ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 48

1973

N° 3

Annales de Parasitologie (Paris), 1973, t. 48, n° 3, pp. 399 à 410

MÉMOIRES ORIGINAUX

Sur quelques caractères de l'infection des larves de *Melolontha melolontha* L.

par *Rickettsiella melolonthae* Krieg

par B. HURPIN et P.-H. ROBERT

*Institut national de la Recherche agronomique, Station de Recherches
de Lutte biologique et de Biocoenotique, La Minière, F 78000 Versailles*

Résumé

Deux aspects de la rickettsiose ont été étudiés : les conséquences de l'infection sur l'alimentation, le poids et la survie des vers blancs ; les délais de passage des rickettsies dans l'hémolymph.

Les symptômes liés à la désorganisation du tissu adipeux deviennent apparents deux semaines après l'injection intracœlomique de *R. melolonthae* : parallèlement l'activité locomotrice diminue, l'alimentation cesse et le poids des larves diminue, à 25° ou à 20°. A 14°, le poids des larves malades continue à augmenter jusqu'à la mort, malgré l'arrêt de l'alimentation.

La survie des insectes infectés est en moyenne de 2 mois mais peut dépasser 6 mois pour certains individus à basse température (5° C).

Les délais d'infection de l'hémolymph sont de quelques minutes après ingestion forcée et de l'ordre de deux jours après ingestion libre.

Summary

Two aspects of the rickettsiosis have been investigated: the consequences of the infection on the feeding, the weight and the survival of white grubs, the time required for the rickettsia to go through the hemolymph.

The symptoms related to the disorganisation of the fat body become obvious two weeks after the intracoelemic injection of *R. melolonthae*, at the same time, the locomotor activity slows down, the feeding stops and the weight of the larvae decreases, either at 25° and 20° C. At 14° C the weight of the diseased larvae keeps increasing until the death in spite of the stop of feeding.

The survival of the infected insects is 2 months on an average, but some of them may survive 6 months at low temperature (5° C). The times required for the infection of the hemolymph vary from a few minutes after forced feeding to 2 days after free ingestion.

Les larves du Hanneton commun, *M. melolontha* L. (Coléopt. Scarabaeidae) sont sensibles à de nombreuses maladies, parmi lesquelles nous avons étudié notamment une rickettsiose observée à plusieurs reprises dans des populations naturelles de vers blancs, soit en Allemagne (Niklas, 1960), soit en France (Hurpin et Vago, 1958). Les caractères histopathologiques de cette maladie font l'objet des investigations de divers collègues et en particulier de Krieg (1955, 1958) et de Vago et ses collaborateurs (Vago, 1959; Meynadier, 1964).

Nous nous sommes attachés à l'examen des conditions permettant le développement de la maladie chez le ver blanc au cours de recherches dont les résultats sont publiés par ailleurs (Hurpin, 1971). Dans cette note, nous nous proposons de présenter certains aspects de l'infection: évolution des symptômes et de l'alimentation des larves malades, délais nécessaires pour que les insectes s'infectent par les trois voies de contamination: injection intracœlomique, ingestion forcée, ingestion libre.

Symptômes et évolution de l'alimentation.

Après injection intracœlomique d'une dilution d'hémolymph de larve malade à des séries de 10 L₃ sains, nous avons suivi l'évolution de la maladie à la fois au point de vue symptômes et au point de vue multiplication des rickettsies dans les insectes.

Dans 6 lots à 24° C, nous avons noté l'alimentation en disposant dans les récipients d'élevage individuel des morceaux de carotte de même taille renouvelés tous les 2 ou 3 jours, dont la consommation était appréciée par notation empirique de 0 à 4. Parallèlement, l'aspect des larves était observé.

La figure 1 illustre les résultats enregistrés, elle met en évidence un arrêt des prises de nourriture, après un délai analogue, à quelques jours près, à celui nécessaire pour que se manifestent les premiers symptômes de l'affection : diminution très sensi-

FIG. 1. — Durée de l'alimentation et délais de manifestation des symptômes de la rickettsiose après injection à 10 larves du troisième stade (Les ordonnées correspondent à la somme des prises de nourriture à chaque relevé selon une notation empirique de 0 à 4)

ble de l'activité locomotrice à l'intérieur du substrat, apparition au niveau du tissu adipeux d'une coloration plus grisâtre liée à un changement d'aspect de ce tissu qui devient plus « granuleux ». Cette coloration et cette désaggrégation s'accroissent avec le temps et parfois un reflet bleu est visible sur l'ensemble du corps adipeux, d'où le nom donné par Dutky et Gooden (1950) à la maladie.

