TMS, 1-hexacosanol TMS, campesterol), 4 methylesters (methyl octadecanoate, hexacosyl acetate, octadecyl acetate, eicosyl acetate), palmitoylethanolamide and all diglycerides and ethanolamines.

The rates of several compounds varied significantly between C0 and C15. The quantities of the following compounds were significantly greater on C0 cocoons than on C15 cocoons: some alcohols: 1-eicosanol (376 ± 65 vs 53 ± 15 ng/µL; Z = 2.611, p = 0.009), 1-heneicosanol (178 ± 76 vs 50 ± 13 ng/µL; Z = 2.19, p = 0.028), cholesterol (6,072 ± 1,753 vs 429 ± 235 ng/µL; Z = 1.98, p = 0.047) and β-sitosterol (308 ± 90 vs 43 ± 12 ng/µL; Z = 2.40, p = 0.016); three fatty acids and one glyceride: pentadecanoic acid TMS (380 ± 87 vs 37 ± 31 ng/µL; Z = 2.61, p = 0.009), hexadecanoic acid TMS (210 ± 30 vs 26 ± 6 ng/µL; Z = 2.61, p =

0.009) and octadecenoic acid TMS (2,065 ± 425 vs 75 ± 28 ng/µL; Z = 2.61, p = 0.009), 1-hexadecanoic acid glyceride DiTMS (1,385 ± 421 vs 43 ± 13 ng/µL; Z = 2.611, p = 0.009).

On the contrary, methyloctadecenoate was present in lower quantities on C0 cocoons than on C15 cocoons (91 ± 15 vs 186 ± 41 ng/µL; Z = 2.40, p = 0.016).

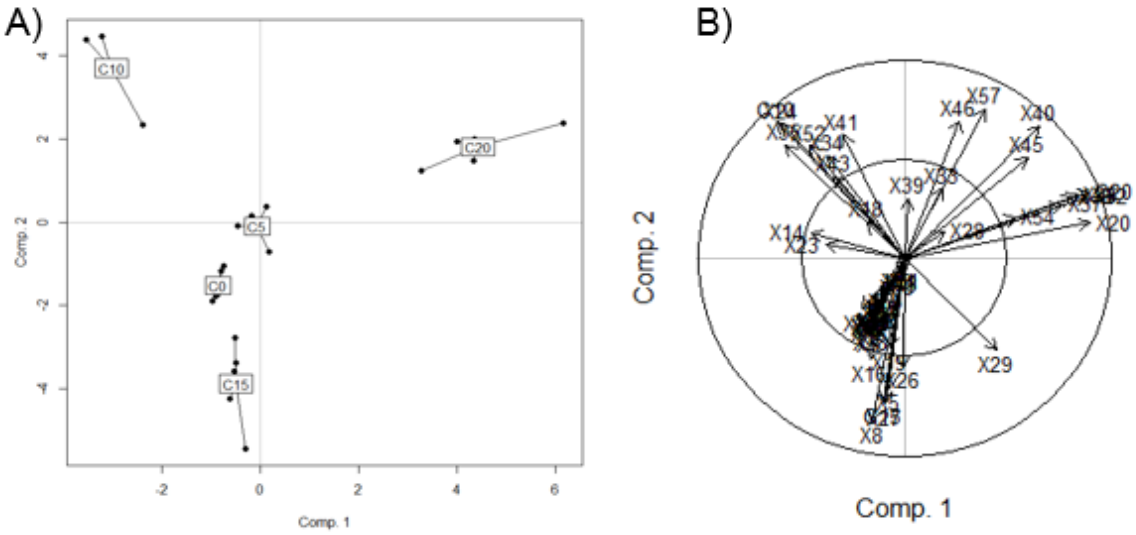


Figure 20: (A) PLS-DA on concentrations of chemical compounds from P. saltans cocoons (95 % confidence ellipses). Plot of 25 individuals: C0 = 0-day-old cocoons, C5 = 5-day-old cocoons, C10 = 10-day-old cocoons, C15 = 15-day-old cocoons and C20 = 20-day-old cocoons. (B) PLS-DA analysis b-plot of the total surface cocoon mixture of P. saltans. Numbers of compounds correspond to peak numbers of GC-MS (cf. Table 7).

III.1.3. Variations of compounds in relation to cocoon age

None of the diglycerides could be detected on 5-day-old, but seven compounds were present at all stages: methyl hecadecanoate, methyl octadecanoate, palmitoylethanolamine, octadecanoic acid DiTMS, 1-nonadecanol TMS, octadecadienoic acid ethanol amide and hexacosyl acetate. Some n-alkanes appeared: *n*-heptacosane appeared on 5-day-old cocoons, and then *n*-tricosane, *n*-tetracosane, *n*-pentacosane and *n*-nonacosane appeared between 10 and 20 days.

Quantifiable analysis of each compound in relation to cocoon age revealed several differences concerning the 57 chemical compounds identified. PLS-DA of concentrations of the chemical compounds showed that the 2 first axes represented 60 % of the total variance (30 % and 30 %, respectively; NMC=0, p-value = 0.001; Fig. 20A). C0 and C5 cocoons were not correlated to the first and second axes. C10 cocoons were correlated negatively to first axis and positively to the second axis. C15 cocoons were negatively correlated to the second and third axes. C20 cocoons were positively correlated to the first and the second axes.

Furthermore, PLS-DA showed that the first axis was negatively correlated to 7 compounds (1-hexadecanoic acid glyceride DiTMS, 1-hexadecanoic acid glyceride TMS, 1-octadecenoic acid glyceride DiTMS, n-tetracosane, n-pentacosane, n-nonacosane and campesterol TMS) and was positively correlated to 5 compounds (2-hexadecanoic acid glyceride DiTMS, n-tricosane, n-heptacosane, 1-tricosanol TMS and β-sitosterol TMS) (Fig. 20B). The second axis was negatively correlated to 6 compounds (methyl eicosatetraenoate, methyl octadecenoate, octadecanoic acid TMS, 1-nonadecanol TMS, 1-tetradecanoic acid glyceride DiTMS and 1-heneicosanol TMS).

III.2. Behavioural tests

Mean latencies to contact a cocoon varied significantly with experimental group (H = 11.877, p = 0.0078; Fig. 21A). These latencies did not differ significantly between mothers with their own cocoon: “M0-C0” *vs* “M15-C15”: 201 ± 64 sec *vs* 200 ± 67 sec (Z = 1.763, p = 0.078); but differed significantly between mothers with unfamiliar cocoons of a different age “M0-C0” *vs* “M0-C15”: 201 ± 64 sec *vs* 86 ± 53 sec (Z = 2.41, p = 0.016); “M15-C15” *vs* “M15-C0”: 200 ± 67 sec *vs* 131 ± 73 sec (Z = 2.07, p = 0.038). Mean durations of cocoon manipulation did not differ significantly between experimental groups (H = 1.538, p = 0.673; Fig. 21B). Most females (92 to 100 %) hung the cocoon presented (Table 9) and mean durations of cocoon hanging did not differ significantly between experimental groups (H = 2.941, p = 0.401; Fig. 21C). “M15” mothers tended to abandon the cocoon more than “M0” mothers (Table 9). “M15” mothers abandoned the cocoon between 18 and 23 days after hanging, and “M0” mothers between 12 and 29 days after hanging. These mothers did not

manifest any cocoon opening behaviour. Examination of these cocoons revealed that all the spiderlings were dead. Some of the "M15-C0" mothers (40 %) manifested an opening behaviour 25 days after hanging; the spiderlings did not emerge at that moment but emerged 6 ± 2 days after opening. Times to spiderlings' emergence from cocoons that had not been abandoned differed significantly between experimental groups ($H = 25.917$, $p < 0.0001$; Table 9). Mothers with their own cocoon (C0 and C15) opened it between 36 and 38 days after laying. Spiderlings from C0 cocoons emerged significantly sooner when their mother was a "M15" mother (31 days) than when she was a "M0" mother (36 days) ($Z = 3.25$, $p = 0.0007$); spiderlings emerged from C15 cocoons significantly sooner when their mother was a "M0" mother (32 ± 1 days) than when she was a "M15" mother (38 ± 1 days) ($Z = 3.935$, $p < 0.0001$). Mothers opened unfamiliar cocoons significantly sooner than their own ("M0-C0" *vs* "M0-C15": $Z = 2.79$, $p = 0.004$; "M15-C15" *vs* "M15-C0": $Z = 2.82$, $p = 0.003$).

Table 9: Behavioural data of P. saltans mothers with different cocoon status: frequency of hanging to spinnerets and abandonment of cocoon by mother (frequency and latency); frequency of opening the cocoon by the mother allowing spiderlings to emerge and age of spiderlings at emergence (days). n=number of cocoons tested.

Experimental groups	Hanging	Abandonment		Emergence	
	% (n)	% (n)	Days after test	% (n)	Days after laying
Mothers 0 with:					
- C 0	100 (12/12)	8 (1/12)	29 ± 0	92 (11/12)	35.5 ± 0.9[a]
- C 15	93 (11/12)	27 (1/11)	12 ± 0	73 (10/11)	32.0 ± 0.4[b]
Mothers 15 with:					
- C 0	100 (15/15)	7 (4/15)	22.8 ± 3.8	93 (11/15)	30.7 ± 0.1[b]
- C 15	100 (15/15)	20 (3/15)	18 ± 3.2	80 (12/15)	37.5 ± 0.8[a]

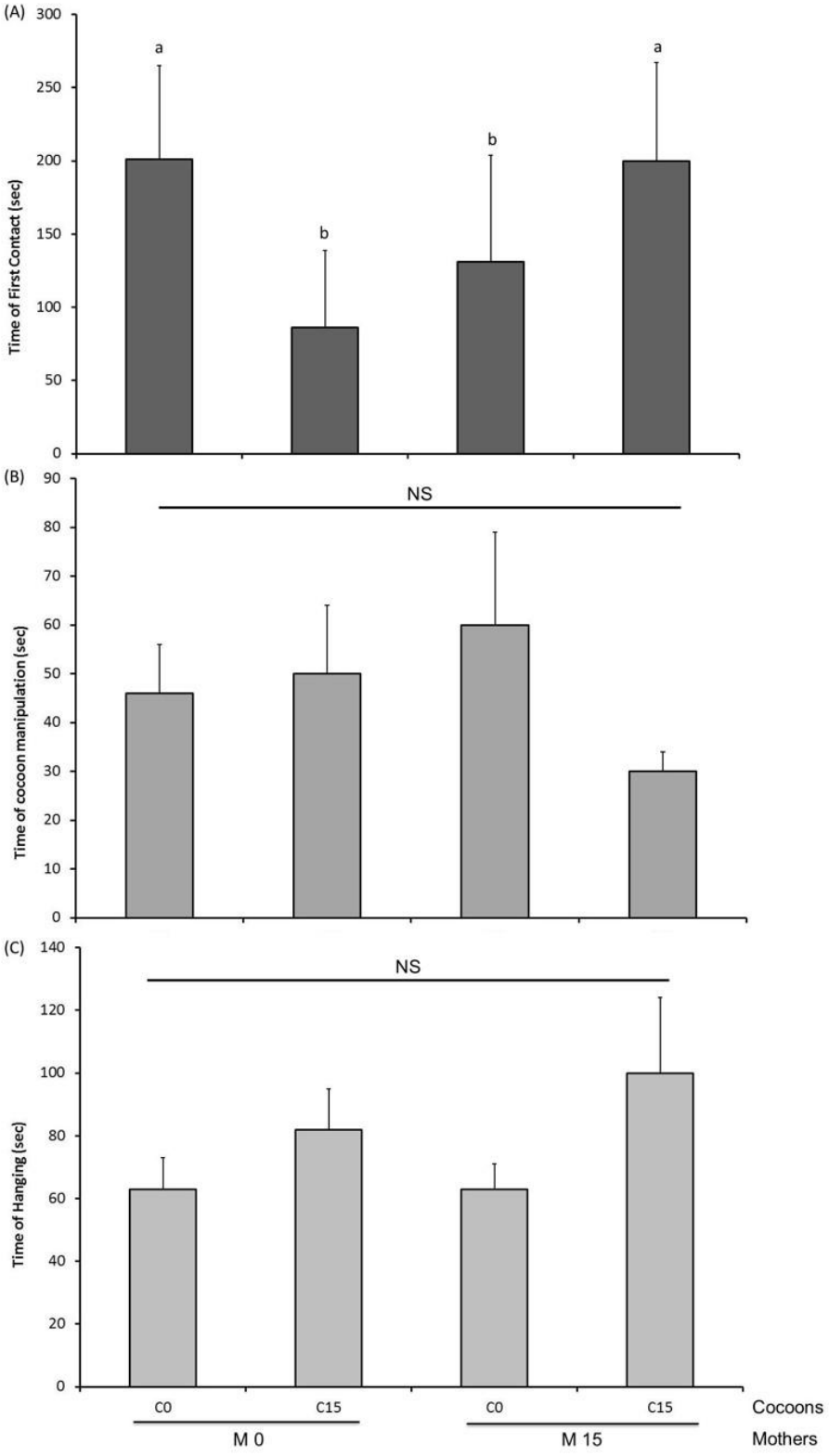


Figure 21: Behavioural data for each experiment: (A) Time until first contact between mother and cocoon (seconds); (B) Duration of manipulation of the cocoon by mother (seconds); (C) Time until hanging cocoon to spinnerets (seconds). Data were compared using Kruskall-Wallis tests followed with Mann-Whitney post-hoc tests: different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$; NS: non-significant.

IV.Discussion

IV.1. Chemical composition

Polar lipids present on cocoons' silk surface present a complex wax mixture principally composed of aliphatic alcohols, glycerides (mono- and diglycerides), fatty acids and their methylesters. These families have also been identified by authors as components of sedentary spiders' web silk (Schulz, 1997; Prouvost *et al.*, 1999b; Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). Some components vary in relation to cocoon age (embryonic and post-embryonic periods). Thus, palmytoylethanolamide (PEA) is present when the cocoon is built, as far as we know this amide of palmitic acid and ethanolamine has never been identified in invertebrates but is well known in vertebrates as a reducer of pain and inflammation (Benvenuti *et al.*, 1968; Perlik *et al.*, 1971; Kahlich *et al.*, 1979). This compound was no longer detected after 5 days of development; so we question the role of this compound is during the embryonic development. Furthermore, our analyses revealed the presence of cholesterol and two phytosterols: β-sitosterol and campesterol which have chemical structure similar to that of cholesterol. Campesterol was detected only during the first days of development, and the quantities of the two other sterols varied with cocoon age. The presence of these phytosterols on newly built cocoons (C0) could be explained by the fact that females build their cocoon on the ground, so their presence on cocoons could be explained by contact between cocoon and litter (passive deposit). However, both these compounds have anti-inflammatory proprieties and facilitate regulation of mammals' plasmatic rates of free cholesterol (Bouic, 2001; Wong, 2001). As the cocoon protects the eggs from different environmental factors such as predation, parasitism, desiccation and temperature changes (Nørgaard, 1956, Bradoo, 1973; Eberhard, 1974; Humphreys, 1974; Lubin, 1974) we can question whether the presence of phytosterols on *P. saltans* spiders' cocoons is linked to an active deposit by mothers in order to favour embryonic development. Another particularity is that diglycerides were present only on 0-day-old cocoons. These highly hydrophobic compounds could protect the cocoon from desiccation during the first five days of development. Furthermore, only newly built cocoons (C0) present on their surface ethanolamines.

All the other compounds varied with cocoon age, i.e. with embryonic (between C0 and C10) and post-embryonic (between C15 and C20) development inside the cocoon. For

example, hydrocarbons (*n*-alkanes) appeared progressively after 10 days of development just before the young hatch. On the contrary, all the fatty acids disappeared before spiderlings emerged (at C20). These variations of compound composition with cocoon development could be linked either to maternal behaviour, because mothers manipulate their cocoon regularly with their palps, clean it with their chelicerae and so could add compounds to those provided by her spinnerets, or to chemical cues emitted by young developing inside the cocoon that could cross the silk protection and be perceived on the outside by mothers.

Furthermore, studies of sedentary spiders showed that mother's web, when her young emerge and aggregate around her and around the cocoon, is covered by numerous linear hydrocarbons (*n*-alkanes) but fatty acids are absent (Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). Pourié *et al.* (2005) observed that the absence of fatty acids facilitates the development of the social tolerance (inhibition of cannibalism) of maternal females with foraging spiderlings. We suggest that the disappearance of fatty acids and the increasing amounts of hydrocarbons just before emergence could play a role in the apparition of maternal tolerance in order to let the spiderlings climb on their mother back.

