

71fe 910254

non microfilmé

9868

Institut d'Elevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays Tropicaux
10, rue Pierre Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général-de-Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

BIBLIOTHÈQUE
IEMVT
10 rue P. Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex



DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

DONNEES ACTUELLES SUR LA PEBRINE

par

Emmanuèle LEBLANC

année universitaire 1990-1991



RESUME

Actuellement, la pébrine, microsporidiose due à *N. bombycis* et affectant entre autres le Bombyx du Mûrier, continue à sévir dans bon nombre de pays.

Or, au moment où la sériciculture se développe dans certains pays tropicaux, il importe de maîtriser parfaitement les conditions sanitaires d'élevage, aspect fondamental à respecter pour lutter efficacement contre cette maladie, qui se transmet en outre par voie transovarienne.

D'autre part, les chercheurs portent actuellement particulièrement attention sur de nouveaux procédés de diagnostic plus rapides et plus fiables, sur la chimiothérapie et sur la création de lignées résistantes à la maladie.

Mots-clés : pébrine, *Bombyx mori* , *Nosema bombycis* ,
grainage cellulaire, ELISA.

DONNEES ACTUELLES SUR LA PEBRINE,
Emmanuèle LEBLANC

TABLE DES MATIERES

DONNEES ACTUELLES SUR LA PEBRINE

INTRODUCTION

I - ETUDE DE LA MALADIE	1
A - ETIOLOGIE	1
1 - Morphologie et systématique de <i>Nosema bombycis</i>	1
2 - Autres spores isolées	3
3 - Isolement et purification des spores	4
B - EPIDEMIOLOGIE	5
1 - Sources de parasites	5
2 - Résistance du parasite	5
3 - Modes d'infection	6
a-Transmission transovarienne et stades de contamination ultérieurs	6
b-Quantité de spores et infection	8
c-Modalités de la contamination secondaire	9
4 - Causes favorisantes	10
a-Distribution géographique des pays séricicoles	10
b-Facteurs saisonniers	10
c-La conduite d'élevage	11
5 - Réceptivité	11
C - CYCLE EVOLUTIF ET PATHOGENIE	12

D - SYMPTOMES ET LESIONS	16
1 - Les œufs	16
2 - Les larves	18
3 - Les chrysalides	20
4 - Les adultes	20
II - DIAGNOSTIC DE LA MALADIE	20
A - CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE	20
B - EXPERIMENTAL	21
1 - Microscopique	21
a-Examen des papillons	21
b-Autres examens	26
2 - Biochimique - Sérologique	28
III - METHODES DE LUTTE	33
A - TRAITEMENT	33
1 - Moyens physiques	33
2 - Chimiothérapie	34
B - PROPHYLAXIE	37
1 - Soins apportés à l'élevage	37
a-A l'incubation	37
b-Durant l'élevage	37
c-Pendant la production de graines	38
d-Traitement des pupes à la chaleur	38
2 - Désinfection	38
a - Les désinfectants	39
b - L'hygiène	41
CONCLUSION	43
BIBLIOGRAPHIE	44

DONNEES ACTUELLES SUR LA PEBRINE

INTRODUCTION

La pébrine, ou maladie du poivre (33), ou encore maladie des corpuscules (30), est une maladie chronique, enzootique, due à un parasite protozoaire microsporidien *Nosema bombycis* Nägeli. Elle affecte les différents stades de *Bombyx mori* et d'autres Lépidoptères également.

Elle diffère des autres affections du ver à soie par la transmission, entre autres, transovarienne.

Bien que la lutte contre cette maladie soit instaurée depuis plus d'un siècle, les pertes ne sont pas totalement éliminées et la pébrine est directement responsable du déclin de l'industrie de la soie dans beaucoup de pays. Une prise de conscience du problème s'est produite dans des pays avancés comme le Japon, ce qui n'est pas toujours le cas dans les pays tropicaux.

Au moment où cette industrie s'étend rapidement dans les pays en voie de développement de la zone tropicale, il y a un urgent besoin d'insister sur cette maladie et son contrôle dont l'efficacité dépend d'une coopération étroite et de la détermination de tous les intervenants, à savoir producteurs de graines, éleveurs et gouvernement.

I - ETUDE DE LA MALADIE

A - ETIOLOGIE

1 - Morphologie et systématique de *Nosema bombycis*

Nosema bombycis doit son nom au botaniste NAGELI en 1857 et qui en fit d'abord une bactérie.

Ce parasite appartient à l'ordre des **Microsporidies**, créé en 1884 par BALBIANI, ordre dont le nom indique que les espèces forment des spores, et qu'elles sont très petites. Le naturaliste italien a également découvert une capsule polaire unique, et une série d'autres observations a montré qu'il s'agissait d'un protozoaire, au cycle évolutif compliqué (8).

Plus tard, basés sur des caractéristiques moléculaires et cytologiques telles que la division nucléaire de type primitif, l'absence de mitochondries, les ribosomes de taille procaryote et leurs ARN, les chercheurs l'ont considéré, d'un point de vue phylogénétique, comme l'un des premiers Eucaryotes unicellulaires connus (31).

La spore, agent causal de la pébrine, montre une morphologie bien caractéristique (fig.1) qui sert de base à la systématique (4) :

- **Classe des MICROSPOREA**

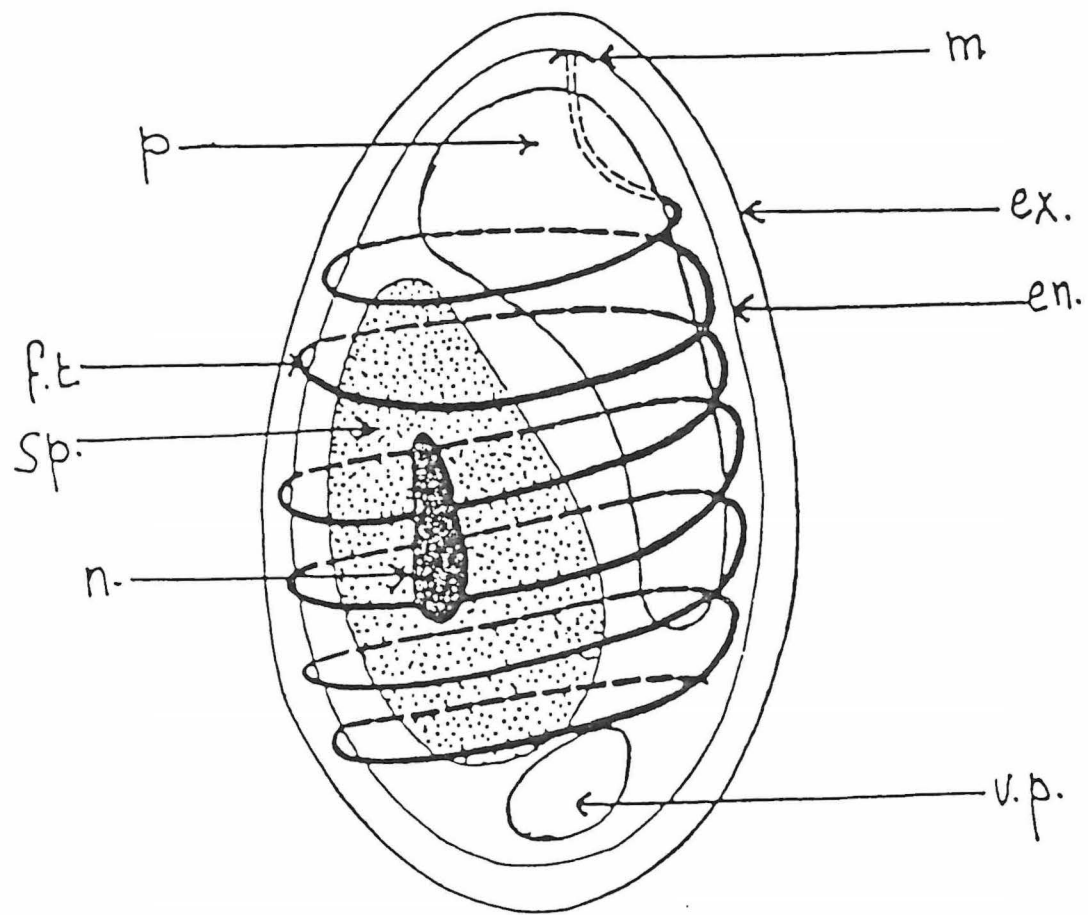
(le filament polaire est enroulé dans la totalité de la spore)

- **Ordre des MICROSPORIDA**

- **Sous ordre des APANSPOROBlastina**

(absence de membrane pansporoblastique autour des sporontes : chaque sporonte donne une seule spore)

fig. 1 : Spore de microsporidie
d'après BLAIS -1989 - (4)



ex : exospore en : endospore sp : sporoplasme n : noyau
ft : filament tubulaire m : manubrium p : polaroplaste
vp : vacuole postérieure

- Famille des NOSEMATIDES

- Genre *Nosema*

- Espèce *Nosema bombycis*..

La spore est un corpuscule ovoïde de 3,4-3,8 µm de long et de 2,0-2,3 µm de large, possédant un indice de réfraction très élevé, dû à sa paroi dure et rigide. Le sporoplasme s'étire selon la forme d'une ceinture autour de la largeur de la spore et il contient deux noyaux. La capsule polaire se projette dans la cavité intérieure de la spore, s'articule avec la paroi de la spore au pôle antérieur et communique à l'extérieur à travers une petite ouverture. Le filament polaire est une structure tubulaire, en spirale comme un ressort et se loge à l'intérieur de la capsule polaire (10).

L'ouverture de la spore se fait sous l'action des sucs gastriques de l'hôte, ou de façon artificielle, sous l'action de bases fortes ou de pressions mécaniques. Le filament polaire se dévagine en passant par le foramen polaire, et mesure alors trente fois la longueur de la spore.

2 - Autres spores isolées

D'autres espèces du genre *Nosema* et d'autres genres ont été isolés et identifiés chez des vers à soie atteints de pébrine, mais qui ne semblent pas participer directement en tant qu'agents causaux de la pébrine, celle-ci étant due uniquement à *Nosema bombycis* pour le Bombyx du Mûrier.

On peut en donner quelques exemples :

- *Nosema* sp 402, 408, 520, 611, M11, K79

- *Vairimorpha* sp M12

- *Pleistophora* sp M27

On note des différences dans la morphologie des spores, dans les tissus cibles et dans la virulence (19). La microscopie électronique a permis de montrer que la forme des noyaux, le nombre moyen des spires du filament polaire, la structure lamellaire du polaroplaste diffèrent entre ces divers agents. Il existe néanmoins quelques éléments communs : présence de deux noyaux, arrangement des ribosomes identique... (35).

Cependant il est important de noter que les variations sérologiques sont mises en évidence au fur et à mesure des progrès effectués dans ce domaine (*cf* diagnostic différentiel), afin de procéder à une discrimination fiable (19).

3 - Isolement et purification des spores

Il est nécessaire, afin de préciser les connaissances cytochimiques et physiologiques au sujet de ces microsporidies, de pouvoir disposer rapidement de grandes quantités de suspension de spores. Il faut alors les isoler des tissus des insectes hôtes et procéder ensuite à une purification.

- La méthode dite de "triangulation" (6) permet d'obtenir des suspensions de 5×10^{10} spores de *Nosema heliothidis*, d'un niveau de pureté de 99 p.100 dans l'un des huit tubes à centrifugation, mais 30 p.100 des spores sont perdues et elle nécessite du temps et de la main d'œuvre. Cependant, les spores ne subissent aucun traitement chimique puisque n'est utilisée que de l'eau distillée stérile. L'utilisation d'ondes soniques pour la remise en suspension des culots de centrifugation ne paraît pas causer de dommages.

- La méthode du gradient LUDOX est plus rapide mais l'utilisation d'hydroxyde de sodium provoque un grand pourcentage de germination des spores.