Cette couleur bleue semble se produire surtout chez les larves jeunes, du deuxième stade notamment, et plus souvent par ingestion libre plutôt qu'après inoculation, lorsque l'élevage est conduit à température peu élevée, 17° par exemple, plutôt qu'à 24° C.

A 24° C, les premières mortalités interviennent 5 à 10 jours après l'arrêt de l'alimentation selon la résistance des larves et la virulence de l'inoculum.

FIG. 2. — Mortalité par rickettsiose de larves du troisième stade à trois températures après injection

La survie des larves malades après la généralisation de l'infection dépend de la vigueur des individus, de leur stade et de la température. Des observations trois fois par semaine portant sur près de 300 vers blancs du troisième stade placés, après l'apparition des symptômes caractéristiques, à quatre températures : 5°, 10°, 13° et 20° sont résumées dans le tableau I.

Tableau I. — Survie des larves L_3 malades à différentes températures

Température	Nombre de larves	Survie en jours		
		Minimum	Maximum	Moyenne
5°	102	16	230	50
10°	87	9	140	60
13°	76	11	146	70
20°	36	12	73	43

Pour compléter ces informations, une expérience ultérieure, réalisée avec des lots de 25 L_3 venant de subir la mue, eut pour but d'examiner les effets de l'infection à rickettsies sur le poids des larves et leur alimentation à trois températures : 14°, 20° et 25°, en opérant d'une part par injection dans l'hémocœle, d'autre part, par injection dans l'œsophage, avec dans chaque cas un lot témoin de 25 L_3 .

La consommation de carotte, évaluée deux fois par semaine de 0 à 4, fut rapportée au poids frais du morceau placé dans les boîtes à chaque contrôle.

FIG. 3. — Evolution de la consommation moyenne individuelle de carotte, en poids frais, de 25 larves du troisième stade à trois températures. Elevage sur tourbe. Lots témoins

a) *Après injection intrahémocœlienne*, 80 à 90 % des larves moururent de rickettsiose caractérisée dans un délai variant de 5 semaines à 8 mois selon la température (fig. 2), alors qu'il n'y eut qu'une mortalité négligeable chez les témoins (2 L_3 à 25°), due à d'autres causes.

La consommation des larves non infectées, après être passée par un maximum un mois environ après le début de l'essai, se ralentit plus ou moins rapidement avec le temps, parallèlement à la maturation des larves en fonction de la température, pour s'arrêter aux approches de la nymphose (fig. 3). Dans les lots traités (fig. 4), les prises de nourriture cessent au bout d'un mois à 25°, contre 2 mois à 20°, et se prolongent au-delà de 5 mois à 14° C. Dans les trois cas, l'arrêt de la consommation de carotte précède d'environ 2 semaines le début de la mortalité.

La consommation moyenne journalière est fonction de la température et est la plus élevée à 25°, témoignant ainsi de la plus grande activité des larves ; mais la consommation totale est la plus importante à 14° à cause des différences considérables

FIG. 4. — Evolution de la consommation moyenne individuelle de carotte, en poids frais, de 25 larves du troisième stade injectées avec *R. melolonthae*. Elevage sur tourbe

selon la température entre les durées de la période d'alimentation. D'autre part, ainsi que l'indique le tableau II, les larves infectées ont une consommation moyenne journalière inférieure à celle des témoins, si l'on considère l'ensemble de la période de survie ou d'observation, aux trois températures considérées, ce qui correspond à une manifestation de l'état pathologique.

Tableau II. — Consommation moyenne journalière

	Température °C	Consommation totale (en g)	Durée (en jours)	Consommation moy. journ.
Témoins	14°	23	215	0,10
	20°	20	110	0,18
	25°	13	60	0,32
Traités	14°	14	215	0,06
	20°	11	75	0,14
	25°	9	35	0,25

L'évolution pondérale des vers blancs sains se traduit aux trois températures (fig. 5) par des courbes analogues indiquant une augmentation rapide du poids dans les deux premiers mois avec une stabilisation par la suite. Chez les insectes traités

FIG. 5. — Evolution pondérale des larves du troisième stade non traitées aux trois températures d'élevage dans la tourbe. Pour chaque température, la courbe se rapporte au poids moyen de 25 larves, les points supérieurs aux poids de l'insecte le plus lourd, les points inférieurs aux poids de l'insecte le plus léger