IV.2. Maternal behaviour and cocoon recognition

Our results show that mothers are able to adopt unfamiliar cocoons of an age different from that of their own. Females take longer to contact cocoons of the same age as their own than cocoons of a different age. This could be explained by attraction to an unfamiliar cocoon odour. Nevertheless, females' behaviour (manipulation and hanging) did not differ significantly with age of unfamiliar cocoons, so they seem to be unable to distinguish cocoon age at this moment as do sedentary web-building spiders *Anelosimus studiosus* (Viera *et al.*, 2007b). However, our chemical analyses of lipids on the cocoon surface revealed differences between recently laid (0-day-old) and 15-day-old cocoons although *P. saltans* mothers manipulate and hang deodorized cocoons (unpublished data). The fact that our results confirm these observations suggests that either chemical cues are not sufficient to allow mothers to detect cocoon age or that maternal care (and in particular hanging a cocoon just after losing it) is an obligatory behaviour during the cocoon guarding period. Mothers seem to abandon adopted cocoons more frequently after 15 days of maternal care than at the beginning of a

maternal cycle, but their times to abandonment were similar: mothers abandoned these cocoons several days before the time spiderlings should theoretical emerge without manifesting any opening behaviour. In both case, abandonment of those cocoons was not linked to their age but to the unviability of these young. Furthermore, M15 females with C0 cocoons initiated opening at 25 days of development (for the mothers 40 days after laying), when the young were not ready to emerge. These opened cocoons were still carried by the female until emergence of spiderlings. For some authors both internal (neurohormonal mechanisms) and external (juveniles' movements) stimuli can elicit female spiders' opening behaviour (Enghelhardt, 1964; Fujii, 1978; Vannini *et al.*, 1986). Our results suggests that *P. saltans* mothers' biorhythm could play an important role in this opening behaviour, but lipid compounds on the cocoon surface could also be involved as external stimuli because their composition varies during development. Times to opening cocoon (and so to spiderling emergence) of mothers guarding their own cocoon were similar (between 36 and 38 days of development), but longer than in 2015 because of temperature and humidity differences (Ruhland et al., submitted). When mothers guard an unfamiliar cocoon of an age different from that related to their biorhythm, they open it (to enable spiderlings' emergence) sooner than when they guard their own cocoon. A previous study of the same species (Ruhland et al., submitted) showned that unfamiliarity of a cocoon did not modify this latency; so the differences observed here are linked to the age difference. Young are mobile inside 15-day-old cocoons, but neither the vibrations at that moment nor the absence of vibratory signals from 0-day-old cocoons appear sufficient to modify maternal behaviour. Thus our results show that the interaction between these factors (internal and external) have to be synchronized in order to allow emergence.

V. Conclusion

Cocoons which have just been laid (0-day-old) present the most complex wax mixture of all ages analysed and present compounds not previously identified in arthropods. Our results show that the chemical composition of the surface of *Pardosa saltans'* cocoons varies with cocoons age (embryonic and post-embryonic periods). Mothers' care behaviour of unfamiliar cocoons of different ages was similar to that of their own; but cocoon opening is linked to internal (mother's biorhythm) and external (from the cocoon) mechanisms.

Article 5

Identification des composés cuticulaires des femelles

I. Introduction

Les lipides cuticulaires présents chez les arthropodes ont pour principal rôle une protection contre la dessication (Hadley, 1994 ; Gibbs *et al*., 1998). Cependant, ces composés peuvent également permettre une communication tacto-chimique intraspécifique. Le profil cuticulaire des femelles araignées varie en fonction de leur état physiologique. En effet des études ont pu mettre en évidence une variation des composés lipidiques de surface en fonction de l'âge des femelles, de leur maturité sexuelle mais également en fonction de leur cycle reproducteur (Trabalon *et al*., 1996, 1998, 2005 ; Pourié & Trabalon, 1999, 2001). La composition de lipides cuticulaires des araignées est similaire à celle des insectes et est majoritairement constituée d'hydrocarbures, d'acides gras et de methylesters (Prouvost *et al.,* 1999b ; Schulz, 2004). Peu d'informations existent sur les glandes impliquées dans la production des lipides cuticulaires. Cependant, chez les araignées, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les lipides cuticulaires pourraient être synthétisés au niveau de l'intégument et transportés vers l'épicuticule *via* des glandes de cires cuticulaires modifiées ou des organes abdominaux (Tietjen & Rovner, 1982 ; Pollard *et al.,* 1987 ; Trabalon *et al.,* 1996).

Nous avons pu observer précédemment que le profil lipidique de surface des cocons varie en fonction des stades de développement. La femelle au cours de la période de gardiennage, manipule régulièrement son cocon. Nous pouvons émettre l'hypothèse que certains composés présents à la surface du cocon sont déposés soit activement par la femelle lors de ces manipulations soit passivement lors des frottements du cocon contre la cuticule maternelle.

L'objectif de notre expérience est donc (1) de regarder si le profil cuticulaire des mères varie au cours de la période de gardiennage du cocon et (2) de comparer les composés lipidiques identifiés à la surface du cocon avec les composés cuticulaires afin de savoir si tous les composés sont présents ou partiellement sur la soie externe du cocon.

II. Méthodes

Nous avons réalisé 11 pools d'extrait cuticulaire (5 femelles / extrait) provenant de femelles vierges (Virgin), de mères le jour de leur oviposition (F0), de mères après 5 (F5), 10 (F10), 15 (F15) et 20 jours de gardiennage du cocon (F20). Les mêmes extraits biologiques ont été réalisés en parallèle avec leurs cocons respectifs (C0, C5, C10, C15 et C20). Les femelles et les cocons ont été lavés dans 200 µL de méthanol pendant 10 mn pour extraire les composés lipidiques. Les extraits biologiques ont été analysés avec la méthode décrite dans le chapitre «Analyses chimiques des extraits biologiques : méthode générale».

III. Résultats

La cuticule des femelles vierges et maternantes est composée d'une mixture d'alcools, de monoglycérides, d'acides gras et d'hydrocarbures (*n*-alcanes et *n*-méthylalcanes) (Table 10 et 11).

Dans les extraits cuticulaires des femelles **vierges**, 3 composés (le β-sitosterol TMS, le 1-octadecenoic acid glyceride DiTMS et le n-hexacosane) ne sont pas retrouvés chez les femelles maternantes. A l'inverse, 2 hydrocarbures (le *n*-pentacosane et le *n*-nonacosane) sont présents seulement dans les extraits cuticulaires des **mères**. Par ailleurs, certains composés ne sont pas détectables dans les extraits cuticulaires des femelles transportant un cocon de 5 et 10 jours. C'est le cas de 2 alcools (le 1-eicosanol et le 1-docosanol), 2 monoglycérides (le bis (hexadecanoic acid) glyceride TMS et l'hexadecanoic acid octadecanoic acid glyceride TMS) et de l'ensemble des acides gras.

Table 10 : Identification acides gras, esters et glycérides présents à la surface des cocons et de la cuticule des femelles en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en terme de présence/absence : P = composé présent, - = composé absent.

Name	C0	C5	C10	C15	C20	Vierge	F0	F5	F10	F15	F20
Fatty Acids											
Tetradecanoic acid TMS (myristic)	P	-	-	p	-	-	-	-	-	-	-
Pentadecanoic acid TMS	P	-	-	P	-	-	-	-	P	-	-
Hexadecanoic acid TMS (palmitic)	P	P	P	P	-	P	-	P	P	-	-
Heptadecanoic acid TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-
Octadecenoic acid TMS	P	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
Octadecanoic acid TMS (stearic)	P	P	P	P	-	P	P	P	P	-	-
Eicosanoic acid TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-
Esters											
Methyl hexadecanoate (palmitate)	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl heptadecanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-
Methyl Eicosatetraenoate	P	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
Methyl octadecadienoate	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl octadecenoate (stearate)	P	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-
Octadecyl acetate	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
Eicosyl acetate	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexacosyl acetate	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerides											
Monoglycerides											
1-Dodecanoic acid glycerid DiTMS	P	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Tetradecanoic acid glyceride DiTMS	-	-	-	-	-	P	-	-	-	P	P
1-Tetradecanoic acid glyceride DiTMS	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
1-Pentadecanoic acid glyceride TMS	-	P	-	-	-	P	P	P	-	P	P
2-Hexadecanoic acid glyceride DiTMS	P	-	-	-	P	P	P	P	P	P	P
2-Hexadecanoic acid glyceride TMS	P	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-
1-Hexadecanoic acid glyceride DiTMS	P	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P
1-Hexadecanoic acid glyceride TMS	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Octadecenoic acid glyceride DiTMS	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
1-Octadecenoic acid glyceride DiTMS	-	P	-	-	-	P	-	-	-	-	-
1-Octadecanoic acid glyceride DiTMS	P	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P
1-Octadecanoic acid glyceride TMS	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Dodecanoic acid glyceride DiTMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-
1-Eicosanoic acid glyceride DiTMS	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
1,2-Bis(hexadecanoic acid) glyceride TMS	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Eicosanoic acid glyceride DiTMS	P	P	P	P	P	-	-	-	-	-	-
Bis(hexadecanoic acid) glyceride TMS	P	P	P	P	P	P	P	P	-	-	-
Hexadecanoic acid octadecanoic acid glyceride TMS	-	P	P	P	P	P	P	P	-	-	-
Diglycerides											
Diglyceride 1	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 2	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 3	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 4	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 5	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 6	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 7	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 8	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 9	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 10	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglyceride 11	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table .11 : Identification alcools, ethanolamines, amides d'acides gras et hydrocarbones présents à la surface des cocons et de la cuticule des femelles en fonction du temps. Les résultats sont exprimés en terme de présence/absence : P = composé présent, - = composé absent.

	Name	C0	C5	C10	C15	C20	Vierge	F0	F5	F10	F15	F20
Alcohols												
	1-Hexadecanol TMS	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1-Octadecanol TMS	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1-Nonadecanol TMS	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1-Eicosanol TMS	P	P	P	P	P	P	P	P	-	-	-
	1-Heneicosanol	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
	1-Heneicosanol TMS	P	P	P	P	P	-	-	-	-	-	-
	1-Docosanol TMS	P	P	P	-	P	P	P	P	-	-	-
	1-Tricosanol TMS	-	-	-	P	P	-	-	-	-	-	-
	1-Tetracosanol TMS	-	P	P	P	P	-	-	-	-	-	-
	1-Hexacosanol TMS	P	P	P	-	P	-	-	-	-	-	-
	1-Octacosanol TMS	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-
	Sterols											
	Cholesterol	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cholesterol TMS	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	Campesterol	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Campesterol TMS	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	β-Sitosterol	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	β-Sitosterol TMS	P	P	P	P	P	P	-	-	-	-	-
Ethanolamines												
	Octadecadienoic acid ethanol amide	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Octadecenoic acid ethanol amide	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9-Octadecenoic acid ethanolamide	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatty Acids Amide												
	Palmitoylethanolamine	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrocarbons	**n-alkanes**											
	Tricosane	-	-	P	P	P	-	-	-	-	-	-
	Tetracosane	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	P
	Pentacosane	-	-	-	P	P	-	P	P	-	P	P
	Hexacosane	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-
	Heptacosane	-	P	-	-	P	P	P	P	P	P	P
	Nonacosane	-	-	P	P	P	-	P	P	P	P	P
	n-methylalkanes											
	2-Methylhexacosane	-	-	-	-	-	P	-	-	P	P	-
	11-methyl and 13-methyl branched hydrocarbon	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-

Contrairement aux extraits lipidiques provenant des cocons, les extraits cuticulaires provenant des femelles ne contiennent pas de diglycérides, d'esters, d'éthanolamines et d'amides d'acides gras. Parmi les autres composés chimiques, seulement 7 composés sont détectés uniquement chez les mères : 2 monoglyécides (le 2-tetradecanoic acid glyceride DiTMS et le 1-dodecanoic acid glyceride DiTMS), le methyl heptadecanoate, l'heptadecanoic acid TMS, l'hexacosane et les *n*-methylalcanes. En revanche de nombreux composés sont présents exclusivement à la surface des cocons : des alcools (comme le 1-heneicosanol TMS, le 1-tetracasanol TMS et le 1-hexacosanol TMS), des monoglycérides (comme le 1-dodecanoic acid glyceride DiTMs, le 2-hexadecanoic acid glyceride TMS, le 1-hexadecanoic acid glyceride TMS et le 1-eicosanoic acid glyceride TMS), 2 acides gras (le tetradecanoic acid TMS et l(octadecenoic acid TMS), 2 hydrocarbones (le tricosane et le tetracosane) et l'ensemble des diglycérides, des esters, des ethanolamides et des amides d'acides gras.

IV. Discussion – Conclusion

Nos résultats indiquent que le profil cuticulaire des femelles *P. saltans* est similaire en composition à ceux d'autres espèces d'araignées, comme les Tégénaires et *Coelotes terrestris* (Trabalon *et al.,* 1996, 1997, 2011 ; Prouvost *et al.,* 1999b ; Trabalon & Assi-Bessekon, 2008). De plus, la composition lipidique cuticulaire des mères est différente de celle de femelles vierges. La copulation et/ou l'oviposition induisent donc une modification dans la composition des cires cuticulaires en accord avec d'autres travaux (Trabalon *et al.,* 1996, 1998, 2005 ; Pourié & Trabalon, 1999, 2001). Chez *Brachypelma albopilosum* (Theraphosidae), la variation de lipides cuticulaires est similaire à la variation des taux d'acides gras hémolymphatiques (Trabalon, 2011). Il est donc possible qu'une modification de l'état physiologique des femelles *P. saltans* après l'oviposition (baisse des lipides hémolymphatiques) soit liée à une modification de leur profil lipidique cuticulaire. Le changement d'informations chimiques sur la cuticule des femelles maternantes pourrait servir de signal répulsif pour les mâles cherchant à s'accoupler.

Nos résultats montrent que certains composés cuticulaires disparaissent entre le 5ème et le 10ème jour de gardiennage du cocon (des alcools, monoglycérides et l'ensemble des acides gras). Chez *B. albopilosum,* la présence de certains lipides (plus particulièrement des

acides gras) entraîne l'inhibition des comportements aggressifs et la manifestation de comportements de tolérance sociale (Trabalon, 2011). La disparition de ces composés chez les mères *P. saltans* pourrait donc être liée à ce type de phénomène. En effet, les jeunes, lorsqu'ils émergent du cocon, grimpent sur l'abdomen de la mère qui les tolère et les transporte pendant 4 à 6 jours en absence de tout comportement agressif. Il est possible que l'absence de ces composés permette aux jeunes de détecter le comportement de tolérance de la mère.

Les composés présents à la fois à la surface des cocons et sur la cuticule des mères peuvent nous indiquer une transmission d'indices chimiques de la mère vers le cocon. Il est également possible que certains composés soient inhérents à l'environnement dans lequel la mère et son cocon se déplacent.

Enfin, les cocons présentent à leur surface des composés qui ne sont pas identifiés chez les mères. Ces composés (alcools, monoglycérides, diglycérides, esters, ethanolamides et amides d'acides gras) peuvent provenir de 2 sources : soit ce sont des composés caractéristiques de la soie constituant le cocon, soit ce sont des signaux chimiques émis par les embryons et qui traversent les différentes couches de soie permettant ainsi de former une signature chimique caractéristique de chaque cocon.

Discussion - Conclusion

Le but de ce travail de thèse était d'étudier les comportements maternels exprimés par l'araignée errante *Pardosa saltans*, en tenant compte de leur variabilité et de leur flexibilité au cours du temps. Cette étude devait également aborder les mécanismes impliqués dans l'expression de ce comportement maternel et d'évaluer les coûts qu'il représente en termes de survie pour la femelle et de possibilité future de reproduction.

I. Stades de développement et soins maternels

Le comportement maternel de la femelle *P. saltans* débute dès la ponte et s'achève avec la dispersion des jeunes 38-40 jours après. Il est observé pendant toute la période d'incubation des embryons et pendant toute la période grégaire des jeunes comme chez de nombreuses espèces d'arthropodes (Tableau 12).

Tableau 12 : Stades auxquels s'exercent les soins maternels chez Pardosa saltans (Lycosidae)

Stades	**Types de soins observés**
Œufs	Incubation indirecte (cocon)
Embryons	Transport
Juvéniles pré-émergence	Protection (température, prédation, parasitismes….)
	Ouverture du cocon
Juvéniles post-émergence	Protection
	Transport
	Pas de nourrissage, Pas de toilettage

Cette association mère - jeunes présente tous les critères qui permettent de classer *P. saltans*, espèce solitaire errante, dans un groupe de type sub-social temporaire lorsqu'elle est en période de reproduction.

La construction du cocon dure 2 heures et s'achève avec le dépôt d'un liquide bleu sur toute la surface du cocon. La mère n'abandonne pas son cocon et manifeste dès son achèvement un comportement spécifique à son espèce : elle accroche le cocon à ses filières et

le transporte pendant toute la période correspondant au développement embryonnaire et à une période post-embryonnaire de développement des juvéniles à l'intérieur du cocon comme décrit par d'autres auteurs (Vachon, 1957 ; Canard, 1987). Ce comportement de gardiennage du cocon est comparable à celui développé par les autres araignées errantes de la famille des Lycoses (Eason, 1964).

Nos observations du développement embryonnaire et post-embryonnaire montrent que les jeunes *P. saltans* éclosent 15 jours après la ponte et subissent 2 mues post-éclosion avant d'émerger du cocon, 15 jours après. Au moment où les jeunes éclosent, il y a apparition d'une bande blanche sur toute la circonférence du cocon (à l'endroit de jonction des 2 coques de soie, appelée suture équatoriale). Cette bande « souple » entraîne une distension du cocon (augmentation du volume) et permet aux juvéniles mobiles à l'intérieur d'avoir plus d'espace pour effectuer leurs futures mues (Fujii, 1977). Ce phénomène a été également observé chez d'autres espèces d'araignées comme par exemple chez la pisaure *Dalomedes plantarius* (Bonnet, 1946). Le comportement de gardiennage du cocon dure donc en moyenne 30 jours. La durée de gardiennage du cocon par la femelle *P. saltans* est comparable à celle observée chez d'autres espèces errantes mais aussi chez des espèces sédentaires comme *C. terrestris* (Assi-Bessekon, 1992) ou *T. atrica* (Trabalon *et al.*, 1996).