- La centrifugation selon un gradient de densité à flux continu (39) permet de mieux concentrer les spores à l'intérieur d'une couche, avec un minimum de débris d'insectes. Les pertes en spores sont de l'ordre de 10 p.100 et on n'observe pas de germination. On obtient en fait trois bandes (35) :

- la première, bien délimitée, contenant des débris de tissus de larves, de feuilles de mûrier, des bactéries,
- la deuxième, floue, contenant des spores matures mais inactives,
- la troisième, nette, contenant uniquement les spores matures et actives.

- Il existe également une autre méthode, relativement récente, qui comprend trois étapes : filtration-précentrifugation, équilibrage par iso-densité, centrifugation à vitesse croissante. Elle a servi à isoler *Nosema* sp K79 (41).

B - EPIDEMIOLOGIE

1 - Sources de parasites (19)

Dans la mesure où l'agent pathogène infecte tous les tissus des vers à soie, les fèces, l'exuvie, les cocons, l'"urine", les écailles des papillons, aussi bien que les cadavres, peuvent être source d'infection.

Le ver vivant infecté libère des spores dans ses excréments lorsque les symptômes deviennent apparents. Il existe cependant des cas de jeunes larves, d'apparence saine, qui sont excrétrices.

Le stade d'évacuation des spores est variable avec l'âge du ver à soie et avec la quantité de germes présente chez l'hôte. Les feuilles de mûrier peuvent elles aussi être source de parasites, si des spores y sont collées, ainsi que les poussières.

2 - Résistance du parasite

Les spores peuvent survivre quelques années dans les conditions habituelles de température et d'humidité des chambrées (21), contrairement à ce qu'a dit PASTEUR (30) pour qui la maladie ne pouvait persister d'une année à l'autre dans une magnanerie.

Elles conservent leur activité en milieu liquide pendant plus de trois semaines et dans l'eau pendant au moins deux mois et demi. Des études faites sur la viabilité des spores dans la terre et le compost, en conditions tropicales, ont montré une survie maximale de 225 jours en sol humide et un minimum de 135 jours dans du compost humide. En fait, la survie des spores dépend du substrat dans lequel elles se trouvent et de son pourcentage d'humidité (31).

Détruites par le feu, elles peuvent se stocker à très basses températures. Des essais ont montré (15) qu'on pouvait obtenir un pourcentage de survie d'au moins 70 p.100 après 7 ans de cryoconservation, sous les conditions suivantes :

- mise dans une solution cryoprotective à 35 p.100 de glycérol,
- équilibration à 25°C pendant une heure,

- cryoconservation à -80°C ou dans l'azote liquide et décongélation rapide à 35°C.

Il est à noter que l'on peut même conserver ainsi des cultures de cellules infectées par des spores (17).

Elles sont sensibles à la dessiccation et ne peuvent survivre pendant plus de 5 heures sous un soleil direct, *a fortiori* quand elles ne sont pas protégées au sein de tissus d'insectes. En effet, les rayons ultra-violets ont un effet sporicide. La quantité de ces rayons arrivant sur la terre dépend des conditions atmosphériques et de l'angle solaire, et leur intensité de la saison (31).

Elles sont également détruites par divers désinfectants chimiques tels que le formol, la chaux chlorée, d'où l'importance fondamentale d'une désinfection minutieuse. Des essais de chimiothérapie avec des substances comme le bavistin, le benomyl ou le thiophanate donnent des résultats encourageants (*cf.* Moyens de lutte).

3 - Modes d'infection (19)

On peut définir trois grands axes de contamination: la voie transovarienne où la femelle infectée transmet des spores à sa descendance, l'élevage de vers sains avec des vers infectés, et la contamination par de la nourriture souillée. Interviennent alors les phénomènes de contamination secondaire.

a-Transmission transovarienne et stades de contamination ultérieurs

Les ovaires sont les derniers organes à être infectés. Quand les cellules du jaune migrent pour former l'ovule, les différents stades végétatifs infestant les cellules nutritives du follicule se trouvent donc insérés à l'intérieur de l'oeuf. Ce phénomène se déroule avant la formation du chorion, qui est ensuite impénétrable. Les stades infectants ne peuvent pas non plus passer par le micropyle, dont l'ouverture est trop étroite (7).

Des œufs précocement pondus par une femelle infectée peuvent échapper à l'infection si la maladie n'est pas à un stade trop avancé mais ceux pondus plus tard montrent un haut taux d'infection.

Le germe ne peut affecter les spermatozoïdes des mâles infectés dans la mesure où la taille de la tête d'un spermatozoïde est inférieure à celle du

germe, qui, de plus, ne pourrait y trouver une quantité de cytoplasme suffisante.

Si la transmission par le sperme est impossible, le taux d'efficacité de transmission par la femelle est de l'ordre de 85 à 90 p.100, (11), (13), et le degré de l'infection de la progéniture est directement lié à l'intensité de l'infection de la femelle, comme le montre le tableau I.

Dans les graines infectées, lors de l'hivernation, le développement de l'agent pathogène est temporairement stoppé. Quand les œufs sont activés et incubés, il en est de même pour le parasite, qui se multiplie. Si le taux d'infection est très élevé, la graine meurt avant l'éclosion. S'il est moindre, soit la graine éclot mais la larve meurt aussitôt, soit elle survit jusqu'à la troisième mue, sans pouvoir l'effectuer. Après avoir montré une croissance irrégulière, elle meurt (28).

Cependant, si des larves saines sont élevées avec elles, il y a alors contamination secondaire, qui se fait *per os*. Les feuilles de mûrier, dans la chambre d'élevage, sont souillées par les spores rejetées avec les fèces des larves malades et les larves saines s'infectent en les consommant : on parle de premier stade de contamination. Deux cas de figure se présentent :

- soit l'infestation a lieu lors du premier ou du deuxième âge : on observe des symptômes lors du quatrième-cinquième âge et l'insecte meurt avant de filer son cocon,

- soit l'infestation a lieu lors du troisième âge : les symptômes apparaissent à la fin du cinquième âge et la mort a lieu pendant la montée, avant le coconnage, ou même dans le cocon.

Ces larves excrètent donc des spores dans les fèces durant le quatrième-cinquième âge. Les larves saines, du même âge, s'infectent par contact avec les malades : c'est le deuxième stade de contamination. Les larves étant matures, elles filent normalement leurs cocons, se métamorphosent en papillons mais forment des œufs contaminés par voie transovarienne.

Tableau I : Etendue de l'infection à la progéniture des mères infectées
d'après GRIYACHEY et SENGUPTA - 1989 - (11)

Intensité de l'infection du papillon	Nombre de larves élevées	Incidence de la pébrine (p.100)				Larves non pébrinisées
		P(L)	P(M)	P(H)	Total (p.100)	
P (L)	150	48,00	23,33	14,00	85,33	14,67
P (M)	150	20,67	31,33	40,67	92,67	7,33
P (H)	150	4,67	31,67	57,33	98,67	1,33

P(L) : jusqu'à 5 spores ;

P(M) : entre 6 et 10 spores ;

P(H) : plus de 10 spores dans un champ microscopique.

Ainsi, la pébrine est maintenue à l'intérieur d'une population de vers à soie par deux stades de contamination et une transmission transovarienne.

b-Quantité de spores et infection

Une à dix spores ingérées avec la nourriture par une larve du premier ou du deuxième âge provoquent une infection. Cependant, chez une larve mature, il en faut cent pour créer une infection perceptible (19).

D'autre part, des études sur la diffusion de la pébrine après introduction de larves infectées par voie transovarienne dans une population de vers à soie sains (2) ont réussi à quantifier la vitesse de propagation de l'infection par contamination secondaire.

Ici, 1, 3, 6, 9, 12 et 15 larves infectées sont mises dans des claies d'élevage, contenant 200 larves saines, au troisième âge. On n'observe pas de mortalité due à la pébrine au cours de la période larvaire.

Cependant, au stade du papillon, on enregistre 41,32 p.100 d'infection dans les lots où l'on a introduit une larve infectée. L'infection augmente de façon proportionnelle au nombre de larves infectées introduites et le pourcentage est de 83,47 avec 15 larves parasitées. Le taux effectif d'élevage diminue aussi, alors qu'il n'y a pas de changement significatif du poids larvaire (tableau II).

**Tableau II : Diffusion de la pébrine après introduction de larves infectées
dans une population saine de vers à soie**

d'après BAIG et al. - 1988 - (2)

Nombre de larves malades par claie	Poids de 10 larves	Période larvaire (jours-heures)	Taux effectif d'élevage (p.100)	Poids du cocon (p.100)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (p.100)	Pourcentage total d'infection au stade papillon
1	34,57	27.06	84,83	1,633	0,320	19,55	41,32
3	37,87	27.06	80,00	1,593	0,310	19,44	45,10
6	38,50	27.06	80,00	1,573	0,283	18,01	63,23
9	37,03	27.06	76,17	1,600	0,310	19,38	69,46
12	36,83	27.06	69,83	1,500	0,300	20,00	76,55
15	36,77	27.06	71,67	1,620	0,313	19,33	83,47
Lot témoin	37,10	27.00	77,83	1,660	0,343	20,48	...
CD au seuil de 5P. 100	N S	N S	5.42	0.082	N S	N S	4.76

Par conséquent, le changement du paysage épizootique correspond au changement du nombre de larves excréant des spores de *Nosema bombycis*.

c-Modalités de la contamination secondaire

Elle est classique à partir des chambres d'élevage, des appareils, des champs de mûriers et des pontes contaminées en surface.

- Contamination sur les claies d'élevage :
 - . par les fèces de larves infectées,
 - . par les plateaux contaminés, les filets et les papiers,
 - . par les cadavres infectés.

Les spores libérées par ces sources se déposent, avec les poussières, sur la feuille de mûrier, formant une source de contamination secondaire dans la chambrée.

Remarque : Parmi le matériel, ce sont les plateaux qui sont source la plus fréquente de contamination secondaire.

- Contamination par les feuilles provenant des champs : l'utilisation incorrecte des litières d'élevage, des larves infectées, et une décomposition incomplète des refus déposés dans les champs de mûriers peuvent donner lieu à des sources de contamination secondaire.

- Contamination par les pontes : si les pontes sont incubées dans une pièce contaminée n'ayant pas subi une désinfection au préalable, les œufs sont contaminés en surface et, à l'éclosion, les larves saines s'infectent. Cette contamination superficielle est aussi possible par les écailles des adultes et par l'"urine". On élimine ce risque en désinfectant les œufs avec du formol.

4 - Causes favorisantes

a-Distribution géographique des pays séricicoles (21)

Si la sériciculture est limitée à quelques mois dans les régions tempérées, elle peut durer toute l'année dans les pays de la zone tropicale qui voient la maladie apparaître de façon sporadique par l'intermédiaire des œufs infectés et une contamination secondaire persistante dans les chambres d'élevage.

En effet, bien que la pébrine fasse l'objet d'un contrôle raisonné, la production de graine se fait en continu, le plus souvent par les éleveurs eux mêmes et non par une structure indépendante (absence de filière).

L'incidence est alors très élevée (cas de la Thaïlande, du Cambodge, du Viet-Nam) car, non seulement les conditions d'élevage dans beaucoup de pays tropicaux ne sont pas idéales pour procéder à une désinfection minutieuse, mais aussi le temps disponible entre deux lots lors du grainage est trop court pour prendre des mesures préventives convenables, ou pour procéder à un dépistage efficace.

b-Facteurs saisonniers (31)

La recherche, dans ce domaine, fait état de résultats très variables. PRINGLE-JAMESON a observé une grande incidence en août-septembre et a pensé qu'une atmosphère humide assortie d'une haute température est plus favorable au développement de la maladie. AOKI montre que des vers élevés en conditions sèches et fraîches deviennent plus sensibles à la pébrine que ceux élevés en conditions chaudes et humides.