(fig. 6), la fin de l'alimentation à 20° et 25° provoque parallèlement une diminution de poids qui s'accroît avec les progrès de la maladie. Au contraire, à 14° C, le poids des larves continue à augmenter régulièrement jusqu'à la mort, même au bout de 8 mois après le début de l'expérience, en dépit de l'arrêt des prises de nourriture 3 ou 4 mois auparavant. Cette croissance concerne non seulement la moyenne mais aussi les poids maxima et minima (fig. 7). Compte tenu de la faible mobilité des insectes malades à cette température, il est peu probable qu'une telle évolution pondérale soit due à l'ingestion de particules de substrat et ses causes sont à préciser. Un phénomène du même ordre a été constaté par Hawlitzky (1969) chez des L_3 infectées également par *R. melolonthae*, mais chez des insectes élevés à 20°.

Fig. 6. — Evolution pondérale des larves du troisième stade injectées avec *R. melolonthae* (même légende que la fig. 5)

Les valeurs maximales moyennes et individuelles sont sensiblement les mêmes à 20° et à 25° mais inférieures à 14° ; elles sont moins élevées dans les 3 cas pour les traités que les témoins (tableau III).

Tableau III. — Poids maxima des larves en g

Température °C		Poids moyen max.	Poids individuel maximum
<i>Témoins</i>	14	2,20	2,85
	20	2,50	3,10
	25	2,45	3,05
<i>Traités</i>	14	2,00	2,40
	20	2,10	2,90
	25	2,05	2,95

b) Après injection œsophagienne, la mortalité fut liée à des septicémies bactériennes succédant à une lyse très rapide du tissu adipeux entraînant un aspect « pseudo-transparent » des larves atteintes selon un mécanisme décrit précédemment (Hurpin et Vago, 1961). Un seul cas de multiplication des rickettsies fut noté, alors que la mortalité « atypique » fut totale dans les trois séries traitées au bout de 2 mois : les larves malades survivent 2 à 3 semaines à 24°, 3 à 4 semaines à 20° et 2 semaines à 14°.

Il est vraisemblable que ce phénomène est dû à l'emploi d'une suspension de *R. melolonthae*, conservée à 0° pendant un mois, dont la virulence s'était ainsi trouvée

FIG. 7. — Mortalité globale à trois températures des larves du troisième stade ayant subi ou non une injection intraœsophagienne de *R. melolonthae*. Elevage sur tourbe

modifiée : les rickettsies n'ont pas eu le temps de se multiplier avant la mort, qui serait due à des processus d'enchaînement de maladies déjà signalés antérieurement (Hurpin, 1971). Les courbes de la figure 7 illustrent ce fait, par comparaison avec celles de la figure 2. La consommation de carotte s'arrête rapidement du fait de la mort des insectes, le délai entre la dernière prise de nourriture et le décès n'étant que de quelques jours, sauf à 14° où trois larves, plus résistantes, survécurent, continuèrent à s'attaquer aux carottes (fig. 8) et par suite gagnèrent du poids (fig. 9).

c) *Délais d'infection.* — Nous avons cherché à déterminer les délais d'infection des larves du Hanneton par les différents modes de contamination. A cet effet, des prélèvements d'hémolymph ont été opérés sur des vers blancs du troisième stade supposés contaminés, au bout de délais augmentant progressivement.

Des larves saines du même stade ont été injectées à l'aide de suspensions préparées à partir de 9 prélèvements, selon la dilution habituelle : deux gouttes d'hémo-

lymphe dans 10 ml d'eau stérile et injection de 0,1 ml par L_3 , de façon à vérifier par le développement de la rickettsiose chez ces insectes de contrôle la présence des germes dans l'inoculum.

Comme on pouvait s'y attendre du fait du petit nombre d'éléments suffisant pour provoquer la maladie (Hurpin, 1971), l'hémolymph de vers blancs ayant subi une injection intrahémocœlienne est déjà infectante 10 minutes après cette injection.

FIG. 8. — Consommation moyenne individuelle de larves du troisième stade injectées «per os» avec *R. melolonthae*

Après ingestion forcée, les trois essais réalisés sont présentés dans le tableau IV, qui met en évidence la rapidité du passage de la paroi intestinale par les rickettsies, la possibilité d'une infection directe de l'hémocœle par lésion de l'œsophage lors de l'injection étant peu vraisemblable, car de tels accidents entraînent une mortalité rapide par septicémie bactérienne qui n'a pas été constatée dans ces expériences.