Par ailleurs, nos observations montrent que les mères *P. saltans* participent à l'émergence des jeunes en déchirant le cocon avec leurs chélicères au niveau de la suture périphérique du cocon. L'ouverture du cocon par les mères semble obligatoire comme chez d'autres espèces de lycosides (Eason & Whitcomb, 1965 ; Whitcomb & Eason, 1967 ; Hirschberg, 1969 ; Higashi & Rovner, 1975 ; Viera *et al.*, 2007b). En effet, nous avons constaté que les jeunes dans les cocons non ouverts par la mère suite à nos expériences de retrait du cocon et de non adoption par les femelles vierges n'émergeaient pas alors qu'ils étaient parfaitement développés. Les raisons écologiques de l'ouverture du cocon par la mère restent floues, mais l'étude approfondie de ce comportement obligatoire chez des espèces sub-sociales transitoires pourra peut être nous renseigner sur son caractère évolutif.

Après l'émergence, les jeunes grimpent sur le dos de la mère et sont transportés ainsi pendant 4-5 jours. Pendant ce transport, les jeunes peu mobiles restent groupés. Lors de nos observations, nous n'avons jamais observé de comportements de nourrissage ou de toilettage

des jeunes par la mère. Les jeunes achèvent d'utiliser leur stock de vitellus pendant la période de phorésie familiale. Vers le 5ème jour post-émergence, les jeunes descendent du dos de la mère et subissent dans les heures qui suivent la 1ère mue post-émergence. Vers les 6ème - 7ème jours, le stock de vitellus est épuisé, les jeunes commencent à s'éloigner de la mère et à attraper des petites proies. La dispersion se réalise vers le 8ème jour post-émergence. La mère devient à nouveau solitaire et réalise une 2ème ponte environ 15 jours après la dispersion de sa 1ère portée.

I.1. Le comportement maternel varie-t-il au cours du temps ?

Notre étude permet de mettre en évidence la présence d'actes moteurs associés au gardiennage du cocon, mais également une ontogenèse du comportement de soin.

Pendant les dix premiers jours de la période embryonnaire, le comportement locomoteur et exploratoire des mères est comparable à celui des femelles vierges. De plus, contrairement à des observations réalisées sur d'autres espèces, les femelles *P. saltans* ne manipulent pas leur cocon qui reste accroché pendant toute cette période aux filières. Or d'après Foelix, (2011) et Marshall (1996), le comportement de rotation du cocon permettrait d'éviter l'agglutinement des œufs à l'intérieur du cocon. Nous pensons que les mouvements liés au transport du cocon sont suffisants pour empêcher l'agglutinement des œufs chez *P. saltans* et permettent ainsi à la femelle de continuer à avoir un comportement locomoteur et prédateur régulier sans perdre du temps à manipuler son cocon.

La femelle *P. saltans* commence à modifier son comportement vis-à-vis de son cocon entre le 10ème et le 15ème jour de gardiennage. En particulier, régulièrement elle tape ses premières paires de pattes au sol entraînant des vibrations au niveau de l'abdomen. Nous supposons que ces vibrations sont transmisses, *via* l'abdomen puis les filières de la mère, aux embryons à travers le cocon. Ces vibrations perçues par les embryons au cours de leur développement stimuleraient la mise en place et la croissance de leurs organes sensoriels.

Les mères, avec des cocons âgés entre 15 et 30 jours, manifestent des comportements directement dirigés vers le cocon. Elles le ramènent sous leur céphalothorax afin de pouvoir le décrocher et le manipuler à l'aide de ses premières paires de pattes et ses pédipalpes. Nous supposons que ce comportement de manipulation du cocon permet à la mère de détecter l'état physico-chimique du cocon (i.e. présence de perforations des coques de soie due à l'environnement accidenté, de parasites, de champignons, température, humidité) et recevoir des informations des juvéniles qui ont éclos et sont mobiles à l'intérieur du cocon. Cette manipulation du cocon permettrait donc à la mère de percevoir des signaux non perceptibles autrement, mais également de rajouter si nécessaire des substances de protection sur le cocon ou de la soie, comme observé chez certaines araignées sub-sociales sédentaires (Gunderman, 1989 ; Assi-Bessekon, 1992). Ces comportements dirigés vers le cocon augmentent en fréquence avec le temps et s'achèvent au moment de l'ouverture du cocon par la mère. Ce qui renforce notre hypothèse selon laquelle ces activités permettent à la mère de s'assurer de la viabilité ou non de sa progéniture *via* les signaux perçus au niveau du cocon.

Pendant la phase d'éclosion des jeunes dans le cocon, lorsque le volume du cocon augmente, le comportement exploratoire et locomoteur des femelles *P. saltans* n'est pas modifié par le transport du cocon. De plus, les mères présentent une activité de prédation importante. Cependant lors de leurs déplacements, les mères *P. saltans* modifient la position de leurs pattes et de leur abdomen pour adopter des positions de plus en plus élevées afin de maintenir le cocon en hauteur et ainsi éviter probablement les obstacles présents sur le sol. Ce comportement d'adaptation de la posture de la mère a été également observé avec les femelles d'une autre lycose, *P. tristis* (Moffett & Doell 1980).

Les expériences réalisées en laboratoire impliquant des adoptions croisées de cocons entre des mères et des cocons d'âges différents (jour de construction du cocon *vs* jour de l'éclosion des jeunes) nous ont permis de vérifier cette observation sur la modification des postures des mères en relation avec l'âge du cocon. Les mères de cocons de 15 jours au moment du retrait présentent un angle entre leur abdomen et le sol beaucoup plus important que celui des femelles venant juste de pondre (cocons de 2-4 heures). De plus, ces mères de cocons de 15 jours, lorsqu'elles adoptent un jeune cocon, montrent des difficultés à l'accrocher à leurs filières, (en effet, l'abdomen reste trop éloigné du cocon qui est plus plat que le leur) et mettent donc plus de temps à le manipuler avant de l'adopter (Fig. 22).

Par ailleurs, Colancecco *et al*. (2007) montrent que les mères *P. milvina* qui transportent un cocon sont plus sensibles à la prédation que lorsqu'elles ne transportent pas de cocon. Or, dans le cadre de nos observations, nous avons vu que l'activité locomotrice des femelles n'est pas modifié par le transport du cocon. Par contre, le cocon devient plus visible suite à la modification de sa posture de déplacement. L'augmentation de la prédation observée chez *P. milvina* est peut être liée à une diminution de l'efficacité du camouflage du cocon et non à une modification de sa locomotion.

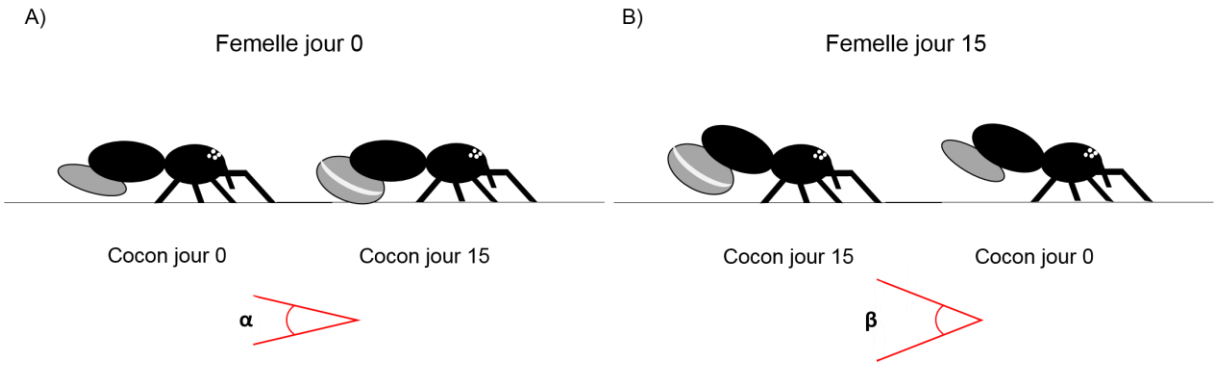


Figure 22 : Représentation schématique d'une adoption entre des cocons de jour 0 et de jour 15 avec A) des femelles de jour 0 et B) des femelles de jour 15. α représente l'angle sol-abdomen des femelles de jour 0, et β représente l'angle sol-abdomen des femelles de jour 15.

Dès l'émergence des jeunes, et pendant les 4-5 jours de transport, les mères *P. saltans* modifient leur comportement locomoteur et prédateur. Les mères se déplacent moins et surtout ne s'alimentent plus. Cette inhibition de l'activité prédatrice est probablement liée au risque pour la mère de confondre un de ses jeunes avec une proie. Par conséquent, de diminuer son succès reproducteur si elle cannibalise ses jeunes. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'au laboratoire, en présence de proies, l'activité prédatrice de la mère n'est observée à nouveau qu'après la dispersion des jeunes.

I.2. La mère dépense-t-elle beaucoup d'énergie lors des soins au cocon et aux jeunes ?

Les coûts énergétiques associés à la fabrication et au gardiennage du cocon puis des jeunes sont importants et variables chez les araignées errantes ayant un mode de vie sub-social transitoire. Mais la maintenance somatique de ces femelles araignées suit-elle le schéma proposé par Alonso-Alvarez & Velando (2012) malgré l'absence d'approvisionnement des jeunes en nourriture ?

La production du cocon de soie est une dépense très importante pour la femelle. Le stock de soie est limité chez les araignées, et en particulier chez les espèces errantes. En effet, ces espèces n'utilisent de la soie que pour construire leur cocon et parfois laisser des fils de cheminement ou de marquage. La production d'une si grande quantité de soie pendant une période si brève doit donc être particulièrement coûteuse, en particulier au niveau des protéines, puisque la soie est majoritairement constituée de protéines (Vollrath, 1999). Nos résultats montrent que les taux de protéines et de glucose chez les mères *P. saltans* sont élevés à la fin de la ponte et de la construction du cocon. Ces taux sont également élevés au moment de l'ouverture du cocon, 30 jours après la ponte. Les femelles *P. saltans* présentent donc un métabolisme protéique et glucidique permettant d'anticiper, ces comportements clefs du comportement maternel qui entraînent de fortes dépenses énergétiques. Nous émettons deux hypothèses : 1 - les femelles construisent un cocon et n'ouvrent le cocon que lorsque leurs niveaux de réserves protéiques et glucidiques sont optimums afin de réaliser ces comportements dans les meilleures conditions ; 2 - les femelles stockent les protéines et les glucides avant de débuter le comportement de reproduction. La première hypothèse nous laisse penser que les mères n'ouvriraient jamais leur cocon lors de périodes de privation alimentaire. Cette hypothèse pourra être testée aisément en laboratoire dans le cadre de nouvelles expériences.

Par ailleurs, au cours du gardiennage du cocon, les mères *P. saltans* font face à une diminution de leur masse alors que celle du cocon transporté ne varie pas. La variation de la masse de la femelle au cours du temps n'est donc pas en lien avec une variation de la masse transportée. Par contre, nous venons de voir que pendant cette période la femelle modifie la position de son corps et de ses pattes pour maintenir une position stable lors du transport du

cocon, notamment lorsqu'il augmente de volume. Le maintien de cette position surélevée doit entraîner des dépenses énergétiques qui peuvent être compensées en partie par l'apport alimentaire. Notre étude montre que les taux de protéines et de glucose varient alors que les taux des triglycérides restent stables. Les mères *P. saltans* compensent donc leurs pertes énergétiques pendant la période de transport du cocon uniquement en utilisant l'énergie apportée par l'alimentation. Mais cet apport n'est pas suffisant pour compenser toutes les dépenses et l'araignée utilise en priorité son stock de protéines et de glucides, ce qui entraîne une baisse progressive de la masse corporelle chez la femelle.

L'activité locomotrice des femelles après l'émergence des jeunes est très faible voir inexistante. Nous supposons que le ralentissement de l'activité locomotrice permet à la mère de maintenir sur son dos ses jeunes dans les meilleures conditions mais aussi de diminuer ses dépenses énergétiques, donc de réduire son métabolisme basal. De plus l'activité de prédation n'est pas observée pendant cette période. Deux hypothèses ont été avancées : 1 - la prédation est inhibée pour permettre à la mère de ne pas confondre des proies avec ses jeunes ; la prédation implique la synthèse de venin, donc un investissement énergétique supplémentaire pour la mère (Malli *et al.,* 1999 ; Wigger *et al.,* 2002). La mère ne réalise pas cette dépense énergétique et inhibe son comportement prédateur. Ces comportements (baisse de l'activité locomotrice et inhibition de la prédation) entraînent une baisse générale des taux de constituants métaboliques (lipides, glucides et protéines) chez les mères *P. saltans*. Le stock énergétique représenté par les lipides est utilisé lors de cette phase de privation alimentaire comme chez d'autres espèces (Arrese & Soulages, 2010).

La dispersion graduelle des jeunes entraîne une diminution de la masse transportée par la femelle, qui augmente en parallèle son activité locomotrice, et reprend son activité prédatrice. L'apport alimentaire entraîne l'augmentation des taux des métabolites énergétiques et la masse corporelle de la mère augmente graduellement. L'activité maternelle est donc bien en relation avec la présence de ses jeunes et la dispersion des jeunes permet à la mère de retrouver une activité normale comme chez *P. monticola* (Bonte *et al.,* 2007). De plus, l'augmentation rapide des stocks énergétiques pendant cette période est probablement en relation avec le démarrage d'un nouveau cycle de maturation ovarienne (vitellogenesis) qui permet à la mère de pondre à nouveau une dizaine de jours après la dispersion de sa 1ère couvée.

Les coûts métaboliques sont donc importants en termes d'énergie chez les araignées errantes exprimant des soins maternels. La maintenance somatique des femelles est directement influencée par leur statut reproducteur et la présence de soins maternels. Un trade-off se met en place entre les dépenses énergétiques associés aux soins et la maintenance d'un métabolisme basal suffisant pour la production des soins et la survie de la mère. Ces mécanismes suivent donc le schéma proposé par Alonso-Alvarez & Velando (2012), mais nos résultats confirment seulement une partie de ce modèle (Fig. 23). L'acquisition et l'allocation des micronutriments, ainsi que l'influence des parasites, prédateurs et conspécifiques sur la maintenance et les dommages somatiques restent à être étudiées.

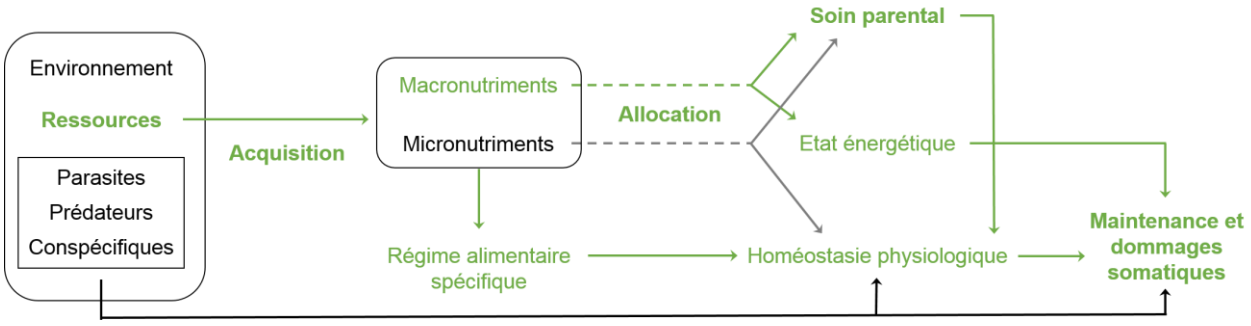


Figure 23 : Schéma représentant les mécanismes hypothétiques reliant le soin parental à la maintenance somatique. En vert, les mécanismes observés chez P. saltans pendant le gardiennage du cocon (modifié de Alonso-Alvarez & Velando, 2012).

I.3. La mère a-t-elle un investissement écologique lors des soins au cocon ?

La construction du cocon est chronophage pour la femelle (environ 2 heures chez *P. saltans*), ce qui entraîne une position statique chez la femelle errante. Cette position cause un grand risque de prédation chez ces femelles qui sont en phase reflexe de ponte et de construction du cocon. On peut supposer que leur niveau de vigilance est moins efficace. Par conséquent les femelles doivent privilégier les endroits les plus propices pour ne pas être aperçues et détectées par les prédateurs. Nos observations en laboratoire montrent que les femelles forment leur cocon uniquement au-dessus du coton blanc humide présent dans leur

terrarium. Ce comportement peut éviter que le cément présent autour des œufs pondus ne sèche avant la formation de la coque de soie supérieure qui ferme le cocon ; il permet également au cocon blanc d'être moins visible. Nous pouvons imaginer que dans la nature les femelles effectuent le même choix sélectif sur le milieu de construction du cocon.