D'autre part, NOMANI a noté une intensité maximale en juillet-août, puis un nouveau pic en novembre-décembre et il suggère qu'il n'existe pas de corrélation entre l'incidence de la maladie et les facteurs de température et d'humidité.

En revanche, le nombre de germes, la population d'hôtes, une voie efficace de transmission de l'agent pathogène sont des données importantes dans l'initiation et le développement de la maladie.

Apparemment, des éléments biotiques et abiotiques doivent jouer, dont les rôles ne sont pas encore clairement établis.

c-La conduite d'élevage

Une mauvaise hygiène, le confinement des vers sont des facteurs importants de la propagation de la maladie.

La sous-nutrition est capable également d'accélérer le processus morbide (31).

Une surveillance rigoureuse ainsi qu'un certain niveau de formation des éleveurs sont fondamentaux car il arrive souvent que les symptômes dus à la pébrine passent inaperçus ou soient confondus avec ceux occasionnés par la flacherie, ce qui laisse à la maladie le temps nécessaire pour se développer.

D'autre part, le prêt ou l'emprunt de matériel d'élevage peuvent servir de vecteurs de spores d'un élevage à l'autre.

5 - Réceptivité

- En fonction de l'âge : l'imago est peu sensible à la maladie, ce qui n'est pas le cas du cinquième stade larvaire, incapable alors de faire son cocon (4). Cependant, tous les stades sont réceptifs.

- En fonction de la race : récemment, des recherches sur des races résistantes à la maladie (en fait, des lignées) ont été menées.

MASERA avait remarqué que les races chinoises blanches étaient plus résistantes que les autres.

En 1989, PATIL et GEETHA BAI ont mis en évidence une plus grande résistance des races indiennes multivoltines par rapport aux lignées bivoltines.

Bien que cette particularité paraisse dépendre de facteurs génétiques propres à une race, des éléments tels que le nombre de spores, une nourriture inadéquate et l'environnement peuvent aussi affecter cette résistance (31).

- En fonction des espèces de Lépidoptères : *Nosema bombycis*, outre *Bombyx mori*, peut infecter 26 autres Lépidoptères, parmi lesquelles *Bombyx mandarina*, *Philosamia cynthia ricini* et *Antheraea pernyi*. Cependant, la transmission transovarienne n'a pas toujours été démontrée (19).

- En fonction des espèces de *Nosema* : relativement nombreuses, pas toujours dotées d'un hôte spécifique, certaines sont retrouvées chez le Bombyx du Mûrier et d'autres Lépidoptères.

Il est intéressant de noter que des microsporidies du genre *Nosema* ont été isolés de papillons gypsy *Lymantria dispar* L, qui créent de graves dommages aux forêts de chênes. L'introduction de spores au sein de cette population de Lépidoptères afin de la diminuer et d'induire ainsi une protection biologique des arbres est à l'étude (7).

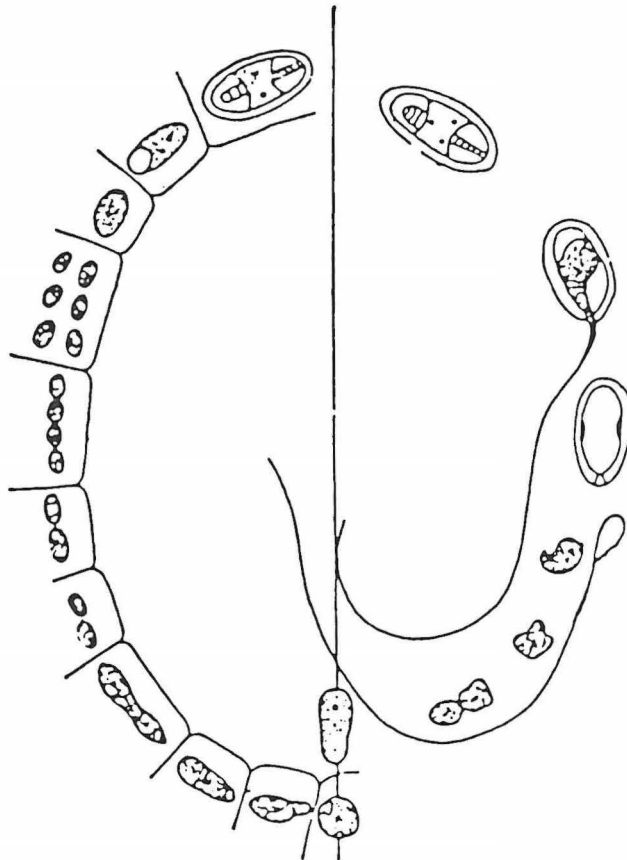
C - CYCLE EVOLUTIF ET PATHOGENIE (4), (10), (19), (18), (21).

Il existe deux phases dans le cycle vital de *Nosema bombycis* :

- la phase où le germe est à l'état de spore, forme de résistance, libre dans le milieu extérieur, qui est transmise à la larve par la nourriture, en général,

- la phase végétative (fig. 2).

fig. 2 : Cycle vital de *Nosema bombycis*
d'après JOLLY - 1986 - (19)



. La germination de la spore a lieu dans l'intestin moyen. Le filament polaire est expulsé par l'effet du pH alcalin et de la présence d'ions potassium dans le milieu. L'énergie nécessaire à cette réaction osmotique est fournie par le polaroplaste (23).

. Les deux noyaux de la spore se divisent pour donner quatre noyaux.

. Après que le filament soit sorti, le sporoplasme à deux noyaux passe par le même orifice que le filament. Comme chez toutes les microsporidies, le filament polaire sert de tube conducteur du sporoplasme. Les deux autres noyaux dégènèrent à l'intérieur de la spore vide.

. Le filament est digéré dans le tractus intestinal

. La structure binucléée est appelée *amœbula*. Ses deux noyaux fusionnent pour donner un organisme uninucléé appelé **planonte**. Il est globuleux, sans membrane, extra-cellulaire et est formé en 1 à 2 jours. Il mesure 0,5-1,5 μm et se reproduit par fission binaire.

. Lorsque le planonte pénètre dans une cellule intestinale par l'intermédiaire du filament qui l'inocule, il se transforme en une forme sédentaire : c'est le **méronte** ou **schizonte**, stade intra-cellulaire, possédant une enveloppe cellulaire définie. Il est sphérique ou piriforme et est formé en 2 à 3 jours après l'infection. Il se reproduit par fission binaire, multiple, ou encore par bourgonnement : c'est la phase de schizogonie.

. Quand le cytoplasme de la cellule infectée est épuisé, les mérontes sont disposés en rangs parallèles.

. La phase de sporulation débute avec l'allongement du méronte en sporonte uninucléé. Son noyau se divise pour en former 2 à 16, regroupés par paires, autour desquelles le cytoplasme se condense pour former des sporoblastes. Chaque sporoblaste n'engendre qu'une seule spore. La paroi cellulaire se rompt et libère les spores.

Le cycle dure 8 jours en pays froid et 4 jours en pays chaud.

Les effets cytopathiques de *Nosema bombycis* chez son hôte sont plus sévères que ceux causés par d'autres microsporidies. Les cellules parasitées par le protozoaire sont très hypertrophiées et forment une masse pseudo-tumorale appelée xénome qui dans un premier temps, protège le parasite. Puis, lorsque la réaction de défense se produit, les leucocytes pénètrent dans le xénome et phagocytent les spores. Lorsque ce processus ne s'établit pas, un foyer de nécrose se forme.

Ces phénomènes d'immunité semblent varier selon un facteur race de ver à soie car certaines semblent plus résistantes que d'autres.

La localisation du germe dans les tissus musculaires et nerveux provoque un dysfonctionnement de ces organes, puis une désorganisation. Cependant, on a montré que les stades présporulatoires n'ont pas d'effets

cytopathogènes mais semblent avoir un effet stimulant sur la cellule et l'organe (31).

En ce qui concerne les cellules hypodermiques infestées, elles se trouvent rejetées dans la cuticule ; elles brunissent en dégénéralant et en déterminant les taches en grains de poivre, correspondant donc à une altération de la chitine et de l'épithélium.

Dans l'intestin moyen de l'hôte, le sporoplasme libéré de la spore peut aussi passer à travers la barrière intestinale et gagner l'hémolymphe à travers les espaces hémocéliques. Il est alors transporté dans différents organes par le fluide circulant et établit des colonies dans les cellules de ces organes. Ainsi, les schizontes présents dans les œufs envahissent les cellules embryonnaires nouvellement formées, notamment intestinales. Par conséquent, l'épithélium de l'intestin moyen des larves nouvellement nées est trouvé plein de schizontes et de spores. Le tableau III donne la séquence de l'infection des tissus dans le temps.

Cependant, le parasite se développe préférentiellement dans le tube digestif et les ovaires chez l'imago alors qu'il est présent en très grandes quantités dans les glandes séricigènes de la larve.

Les recherches s'orientent également, dans ce domaine, vers des aspects moléculaires. Ainsi, la présence d'une activité de type hormone juvénile a été décelée chez des spores de microsporidies. De deux choses l'une, soit le parasite produit une substance dont l'activité est voisine de cette hormone, soit le parasite l'absorbe, à partir de l'hémolymphe de son hôte.

Il a été noté, d'autre part, que des larves pébrinées subissaient des mues surnuméraires, fait caractéristique d'un taux d'hormone juvénile anormalement haut ou persistant. Cela pourrait indiquer que l'infection par *Nosema bombycis* a un effet sur le système endocrinien des larves, dans le sens d'un allongement de la période larvaire, qui permet au parasite de poursuivre son cycle jusqu'à un développement complet (31).

D'autre part, on essaie aussi de comprendre les phénomènes parasitaires de spoliation, chez l'hôte, d'éléments tels que les acides aminés, notamment au stade embryonnaire. Ainsi, chez *Antheraea mylitta*, les œufs pébrinés voient leur nombre et leur concentration en acides aminés diminuer, métabolites fondamentaux pour la fabrication des tissus et organes de la future larve .

Tableau III : Ordre chronologique de l'infection des tissus de larves de *Bombyx mori* par *Nosema bombycis*.

Les stades de *Nosema bombycis* - Nombre de jours après la contamination.

	1	2	3	4	5	6	7	8
intestin	aaaa	aaaaa	aabbb	bbbbb	bbbbb	cccc	...	...
muscle intestinal circulaire	...	...	...	aaa	bbbb	bbbb	cccc	cccc
muscle intestinal longitudinal	...	...	...	aa	ab	aaabb	aacc	bbcc
coelome	...	...	...	a	aab	abbbb	aacc	accc
tissu adipeux	...	...	...	...	aa	ab	aa	abcc
trachées	...	...	...	...	...	aa	aabcc	abbbb
glandes séricigènes	...	...	...	...	...	aa	aaaa	accc
cellules sanguines	...	...	...	...	...	a	a	accc
tégument	...	...	...	...	...	a	a	accc
gonades	...	...	...	...	...	a	...	a
nerfs	...	...	...	...	...	...	...	aaaaa
vaisseau dorsal	...	...	...	...	...	...	...	aa

Les données proviennent de coupes faites sur 5 larves qui sont infectées après la première mue : a = schizonte ; b = stades sporogonaux ; c = spore mature.

Chaque lettre fait référence à une larve.

D - SYMPTOMES ET LESIONS (19), (21), (28)

Les symptômes dépendent du stade d'évolution de l'insecte, à savoir l'œuf, la larve, la chrysalide et l'adulte.

La maladie évolue plus rapidement dans les premiers âges que chez la larve mature.

1 - Les œufs

Ils se détachent facilement de la carte à graines.

Ils sont peu nombreux et ne sont pas étendus de façon uniforme mais entassés les uns sur les autres (fig. 3).