Pour apprécier le délai minimum de présence des larves dans un substrat contaminé nécessaire pour assurer l'infection, des vers blancs du 2^e ou du 3^e stade furent

Tableau IV. — Cas de rickettsiose après injections intracoelomiques d'hémolymph prélevée chez des larves ayant subi une infection «per os»

Essai	Nbre de L_3 injectées «per os»	Nbre de L_3 de contrôle	Prélèvement effectué après							
			5 mn	10 mn	15 mn	20 mn	25 mn	30 mn	60 mn	2 h
1	25	6	—	—	—	—	—	5	4	6
2	10	6	—	2	—	0	—	0	—	—
3	25	3 × 5	3 × 5	3 × 5	3 × 5	3 × 5	3 × 4	3 × 3	3 × 3	—

placés, à trois reprises, dans de la tourbe à laquelle avait été incorporé le broyat d'insectes malades à raison de 1 L₃ par litre, puis retirés après des durées variables de séjour dans ce milieu pour être mis en élevage dans de la tourbe non traitée. D'après

FIG. 9. — Evolution pondérale de larves du troisième stade infectées « per os » avec *R. melolonthae*

le tableau V, il apparaît que par ingestion libre également, lorsque les conditions favorables sont réunies, la contamination des larves s'effectue rapidement puisqu'un séjour de deux jours donne des résultats analogues à ceux du maintien permanent dans le milieu traité.

Tableau V. — Cas de rickettsiose selon la durée du séjour dans la tourbe contaminée

Essai	Nbre de larves	Durée de séjour dans le substrat traité						
		2 j.	4 j.	1 sem.	2 sem.	3 sem.	4 sem.	Constant
1	10 L ₂	2	0	2	2	—	—	1
2	12 L ₃	1	2	2	3	1	4	4
3	12 L ₃	4	4	4	4	2	4	4

Conclusions.

Les caractères de l'infection des larves de *M. melolontha* par *Rickettsiella melolonthae* étudiés au cours de ce travail ne concernent que certains aspects de la pathogénèse de cette rickettsie ; il conviendrait de compléter ces informations par des recherches plus approfondies en particulier sur les modifications cellulaires et biochimiques de l'hémolymphe et du tissu adipeux liées au développement de la maladie.

La rapidité de passage dans l'hémolymphe après contamination orale pose la question de la perméabilité de l'intestin à ce type de micro-organisme qu'il conviendrait de préciser au niveau histopathologique.

Bibliographie

- DUTKY (S. R.) et GOODEN (E. L.), 1950. — Blue disease of Japanese beetle larvae. *Bact. Proceed*, 50, 22-23.
- HAWLITZKY (N.), 1969. — Incidence de deux germes pathogènes sur quelques caractères physiologiques des larves du troisième stade de *Melolontha melolontha* L. (Col. Scarabaeidae). *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 1, 149-181.
- HURPIN (B.), 1971. — Contribution à l'étude des facteurs de pathogénie de *Rickettsiella melolonthae* à l'égard du Hanneton commun (*Melolontha melolontha* L.). *Entomophaga*, 16, 297-341.
- et VAGO (C.), 1958. — Les maladies du Hanneton commun (*Melolontha melolontha* L.) (Col. Scarabaeidae). *Entomophaga*, 3, 285-330.
- —, 1961. — Remarques sur la maladie transparente des larves de *Melolontha melolontha* L. *Entomophaga*, 6, 191-196.
- KRIEG (A.), 1955. — Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathologie der « Lorsch'schen Erkrankung » von Engerlingen und zur Zytologie der *Rickettsia melolonthae* nov. spec. *Z. Naturforsch.*, 10, 34-37.
- , 1958. — Weitere Untersuchungen zur Pathologie der Rickettsiose von *Melolontha* sp. *Z. Naturforsch.*, 13, 374-379.
- MEYNADIER (G.), 1964. — Les rickettsioses d'insectes. *Proceed. 12th. Int. Cong. Entomol., London*, 714-715.
- NIKLAS (O. F.), 1960. — Standorteinflüsse und natürliche Feinde als Begrenzungsfaktoren von *Melolontha* - Larvenpopulationen eines Waldgebietes (Forstamt Lorsch, Hessen) (Coleoptera, Scarabaeidae). *Mitt. Biol. Bund. Land - u. Forstwiss., Berlin*, 101, 1-60.
- VAGO (C.), 1959. — Etudes cytopathologiques sur la rickettsiose bleue du Coléoptère *Melolontha melolontha*. *Arch. Inst. Pasteur, Tunis*, 36, 585-593.