Lorsque la femelle construit son cocon, elle utilise une soie blanche. Le cocon est alors facilement détectable car sa couleur blanche contraste de manière importante avec la litière et avec la femelle. La mère *P. saltans*, dès la fin de la construction du cocon, le manipule et dépose progressivement à sa surface un liquide de couleur bleu-grisâtre, qui diffuse rapidement. Cette coloration entraîne une diminution du contraste avec le substrat et la mère. Svensson (1988) observe que, chez le poisson *Nerophis ophidion* (Syngnathidae), lorsque c'est le mâle qui transporte les œufs dans une poche il est plus sujet à la prédation que lorsque c'est la femelle. Cette différence serait liée à une visibilité plus importante des mâles. Nous pouvons supposer qu'une mère qui transporte un « objet » contrastant de manière importante avec son environnement serait plus sensible au risque de prédation. Cette coloration cryptique permet ainsi à la mère qui transporte un cocon d'être moins visible face aux prédateurs et/ou aux parasites potentiels. Dans ce cadre, il serait intéressant également de regarder s'il existe une modification de la pigmentation en fonction des substrats environnementaux. Une deuxième fonction pourrait être attribuée à l'utilisation du colorant par la mère. En effet, nous savons que le cocon permet de protéger les œufs à des attaques de microorganismes. Ce liquide coloré déposé par la mère pourrait contenir des substances anti-pathogènes et antifongiques non présentes dans la soie. Une validation de ces hypothèses devrait être effectuée par l'analyse chimique approfondie du liquide pigmenté puis par l'étude de ses capacités anti-pathogènes et antifongiques.

Par ailleurs dans la nature, les femelles errantes sont susceptibles de perdre leur cocon et d'entraîner ainsi une baisse de leur succès reproducteur. En effet, la perte du cocon implique la mort des jeunes car la présence de la mère est obligatoire pour permettre leur émergence. La mère a donc intérêt à rechercher activement son cocon. Nos résultats montrent pour la première fois qu'effectivement les mères *P. saltans* manifestent un comportement de recherche après avoir perdu leur cocon. Toutes les mères (avec un cocon tout juste construit et/ou avec un cocon transporté depuis 15 jours) modifient leur locomotion et leur comportement afin de retrouver et raccrocher leur cocon. Les modifications

comportementales de la mère durant la recherche se traduisent par des trajectoires plus courbes, et des comportements non exprimés en présence du cocon (le repli des pattes sous son corps et les mouvements abdominaux). Ces modifications permettent ainsi à la femelle de couvrir une plus grande surface de l'environnement et d'utiliser des indices chimiques lui permettant de le retrouver. En effet, la présence de mouvements abdominaux peut rappeler le comportement de marquage effectué par les individus lors de phase d'exploration alimentaire ou de reproduction (Tietjen, 1977). Cette recherche entrainant des modifications comportementales peut induire un coût écologique important pour la femelle. En effet, son niveau de vigilance peut être à nouveau diminué pendant cette recherche et sa locomotion peut éventuellement être perçue plus facilement par les prédateurs. Par ailleurs, l'intensité de ce comportement de recherche dépend du temps et de l'énergie consacrés par la mère avant la perte du cocon. En effet, les mères ayant perdu leur cocon de 15 jours manifestent un comportement de recherche plus important que celles venant juste de le construire. Les femelles sont physiologiquement capables de pondre et de construire un nouveau cocon grâce à leurs réserves spermatiques, mais après avoir reconstitué leurs réserves énergétiques et avoir réalisé un nouveau cycle de maturation ovarienne. Les réserves énergétiques des mères qui viennent de perdre leur cocon de 15 jours sont plus réduites que celles qui viennent tout juste de pondre. Les dépenses énergétiques de ces mères sont plus importantes, ce qui peut expliquer leur comportement de recherche plus intense. Mais ce comportement de recherche entraîne également une augmentation de leurs dépenses énergétiques et temporelles avec les risques de prédation. Par conséquent la femelle doit pouvoir faire un compromis entre la dépense associée à la recherche du cocon par rapport au bénéfice de retrouver sa progéniture. Au laboratoire le risque de prédation est nul. Nous constatons que nos femelles continuent de manifester un comportement de recherche pendant plusieurs heures. Nous avons pu observer qu'une mère *P. saltans* continue de rechercher et raccroche son cocon s'il lui est présenté 6 heures après l'avoir perdu. En revanche, une femelle séparée de son cocon ne le raccroche pas (et ce même si elle rentre par inadvertance en contact avec) lorsqu'il est rendu 2 jours après. Il serait intéressant de regarder dans la nature si ce comportement de recherche est rapidement abandonné par la mère ou s'il est maintenu aussi longtemps qu'en laboratoire. Car on peut se poser une question : à partir de quel moment est-il plus intéressant pour la femelle d'investir dans un deuxième cycle de reproduction plutôt que dans la recherche du cocon perdu ? Nous pouvons proposer 2 hypothèses quant à l'extinction du comportement de recherche et d'accrochage : 1 - la femelle cesse d'investir dans la recherche du cocon lorsque les dépenses

énergétiques et écologiques dépassent le bénéfice apporté par le comportement maternel ; 2 - la femelle cesse de rechercher son cocon à partir du moment où, en fonction du stade de développement, le cocon est resté trop longtemps sans soins pour que cela ait un impact sur la survie des jeunes. Nous pouvons donc imaginer que selon le stade de développement du cocon et de l'état physiologique de la mère, l'extinction du comportement de recherche apparaît plus ou moins tôt.

En résumé (tableau 13) nous pouvons dire que *P. saltans* développe une stratégie d'investissement maternel intermédiaire entre la stratégie r et K décrite par Mac Arthur & Wilson (1967).

Tableau 13 : Investissement parental de la femelle P. saltans basé sur la théorie de Mac Arthur & Wilson (1967).

Investissement parental en relation avec les	**Stratégies reproductrices**
Caractères Individuels :	
- Maturation	Rapide (quelques mois)
- Reproduction	Précoce (1 mois après la mue
- Vie	imaginale)
- Effort reproductif	Courte (< 1 an)
- Utilisation de l'énergie	Important
- encéphalisation	Intense
	Réduite
Caractères de la Famille :	
- portée	Peu nombreuse (< 30 œufs)
- intervalle entre portées	Court (15-20 jours)
- descendants	Faible (< 15 jeunes)
- mortalité infantile	Forte
- soins parentaux	Moyen
Caractéristiques de la Population :	
- exploiteurs	Opportuniste
- colonisateurs	Dispersant
- taille de la population	Variable
- compétition	Relâchée
Caractéristiques du système social :	
- Organisation sociale	Sub-sociale transitoire
- altruisme	peu

II. Facteurs impliqués dans les soins maternels

II.1.Facteurs internes

Chez *P. saltans,* le comportement de gardiennage du cocon semble être programmé *via* des mécanismes autonomes liés à l'acte d'oviposition. En effet, nos expériences montrent que les femelles vierges ne manifestent aucune attraction vis-à-vis d'un cocon, et même si elles entrent en contact avec un cocon abandonné elles ne le manipulent pas, contrairement aux femelles *Theridion saxatile* (Nørgaard, 1956). Des résultats similaires aux nôtres ont été observés chez d'autres araignées, comme par exemple chez *Schizocosa ocreata* (Horel & Gundermann, 1992), *Clubiona kulezynskii* (Buckle, 1971) ou *Dolomedes plantarius* (Bonnet, 1946). Par ailleurs, dans la nature les mères ayant perdu leur cocon accrochent à leurs filières des objets étrangers (Locket & Marsh, 1957 ; Bristowe, 1958 ; Fujii, 1980). Lors de nos expériences les mères *P. saltans* accrochent elles aussi, aussi bien leur cocon « normal » que leur cocon « anormal » (lavé avec les différents solvants organiques). Ainsi Culley *et al.* (2010) ont montré que lorsqu'une femelle *P. milvina* raccroche un leurre avant de trouver son propre cocon, elle ignore ce dernier. Le comportement de gardiennage du cocon (et notamment le fait d'avoir un cocon à transporter) semble donc être un comportement obligatoire et le comportement d'accrochage inhibe la recherche.

Chez les vertébrés, il a été montré que le comportement de soin maternel est régulé *via* les hormones ovariennes et hypophysaires (Poindron & Le Neindre, 1980 ; Corona & Lévy, 2015). Chez les femelles araignées adultes, la seule hormone connue pour l'instant est une hormone stéroïdienne, la 20-hydroxyecdysone (Trabalon *et al.*, 1992), et son site de synthèse n'est pas connu. Cette hormone semble être impliquée dans le développement ovarien (vitellogenèse) et l'apparition de la réceptivité sexuelle (Pourié & Trabalon, 2003 ; Trabalon *et al.*, 2005). A l'heure actuelle aucune étude n'a été réalisée sur le rôle possible de cette hormone sur le comportement maternel. Nos résultats laissent penser que chez les araignées, comme chez les vertébrés, des facteurs endogènes liés à la copulation et à la ponte (*i.e.* hormones, neuromédiateurs) permettent l'apparition du comportement maternel et son maintien (Opell, 2001 ; Horel & Gundermann, 1992 ; Wagner, 1995 ; Trabalon *et al.*, 1998 ;

Lévy *et al.*, 2004 ; Corona & Lévy, 2015). Il sera donc intéressant d'effectuer des expériences pour tester le rôle de la 20-hydroxyecdysone sur le comportement de soin maternel.

II.2. Facteurs externes

Les changements de l'état physiologique des femelles permettent-ils à eux seuls le maintien du comportement de soin pendant une durée plus ou moins longue (de quelques jours à plusieurs semaines) ? Chez les vertébrés, comme par exemple les mammifères, nous savons que la présence des jeunes stimule, *via* des signaux de communication (olfactifs, sonores, tactiles), l'apparition et le maintien des comportements de soins parentaux (Fletcher & Michener, 1987 ; Corona & Lévy, 2015). Chez les insectes sub-sociaux et sociaux, nous savons également que les stimulations tactochimiques interviennent dans le comportement de soin des œufs et des larves (Jaisson, 1975 ; Errard, 1986 ; Vancassel *et al*., 1987).

Nos propres expériences montrent que des signaux provenant du cocon sont utilisés par la mère *P. saltans* pour détecter la viabilité de sa progéniture. Elle modifie son comportement vis-à-vis du cocon au cours du temps. Ainsi, pendant la période embryonnaire, les embryons ne produisent aucune vibration, les mères ne manifestent qu'un comportement de transport. Puis leur comportement se complexifie vis-à-vis du cocon au fur et à mesure que les juvéniles bougent à l'intérieur du cocon. En effet, nous avons vu que les juvéniles de stade 2 sont beaucoup plus mobiles qu'au stade 1. De plus ces jeunes présentent au début une mobilité faible de type « chronique » et asynchrone entre eux. A l'inverse, dans les jours qui précèdent leur émergence, leur mobilité devient synchrone et « périodique ». Nous pouvons penser que ces mouvements à l'intérieur du cocon produisent des « vagues » de vibrations qui augmentent en intensité au fur et à mesure que les juvéniles s'approchent de la date de l'émergence. Chez une araignée sédentaire, *Anelosimus sp.,* il a été montré que les embryons présents à l'intérieur du cocon produisent des vibrations transmises *via* la toile maternelle (Viera *et al.* 2007b). Chez *P. saltans* nous pouvons supposer que les vibrations émises par les juvéniles traversent la coque de soie du cocon et sont perçues par la mère. Ce qui expliquerait pourquoi la mère augmente la fréquence de manipulations de son cocon au cours du temps. De plus, la détection d'un certain seuil de vibrations doit être perçue par la mère comme un

signal stimulant le comportement d'ouverture du cocon. En effet, nos résultats montrent que les mères en présence d'un cocon ne contenant que des embryons morts l'abandonnent au moment présumé de l'émergence sans l'ouvrir. Par conséquent, ce comportement d'ouverture du cocon n'est pas simplement lié à un comportement dirigé uniquement par son état physiologique (*i.e.* hormonal et énergétique). Il est intéressant de constater que des mères qui n'ont pas manifesté de comportement d'ouverture du cocon à cause de la présence de juvéniles morts, ne pondent pas de deuxième cocon. Il apparaît que le succès de la première reproduction (viabilité des jeunes issus du premier cocon) influence de manière positive l'investissement de la femelle dans la production d'un nouveau cycle de reproduction chez *P. saltans*.

Cependant, nos expériences montrent que les mères en présence de leur propre cocon dont nous avons tué les juvéniles par le froid ne modifient pas leur comportement de soin jusqu'à la date supposée d'émergence. L'absence de vibrations provenant des jeunes montre que le comportement de la mère est stimulé également par d'autres types de signaux. Ainsi, lorsque la mère cherche son cocon, elle ne se dirige pas directement vers celui-ci, par conséquent elle n'utilise pas la vue. Par contre, elle manifeste des comportements d'émission/réception de signaux vibratoires/chimiques (marquage de la surface explorée et comportement de repli), qui suggèrent l'utilisation d'une communication de type tacto-chimique. L'utilisation de ce type de communication s'explique par le mode de vie de *P. saltans*. En effet, nous pensons que la séparation entre la mère et son cocon est rare, puisque la femelle transporte et reste de manière permanente en contact avec celui-ci. La présence sur le cocon de signaux chimiques perceptibles à distance (composés volatiles) semble écologiquement inutile. Nos analyses des composés chimiques présents à la surface du cocon montrent la présence d'un mélange complexe de composés lipidiques, constitué de produits apolaires et polaires, de poids moléculaires élevés (peu ou pas volatiles). Lorsque les composés apolaires sont absents (cocon lavé au dichlorométhane) la mère ne modifie pas son comportement vis-à-vis du cocon. Ces composés seuls ne semblent pas être responsables de la modification du comportement maternel. Lorsque les composés polaires sont seuls retirés (cocon lavé au méthanol) la mère ne modifie pas son comportement. Il est important de signaler que, contrairement aux autres solvants, le méthanol ne pénètre pas à l'intérieur du cocon et n'entraîne pas la mort des juvéniles. Par conséquent, dans le cadre de cette expérience nous ne pouvons pas conclure sur l'effet de la disparition des constituants polaires

sur le comportement maternel, puisque les jeunes continuent d'émettre des vibrations. Enfin, lorsque l'ensemble des composés polaires et apolaires sont retirés (cocon lavé avec un mélange de méthanol - dichlorométhane – pentane) le comportement de la mère est modifié. Ainsi, les mères manifestent soit un comportement de rejet (ne raccrochent pas le cocon), soit un comportement d'abandon du cocon rapidement après le raccrochage. Le mélange de produits polaires et apolaires paraît nécessaire pour stimuler et maintenir le comportement maternel chez *P. saltans*. Par ailleurs, ces composés ne semblent pas être utilisés par la femelle dans le cadre de la reconnaissance de son cocon par rapport à un conspécifique. En effet, les femelles adoptent, dans le cadre de nos expériences, des cocons étrangers sans modifier leur comportement, comme observé chez d'autres espèces (Ghione *et al.,* 2003; Japyassú *et al.,* 2003; Viera *et al.,* 2007b; Culley *et al.,* 2010).

Il est intéressant de constater que les composés présents sur le cocon varient au cours du temps. Certains de ces composés semblent être d'origine végétale. Ils sont sûrement issus d'une contamination passive du cocon par le substrat sur lequel la mère se déplace. Ces composés peuvent peut-être servir d'indices de reconnaissance de son cocon pour la mère et de camouflage olfactif. D'autres composés comme par exemple les lipides polaires (*i.e*. acides gras) disparaissent quelques jours avant l'émergence, et à l'inverse les lipides apolaires (*i.e*. les hydrocarbures) augmentent. Nos expériences à l'heure actuelle ne nous permettent pas de connaître l'origine de ces composés : origine maternelle ou origine du cocon (juvéniles en pré-émergence). Ces modifications sont observées en parallèle avec les modifications de l'activité des jeunes à l'intérieur du cocon. Il a été montré chez une espèce sédentaire, *Tegenaria atrica,* que l'absence d'acides gras et des taux élevés d'hydrocarbures sur la cuticule des jeunes grégaires stimulent le comportement de tolérance maternelle des femelles quel que soit leur état physiologique (Trabalon *et al.,* 1996 ; Pourié *et al.,* 2001, 2005). Nous pouvons donc avancer que la modification du mélange lipidique (composés polaires/apolaires) présent à la surface du cocon intervient en synergie avec les vibrations des jeunes dans la modification progressive du comportement de soin maternel chez *P. saltans.* Il serait intéressant maintenant d'effectuer des expériences complémentaires pour rechercher l'origine de ces composés (cuticule de la mère ou juvéniles en pré-émergence) et d'identifier leurs rôles respectifs dans le cadre des soins maternels.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les composés chimiques seuls ne permettent pas à la femelle d'identifier l'âge du cocon ou le stade de développement des juvéniles. En effet, les femelles qui viennent de pondre (expérience de gardiennage de 0 jour), lorsqu'elles sont en présence d'un cocon âgé de 15 jours, n'ouvrent pas le cocon à la date correspondant à l'émergence des jeunes. Ce qui suggère que l'état physiologique de la mère joue un rôle important pour entraîner une modification progressive du comportement maternel, en particulier favoriser la capacité d'intégration des stimuli provenant du cocon. Le comportement maternel chez *P. saltans* pourrait donc être lié à un apprentissage. Cependant, les mères ayant une expérience maternelle de 15 jours, lorsqu'elles adoptent un cocon de 0 jour, manifestent un comportement d'ouverture du cocon non adapté au stade de développement des jeunes. Ainsi, lorsqu'elles ouvrent le cocon, les juvéniles n'émergent pas. Ces femelles n'abandonnent pas le cocon ouvert et continuent de le transporter jusqu'à l'émergence effective des jeunes. Cette observation confirme que le comportement d'ouverture du cocon est lié comme nous l'avons vu, aux signaux émis par les juvéniles, mais surtout à l'état physiologique de la mère. Le biorythme de la femelle *P. saltans* joue ainsi un rôle prépondérant dans le comportement clef d'ouverture du cocon. Cependant, la mère est capable d'adapter son comportement à celui des juvéniles puisqu'elle n'abandonne pas le cocon lorsque les juvéniles vivants n'émergent pas.