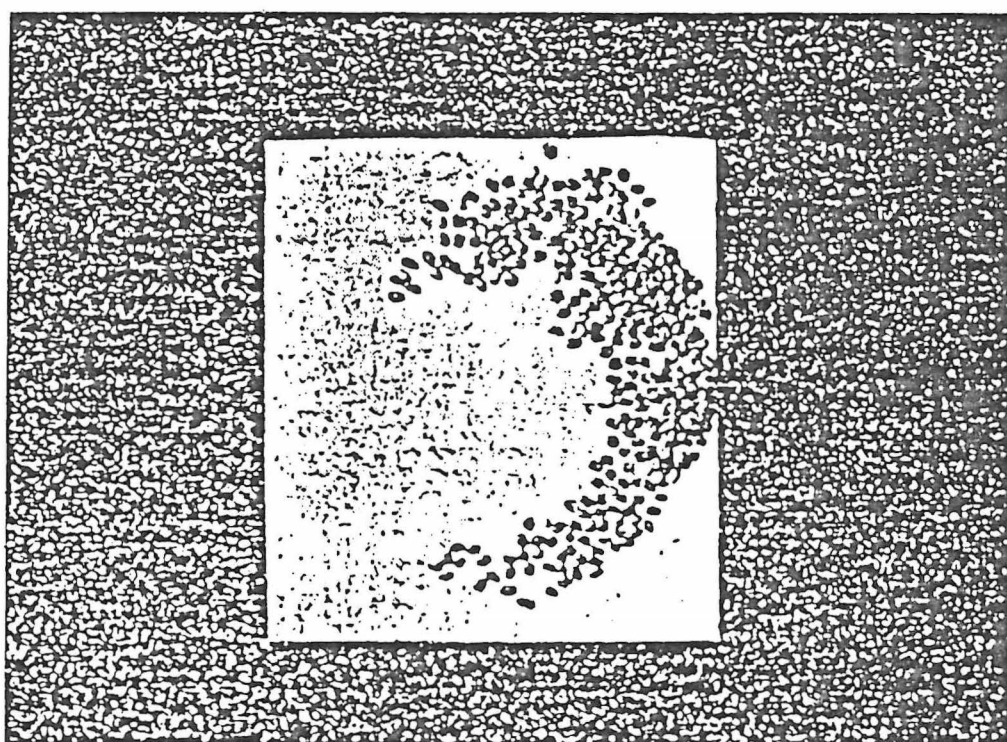
Le pourcentage d'œufs non fécondés est plus important ainsi que celui d'œufs morts.

L'éclosion est donc pauvre et irrégulière et n'a parfois même pas lieu.

On peut noter la couleur plus pâle des œufs pébrinés, phénomène particulièrement évident pour les races de type NISTARI chez lesquelles les œufs sont normalement d'un jaune soutenu (31).

Enfin, on observe une réduction de taille et de poids des œufs corpusculeux alors que leur densité augmente (36).

fig. 3 : Oeufs pébrinés, pondus entassés.
d'après JOLLY - 1986 -(19)



2 - Les larves

Elles ont peu d'appétit, sont paresseuses. La croissance et le développement sont donc perturbés, ce qui induit une disparité des tailles (fig. 4) et une irrégularité des mues.

La progression de la maladie accentue le dérèglement des périodes de nourrissage et les vers rétrécissent après les mues, qui s'accomplissent avec toujours plus de retard.

Les larves ont la tête pendante, leur peau devient brune et ridée.

Au stade moribond, les vers ne se putréfient pas mais restent au contraire fermes et peuvent mettre très longtemps à mourir. Le cocon éventuellement filé est fragile.

Le tube digestif devient opaque, les glandes séricigènes montrent des pustules blanches ou des taches et perdent leur transparence.

Les mouchetures brunes ou noires visibles sur la cuticule (fig. 5) peuvent aussi se former à la suite d'infections fongiques ou de blessures mécaniques.

Ce symptôme n'est donc pas fiable, d'autant plus qu'il n'est pas toujours présent.

La mort des larves n'est pas due à une quelconque toxine mais à la rupture mécanique des tissus et à la privation de nutriments qui perturbe les fonctions normales de l'hôte.

fig. 4 : Larves inégales.
d'après JOLLY - 1986 - (19)

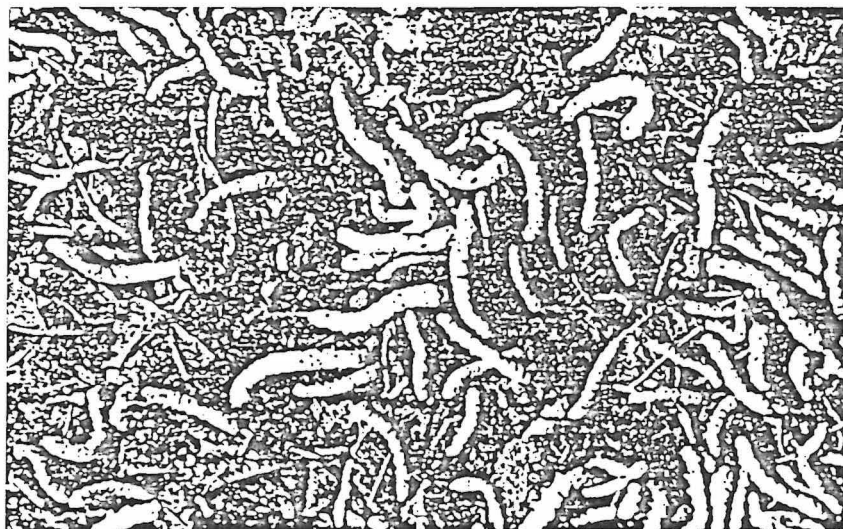
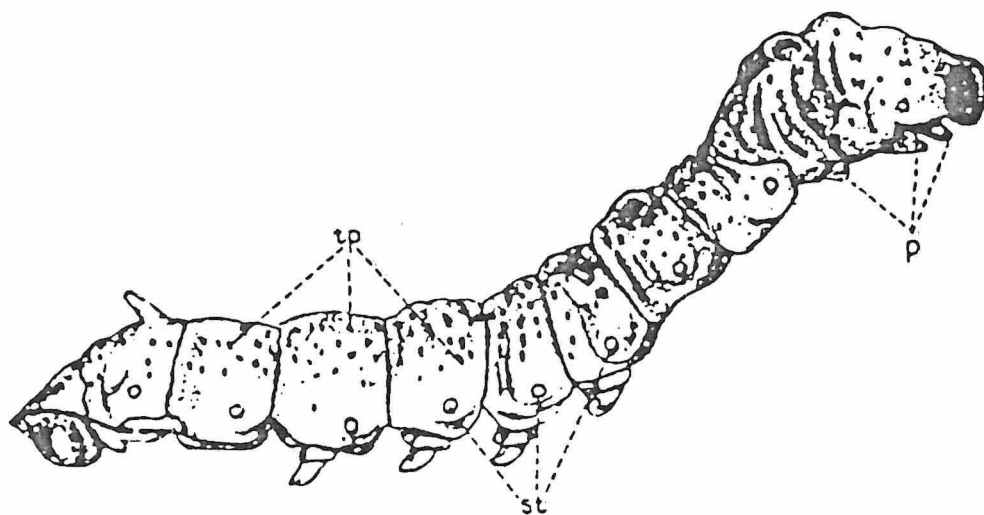


fig. 5 : Chenille de *Bombyx mori* montrant des taches de pébrine.
d'après GRASSE - 1953 - (10)



p : pattes thoraciques
st : stigmates
tp : taches de pébrine

3 - Les chrysalides

Elles sont flasques et gonflées dans la région abdominale. On aperçoit parfois des taches noires près des rudiments d'ailes, sur l'abdomen.

Les sujets très infectés ne peuvent se métamorphoser en adulte et meurent.

4 - Les adultes

L'émergence du cocon est laborieuse et se fait en retard. Les ailes sont déformées, les antennes tordues.

Les papillons sont indolents, l'activité sexuelle est diminuée et l'accouplement se fait mal ou n'a pas lieu. La ponte, si elle existe, est irrégulière.

On observe des taches noires, occasionnellement, sur l'abdomen et sur les ailes, dont les écailles sont décolorées. Elles peuvent même tomber, d'où un aspect terne des papillons.

Chez la femelle, les glandes accessoires sont infectées, ce qui explique la diminution ou l'absence de production de gluten et le fait que les œufs n'adhèrent pas aux cartes.

II - DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

A - CLINIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE

On a vu ci-dessus que les symptômes exprimés sont relativement frustes et souvent discrets, au moins en début d'évolution de la maladie.

D'autre part, les taches noires ne sont nullement pathognomoniques. En fait, le symptôme le plus frappant reste celui de la croissance irrégulière des larves.

L'épidémiologie peut fournir des données intéressantes lorsqu'on suspecte la pébrine dans un élevage. Il faut savoir si la région concernée connaît une forte prévalence, si la saison est propice. Une mauvaise hygiène, l'absence de désinfections rigoureuses, la présence de voisins, le prêt ou l'emprunt de matériel d'élevage sont des éléments à prendre en compte.

Cependant, la confirmation de la présence de la maladie doit s'étayer sur un diagnostic expérimental, avec mise en évidence des spores, les seuls facteurs cités plus haut n'étant pas assez fiables.

B - EXPERIMENTAL

1 - Microscopique

L'examen des papillons femelles est fondamental car ce sont eux qui transmettent le germe à la génération suivante. On peut aussi examiner les œufs morts et non fécondés, leur coquilles et les larves nouvellement nées. Puisque la maladie affecte la croissance et que les spores passent dans les fèces, le diagnostic peut également être fait sur les larves en retard, les matières fécales et les poussières de l'élevage.

Pour améliorer la fiabilité de ces tests, on peut avoir recours à la centrifugation. Les spores, si elles sont présentes, se concentrent dans le culot, rendant leur détection plus aisée.

a-Examen des papillons (19), (32), (40)

La production de pontes exemptes de pébrine passe par l'examen des femelles. Il existe deux types d'examen, individuel et échantillonné.

On peut utiliser des papillons vivants ou desséchés. Dans le deuxième cas, les papillons sont déshydratés à 60-70°C pendant 5 heures et gardés sous atmosphère sèche. Il faut veiller à respecter ces normes car une température de 80°C et au delà déforme les spores et un séchage insuffisant induit la multiplication des saprophytes.

Avant que les papillons ne soient broyés, les têtes et les ailes sont coupées afin de faciliter la visualisation des spores au microscope.

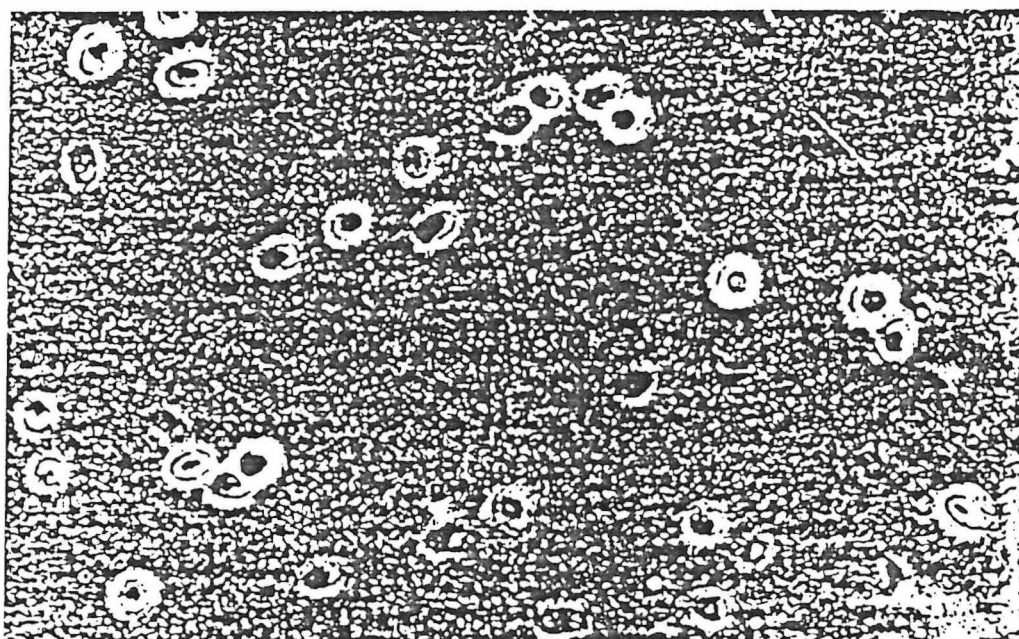
a.1 - Examen individuel :

Il est obligatoire lorsque les œufs sont destinés soit à la reproduction soit à la production de cocons à graine. Chaque papillon est broyé dans un mortier de céramique avec un pilon, tous numérotés, ou dans une machine conçue à cet effet. L'opération est facilitée par addition de 1 à 2 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 2 p.100.