Conclusion

L'évolution des comportements parentaux implique une coévolution comportementale entre les signaux émis par les jeunes et les réponses de la mère associées, et une coévolution physiologique entre l'état physiologique de la mère lors de son cycle reproducteur et le développement des jeunes. Au vu de nos résultats, le comportement maternel d'une espèce d'araignée sub-sociale transitoire semble être régulé par de multiples mécanismes internes et externes provenant à la fois des jeunes mais aussi de la mère. Nous pouvons ainsi proposer un schéma résumant cette régulation (Fig. 24). Les soins maternels dirigés vers les embryons et les jeunes interagissent avec l'état physiologique des mères (état énergétique et hormonal). Parallèlement, les stimuli émis par les jeunes induisent des comportements de soins particuliers de la mère et sont modulés par leur état de développement.

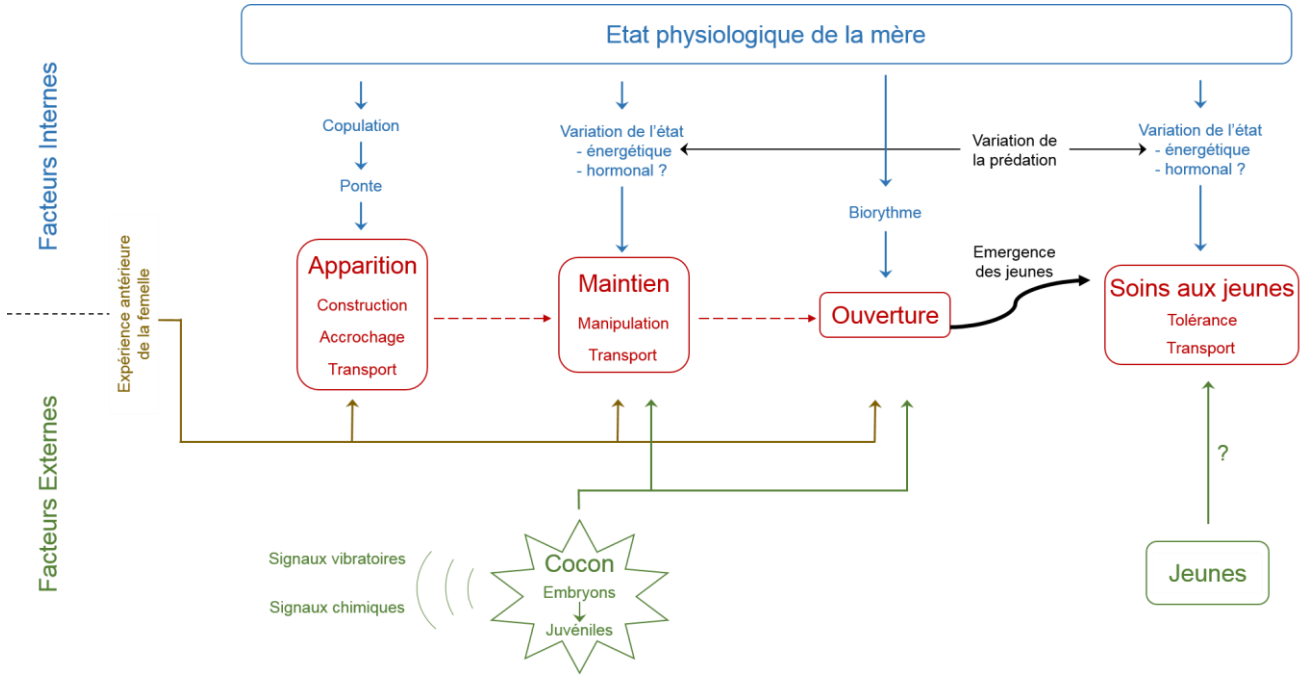


Figure 24 : Représentation schématique de la régulation du comportement maternel chez l'araignée errante P. saltans.

L’étude des mécanismes permettant l’initiation, le maintien et le développement du comportement maternel chez une araignée errante nous permet de nous affranchir des signaux transmis *via* la toile et ainsi d’apporter des informations complémentaires à celles observées chez des araignées sédentaires.

Les soins maternels évoluent uniquement si les parents sont capables de défendre leurs œufs et leurs jeunes sans augmenter leur propre risque de pression de prédation. Ainsi, la relation fonctionnelle qui existe entre le niveau de soins parentaux apportés et les bénéfices résultants pour les jeunes ou les coûts pour les parents peuvent affecter les patterns de soins. Les araignées errantes telles que *Pardosa saltans* possèdent de multiples mécanismes de variations comportementales et physiologiques permettant un bon développement et la protection de leur progéniture sans pour autant diminuer leur propre chance de survie. Il apparaît donc que ces espèces sub-sociales transitoires sont un chaînon essentiel dans la compréhension de l’évolution des comportements parentaux et sociaux. De nombreuses questions restent néanmoins en attente de réponses.

Bibliographie

Aakra, K., Morka, G.H., Antonsen, A., Farlund, M., Wrånes, R.E., Frølandshagen, R., Løvbrekke, H., Furuseth, P., Fjellberg, A., Lemke, M., Pfliegler, W.P., Andersen, S., Olsen, K.M., Aadland, B. & Berggren, K. (2016). Spiders new to Norway (Arachnida, Araneae) with ecological, taxonomical and faunistic comments. *Norwegian Journal of Entomology*, 63, 6–43.

Alcock, J. (1998). Animal behaviour: an evolutionary approach, 6th ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

Alonso-Alvarez, C. & Velando, A. (2012). Benefits and costs of parental care. The evolution of parental care. (N. J. Royle, P. T. Smiseth and M. Kölliker, eds). Oxford University Press.

Anderson, J.F. (1974). Responses to starvation in the spiders *Lycosa lenta* Hentz and *Filistata hibernalis* (Hentz). *Ecology*, 55, 576-585.

Anderson, J.F. & Prestwich, K.N. (1982). Respiratory gas exchange in spiders. *Physiological Zoology*, 55, 72-90.

Arrese, E.L. & Soulages, J.L. (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207-225.

Assi-Bessekon, D. (1992). Contribution à l'étude des mécanismes intervenant dans la régulation du comportement maternel chez l'araignée *Coelotes terrestris* (Araneae, Agelenidae). *Thèse de Neurosciences de l'Université de Nancy 1*, n°516, pp 143.

Baerends, G.P. (1964). La reconnaissance de l'oeuf par le goéland argenté. *Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne*, 37, 193-208.

Baerends, G.P. & Drent, R.H. (1970). The herring gull and its egg. Part I. *Behaviour suppl*. XVIII, 265-310.

Bagnères, A.G., Trabalon, M., Blomquist, G.J. & Schulz, S. (1997). Waxes of the social spider *Anelosimus eximius* (Araneae, Theridiidae): abundance of novel n-propyl esters of long-chain methyl-branched fatty acids. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 36, 295-314.

Barba, E., Lopez, J.A. & Gil-Delgado, J.A. (1996). Prey preparation by adult Great Tits *Parus major* feeding nestlings. *Ibis*, 138, 532-53.

Barrantes, G. (2007). Camouflage in webs of *Helvibis longicauda* (Araneae: Theridiidae). *Bulletin of the British Arachnological Society*, 14, 59–60.

Barrantes, G., Sandoval, L., Sánchez-Quirós, C., Bitton, P.P. & Douect, M. (2013). Variation and possible function of egg sac coloration in spiders. *The Journal of Arachnology*, 41, 342-348.

Barron, P.D., Horner, N.V. & Cate, R.L. (1990). Carbohydrate analysis in spider hemolymph of selected lycosid and araneid spiders (Araneae: Lycosidae and Araneidae). *Journal of Arachnology*, 27, 550-552.

Barth, F.G. (1982). Spiders and vibratory signals: sensory reception and behavioral significance. In Spider Communication: Mechanisms and Ecological Significance, (Witt P.N. & Rovner J.S., eds.), Princeton New Jersey, Princeton University Press, pp 67-120.

Barth, F.G. & Schmitt, A. (1991). Species recognition and species isolation in wandering spiders (*Cupiennius* spp.; Ctenidae). *Behavioural, Ecology and Sociobiol*ogy, 29(5), 333-339.

Bekkaoui, A. & Thibout, E. (1993). Role of the cocoon of *Acrolepiopsis assectella* (Lep., Hyponomeutoidae) in host recognition by the parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hym., Ichneumonidae). *Entomophaga*, *38*(1), 101-113.

Beninger, P.G. & Lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus L.* (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 79, 19-37.

Blanke, R. (1975a). Die Bedeutung der Guanocyten für den physiologischen Farbwechsel bei *Cyrtophora cicatrosa* (*Arachnida: Araneidae*). *Ent. Germ*, 2, 1-6.

Blanke, R. (1975b). Untersuchungen Zum Sexualverhalten von *Cyrtophora cicatrosa* (Stoliczka) (*Araneae: Araneidae*). *Z. Tierpsychol*, 37, 62-74.

Bonnet, P. (1946) L'instinct maternel chez les araignées à l'épreuve de l'expérimentation. *Bulletin de la Société d'Histoires Naturelles de Toulouse*, 81, 185-250.

Bonte, D., Van Belle, S. & Maelfait, J.P. (2007). Maternal care and reproductive state-dependent mobility determine natal dispersal in a wolf spider. *Animal Behaviour*, 74, 63-69.

Brach, V. (1976). Subsocial behavior in the funnel-web wolf spider *Sosippus floridanus* (Araneae: Lycosidae). *The Florida. Entomol*ogist, 59, 225-229.

Bradoo, B.L. (1973). The cocoon spinning behaviour and fecundity of *Stegodyphus sarasinorum* Karsh (Araneae, Eresidae). *Orit. Insects*, 6, 193-203.

Bristowe, W. S. (1971). The World of Spiders. Collins, London.

Buckle, D.J. (1971). Social behavior in Spiders with special reference to maternal behavior in *Clubiona kulezynski* (Lessert). *Proceeding of 19th* Annual *Meeting Entomology Society,* Saskatchewan.

Burch, T.L. (1979). The importance of communal experience to survival for spiderlings of *Araneus diadematus* (Araneae: Araneidae). *Journal of Arachnology*, 7, 1-18.

Burgess, J.W. & Uetz, G.W. (1982). Social spacing strategies in spiders. in: Spider Communication: Mechanisms and Ecological Significance (P.N. Witt, J.S. Rovner, eds.). Princeton University Press, U.S.A, 317–351.

Buskirk, R.E. (1975). Coloniality, activity patterns and feeding in a tropical orb-weaving spider. *Ecology*, 56, 1314-1328..

Buskirk, R.E. (1981). Sociality in the Arachnida. In: Social Insects, vol. 2 (Hermann, H.R., ed.). Academic Press, New York, p. 281-367.

Canard, A. (1987). Analyse nouvelle du développement postembryonnaire des araignées. *Revue of Arachnology,* 7(3), 91-128.

Carrel, J.E. & Heathcote, R.D. (1976). Heart rate in spiders: influence of body size and foraging energetic. *Science*, 193, 148-150.

Casas, J., Pincebourde, S., Mandon, N., Vannier, F., Poujol, R. & Giron, D. (2005). Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology*, 86, 545-554.

Cerda, G. & Wolff, M. (1993). Feeding ecology of the crab *Cancer polyodon* in la Herradura Bay, northern Chile. II – Food spectrum and prey consumption. *Marine Ecology Progress Series*, 100, 119-125.

Chapman, R.F. (1998). The insects: structure and function. 4th Edition, Cambridge University Press, New York.

Chauvin, R. (1969). Psycho-Physiologie. II. Le comportement animal. Précis de Sciences Biologiques, Masson et Cie, Paris, 418 p.

Chen, X., Chen, Y., WU, L., Peng, Y., Chen, J. & Liu, F. (2010). A survey of nectar feeding by spiders in three different habitats. *Bulletin of Insectology,* 63, 203-208.

Chiarle, A. & Isaia, M. (2013). Signal complexity and modular organization of the courtship behaviours of two sibling species of wolf spiders (Araneae: Lycosidae). Behavioural Process, 97, 33-40.

Chinery, M. (2012). Insectes de France et d'Europe Occidentale. Flammarion, Paris. 320 p.

Christensen, T. E. (1984). Behaviour of colonial and solitary spiders of the theridiid species *Anelosimus eximius*. *Animal Behaviour*, 32, 725–734.

Clarck, R.J. & Jackson, R.R. (1994). Self recognition in a jumping spider: *Portia labiate* females discriminate between their own draglines and those of conspecifics. *Ethology Ecology & Evolution*, 6(3), 371-375.

Clark, R.J. & Jackson, R.R. (1995). *Portia labiata*, a cannibalistic jumping spider, discriminates between own and foreign eggsacs. *International Journal of Comparative Psychology*, 7(1), 38–43.

Cloudsey-Thompson, J.L. (1968). The water relations of scorpions and tarantulas from the Sonoran desert. *Entomology Month. Mag*., 103, 217-220.

Clutton-Brock, T.H. (1991). The evolution of parental care: Monographs in behavior and ecology. Princeton University Press, Princeton.

Colancecco, M., Rypstra, A.L. & Persons, M.H. (2007). Predation and foraging costs of carrying eggsacs of different mass in the wolf spider *Pardosa milvina. Behaviour*, 144(9), 1003-1018.

Conti, A., Ugolini, A. & Vannini, M. (1991). Preliminary observations on trophallaxis in *Pardosa hortensis* (Thorell 1872) (Lycosidae Aranea). *Ethology, Ecology, Evolution*, 1, 147-149.

Corona, R. & Lévy, F. (2015). Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. *Hormones & Behavior*, 68, 77-90.

Cox, R.M. & Calsbeek, R. (2010). Severe costs of reproduction persist in *Anolis lizards* despite the evolution of a single-egg clutch. *Evolution*, 64, 1321-30.

Craig, C.L., Riekel, C., Herberstein, M.E., Weber, R.S., Kaplan, D. & Pierce, N.E. (2000). Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1904-1913.

Croshaw, D.A. & Scott, D.E. (2005). Experimental evidence that nest attendance benefits female marbled salamanders (*Ambystoma opacum*) by reducine egg mortality. *American Midland Naturalist*, 154, 398-411.

Crump, M. (1974). Reproductive strategies in a tropical anuran community. *Misellaneous Publication Museum of Natural History University of Kansas*, 61, 1–68.

Culley, T., Wiley, J.E. & Persons, M.H. (2010). Proximate cues governing egg sac discrimination and recognition in the wolf spider *Pardosa milvina* (Araneae: Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 38, 387-390.

Dijkstra, H. (1976). Searching behaviour and tactochemical orientation in males of the wolfspider *Pardosa amentata* (Cl.) (*Araneae, Lycosidae*). *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse akademie van wetenschappen. Series C. Biological and medical sciences*, 79, 235-244.

Dobrakova, I., Tanaeva, K.K., Dubynin, V.A., & Kamenskiĭ, A.A. (2010). The role of dopamine and opioid systems in the regulation of maternal behavior. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*, 42(1), 3-17.

Dolejš, P., Kubcová, L. & Buchar, J. (2010). Courtship, mating, and cocoon maintenance of *Tricca lutetiana* (Araneae: Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 38, 504-510.

Dondale, C.D. & Hegdekar, B.M (1973). The contact sex pheromone of *Pardosa lapidicina* Emerton (*Araneida, Lycosidae*). *Canadian Journal of Zoology*, 51, 400-401.

Donzé, G., Schnyder-Candrian, S., Bogdanov, S., Diehl, P.A., Guerin, P.M., Kilchenman, V. & Monachon, F. (1998). Aliphatic alcohols and aldehydes of the honey bee cocoon induce arrestment behavior in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37(2), 129-145.

Downes, M.F. (1992). The life history and behaviour of the subsocial amaurobioid spider *Badumna candida.* Doctoral dissertation, James Cook University.

Duellman, W.E. & Trueb, L. (1986). Biology of amphibians. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.

Duman, J.G., Bennett, V., Sformo, T., Hochstrasser, R. & Barnes, B.M. (2004). Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *Journal of Insect Physiol*ogy, 50(4), 259-66.

Dumpert K. (1978). Spider odor receptor: Electrophysiological proof. *Experientia*, 34, 754-756.

Eason, R. R. (1964). Maternal care as exhibited by wolf spiders (*Lycosids*). *Arkansas Academy of Science Proceedings*, 18, 13-19.

Eason, R.R. (1969). Life history and behavior of *Pardosa lapidicina* Emerton (Araneae: Lycosidae). *Journal of Kansas Entomology Society*, 42, 339-360.

Eason, R.R. & Whitcomb, W.H. (1965). Life history of the dotted wolf spider, *Lycosa punctulata* Hentz (Araneida: Lycosidae). *Arkansas Academy of Science Proceedings*, 19, 11-20.

Eberhard, W.G. (1974). Maternal behaviour in a South American *Lyssomanes*. *Bulletin British Arachnology Society*, 3, 51-52.

Edgar, W.D. (1971a). Seasonal weight changes, age structure, natality and mortality in the wolf spider *Pardosa lugubris* Walck in Central Scotland. *Oikos*, 22, 84-92.

Edgar, W.D. (1971b). Aspects of the ecological energetics of the wolf spider *Pardosa* (*Lycosa*) *lugubris* (Walckenaer). *Oecologia*, 7, 136-154.