Une goutte de broyat est déposée sur une lame, couverte par une autre lame et examinée au microscope.

Le grossissement adéquat est de l'ordre de 600. Une source lumineuse artificielle est préférable, ainsi qu'un contraste de phase plutôt qu'un simple microscope optique, car on peut alors discerner les stades intermédiaires plus pâles par rapport à la spore mature brillante (fig. 6).

fig. 6 : Spores de pébrine sous contraste de phase.
d'après JOLLY - 1986 - (19)



La conidie du champignon, agent causal des muscardines verte et rouge, ressemble à la spore de pébrine mais peut être identifiée grâce à sa réfringence plus faible et la présence d'un granule central.

Pour chaque papillon, 2 gouttes de broyat sont testées par deux techniciens séparément et, pour chaque examen, 5 champs sont observés.

Chaque femelle trouvée infectée voit sa ponte écartée de la production.

a.2 - Méthode de sédimentation des spores

Ce procédé consiste à collecter les spores de façon plus efficace et à obtenir une meilleure visualisation de ces éléments qui peuvent être peu nombreux.

Les femelles sont broyées dans 2 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 2 p.100. Le mélange est versé à travers un filtre de papier dans un tube à sédimentation de 7 cm de long, d'une capacité de 6 ml et qui présente un bouchon à son extrémité inférieure.

On ajoute 5 ml d'eau et on bouche le tube en son extrémité supérieure. Quelques gouttes de formol à 10 p.100 ou de crésol à 5 p.100 peuvent être additionnées afin de prévenir une contamination bactérienne.

Le tube est laissé au repos pendant 48 h si les femelles étaient desséchées, 24 h si elles étaient fraîches.

Ensuite, le tube est retourné et une portion du sédiment restée sur le bouchon inférieur est récupérée, transférée sur une lame, à laquelle une goutte de solution de LABARRAQUE est additionnée. Le tout est couvert d'une lamelle et examiné au microscope.

Remarque : La solution de LABARRAQUE est faite à partir de deux solutions A et B.

Solution A : dissolution de 20 mg de chlorure de chaux dans 50 ml d'eau puis ajustement à 500 ml.

Solution B : dissolution de 32,5 mg d'hydroxyde de sodium dans 500 ml d'eau.

Les deux solutions sont mélangées en quantités égales. Le surnageant qui se forme est prélevé, gardé en atmosphère fraîche et sombre et utilisé pour le test.

Cette méthode est la plus efficace mais nécessite du temps (24 - 48 h), un grand nombre de tubes et beaucoup de main d'oeuvre. De fait, elle est

effectivement utilisée dans les grainages en vue de la reproduction, quand le nombre de femelles à examiner est limité.

a.3 - Examen de masse

Utilisé lors de production industrielle d'oeufs à grande échelle, ce procédé convient bien pour une inspection rapide et efficace des papillons frais ou secs.

Dans les grainages industriels, lorsque les œufs sont préparés en vrac, un groupe de 100 à 200 femelles sont déposées sur une large toile amidonnée afin d'y pondre. Elles sont alors broyées et examinées par lots de 30 femelles. Si le nombre de papillons est supérieur, on examine uniquement un échantillon.

Si on détecte des spores, la totalité des œufs issue du groupe entier de femelles est rejetée.

Cette méthode est employée lorsque le taux d'infection est faible, sinon le rejet des œufs est tel que la production n'est plus rentable et même anti-économique.

Le broyage des 20-30 femelles se fait dans un mixer, dans 80-90 ml d'une solution de carbonate de potassium à 0,5 p.100. On centrifuge le tout à 9 000 -10 000 t/mn pendant 2 mn afin de libérer les spores des tissus. L'addition de carbonate de potassium augmente le pH ce qui facilite l'extraction des spores.

Le matériel est laissé au repos pendant 2 mn puis filtré à travers du coton hydrophile. Le filtrat est collecté et centrifugé à 2 600 t/mn pendant 3 mn. Le surnageant est écarté. Si les femelles étaient desséchées, le culot est dissout avec 2 ml d'hydroxyde de potassium à 2 p.100. Si les femelles étaient fraîches, l'opération n'est pas nécessaire mais une petite quantité d'hydroxyde de potassium à 0,5 p.100 est additionnée au culot.

On dépose le mélange obtenu dans un verre de montre et on l'examine au microscope.

Selon ce principe, un équipement sophistiqué a été mis au point et est utilisé à une large échelle au Japon. Il a pour nom "Hirano Moth Testing Machine" et effectue toutes les opérations ci-dessus, de façon entièrement automatique. Cette standardisation permet une plus grande rentabilité et 500 échantillons peuvent être testés en 8 h.

Les graines industrielles sont toujours préparées en grandes quantités et un testage de tous les papillons est laborieux et prend beaucoup de temps.

Dans beaucoup de grainages, par conséquent, un échantillon de 20 p.100 des femelles d'un lot est testé chaque jour.

Cependant, cette procédure n'est pas non plus satisfaisante dans la mesure où la taille de l'échantillon est fixée, sans tenir compte de la taille du lot et tous les œufs produits sont rejetés si un seul broyat est pébriné. De plus, si l'on retient un taux de 20 p.100, les femelles sont examinées individuellement, soit une grande perte de temps.

Basée sur la recherche (22), une méthode d'échantillonnage systématique a été mise au point pour améliorer l'efficacité, la simplicité et la standardisation de la technique. Elle est largement utilisée au Japon dans la production de graines commerciales, depuis 1968.

Les normes sont données dans le tableau IV.

Les échantillons de femelles sont collectés en fonction du nombre de femelles présentes dans le lot.

Si le nombre de femelles excède 700, un deuxième échantillon est collecté. Les femelles sont testées et si elles sont exemptes de pébrine, tous les œufs sont qualifiés pour l'élevage.

Si le nombre de broyats pébrinés est inférieur au nombre indiqué dans le tableau, le deuxième échantillon est testé.

Tous les œufs sont rejetés si le nombre total des broyats infectés est supérieur au nombre donné dans la dernière colonne.

En adoptant cette méthode d'échantillonnage, 99,5 p.100 des lots contaminés par la pébrine à une incidence de 0,5 p.100 et 100 p.100 des lots contaminés à une incidence de plus de 0,8 p.100 peuvent être détectés et exclus de la production.

Tableau IV : Echantillonnage pour l'inspection de masse des femelles.
d'après JOLLY - 1986 - (19)

Nombre de femelles dans le lot	Première inspection		Seconde inspection		Nombre total maxi de broyats pébrinés avant rejet des oeufs
	Nombre de femelles à inspecter	Nb. maxi de broyats pébrinés avant rejet des oeufs	Nombre de femelles à inspecter	Nb. maxi de broyats pébrinés avant rejet des oeufs	
390 au moins	toutes	1			1
391-500	390	1			1
501-600	450	1			1
601-700	480	1			1
701-800	565	2	105	2	2
801-1000	620	2	130	2	2
1001-2000	755	2	195	2	2
2001-3000	865	3	500	3	3
3001-4000	915	4	815	4	4
4001-6000	955	5	1140	5	5
6001-10000	990	6	1500	6	6
10001-30000	1030	6	1620	6	6
30001 au plus	1060	6	1730	6	6

b- Autres examens (19)

b.1 - Test correctif

Les œufs, leurs coques, les jeunes larves sont utilisés comme matériel de testage, broyé dans quelques gouttes d'hydroxyde de potassium à 2 p.100. Le tout est centrifugé à 1 000 t/mn pendant 2 mn.

On examine le culot. Si la pébrine est détectée, les vers ne sont pas brossés ou sont détruits s'ils l'ont déjà été. Ainsi, le lot malade peut être écarté avant son élevage effectif.

b.2 - Test prédictif

Les derniers vers en mue, les exuvies, les vers en retard, les larves mortes, les matières fécales et les pupes peuvent aussi être testés.

En ce qui concerne les fèces, on les mélange avec de l'acide chlorhydrique puis elles sont coagulées par addition d'alcool à 90°. On examine le culot après centrifugation.

b.3 - Examen des poussières

Elles sont délayées dans une solution de potasse caustique à 0,1-0,2 p.100 ou dans une solution de carbonate de potassium à 0,5 p.100.

Le mélange est homogénéisé pendant 3 à 5 mn dans un mixer, puis filtré à travers un coton absorbant puis centrifugé à 1 500 g pendant 3 mn. Le culot est examiné au microscope.

b.4 - Test d'émergence forcée

Un certain nombre de cocons de chaque lot est exposé à une température de 32°C, ce qui favorise une émergence précoce des papillons, de 1-2 jours pendant l'été et de 2-3 jours en saison fraîche.

Les papillons éclos prématurément sont examinés, et s'ils sont pébrinés, le lot entier de cocons est envoyé au dévidage après étouffage.

b.5 - Test sur pupes

Dans la mesure où les spores ne sont pas en grand nombre dans les chrysalides (phénomène dû à la multiplication lente au départ du germe), et qu'elles possèdent une importante proportion de tissu adipeux, la capacité de détection au stade pupal est inférieure à celle du stade adulte. On peut contourner le problème en activant leur développement et en les disséquant pour n'examiner que le tube digestif, puisque le broyage de l'insecte entier rend difficile la détection des spores.

Ainsi, l'examen microscopique, méthode employée pour le diagnostic de routine est largement utilisé. Cependant, la détection de spores par ce moyen ne donne pas lieu à une identification exacte et se pose alors le problème du diagnostic différentiel par rapport aux autres microsporidies. D'autre part, les spores, si elles sont peu nombreuses, peuvent échapper à l'observateur humain et si l'on tolère une incidence aux alentours de 0,5 p.100 dans les grainages industriels, la pébrine doit être totalement éliminée dans les grainages parentaux.

L'avènement de la microscopie électronique, l'adaptation de techniques sérologiques, ont permis d'accroître le champ des connaissances de façon considérable.

2 - Biochimique - Sérologique

Ces procédés permettent maintenant de détecter et d'identifier exactement les spores en cause, chose importante si l'on considère que la pébrine n'est due qu'aux spores de *Nosema bombycis*.

Ainsi, on a pu déterminer le coefficient de sédimentation des monoribosomes du sporoplasme de *Nosema bombycis*, d'une valeur de 70 S au moyen d'une centrifugation selon un gradient densité de saccharose (31).

La nature des granules métachromatiques, la distribution des ribosomes, la composition chimique de la spore... deviennent les clés de la classification des microsporidies, et notamment au sein du genre *Nosema* dans lequel la nouvelle microsporidie K79 isolée à Kuyngpook en Corée en 1979, a pu être classée récemment (43).

La discrimination des différentes espèces de microsporidies est encore affinée avec l'emploi de l'électrophorèse (avec gel de polyacrylamide ou gel de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide). Les polypeptides séparés fournissent des profils électrophorétiques reproductibles (31).