Eggert, A.K., Reinking, M. & Müller, J.K. (1998). Parental care improves offspring survival and growth in burying beetles. *Animal Behaviour*, 55, 97-107.

Eickwort, A.C. (1981). Prosocial insects. In: Social Insects (Hermann, H.R., ed.). Academic Press, New York, pp. 199-280.

Eisert, R. (2011). Hypercarnovory and the brain: protein requirements of cats reconsidered. *Journal of Comparative Physiology B*, 181, 1-17.

Eberhard, W.G. (1974). Maternal behaviour in a South American *Lyssomanes*. *Bulletin British Arachnology Society*, 3, 51-52.

Elias, D.O., Lee, N., Hebets, E.A. & Mason, A.C. (2006). Seismic signal production in a wolf spider: parallel versus serial multi-component signals. *Journal of Experimental of Biology*, 209, 1074-1084.

Engelhardt, W. (1964). Die mitteleuropäischen Arten der Gattung *Trochosa* C.L. Koch 1848 (Araneae, Lycosidae). Morphologie, Chemotaxonomie, Biologie, Autoekologie. Z. Morphol. Oekol. *Tiere*, 54, 219-392.

Errard, C. (1986). Artificial mixed colonies: a model for the investigation of colony odor in ants. In: The individual and the Society (Passera, L. & Lachaud, J.P., eds.). Privat, Toulouse.

Escalante, I., Aisenberg, A. & Costa, F.G. (2015). Risky behaviors by the host could favor araneophagy of the spitting spider *Scytodes globula* on the hacklemesh weaver *Metaltella simony*. Journal of Ethology, 33, 125-136.

Evans, T.A.,Wallis, E.J. & Elgar, M.A. (1995). Making a meal of mother. *Nature*, 376, 299.

Fairbanks, L.A. & McGuire, M.T. (1986). Age, reproduction value, and dominance-related behaviour in vervet monkey females: cross-generational influences on social relationships and reproduction. *Animal Behaviour*, 34, 1710-21.

Field, J. (1992). Intraspecific parasitism as an alternative reproductive tactic in nest-building wasps and bees. *Biological Review*, 67(1), 79-126.

Fink, L.S. (1986). Costs and benefits of maternal behaviour in the green lynx spider (Oxyopidae, *Peucetia viridans*). *Animal Behaviour*, 34, 1051-1060.

Fink, L.S. (1987). Green Lynx spider egg sacs: sources of mortality and the function of female

guarding (Araneae, Oxyopidae). Journal of Arachnology, 15(2), 231-239.

Fisher, D.O, Blomberg, S.P. & Owens, I.P.F. (2002). Convergent maternal care strategies in ungulates and macropods. *Evolution*, 56(1), 167-176.

Fletcher, D.J. & Michener, C.D. (1987). Kin recognition in animals. John Wiley & Sons, New York, 465 p.

Foelix R.F. (1970). Chemosensitive hairs in spiders. *Journal of Morphology*, 132, 313-334.

Foelix, R.F. (2011). Biology of spider, 3rd edition. Oxford University Press, New York.

Ford, M.J. (1977). Metabolic costs of the predation strategy of the spider *Pardosa amentata* (Clerck) (Lycosidae). *Oecologia*, 28, 333-340.

Forster, L.M. (1982). Visual communication in jumping spiders (Salticidae). In: Spider communication: mechanisms and ecological significance (Witt, P.N. & Rovner, J.S., eds.). Princeton University Press, 161–212.

Foucreau, N., Renault, D., Lugan, R., Hidalgo, K. & Pétillon, J. (2012). Effects of diet and salinity on the survival, egg laying and metabolic fingerprints of the ground-dwelling spider *Arctosa fulvolineata* (Araneae, Lycosidae). *Comparative Biochemistry and Physiology - Molecular and Integrative Physiology*, 163A, 388-395.

Fujii, Y. (1977). Examinations of the maternal care of cocoon in *Pardosa astrigera* L. Koch (Araneae, Lycosidae). *Journal of Thermal Biology,* 10, 171-175.

Fujii, Y. (1980). Analytical study of maternal behavior in *Pardosa astrigera* L. Koch (Araneae, Lycosidae). *Bulletin Nippon. Dent. Univ. Gen. Ed*., 9, 235-245.

Garcia-Guerrero, M., Racotta, I.S. & Villarreal, H. (2003). Variation in lipid, protein, and carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology,* 23, 1-6.

Gertsch, W.J. (1979). American spiders (2nd edn). Van Nostrand, New York.

Ghalambor, C.K., Reznick, D.N. & Walker, J.A. (2004). Constraints on adaptive evolution: the functional trade-off between reproduction and fast-start swimming performance in the *Trinidadian guppy* (Poecilia reticulata). *The American Naturalist*, 164(1), 38-50.

Ghione, S., Viera, C., Nieto, F. & Costa, F.G. (2003). Desarrollo intraooteca de la araña social Anelosimus studiosus (Araneae, Theridiidae) de Uruguay. *Actas VII Jornadas de Zoología del Uruguay*: 60.

Gibbs, A.G., Louie, A.K., & Ayala, J.A. (1998). Effects of temperature on cuticular lipids and water balance in a desert Drosophila: is thermal acclimation beneficial? *Journal of Experimental Biology*, *201*(1), 71-80.

Gillepsie, R.G. (1990). Costs and benefits of brood care in the Hawaiian happy face spider *Theridion grallator* (Araneae, Theridiidae). *American Midland Naturalist,* 123, 236-243.

Grandison, R.C., Piper, M.D.W. & Partridge, L. (2009). Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature*, 462, 1061-1064.

Grinsted, L., Bilde, T. & d'Ettorre, P. (2011) Cuticular hydrocarbons as potential kin recognition cues in a subsocial spider. *Behavioral Ecology*, 22(6), 1187-1194.

Gross, M.R. & Shine, R. (1981). Parental care and mode of fertilization in ectothermic vertebrates. *Evolution,* 35, 775-793.

Gundermann, J.L. (1989). Etudes sur le comportement maternel et son implication dans les phénomènes sub-sociaux chez l'araignée *Coelotes terrestris* (Wider). Thèse de l'Université de Nancy 1, n° 160, pp 135.

Gundermann, J.L., Horel, A. & Krafft, B. (1988). Maternal food-supply activity and its regulation in *Coelotes terrestris* (Araneae, Agelenidae). *Behaviour*, 107, 278–296.

Gundermann, J.-L., Horel, A. & Roland, C. (1991). Mother-offspring food transfer in *Coelotes Terrestris* (Araneae, Agelenidae*). Journal of Arachnology*, 19, 97–101.

Gundermann, J.-L., Horel, A. & Roland, C. (1997) Costs and benefits of maternal care in a subsocial spider, *Coelotes terrestris*. *Ethology*, 103, 915-925.

Hadley, N.F. (1994). Water relations of terrestrial arthropods. Academic Press.

Hallander, H. (1970). Prey, cannibalism and microhabitat selection in the wolf spiders *Pardosa chelate* O.F. Müller and *P. pullata* Clerck. *Oikos*, 21, 337-340.

Harrison, P.L., Babcock, R.C., Bull, G.D., Oliver, J.K., Wallace, C.C. & Willis, B.L. (1984). Mass spawning in tropical reef corals. Science, 223(4641), 1186-1189.

Hebets, E.A., Stratton, G.E. & Miller, G.L. (1996). Habitat and courtship behavior of the wolf spider *Schizocosa retrosa* (Banks) (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 24, 141-147.

Hegdekar, B.M. & Dondale, C.D. (1969). Contact sex pheromone and some response parameters in Lycosid spiders. *Canadian Journal of Zoology*, 47, 1-4.

Hendrickx, F., De Cock, K., De Bakker, D. & Maelfait, J.P. (2001). Differences in distribution and habitat of some cryptic species in the *Pardosa lugubris* group (Lycosidae, Araneae) in Belgium. *Belgian Journal of Zoology*, 131, 79-84.

Hendrickx, F., Maelfait, J.P., Speelmans, M. & van Straalen, N.M. (2003). Adaptive reproductive variation along a pollution gradient in a wolf spider. *Oecologia*, 134, 189-194.

Hennen, G. (2006). Biochimie : Approche bioénergétique et médicale. Ed. Dunod, 4ème édition, Paris.

Hepper, P.G. (1991). Kin recognition. Cambridge University Press.

Heras, H., Gonzalez-Baró, M.R. & Pollero, R.J. (2000). Lipid and fatty acid composition and energy partitioning during embryo development in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*, 35(6), 645-651.

Herberstein, M.E. (2011). Spider behaviour: Flexibility and Versatility, Cambridge University Press, New York.

Herberstein, M.E., Craig, C.L., Coddington, J.A. & Elgar, M.A. (2000). The functional significance of silk decorations of orb-web spiders: a critical review of the empirical evidence. *Biological Reviews*, *75*(4), 649-669.

Hersher, L., Richmond, J.B. & Moore, A.U. (1963). Modifiability of the critical period for the development of maternal behavior in sheep and goats. *Behaviour*, 20(3), 311-320.

Heyward, A.J. & Babcock, R.C. (1986). Self- and cross-fertilization in scleractinian corals. *Marine Biology*, 90, 191-195.

Higashi, G.A. & Rovner, J.S. (1975). Post emergent behaviour of juvenile lycosid spiders. *Bulletin of the British Arachnological Society*, 3, 113–119.

Hinde, R.A. & Spencer-Booth, X (1967). The behaviour of socially living rhesus monkeys in their first two and a half years. *Animal Behaviour*, 15, 169-196.

Hirschberg, D. (1969). Beiträge zur Biologie, insbesondere zur Brutpflege einiger Theridiiden. *Z. wiss. Zoology*, 179, 189-252.

Homann, H. (1947). Beiträge zur Physiologie der Spinnenaugen. V. Der Lichtsinn von *Aranea sexpunctata* (Argiopidae). *Biol. Zbl*., 66, 251.

Horel, A. & Gundermann, J.L. (1992). Egg sac guarding by the funnel-web spider *Coelotes terrestris*: function and development. *Behavioural Processes*, 27, 85–93.

Humphreys, W.F. (1974) Behavioral thermoregulation in a wolf spider. *Nature*, 251, 502-503.

Insley, S.J., Paredes, R. & Jones, I.L. (2003). Sex differences in razorbill *Alca torda* parent-offspring vocal recognition. Journal of Experimental Biology, 206, 25-31.

Ito, C. & Shinkai, A. (1993). Mother-young interactions during the brood-care period in *Anelosimus crassipes* (Araneae: Theridiidae). *Acta Arachnologica*, 42, 73-81.

Ito, Y. (1964). Preliminary studies on the respiratory energy loss of a spider, *Lycosa pseudoannulata*. *Researches on Population Ecology*, 6, 13-21.

Jackson, R.R. (1977). Courtship versatility in the jumping spider *Phidippus johnsoni* (Araneae: Salticidae). *Animal Behaviour*, 25, 953-957.

Jackson, R.R., & Brassington, R.J. (1987). The biology of *Pholcus phalangioides* (Araneae, Pholcidae): predatory versatility, araneophagy and aggressive mimicry. *Journal of Zoology*, *211*(2), 227-238.

Jackson, R.R., Pollard, S.D., Nelson, X.J. Edwards, G.B. & Barrion, A.T. (2001). Jumping spiders (Araneae: Salticidae) that feed on nectar. *Journal of Zoology* – London, 255, 25-29.

Jaisson, P. (1975). L'imprégnation dans l'ontogenèse des comportements de soins aux cocons chez *Formica polyctena* Först. Behaviour, 52, 1-37.

Jaisson, P. (1991). Kinship and fellowship in ants and social wasps. In: Kin recognition (Hepper, P.G., ed.). Cambridge University Press, Cambridge.

Jakob, E.M. (1991). Costs and benefits of group living for pholcid spiderlings: losing food, saving silk. *Animal Behaviour*, 41(4), 711-722.

Japyassú, H.F., Macagnan, C.R. & Knysak, I. (2003). Eggsac recognition in *Loxosceles gaucho* (Araneae, sicariidae) and the evolution of maternal care in spiders. *Journal of Arachnology*, 31, 90-104.

Jensen, K., Mayntz, D., Wang, T., Simpson, S.J. & Overgaard, J. (2010). Metabolic consequences of feeding and fasting on nutritionally different diets in the wolf spider *Pardosa prativaga*. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1095-1100.

Jouventin, P. (1982). Visual and vocal signals in penguins, their evolution and adaptative characters. Advances in Ethology, 24, 1-149.

Jouventin, P & Aubin, T. (2002). Acoustic systems are adapted to breeding ecologies: individual recognition in nesting penguins. *Animal Behaviour*, 64, 747-757.

Jouventin, P. Aubin, T. & Lengagne, T. (1999). Finding a parent in a king penguin colony: the acoustic system of individual recognition. *Animal Behaviour*, 57, 1175-1183.

Juberthie, C. (1964). Sur les cycles biologiques des araignées. *Bulletin de la Société d'Histoires Naturelles de Toulouse*, 84(3-4), 299-318.

Kaston, B.J. (1936). The senses involved in the courtship of some vagabond spiders. *Entomology of America*, 16: 97-166.

Kaston, B.J. (1965). Some little known aspects of spider behavior. *Amererican Midl. Naturalist*, 73, 336-356.

Kaston, B.J. (1970). Comparative biology of American black widow spiders. Transact. *San Diego Society Natural History*, 16, 33-82.

Kawamichi, T. & Ueda, H. (1998). Spawning at nes of extra-large males in the giant salamander. *Journal of Herpetology*, 32, 132-136.

Kight, S.L. & Ozga, M. (2002). Costs of reproduction in the terrestrial isopod *Porcellio laevis* Latreille (Isopoda: Oniscoidea): brood-bearing and locomotion. *Journal of Kansas Entomology Societie*, 74, 166-171.

Kim, K.W. (2000). Dispersal behaviour in a subsocial spider: group conflict and the effect of food availability. *Behavioral, Ecology and Sociobiol*ogy, 48, 182-187.

Kim, K.W. & Horel, A. (1998). Matriphagy in the spider *Amaurobius ferox* (Araneidae, Amaurobiidae): an example of mother-offspring interactions. *Ethology*, 104, 1021–1037.

Kim, K.W. & Roland, C. (2000). Trophic egg laying in the spider, *Amaurobius ferox*: mother-offspring interaction and functional value. *Behavioural Processes*, 50, 31–42.

Kim, K., Roland, C. & Horel, A. (2000). Functional value of matriphagy in the spider *Amaurobius ferox*. *Ethology*, 106, 729-742.

Knowles, S.C., Nakagawa, S. & Sheldon, B.C. (2009). Elevated reproductive effort increases blood *parasitaemia* and decreases immune function in birds: a meta-regression approach. *Functional Ecology*, 23(2), 405-415.

Krafft, B. (1981). The significance and complexity of communication in spiders. In: Spider Communication: Mechanisms and Ecological Significance (Witt, P.N. & Rovner, J.S., eds.). Princeton University Press, Princeton New Jersey, pp 15-66.

Krafft, B. & Horel, A. (1980). Comportement maternel et relations mères-jeunes chez les araignées. *Reproduction Nutrition and Dévelopment*, 20, 747–758.

Krafft, B., Horel, A. & Julita, J.M. (1986). Influence of food supply on the duration of the gregarious phase of a maternal-social spider, *Coelotes terrestris* (Araneae, Agelenidae). *Journal of Arachnol*ogy, 14, 219-223.

Kronenstedt, T. (1979). Study on chemosensitive hairs in Wolf spiders (Araneae, Lycosidae) by scanning electron microscopy. *Zoology SCR*, 8, 279-285;

Kullmann, E. (1972). Evolution of social behaviour in spiders (Araneae; Eresidae and Theridiidae). *American* Zoology, 12, 419-426.

Kullmann, E. & Zimmermann, W. (1975). Regurgitatiobsfuetterungen als bestandteil der brutfuersorge bei haubennetzund roehrenspinnen (Araneae, Therediidae und Eresidae). Proceeding 6th International Arachnology Congress, Vrije University, Amsterdam. pp. 120-124.

Kürpick, S.M. (2002). Cocoon care in the social spider *Stegodyphus dumicola* (Eresidae). *Proceedings of the 19th European Colloquium of Arachnology*, 39-44.

Laino, A., Cunningham, M., Costa, F.G. & Garcia, C.F. (2013). Energy sources from the eggs of the wolf spider *Schizocosa malitiosa*: isolation and characterization of lipovitellins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 165 B, 172-180.

Land, M.F. & Nilsson, D.E. (2002). Animal eyes. In; Animal eyes (Willmer, P. & Norman D., eds.). Oxford, UK: Oxford University Press, Oxford.

Lardies, M.A., Cotoras, I.S. & Bozinovic, F. (2004). The energetics of reproduction and parental care in the terrestrial isopod *Porcellio laevis*. *Journal of Insect Physiology,* 50, 1127-1135.

Leborgne, R. (1986). Le rapprochement des sexes chez *Coelotes terrestris* (Wider) (Araneae, Agelenidae): Etude des phénomènes vibratoires transmis par la toile lors de la rencontre des partenaires. *Biology of Behaviour*, 11, 205-216.

Lee, P.L. (1986). Early social development among African elephant calves. *National Geographical Research*, 2, 388-401.

Lehrman, D.S. (1965). Interaction between internal and external environments in the regulation of the reproductive cycle of the ring dove. In: Sex and Behavior (Beach, F.A., ed.). Wiley, New York, pp. 355-380.

Lévy, F., Keller, M. & Poindron, P. (2004). Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones & Behavior,* 46, 284-302.