Deux méthodes de coloration spécifiques à l'immunopéroxydase ont également été mises au point (12) à partir de papillons femelles desséchés à 70°C pendant 2 h et broyés dans une solution d'hydroxyde de potassium. Le substrat chromogénique employé est le diaminobenzidine-4HCl, il permet de discriminer les spores de *Nosema bombycis* de celles de *Nosema* sp M11.

L'immunofluorescence peut également être utilisée (34). Dans la mesure où les antigènes des spores sont spécifiques et différent donc d'une espèce à l'autre, la dilution nécessaire de l'anti-sérum contenant les anticorps marqués avec un fluorochrome varie également, ce qui permet de différencier deux espèces, par exemple K79 et *Nosema bombycis* (42).

Le tableau V illustre le propos : à la dilution 1/20, le sérum anti-*N. bombycis* donne une réaction négative avec les spores de K79 alors qu'elle reste positive avec les spores de *N. bombycis*. Les deux espèces sont donc sérologiquement différentes.

L'agglutination et le test ELISA permettent un diagnostic rapide et précoce, permettant d'adapter facilement les mesures de contrôle, et l'apparition d'anticorps monoclonaux améliore encore la sensibilité et la spécificité de ces méthodes (26).

**Tableau V : Activité fluorescente des anti-corps anti- *N. bombycis*
et anti-K 79 vis-à-vis des spores de même nom.
d'après YUN et LIM - 1984 - (42)**

Dilution sérum	1/10		1/20		1/40		1/80	
Nom de la spore	N.b.	K 79	N.b.	K 79	N.b.	K 79	N.b.	K 79
Sérum anti- <i>N.b.</i>	++	+	++	-	++	-	+	-
Sérum anti-K 79	++	++	+	+	±	±	±	±
Sérum témoin	-	±	-	-	-	-	-	-

N.b. = *Nosema bombycis*

L'agglutination passive se fait sur des particules de latex sur lesquelles sont adsorbés des anticorps anti-spore produits sur lapin blanc. Des spores purifiées en suspension (minimum 10² spores par ml) font office d'antigènes. On note que des espèces de microsporidies très voisines de *N. bombycis*, en l'occurrence *Nosema* sp 402, 408, 520, 611, réagissent positivement avec des particules de latex sensibilisées avec des anticorps anti-*N. bombycis*. En revanche, *Nosema* sp M11, *Vairimorpha* sp M12 et *Pleistophora* sp M27 donnent une réaction négative. On obtient les mêmes résultats en agglutination directe ou en immunofluorescence indirecte (14).

On sait produire des anticorps monoclonaux anti-*N. bombycis*, anti-M11 et anti-M12, et des tests d'agglutination sur latex spécifiques d'espèce sont également réalisés (25).

L'agglutination directe peut aussi servir à déterminer de quelle espèce connue se rapproche le plus une spore inconnue, nouvellement isolée (1).

Le test ELISA, en revanche, semble plus axé, actuellement, sur le diagnostic de *N. bombycis*..

On peut extraire les protéines de surface des spores en utilisant des solutions alcalines afin d'obtenir des antigènes solubles (20). Les spores de *N. bombycis* NIS 001 (souche standard japonaise) sont alors traitées avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 N à 27°C pendant 30 mn puis centrifugées.

10⁸ spores libèrent 30 µg de protéines dans le surnageant (soit 10⁸ antigènes équivalent-spore), alors que le test est capable d'en détecter 600 pg (soit 2 000 antigènes équivalent-spore).

L'antisérum est obtenu à partir de lapins blancs au moyen de 5 injections intra-veineuses, toutes les semaines, d'un ml contenant 10^9 spores traitées afin d'extérioriser les antigènes.

Le conjugué est un sérum de chèvre, contenant des anticorps anti-immunoglobuline de lapin.

A 492 nm, la plus grande sensibilité est obtenue avec les dilutions de sérum suivantes : 1/500 pour le sérum de lapin et 1/1 000 pour le conjugué.

Un essai effectué avec des spores intactes a montré une sensibilité moindre dans la mesure où les lavages successifs entraînent avec eux un certain nombre de spores.

Ce test est applicable à un diagnostic rapide de microsporidiose car ces antigènes de surface pouvant se solubiliser en solution alcaline sont présents et peuvent être détectés dans les fèces et les insectes desséchés.

On peut aussi utiliser l'EIA (Enzyme Immuno Assay) en vue de la détection de spores entières de *N. bombycis* (27). Les productions de sérum anti-spore et de conjugué sont identiques à ce qui est décrit ci-dessus.

On détermine d'abord les optimums, en fonction d'une absorbance à 560 nm, de la concentration en gamma-globulines de lapin (fig. 7), ici 0,2 mg/ml et de la dilution du conjugué (fig. 8), ici 1/50.

On obtient alors un histogramme illustrant la relation entre le nombre de spores détectés par l'EIA en fonction du degré d'absorbance (fig. 9). On peut alors en déduire les conditions requises pour une sensibilité maximale du test : on détecte au moins 2×10^5 spores par tube en utilisant des globulines de lapin à 0,2 mg/ml ou 2 mg/ml et un conjugué à la dilution 1/50.

Le test ELISA s'emploie également, comme les autres techniques, pour identifier les espèces voisines de *N. bombycis* et il est intéressant de le signaler car les résultats diffèrent légèrement de ceux obtenus par ailleurs (20).

La figure 10 compare les détections de plusieurs microsporidies pathogènes pour les vers à soie au moyen de leurs antigènes de surface solubilisés en solution alcaline avec un sérum anti-*N. bombycis* NIS 001 et son conjugué.

fig 7 : Relation entre la concentration en gamma-globuline de lapin anti-spore *Nosema bombycis* et l'absorbance à 560 nm dans le test EIA.

d'après MIYAMOTO - 1989 - (27)

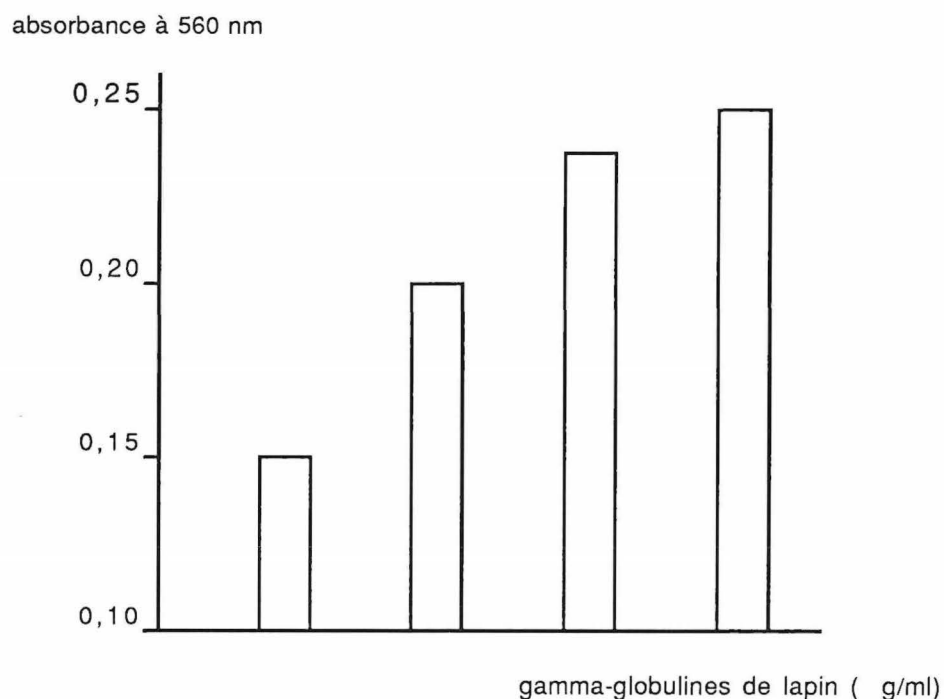


Fig. 8 : Relation entre la dilution du conjugué (globulines de chèvre anti-Ig G de lapin) et l'absorbance à 560 nm dans l'EIA

d'après MIYAMOTO - 1989 - (27)

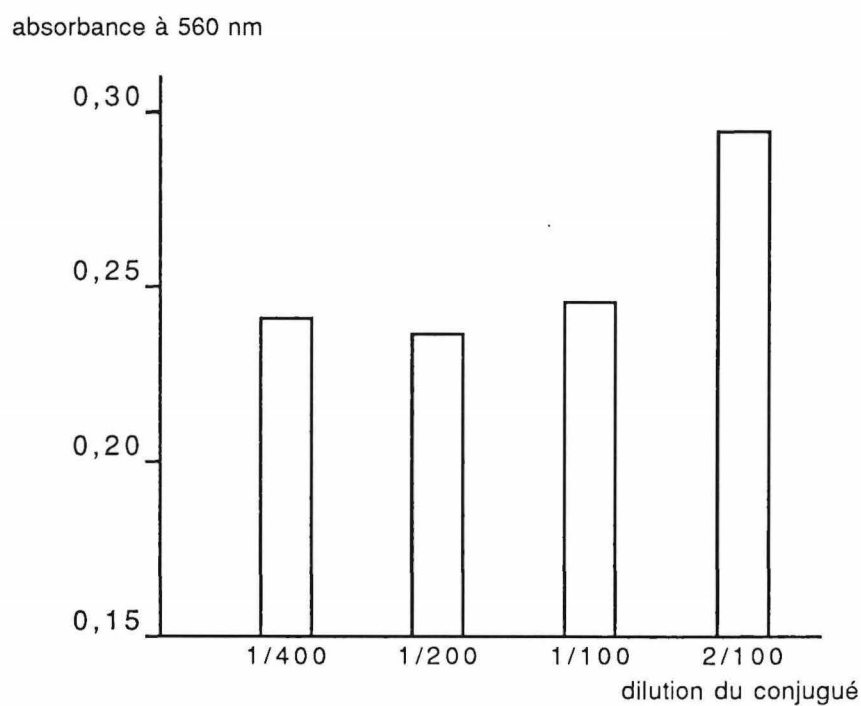


Fig 9 : Relation entre le nombre de spores par tube
et l'absorbance à 560 nm dans l'EIA
d'après MIYAMOTO - 1989 - (27)

absorbance à 560 nm

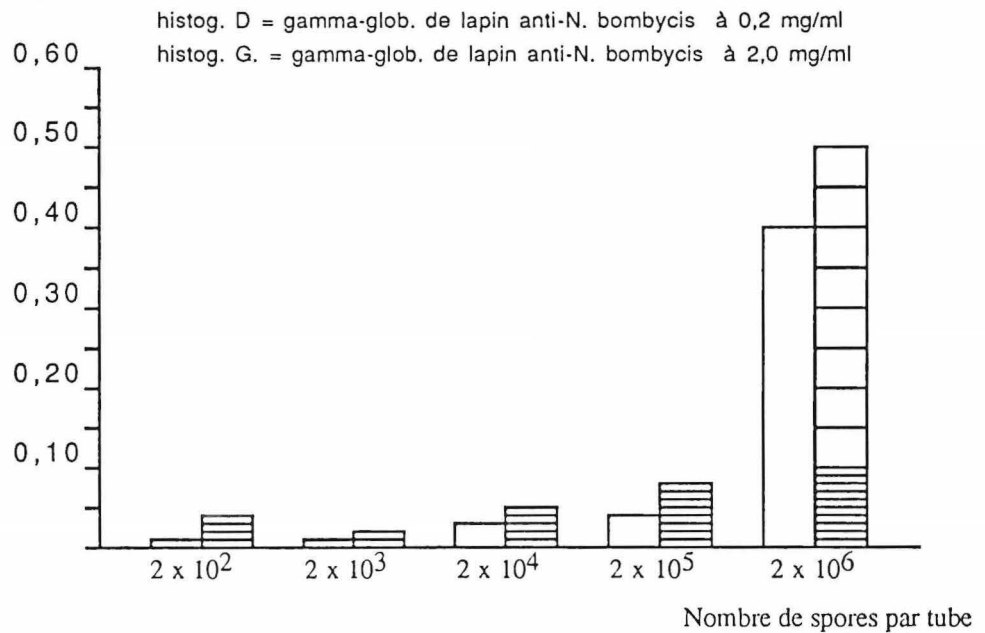
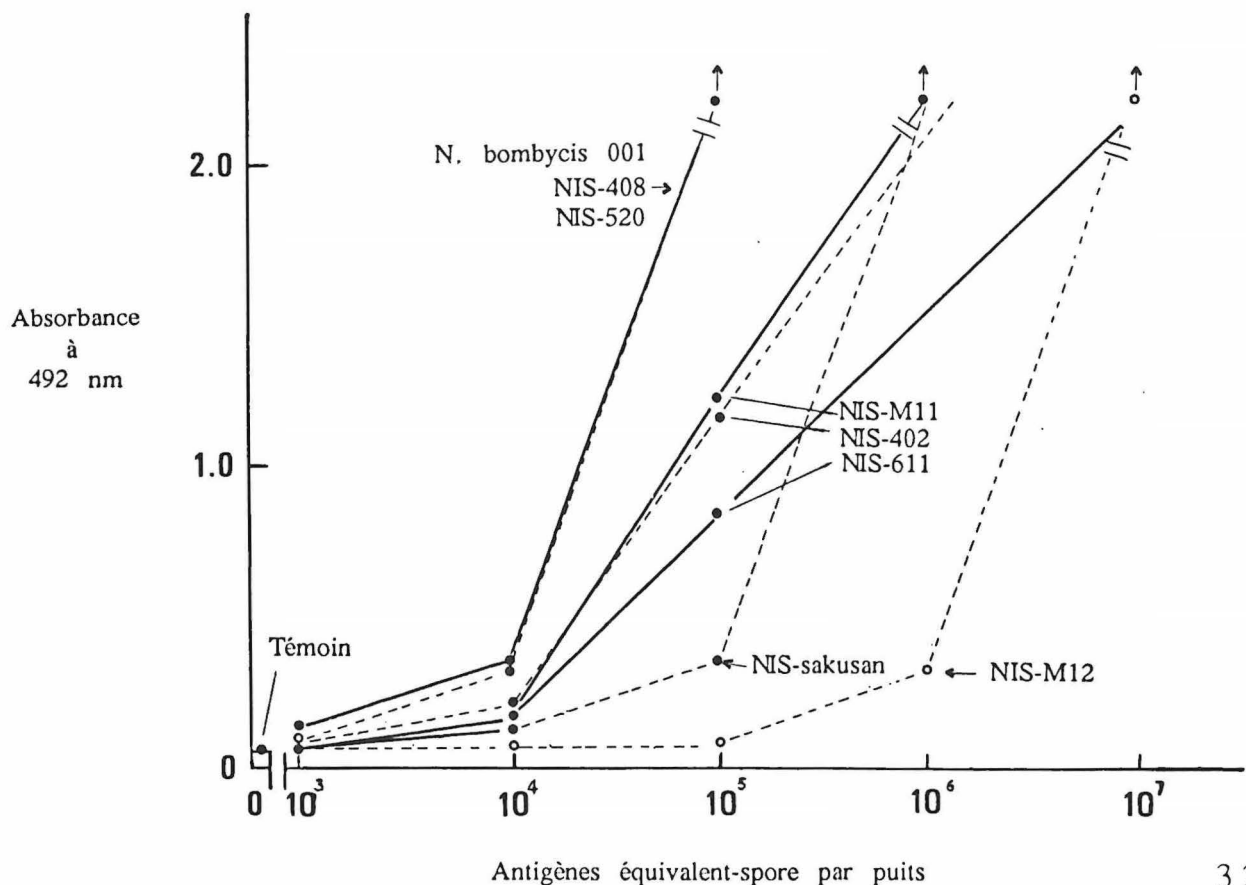


Fig. 10 : Détection comparée, par ELISA utilisant un sérum anti-spore de
N. bombycis NIS 001, des antigènes de surface de *N. bombycis* NIS 001,
Nosema sp 402, 408, 520, 611, *sakusan*, M11 et M12
d'après KAWARABATA et HAYASAKA - 1987 - (20)



Si les antigènes de *Nosema* sp 408 et 520 réagissent de façon similaire à *N. bombycis* NIS 001 vis-à-vis du sérum anti-*N. bombycis* NIS 001, on enregistre des réactions modérées pour *Nosema* sp M11, 402, sakusan et 611, et une réaction tout à fait différente pour *Nosema* sp M12.

L'immunofluorescence et l'agglutination passive regroupent *N. bombycis* et *Nosema* sp 402, 408, 520 et 611, ces derniers étant considérés comme des variants du premier, d'un point de vue antigénique.

Les résultats ELISA permettent d'affiner les choses et l'auteur propose, au vu des courbes, de les diviser en 2 groupes.

Le premier rassemble *N. bombycis*, *Nosema* sp 408 et 520 dans le groupe *Nosema bombycis*. Le deuxième accueille *Nosema* sp 402 et 611 ainsi que *Nosema* sp sakusan et M11 et se nomme le groupe *Nosema* sp M11.

Nosema sp M12 possède des antigènes et des caractéristiques biologiques tout à fait différentes et se doit donc d'être mis dans un troisième groupe, où il est seul, appelé le groupe *Nosema* sp M12.

Conclusion :

Ainsi, ce faisceau de techniques relativement nouvelles, dont les plus sensibles sont certainement les méthodes immuno-enzymatiques, permet une détection et une identification toujours plus précises, et donc une meilleure maîtrise de ces affections, ce qui doit pouvoir déboucher sur des méthodes de lutte et de contrôle moins lourdes et plus spécifiques.

III - METHODES DE LUTTE

A - TRAITEMENT

1 - Moyens physiques

Plusieurs chercheurs, dont ASTAUROV, en 1962, ont d'abord préconisé le traitement des œufs pébrinés avec de l'eau chaude. Cependant SMYK, expérimentant le procédé sur des lots fortement infectés, trouva des résultats très variables.

BEDRJKOVA et VERENSKAJA ont utilisé les hautes températures pour stériliser les œufs infectés, à différents stades de la diapause.

FUJIWARA et KAGAWA (9) arrivent à obtenir un assainissement des œufs infectés par traitement avec une solution d'acide chlorhydrique à 20 p.100, à 48°C pendant 5 mn, puis stockage au froid à 5°C (3), (31).

2 - Chimiothérapie

Plusieurs substances ont été testées pour tenter d'éliminer la pébrine, parmi lesquelles on trouve des antibiotiques (24), des inhibiteurs microbiens, des fongicides...

Le benomyl (BENLATE R), fongicide systémique, a d'abord été testé sur le charançon de la luzerne (16) et permet d'éliminer complètement l'infection alors que le lot témoin enregistre 100 p.100 de larves atteintes par les spores de *Nosema* sp. Il a ensuite fait l'objet d'essais sur *N. bombycis*, chez des vers à soie, en même temps que d'autres substances, mélangées aux feuilles de mûrier (41).

Aux concentrations de 10 000 - 40 000 ppm, le bavistin (carbendazim), le benomyl et le thiophanate sont tous efficaces et éliminent presque entièrement les spores, alors que le lot témoin montre un degré d'infection variant de 61 à 94 p.100 ; tableau VI. Les larves sont infectées juste après la quatrième mue et les produits sont administrés une à trois fois par jour, du lendemain de l'infestation jusqu'à la maturité.

L'effet thérapeutique du bavistin sur la transmission transovarienne de *N. bombycis* a fait également l'objet d'investigations. De jeunes larves infestées sont nourries de feuilles traitées avec 10 000 ppm, deux fois par jour de la naissance jusqu'au troisième âge. On note 11,9 p.100 en moyenne de larves malades dans le lot témoin et aucune trace d'infection dans le lot traité ; tableau VII.

Enfin, des rations contenant de 100 à 10 000 ppm de bavistin, administrées pendant toute la période larvaire à des vers infectés par voie transovarienne donnent des lots traités complètement exempts de pébrine, alors que la prévalence varie entre 92,4 p.100 et 100 p.100 dans les lots témoins ; tableau VIII.

Les effets curatifs du bavistin apparaissent donc très satisfaisants, notamment en ce qui concerne la dernière expérience.

Le pantelmin (mébendazole) a également été testé (5). Il est administré *per os* au troisième âge, mélangé dans la nourriture à raison de 2 000 ppm.

Tableau VI : Effet curatif du bavistin et du benomyl sur les vers pébrinés.
d'après XIAN - 1987 - (41)

Concentration des spores de <i>Nosema</i> dans la nourriture	Traitement	Nombre de larves testées	Nombre de cocons	Nombre d'adultes sortis	Incidence de la maladie (p.100)	Index de l'infection (p.100)
10^3 / ml	4 % bavistin	148	148	148	0	0
	4 % benomyl	136	135	134	0,7	5,3
	témoin	132	132	129	13,2	100
10^4 / ml	4 % bavistin	135	134	130	0	0
	4 % benomyl	140	140	140	0	0
	témoin	140	139	137	61,3	100
10^5 / ml	4 % bavistin	130	130	128	0,8	0,8
	4 % benomyl	137	134	133	0	0
	témoin	145	138	130	94,5	100

Tableau VII : Effet curatif du bavistin sur des pontes infectées
d'après XIAN - 1987 - (41)

N° de série des pontes infectées	Degré d'infections des pontes	Traitement	Nombre de vers examinés	Incidence de la pébrine (p.100)	Index de l'infection (p.100)
N1 - N3	légèrement	témoin	84	11,9	100
	légèrement	traité	84	0	0
N4 - N6	fortement	témoin	84	61,9	100
	fortement	traité	80	3,8	0

Tableau VIII : Résultats d'élevage de vers soumis à un régime contenant du bavistin pendant toute la période larvaire.

d'après XIAN - 1987 - (41)

Degré d'infection des pontes	Concentration en bavistin dans le régime	Nombre de vers testés	Pourcentage d'infection au 5 ^e age	Pourcentage d'infection des femelles	Infection totale
fortement	10 mg/g	60	0	0	0
	0 (témoin)	59	100	100	100
fortement	1 mg/g	53	0	0	0
	0 (témoin)	56	100	100	100
moyennement	0,5 mg/g	72	0	0	0
	0 (témoin)	61	86,4	100	98,4
moyennement	0,1 mg/g	89	0	0	0
	0 (témoin)	66	87,2	100	92,4

L'effet substance est statistiquement significatif en ce qui concerne le poids larvaire, le pourcentage effectif d'élevage et la richesse soyeuse des cocons.

Cependant, l'autopsie d'insectes prélevés dans les lots traités montrent la présence de spores de *N. bombycis*, et l'auteur estime d'ailleurs qu'il n'est pas possible d'éliminer complètement le parasite par le traitement.

Ainsi, ces substances, auxquelles on peut rajouter le nosématol, sont effectivement actives contre la pébrine. Cependant, on reste là dans le domaine expérimental et leur efficacité sur le terrain doit faire l'objet d'une évaluation.

B - PROPHYLAXIE (4), (19), (21), (28)

1 - Soins apportés à l'élevage

a-A l'incubation

Les œufs doivent être désinfectés avant l'incubation. Généralement, on utilise une solution de formol à 2 p.100 dans laquelle on trempe les œufs pendant 10 mn.

La température et la concentration sont importantes à respecter car KAGAWA a montré que ces deux facteurs agissaient directement sur le taux de mortalité des spores (31).

Cette stérilisation superficielle a également été expérimentée avec d'autres substances et BAIG (3) a montré que l'Hilite (dichloro isocyanurate de potassium), l'hypochlorite de sodium, la chaux, à 0,5- 1 -1,5 et 2 p.100 sont tous efficaces, en particulier l'Hilite qui semble pouvoir remplacer le formol en réduisant de façon significative l'étendue de la pébrine.