Li, D. (2002). Hatching responses of subsocial spitting spiders to predation risk. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 269, 2155–216.

Li, D. & Jackson, R. R. (1996). How temperature affects development and reproduction in spiders : a review. *Journal therm. Biol*ogy, 21(4), 245-274.

Li, D. & Jackson, R.R. (2003). A predator's preference for egg-carrying prey: a novel cost of parental care. *Behavioural, Ecology and Sociobiol*ogy, 55, 129-136.

Li, D., Jackson, R.R. & Barrion, A.T. (1999). Parental and predatory behavior of *Scytodes sp.*, an ananeophagic spitting spider (Aranaea: Scytodidae) from the Philippines. *Journal of Zoology London,* 247, 292–310.

Lloyd, J.E. (1983). Bioluminescence and communication in insects. *Annual Review of Entomology*, 28, 131-160.

Locket, G.H. & Marsh, M.D. (1957). Two cases of lycosid spider carrying snail shell instead of egg cocoons. *Entomol. Month Mag. London*, 92, 139.

Lockey, K.H. (1988). Lipids of insect cuticule: Origin, composition and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 89, 595-645.

Lormée, H., Jouventin, P., Chastel, O. & Mauget, R. (1999). Endocrine correlates of parental care in an Antarctic winter breeding seabird, the emperor penguin, *Aptenodytes forsteri*. *Hormones and behavior*, 35(1), 9-17.

Lubin, Y.D. (1974). Adaptative advantages and the evolution of colony formation in *Cyrtophora* (Araneae, Araneidae). *Zoology Journal of Linnaean Society*, 54, 321-339.

Lubin, Y.D. (1982). Does the social spider *Achaearanea wau* (Theridiidae) feed its young? *Z. Tierpsychology*, 60, 127-134.

Mac Arthur, R.H. & Wilson, E.O. (1967). The theory of Island Biogeography. Princeton University Press, 203 p.

Magni, F. (1966). Analysis of polarised light in wolf spiders. In: The Functional Organisation of the Compound Eye (Bernhard C.G., ed.). Pergamon Press, Oxford. 201 p.

Malli, H., Kuhn-Nentwig, L., Imboden, H., & Nentwig, W. (1999). Effects of size, motility and paralysation time of prey on the quantity of venom injected by the hunting spider *Cupiennius salei*. *Journal of Experimental Biology*, *202*(15), 2083-2089.

Mansour, F., Rosen, D. & Shulov, A. (1980). Biology of the spider *Chiracanthium mildei* (Arachnida: Clubionidae). *Entomophaga*, 25, 237-248.

Marques, E.S.A., Vascocelos-Netto, J. & de Mello, M.B. (1998). Life history and social behavior of *Anelosimus jabaquara* and *Anelosimus dubiosus* (Araneae, Theridiidae). *Journal of Arachnology*, 26, 227-237.

Marshall, S.D. (1996). Evidence for territorial behavior in a burrowing wolf spider. *Ethology*, *102*(1), 32-39.

Meehan, C.J., Olson, E.J., Reudink, M.W., Kyser, T.K. & Curry R.L. (2009). Herbivory in a spider through exploitation of an ant-plant mutualism. *Current Biology*, 19, R892-R893.

Mendi, M. (1988). The effects of litter-size variation on the development of play behaviour in the domestic cat: litters of one and two. *Animal Behaviour*, 36(1), 20-34.

Miller, G.L. & Miller, P.R. (1987). Life cycle and courtship behavior of the burrowing wolf spider *Geolycosa turricola* (Treat) (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnol*ogy, 15, 385-394.

Miyashita, K. (1968). Quantitative feeding biology of *Lycosa T-insignita* BOES. et STR. (Araneae: Lycosidae). *Bull. Nat. Inst. Agric. Sci.(Japan)*, 22, 329-334.

Moffett, S. & Doell, G.S. (1980). Alteration of locomotor behavior in wolf spiders carrying normal and weighted egg cocoons. *Journal of Experimental Zoology*, 213, 219-226.

Morales, J., Valando, A. & Torres, R. (2009). Fecundity limits attractiveness when pigments are scarce. *Behavioral Ecology*, 20, 117-23.

Moya, J., Quesada, R., Barrantes, G., Eberhard, W.G., Escalante, I., Esquivel, C., Rojas, A., Triana, E. & Arias, A. (2010). Egg sac construction in folded dead leaves by *Pozonia nigroventris* and *Micrathena sp*. (Araneae, Araneidae). *Journal of Arachnology*, 38, 371–373.

Nalepa, C.A. (1984). Colony composition, protozoan transfer, and some life history characteristics of the woodroach *Cryptocercus punctulatus* Scudder (Dictyoptera, Cryptoceridae). Behavioral Ecology and Sociobiology, 23, 273-279.

Nazareth, T.M. & Machado, G. (2009). Reproductive behavior of *Chavesincola inexpectabilis* (Opiliones: Gonyleptidae), with the description of a new and independently evolved case of parental care in harvestman. *Journal of Arachnology*, 37, 127-134.

Nawabi, S. (1974). Histologische Untersuchungen an der Mitteldarmenta von *Stegodyphus pacificus* (Pocock 1900) (Aranea, Eresidae). Diss Universitat, Bonn

Nentwig, W., Blick, T., Gloor, D., Hänggi, A. & Kropf, C. (2016). Spiders of Europe. www.araneae.unibe.ch.

Neuhofer, D., Machan, R. & Schmid, A. (2009). Visual perception of motion in a hunting spider. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 2819-2823.

Nordling, D., Andersson, M., Zohari, S. & Lars, G. (1998). Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1403), 1291-1298.

Nørgaard, E. (1951). On the ecology of two Lycosid spiders (*Pirata piraticus* and *Lycosa pullata*) from a Danish sphagnum bog. *Oikos*, 3, 1-21.

Nørgaard, E. (1956). Environment and behavior of Theridian saxatile. *Oikos*, 7, 159-192.

Nyffeler, M. (2000). Do adult female lycosids feed during the period of maternal care? *Bulletin of the British Arachnological Society*, 11, 388-390.

Nyffeler, M., Sterling, W.L. & Dean, D.A. (1994). How spiders make a living. *Environmental. Entomology*, 23, 1357-1367.

Oelbermann, K. & Scheu, S. (2002). Effects of prey type and mixed diets on survival, growth and development of a generalist predator, *Pardosa lugubris* (Araneae: Lycosidae*). Basic and Applied Ecology*, 3, 285-291.

Opell, D.B. (2001). Egg sac recognition by female *Miagrammopes animotus* (Araneae, Uloboridae). *Journal of Arachnol*ogy, 29, 244-248.

Ortega-Escobar, J. (2011). Anterior lateral eyes of *Lycosa tarantula* (Araneae: Lycosidae) are used during orientation to detect changes in the visual structure of substratum. *Journal of Experimental Biology*, 214, 2375-2380.

Paine, R.T. (1971). The measurement and application of the calorie to ecological problems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 2, 145-164.

Palmgren, P. (1944). Hymenopterous parasites in egg sacs of spiders of the genus *Pardosa*. *Tijdschr. Entomol*., 116, 43-61.

Papke, M.D., Reichert, S.E. & Schulz, S. (2001). An airborne female pheromone associated with male attraction and courtship in a desert spider. *Animal Behaviour*, 61, 877-886.

Papke, M., Schulz, S., Tichy, H., Gingl, E., & Ehn, R. (2000). Identification of a new sex pheromone from the silk dragline of the tropical wandering spider *Cupiennius salei*. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(23), 4339-4341.

Pasquet, A., Trabalon, M., Bagnères, A.G. & Leborgne, R. (1997). Does group closure exist in the social spider *Anelosimus eximius*? Behavioural and chemical approach. Insectes Sociaux, 44, 159-169.

Peck, W.B. & Whitcomb, W.H. (1970). Studies on the biology of a spider *Chiracanthium inclusum* (Hentz*). Agr. Exp. Sta. Div. Agr., Univ. Arkansas Bull*., 753.

Pérez-Rodríguez, L. (2009). Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. *Bioassays*, 31, 1116-26.

Perrone, M.Jr. & Zaret, T.H. (1979). Parental care patterns of fishes. *American Natura*, 113, 351-361.

Pétillon, J., Lambeets, K., Ract-Madoux, B., Vernon, P. & Renault, D. (2011). Saline stress tolerance partly matches with habitat preference in ground-living wolf spiders. *Physiological Entomology*, 36, 165-172.

Pike, T.W., Blount, J.D., Lindström, J. & Metcalfe, N.B. (2007). Dietary carotenoid availability influences a male's ability to provide parental care. *Behavioral Ecology*, 18, 1100-1105.

Pitman, R.L., Ballance, L.T., Mesnick S.I. & Chivers, S.J. (2001). Killer whale predation on sperm whales: Observations and implications. *Marine Mammal Science*, 17(3), 494-507.

Poindron, P. & Le Neindre, P. (1980). Endocrine and sensory regulation of maternal behavior in the ewe. In: Advances in the study of behavior. (Rosenblatt, J.S., Hinde, R.A., Beer, C. and Busnel, M.C., eds.) New York: Academic Press.

Poindron, P. & Levy, F. (1990). Physiological, sensory and experimental determinants of maternal behaviour in sheep. In: Mammalian parenting: Biochemical, Neurobiological and Behavioral Determinants (Krasnegor, N.A. & Bridges, R.B., eds.). Oxford University Press, New York, pp. 133-156.

Pollard, S.D. (1984). Egg guarding by *Clubiona cambridgei* (Araneae, Clubionidae) against conspecific predators. *Journal of Arachnology*, 11, 323-326.

Pollard, S.D., Macnab, A.M. & Jackson, R.R. (1987). Communication with chemicals: Pheromones and Spiders. In: Ecophysiology of Spiders (Nentwig W., ed.). Springer Verlag, pp 133-141.

Pollierer, M.M., Scheu, S. & Haubert, D. (2010). Taking it to the next level: trophic transfer of marker fatty acids from basal resource to predators. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 919-925.

Pourié, G., Ibarra, F., Francke, W. & Trabalon, M. (2005). Fatty acids mediate aggressive behavior in the spider *Tegenaria atrica*. *Chemoecology*, 15(3), 161-166.

Pourié, G. & Trabalon, M. (1999). Agonistic behaviour of female *Tegenaria atrica* in the presence of different aged spiderlings. *Physiological Entomology*, 24, 1-7.

Pourié, G. & Trabalon, M. (2001). Plasticity of agonistic behaviour in relation to diet and contact signals in experimentally group-living of *Tegenaria atrica*. *Chemoecology*, 11(4), 175-181.

Pourié, G. & Trabalon, M. (2003). The role of 20-hydroxyecdysone on the control of spider vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 131, 250-257.

Prestwisch, K.N. (1983a). The roles of aerobic and anaerobic metabolism in active spiders. *Physiological Zoology*, 56, 122-132.

Prestwisch, K.N. (1983b). Anaerobic metabolism in spiders. *Physiological Zoology*, 56, 112-121.

Prouvost, O., J.M. Keller, Trabalon, M. (1999a). Comportement sexuel et répartition des sensilles chez les mâles et femelles de *Tegenaria atrica* C.L. Koch (Agelenidae). *Bulletin des Académies et Sociétés Lorraines des Sciences*, 38, 1-4.

Prouvost, O., Trabalon, M., Papke, M. & Schulz, S. (1999b). Contact sex signals on web and cuticle of *Tegenaria atrica* (Araneae, Agelenidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *40*(4), 194-202.

Puzin, C., Acou, A., Bonte, D. & Pétillon, J. (2011). Comparison of reproductive traits between two salt-marsh wolf spiders (Araneae, Lycosidae) under different habitat suitability conditions. Animal Biology **61**, 127-138.

Randall, J.B. (1977). New observations of maternal care exhibited by the green Lynx Spider *Peucetia viridans* Heutz (Araneae, Oxyopidae). *Psyche.*, 84, 286-291.

Reguera, P. & Gomendio, M. (1999). Predation costs associated with parental care in the golden egg bug *Phyllomorpha laciniata* (Heteroptera: Coreidae). *Behavioral Ecology,* 10(5), 541-544.

Richard, G. (1975). Les comportements instinctifs. In: Sup. Le Psychologue, n°59. Presses Uuniversitaires de France, Paris, 256 p.

Ridley, M. (1995). Animal Behavior. An introduction to behavioral mechanisms, development and ecology, 2^{d} ed. Blackwell Scientific Publications, Boston.

Riechert, S.E. (1984). Games spiders play. III: Cues underlying context-associated changes in agonistic behaviour. *Animal Behaviour*, 32, 1-15.

Roberts, J. A. & Uetz, G. W. (2004). Chemical signaling in a wolf spider: a test of ethospecies discrimination. *Journal of Chemical Ecol*ogy, 30, 1271-1284.

Roland, C., Gundermann, J.L. & Horel, A. (1996). Maternal state induction in female spiders by the young. *Behaviour*, 133, 1125-1131.

Rolls, E.T. (1994). Brain mechanisms for invariant visual recognition and learning. *Behavioural Process,* 33, 113-138.

Rosenblatt, J.S. & Snowdon, C.T. (1996). Parental care: Evolution, Mechanisms, and Adaptative Significance. Advance Studies of Behaviour, 25. Academic Press, New York.

Rosenqvist, G. (1990). Male mate choice and female-female competition for mates in the pipefish Nerophis ophidion. Animal Behaviour, 39, 1110-1116.

Rovner, J.S., Higashi, G.A. & Foelix, R.F. (1973). Maternal behaviour in wolf spiders: the role of abdominal hairs. *Science*, 182, 1153-1155.

Royle, N.J., Smiseth, P.T. & Kölliker, M. (2012). The evolution of parental care (1st edn). Oxford University Press.

Ruch, J, Riehl, T, May-Collado, L.J. & Agnarsson, I. (2015). Multiple origins of subsociality in crab spiders (Thomisidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 330-340.

Rundus, A.S., Biemuller, R., DeLong, K., Fitzgerald, T. & Nyandwi, S. (2015). Age-related plasticity in male mate choice decisions by *Schizocosa retrorsa* wolf spiders. *Animal Behaviour*, 107, 233-238.

Rypstra, A.L. (1986). High prey abundance and a reduction in cannibalism: the first step to sociality in spiders (Arachnida). *Journal of Arachnology*, 14, 193–200

Salomon, M., Schneider, J. & Lubin, Y. (2005). Maternal investment in a spider with suicidal maternal care, *Stegodyphus lineatus* (Araneae, Eresidae). *Oikos*, 109, 614-622.

Salthe, S.N. (1969). Reproductive modes and the number and sizes of ova in the Urodeles. *The American Midland Naturalist*, 81(2), 467-490.

Samu, F., Toft, S. & Kiss, B. (1999). Factors influencing cannibalism in the wolf spider *Pardosa agrestis* (Araneae, Lycosidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 45, 349-354.

Sauvé, C.C., Beauplet, G., Hammill, M.O. & Charrier, I. (2015). Mother-pup vocal recognition in harbor seals: influence of maternal behaviour, pup voice and habitat sound properties. *Animal Behaviour*, 105, 109-120.

Sayler, A. & Salmon, M. (1971). An ethological analysis of communal nursing by the house mouse (*Mus musculus*). *Behaviour*, 40(1), 62-84.

Schartau, W. & Leidescher, T. (1983). Composition of the hemolymph of the tarantula *Eurypelma californicum*. *Journal Comparative Physiology*, 152, 73-77.

Schildknecht, H., Kunzelmann, P., Krauss, D. & Kuhn, C. (1972). Uber die Chemie der Spinnwebe, I. Arthropodenawehrstoffe, LVII, *Naturwissenschafter*, 59, 98–99.

Schlesinger A., Kramarsky-Winter, E., Rosenfeld, H., Armoza-Zvoloni, R. & Loya, Y. (2010). Sexual plasticity and self-fertilization in the sea anemone *Aiptasia diaphana*. PloS One, 5(7), e11874. Doi: 10.1371/journal.pone.0011874

Schmitt, A., Schuster, M. & Barth, F.G. (1993). Importance of pause between spider courtship vibrations and general problems using synthetic stimuli in behavioural studies. *Journal of Comparative Physiology*. *A.* 172: 707-714.

Schneider, J.M. (2002). Reproductive state and care giving in *Stegodyphus* (Araneae: Eresidae) and the implications for the evolution of sociality. *Animal Behaviour*, 63(4), 649-658.

Schneider, J.M & Lubin, Y. (1977). Does high adult mortality explain semelparity in the spider *Stegodyphus lineatus* (Eresidae)? *Oïkos*, 79, 92-100.

Schradin, C. & Anzenberger, G. (2001). Costs of infant carrying in common marmosets, *Callithrix jacchus*: an experimental analysis. *Animal Behaviour*, 62(2), 289-295.

Schulz, S. & Toft, S. (1993a). Identification of a sex pheromone from a spider. *Science*, 260, 1635-1637.

Schulz, S. & Toft, S. (1993b). Branched long chain alkyl methyl ethers: A new class of lipids from spider silk. *Tetrahedron*, 49, 6805-6820.

Schulz, S. (1997). The chemistry of spider toxins and spider silk. *Angew Chem Int Ed Engl*., 36, 314-326.

Schulz, S. (2004). Semiochemistry of spiders. *Advances in insect chemical ecology*, *1*, 110-150.

Seibel, B.A., Robison, B.H. & Haddock, S.H.D. (2005). Post-spawning egg care by a squid. *Nature*, 438-929.

Seibt, U. & Wickler, W. (1987). Gerontophagy versus cannibalism is the social spider Stegodyphus mimosarum Paresi and Stegodyphus dumicola Pocock. *Animal Behav*iour, 35, 1903-1904.

Seyfarth, E.A. & Barth, F.G. (1972). Compound slit sense organs on the spider leg: Mechanoreceptors involved in kinesthesic orientation. Journal of Comparative Physiology, 78, 176.-191.

Shao, Z., & Vollrath, F. (1999). The effect of solvents on the contraction and mechanical properties of spider silk. *Polymer*, 40(7), 1799-1806.

Shear, W.A. (1970). The evolution of social phenomena in spiders. *Bulletin British. Arachnology Society*, 1, 65-76.

Smiseth, P.T., Kölliker, M. & Royle, N.J. (2012). What is parental care? In: The Evolution of Parental Care (Royle, N. J., Smiseth, P. T. & Kölliker M., eds). Oxford University Press, United Kingdom, pp. 1-17.

Smith, J.M. & Riechert, S.E. (1984). A conflicting-tendency model of spider agonistic behaviour: hybrid-pure population line comparisons. *Animal Behaviour*, 32, 564-578.

Stanley-Samuelson, D.W., Jurenka, C., Crips, G.J., Blomquist, G.J. & de Renobales, M., (1988). Fatty acids in insects: composition, metabolism and biological significance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 9, 1-33.

Stefani, V., Del-Claro, K., Silva, L.A., Guimaraes, B. & Tizo-Pedroso, E. (2011). Mating behaviour and maternal care in the tropical savanna funnel-web spider *Aglaoctenus lagotis* Holmberg (Araneae: Lycosidae). *Journal of Natural History*, 45, 1119–1129.

Stefani, V., Moreira, S. & Del-Claro, K. (2011). Oviposition and post-embrionic development of *Aglaoctenus lagotis* (Araneae: Lycosidae). *Zoologia*, **28**, 565-570.

Stewart, D.M., Martin, A.W. (1970). Blood and fluid balance of the common tarantula, *Dugesiella hentzi*. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 70, 223-246.

Stiles, G.J. & Coyle, F.A. (2001). Habitat distribution and life history of species in the spider genera Theridion, Rugathodes, and Wamba in the Great Smoky Mountains National Park (Araneae, Theridiidae). *Journal of Arachnology*, 29, 396–412.

Stoltz, J.A., Hanna, R. & Andrade, M.C.B. (2010). Longevity costs of remaining unmated under dietary restriction. *Functional Ecology*, 24, 1270-1280.

Summers, K. (1992). Mating strategies in two species of dar-poison frogs: a comparative study. *Animal Behaviour*, 43, 907-919.

Suter, R.B., Shane C.M. & Hirscheimer A.J. (1987). Communication by cuticular pheromones in a Linyphiid spider. *Journal of Arachnology.* 15:157-162.

Suter, R.B., Shane C.M. & Hirscheimer A.J. (1989). Spider *vs*. spider: *Frontinella pyramitela* detects *Argyrodes trigonum via* cuticular chemicals. *Journal of Arachnology.* 17: 237-240.

Svensson, I. (1988). Reproductive costs in two sex-role reversed pipefish species (Syngnathidae). *The Journal of Animal Ecology*, 929-942.

Tahiri, A., Horel, A. & Krafft, B. (1989). Etude préliminaire sur les interactions mère-jeunes et jeunes-jeunes chez deux espèces d'*Amaurobius* (Araneae, Amaurobiidae). *Revue d'Arachnologie*, 8, 115-128.

Tallamy, D.W. (2001). Evolution of exclusive paternal care in arthropods. *Annual review of entomology*, 46(1), 139-165.

Tallamy, D.W. & Wood, T.K. (1986). Convergence patterns in subsocial insects. Annual Revue of Entomology 31, 369-390.

Tammaru, T., Esperk, T. & Castellanos, I. (2002). No evidence for costs of being large in females of *Orgyia* spp. (Lepidoptera, Lymantriidae): larger is always better. *Oecologia*, 133, 430-438.

Tanaka, K. & Ito, Y. (1982). Decrease in respiratory rate in a wolf spider, *Pardosa astrigera*, under starvation. *Researches on Population Ecology*, 24, 360-374.

Taylor, R.M. & Bradley, R.A. (2009). Plant nectar increase survival, molting, and foraging in two foliage wandering spiders. *Journal of Arachnology*, 37, 232-237.

Telfer, W.H. & Kunkel, J.G. (1991). The function and evolution of insect storage hexamers. *Annual Review of Entomology*, 36, 205-228.

Tietjen, W.J. (1977). Dragline-following by male Lycosid spiders. *Psyche*, 84, 165-178.

Tietjen, W.J. & Rovner J.S. (1982). Chemical communication in Lycosida and other spiders. In Spider Communication: Mechanisms and Ecological Signifiance (Witt P.N. & Rovner J.S., eds.). Princeton University Press, Princeton, New Jersey. pp 249.

Toyama, M. (1999). Adaptive advantages of maternal care and matriphagy in a foliage spider, *Chiracanthium japonicum* (Araneae: Clubionidae). *Journal of Ethology*, 17, 33-39.

Toyama, M. (2003). Relationship between reproductive resource allocation and resource capacity in the matriphagous spider, *Chiracanthium japonicum* (Araneae: Clubionidae *Journal of Ethology*, 21, 1-7.

Trabalon, M. (2000). Les modes de communication des araignées. *Actes Colloques Insectes Sociaux, 13*, 1-11.

Trabalon, M. (2011). Agonistic interactions, cuticular and hemolymphatic lipid variations during the foraging period in spider females *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae). *Journal of Insect Physiology*, 57, 735-743.

Trabalon, M. & Assi-Bessekon, D. (2008). Effects of web chemical signatures on intraspecific recognition in a subsocial spider, Coelotes terrestris (Araneae). *Animal Behaviour*, *76*(5), 1571-1578.

Trabalon, M., & Bagnères, A.G. (2010). Contact recognition pheromones in spiders and scorpions. In: Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology (Blomquist, G. & Bagnères, A.G., eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 344-374.

Trabalon, M., Bagnères, A.G., Hartmann, N. & Vallet, A.M. (1996). Changes in cuticular compounds composition during the gregarious period and after dispersal of the young in *Tegenaria atrica* (Aranea, Agelenidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biol*ogy, 26, 77-84.

Trabalon, M., Bagnères, A.G. & Roland, C. (1997). Contact sex signals in two sympatric spider species, *Tegenaria domestica* and *Tegenaria pagana*. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 747-758.

Trabalon, M., Bautz, A.M., Moriniere, M. & Porcheron, P. (1992). Ovarian development and correlated changes in hemolymphatic ecdysteroid levels in two spiders, *Coelotes terrestris* and *Tegenaria domestica* (Araneae, Agelenidae). *General and Comparative Endocrinology*, 88, 128-136.

Trabalon, M., Campan, M., Porcheron, P., Clément, J.L. Baehr, J.C., Morinière, M. & Joulié, C. (1988). Changes in cuticular hydrocarbon composition in relation to age and sex behavior in the female *Calliphora vomitaria* (Diptera). *Behavioral Processes*, 17, 107-115.

Trabalon, M., Niogret, J. & Legrand-Frossi, C. (2005). Effect of 20-hydroxyecdysone on cannibalism, sexual behavior, and contact sex pheromone in the solitary female spider, *Tegenaria atrica*. *General and Comparative Endocrinology*, *144*(1), 60-66.

Trabalon, M., Pourié, G. & Hartmann, N. (1998). Relationships among cannibalism, contact signals, ovarian development and ecdysteroid levels in *Tegenaria atrica* (Araneae, Agelenidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biol*ogy, 28, 751-758.

Trivers, R.L. (1972). Parental investment and sexual selection. In: Sexual selection and the descent of man (Campbell, B., ed.). Aldine, Chicago, pp 136-179.

Turnbull, A.L. (1973). Ecology of the true spiders (Araneomorphae). *Annual Review of. Entomol*ogy, 18, 303–348

Tyndale, S., Letcher, R., Heath, J. & Heath, D. (2008). Why are salmon eggs red? Egg carotenoids and early life survival of Chinook salmon (*Oncorhynchus tsawytscha*). *Evolutionary Ecology Research*, 10, 1187-99.

Uetz, G.W. (1986). Web building and prey capture in communal orb weavers. In: Webs, Behavior, and Evolution (Shear, W.A., ed.). Stanford University Press, Stanford, pp. 207-231.

Uetz, G.W. & Stratton, G.E. (1982). Acoustic communication and reproductive isolation in spiders. In: Spider Communication: Mechanisms and Ecological Signifiance (Witt P.N. & Rovner J.S., eds.) Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp 123.

Vachon, M. (1957). Contribution à l'étude du développement post-embryonnaire des araignées. Première note. Généralités et nomenclatures des stades. *Bulletin de la Société Zoologique Française*, 82, 337-354.

Vallet, A.M., Keller, J.M., Bautz, A.M. & Trabalon, M. (1994). Morphologie des sensilles chemoréceptrices de *Tegenaria atrica* (Agelenidae). *Bulletin des Académies et Société Lorraines des Sciences*, 33(4), 193-203.

Vallet, A.M., Marion-Poll, F. & Trabalon, M. (1998). Preliminary electrophysiological study of the contact chemoreceptors in a spider. *C.R. Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie*, 321, 463-469.

Vancassel, M. (1977). Le développement du cycle parental de *Labidura riparia*. *Biology of Behaviour*, 2, 51-64.

Vancassel, M., Foraste, M., Strambi, A. & Strambi, C. (1984). Normal and experimentally induced changes in hormonal hemolymph titers during parental behavior of the earwig *Labidura riparia*. *General and Comparative Endocrinology*, 56, 444-456.

Vancassel, M., Foraste, M., Quris, R., Strambi, A. & Strambi, C. (1987). The parental response of females *Labidura riparia* to young and its control. *General and Comparative Endocrinology*, 6, 169-173.

Vannini, M., Contini Bonacossi, B. & Ugolini, A. (1986). Cocoon care in *Pardosa hortensis* (Araneae, Lycosidae). *Biology of Behaviour*, 11, 85-96.

Viera, C. & Romero, G.Q. (2008). Maternal care in a neotropical jumping spider (Salticidae). *Journal of Zoology*, 276, 237–241.

Viera, C., Costa, F.G., Ghione, S. & Benamù-Pino, M.A. (2007a). Progeny, development and phenology of the sub-social spider *Anelosimus* cf. *studiosus* (Araneae, Theridiidae) from Uruguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 42(2), 145-153.

Viera, C., Ghione, S. & Costa, F.G. (2007b). Mechanisms underlying egg-sac opening in the subsocial spider *Anelosimus* cf. *studiosus* (Araneae Theridiidae). *Ethology, Ecology, Evolution*, 19, 61-67.

Vlijm L., Kessler A. & Richter C.J.J. (1963). The life history of *Pardosa amentata* (Cl.) (*Araneae, Lycosidae*). *Ent. Berichten*. 23: 75-80.

Vogelei, A. & Greissl, R. (1989). Survival strategies of the crab spider *Thomisus onustus* Walkenaer 1806 (Chelicerate, Arachnida, Thomisidae). *Oecologia*, 80, 513-515.

Vollrath, F. (1987). Foraging strategies of spider. In: Trends in Ecology and evolution (Nentwig W., Ed.). Heidelberg, Springer-Verlag. pp 357-370.

Vollrath, F. (1999). Biology of spider silk. *International Journal of Biological Macromolecule*, 24, 81-88.

Wagner, J.D. (1995). Egg sac inhibits filial cannibalism in the wolf spider, *Schizocosa ocreata*. *Animal Behaviour*, 50, 555-557.

Walker, S.E., Marshall, S.D., Rypstra, A.L. & Taylor, D.H. (1999). The effects of hunger on locomotory behaviour in two species of wolf spider (Araneae, Lycosidae). *Animal Behaviour*, 58, 515-520.

Watson, P.J. (1986). Transmission of a female sex pheromone thwarted by males in spider *Linyphia litigiosa* (*Linyphiidae*). *Science*, 233, 219-221.

Withcomb, W.H. (1962). Egg sac construction and oviposition of the green lynx spider, *Peucetia viridans* (Oxyopidae). Southwestern Nature 7, 198-201.

Whitcomb, W.H. & Eason, R. (1964). A technique for determining the duration of egg incubation in wolf spiders. *Turtox News*, 42, 301-302.

Whitcomb, W.H. & Eason, R. (1967). Life history and predatory importance of the striped lynx spider (Araneida: Oxyopidae). *Arkansas Academy of Science Process*, 21, 54-58.

Whitcomb, W.H., Hite, M. & Eason, R. (1966). Life history of the green lynx spider, *Peucetia viridans* (Araneida: Oxyopidae). *Journal of Kansas Entomological Society*, 39, 259-267.

Wigger, E., Kuhn-Nentwig, L., & Nentwig, W. (2002). The venom optimisation hypothesis: a spider injects large venom quantities only into difficult prey types. *Toxicon*, 40(6), 749-752.

Wilder, S.M. (2011). Spider nutrition: an integrative perspective. *Advances in Insect Physiology*, 40, 87-136.

Wilder, S.M., Mayntz, D., Toft, S., Rypstra, A.L., Pilati, A. & Vanni, M.J. (2010). Intraspecific variation in prey quality: a comparison of nutrient presence in prey and nutrient extraction by predators. *Oikos*, 119, 350-358.

Wilder, S.M. & Rypstra, A.L. (2008). Diet quality affects mating behaviour and egg production in a wolf spider. *Animal Behaviour*, 76, 439-445.

Willey, M.B. & Alder, P.H. (1989). Biology of *Peucetia viridans* (Araneae, Oxyopidae) in South Carolina, with special reference to predation and maternal care. *Journal of Arachnology*, 17, 275–284.

Willmer, P.G. (1985). Thermal ecology, size effects, and the origins of communal behaviour in Cerceris wasps. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 17(2), 151-160.

Wilson, E.O. (1971). Insect Societies. Harvard University Press, Cambridge, USA.

Wilson, E.O. (1975). Sociobiology: The new synthesis. Harvard University Press, Cambridge.

Winkler, D.W. (1987). A genral model for parental care. *Am Nat*, 130, 526-543.

Wise, D. H. (1993). Spiders in ecological webs. Cambridge University Press, UK.

Witt, P.N. & Rovner, J.S. (1982). Spider Communication: Mechanism and Ecological significance. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. p 441

Witter, M.S. & Cuthill, I.C. (1993). The ecological costs of avian fat storage. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 340(1291), 73-92.

Wong, N.C. (2001). The beneficial effects of plant sterols on serum cholesterol. *The Canadian journal of cardiology*, *17*(6), 715-721.

Yip, E.C. & Rayor, L.S. (2014). Maternal care and subsocial behaviour in spiders. *Biological Reviews*, 89, 427-449.

Zeh, D.W., Smith, R.L. 1985. Paternal investment by terrestrial arthropods. American Zoology 25, 785-805.

Zink, A.G. (2003). Quantifying the costs and benefits of parental care in female treehoppers. *Behavioral Ecology*, 14, 687-93.

La science c'est comme faire l'amour :
parfois quelque chose d'utile en sort, mais ce n'est pas la raison pour laquelle nous le faisons.
Richard Feynman

VU :

Le Directeur de Thèse
TRABALON Marie

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale
THERET Nathalie

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

David ALIS

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

Résumé

Les soins parentaux sont observés dans de nombreux taxons et sont exprimés de façon plus ou moins complexe. L'étude de ces comportements chez les arthropodes, en particulier chez les araignées, nous permet de mieux comprendre comment les soins à la progéniture se sont mis en place au cours de l'évolution. Au cours de cette thèse nous avons étudié le comportement d'une espèce errante *Pardosa saltans* (Lycosidae) vis-à-vis de son cocon, puis de ses jeunes. Nous avons décrit les comportements manifestés par la mère pendant toute la période de soin au cocon (période de développement embryonnaire et postembryonnaire des jeunes). Notre étude a permis de mettre en évidence qu'il existe une ontogenèse comportementale dans le cadre des soins parentaux chez cette espèce. Elle a permis également d'évaluer les dépenses énergétiques subies par la mère pendant cette période. Et enfin nous avons identifié, pour la première fois, les composés chimiques présents à la surface du cocon. Nos expériences montrent que ces composés chimiques associés aux vibrations émises par les juvéniles à l'intérieur du cocon sont utilisés par la mère détecter l'état de développement de sa progéniture.

Mots-clés : comportement maternel, investissement, activité locomotrice, prédation, *Araneae.*

Abstract

Parental care is widespread among animal kingdom and is more or less expressed. Thus, the study of these behaviours among primitive species, can let us understand how parental behaviours were implemented during evolution. In this thesis we studied maternal behaviour in a wandering spider *Pardosa saltans* (Lycosidae) with her egg-sac and her young which she actively transports. We have described maternal behaviour towards the egg-sac and highlighted the presence of ontogeny of maternal behavior in this species. Furthermore, we were able to evaluate some of the physiological and ecological investment associated with maternal care of the egg-sac and young. Finally, we have, for the first time, identify chemical compounds on the surface of the silk egg-sac, and placed in evidence the presence of a chemical and vibrational communication between the mother and her cocoon.

Key-words: Lycose, maternal behaviour, egg-sac, ontogeny, locomotor activity, physiology, chemical signals, vibratory signals.