On peut également pratiquer cette stérilisation pendant le grainage, après la préparation des œufs et la répéter après le stockage au froid. Si les œufs sont à un stade de développement avancé, le procédé doit cependant être évité.

La chambre d'incubation et les équipements sont minutieusement lavés, désinfectés avant le transfert des œufs dans ce local.

b-Durant l'élevage

Avant le brossage des jeunes larves, la pièce et les équipements destinés à les recevoir sont lavés et désinfectés.

On opère ensuite un test correctif sur les œufs morts et les larves écloses afin de détecter précocement la pébrine.

De même, plus tard, les larves inégales, les fèces et les exuvies sont testées.

Durant l'élevage du dernier âge, les larves sont soumises au test prédictif si elles montrent une irrégularité de croissance.

Le maintien de l'hygiène de l'élevage passe aussi par la prévention de l'incidence et de l'extension de la maladie. L'application de substances chimiques actives contre les spores s'est révélée efficace mais elle diminue plutôt l'incidence qu'elle ne la supprime en pratique. D'autre part, si leur administration est discontinuée, le germe semble acquérir une certaine résistance.

Par conséquent, pour le moment, leur utilisation doit être très prudente sur le terrain.

c-Pendant la production de graines

Outre le testage des papillons, il faut empêcher la contamination des graines à partir d'autres sources pendant le grainage.

Chaque lot d'œufs pondus doit être isolé pour éviter l'intercontamination. Les papiers ou cartes à graines, utilisés pour supporter les œufs doivent être détruits par le feu, les cellules désinfectées avant d'être réutilisées.

Les œufs, après désinfection superficielle, doivent être séchés et stockés sur des plateaux désinfectés. Dans la mesure du possible, chaque manipulation se fait dans des locaux séparés (désinfection des plateaux, production des œufs, examen des œufs...).

L'ensemble du matériel utilisé dans ces opérations est désinfecté après chaque utilisation.

d-Traitement des pupes à la chaleur

Les pupes âgées de 5 jours sont exposées à une température de 40°C, à une humidité relative de 60 p.100, pendant 12 à 16 h. Les pupes, à ce stade, sont résistantes à la chaleur qui permet de diminuer la contamination des œufs par les spores de pébrine.

Cette méthode semble efficace mais elle affecte néanmoins la fécondité des insectes et le pourcentage d'œufs non fécondés a tendance à augmenter.

2 - Désinfection (19), (21)

C'est en effet l'utilisation de produits chimiques qui correspond à la méthode la plus simple et la plus efficace pour détruire les spores. Les

méthodes physiques, déjà évoquées (soleil, feu, ensevelissement, eau chaude...) ne sont citées ici que pour mémoire.

Le désinfectant est sélectionné en fonction de quatre critères :

- son efficacité contre le germe,
- la simplicité de son application et sa rapidité d'action,
- son innocuité envers l'homme et les animaux domestiques,
- l'absence d'agression contre les constructions et les équipements.

L'efficacité du désinfectant varie selon trois facteurs :

- sa concentration,
- la durée du traitement,
- les conditions de température ambiante.

Les désinfectants chimiques les plus communément utilisés en sériciculture, efficaces contre des germes variés, incluant la pébrine, sont le formol, le formaldéhyde, le chlorure de chaux, l'hypochlorite de sodium et composés voisins.

a - Les désinfectants

a.1 - Le formol

Le formol est une solution à base de formaldéhyde et d'eau, dont la forme commercialisée contient 35-38 p.100 de formaldéhyde.

Son activité désinfectante est due à l'inhibition de l'activité du germe. Aussi bien fongicide que bactéricide, il est aussi efficace contre les spores de pébrine.

Le tableau IX donne les relations entre sa concentration, la température et la durée du traitement. Son activité est très réduite à une température inférieure à 20°C.

Il est très irritant pour la muqueuse nasale, les yeux et la peau.

Ce produit est le plus largement utilisé, aussi bien en pulvérisation qu'en fumigation.

Tableau IX : Effet sporicide du formol - Relation générale entre la concentration, la durée du traitement et la température.
d'après JOLLY - 1986 - (19)

Températures	Temps / concentration (%)	1 min.	2 min.	4 min.	8 min.	16 min.	32 min.	64 min.
5°	0,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-	-
	2,0	-	-	-	-	-	±	±
	4,0	-	-	-	-	-	±	±
	8,0	-	-	-	±	±	++	++
10°	0,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	±	±
	2,0	-	-	-	-	±	±	++
	4,0	-	-	-	±	±	++	++
	8,0	-	-	±	++	++	++	++
15°	0,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-	±
	2,0	-	-	-	-	±	±	++
	4,0	-	-	-	-	±	++	++
	8,0	-	-	±	++	++	++	++
20°	0,25	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	±	±
	1,0	-	-	-	-	-	±	++
	2,0	-	-	-	-	-	++	++
	4,0	-	-	-	±	±	++	++
	8,0	-	-	±	±	++	++	++
25°	0,25	-	-	-	-	-	±	±
	0,5	-	-	-	-	±	±	++
	1,0	-	-	-	±	±	++	++
	2,0	-	-	±	±	++	++	++
	4,0	-	±	±	++	++	++	++
	8,0	-	±	++	++	++	++	++

++ : sporocide à 100% ; - : sporocide à moins de 50 % ; ± : sporocide de 50 à 100 %

a.2 - Le paraformaldéhyde

Il se présente sous forme de poudre blanche, polymère du formaldéhyde.

Chauffé, il s'opère une sublimation et il libère du gaz formaldéhyde. Il est donc communément utilisé en fumigation.

a.3 - Le chlorure de chaux

C'est une poudre blanche amorphe, qui libère du chlore rapidement si l'humidité est importante, à température ambiante.

Son action désinfectante est due à son pouvoir oxydant, ce qui affecte les articles métalliques et les textiles.

La spécialité commerciale disponible n'est pas complètement soluble dans l'eau et seul le surnageant est utilisé, en pulvérisation.

a.4 - L'hypochlorite de sodium

C'est un agent blanchissant et fortement oxydant, communément utilisé pour nettoyer le matériel et les locaux d'élevage.

Sa stabilité est influencée par la lumière et la température.

Il n'est pas toxique (sauf sous sa forme concentrée), il est soluble dans l'eau froide et est utilisable en pulvérisation.

b - L'hygiène

La réalisation de bonnes conditions d'élevage passe par l'application de principes simples d'hygiène, énoncés par JOLLY (19).

- L'entrée dans les locaux d'élevage doit être restreinte aux quelques personnes indispensables.

- Les vers morts sont détruits et les larves malades sont isolées et désinfectées à l'aide d'une solution de formol.

- Le récipient destiné à recevoir les litières et les refus qui sont ensuite transportés dans la fosse à engrais doit être régulièrement désinfecté en cours d'élevage et ne doit pas être utilisé pour le transport des feuilles de mûrier.

- La fosse à compost des litières doit se trouver à l'extérieur des locaux d'élevage et la litière fraîche ne doit pas être utilisée dans les champs de mûrier sans une décomposition complète auparavant. Quand les refus sont donnés comme fourrage au bétail, ce dernier doit être écarté des magnaneries pour empêcher que des déchets virulents ne soient réintroduits dans les locaux d'élevage.

- Lors du délitage, il faut veiller à ne pas faire tomber des litières sur le sol du local. Immédiatement après, la chambre doit être balayée et les magnaniers doivent nettoyer leurs chaussures et leurs mains. Les creux et les fissures du sol doivent être régulièrement comblés pour empêcher l'accumulation des poussières à l'intérieur.

- Les plateaux sur lesquels on trouve un grand nombre de vers malades doivent être remplacés par des plateaux désinfectés et être eux mêmes traités.

- Pour éviter l'expansion de la maladie, il convient de ne pas emprunter ou prêter le matériel d'élevage. Sinon, ils sont désinfectés avant utilisation.

- L'élevage des stades jeunes et âgés ne doit pas se faire dans la même pièce. Le brossage des larves nouvellement écloses ne doit pas être effectué avant la récolte de la chambrée précédente. Si un tel empiètement ne peut être évité, on élèvera les deux lots dans deux pièces différentes.

- La chambre froide pour la conservation des papillons doit être séparée des chambres d'hivernation et d'incubation dans les grainages.

CONCLUSION

PASTEUR fut le premier chercheur à utiliser et synthétiser les données publiées avant lui au sujet de la pébrine, puis à résoudre un par un les problèmes qui se posaient, grâce à l'expérimentation comparative systématique. Le procédé prophylactique de grainage cellulaire qu'il déduisit de ses études lui semblait alors le seul moyen propre à prévenir et éliminer la maladie puisqu'à l'époque, toutes les substances testées au titre de traitement n'avaient aucunement fait la preuve de leur efficacité.

De fait, la méthode de PASTEUR est encore utilisée actuellement, avec quelques modifications, et les investigations récentes dans le domaine de la chimiothérapie ne sont apparemment pas couronnées de succès, notamment si on les compare aux autres secteurs de la protozoologie. En fait, les produits testés sont sélectionnés empiriquement et essayés de manière classique. Une approche plus rationnelle semble donc souhaitable, qui passerait par une meilleure connaissance biochimique du cycle du parasite chez l'hôte (38) et une identification subséquente de sites spécifiques chez le germe sur lesquels pourrait agir une substance donnée.

D'autre part, au moment où le ver à soie commence à être utilisé comme modèle biologique (29) dans le domaine de la transgénie, il serait intéressant d'approfondir les aspects moléculaires et génétiques de la résistance de certaines races à la pébrine. En effet, on peut estimer qu'il est maintenant possible d'identifier, d'isoler, de purifier et de cloner des gènes commandant ce caractère, de les introduire dans les races sensibles afin de créer des lignées résistantes et productives.

BIBLIOGRAPHIE

- 1.- ABE Y. - *Nosema mesnili* isolated from the fall webworm, *Hyphantria cunea*.
J. Seric. Jpn., 1988, 57 (3), 200-202.
- 2.- BAIG M., SAMSON M. V., SASIDHARAN T. O. et al.- Study on the spread of pebrine after introduction of transovarially infected worms in a colony of silkworms (*Bombyx mori* L).
Sericologia, 1988, 28 (1), 75-77.
- 3.- BAIG M., SAMSON M. V., SHARMA S. D. et al. - Effect of certain disinfectants as surface sterilents against pebrine in surface contaminated layings.
Sericologia, 1988, 28 (1), 81-87.
- 4.- BLAIS N. - Les maladies des vers à soie : revue synthétique et pratique.
Thèse Méd. Vét., Lyon, 1989, n° 29, 114 pages.
- 5.- CHANDRA A. K., SAHA KUNDU A. K. - The effect of drug on pebrine infection in *Bombyx mori* L. Indian
J. Seric., 1982-83, 21-22, 67-69.
- 6.- COLE R. J. - The application of the "triangulation" method to the purification of *Nosema* spores from insect tissues.
J. of Invert. Pathol. , 1970, 15, 193-195.
- 7 - DAVID L., MIRCHEV P., PILARSKA D. - Application of the microsporidian *Nosema* sp. to biological protection of oak forests from the gypsy moth, *Lymantria dispar* L.
Acta Entomol. Bohemoslov, 1989, 86, 269-274.
- 8.- DECOURT P. - Béchamp et la fausse légende de Pasteur. In : Archives internationales Claude Bernard, 2, 1972, 49-131.
- 9.- FUJIWARA T., KAWAGA T. - Contrôle du parasite des oeufs de vers à soie *Nosema bombycis* grâce au traitement à l'acide chlorhydrique ou par l'exposition à diverses températures.
J. Sericult. Sci. Jpn., 1984, 53 (5), 394-398.

- 10.- GRASSE P. P. - Ordre des Microsporidies. In : Traité de zoologie. Tome 1, fascicule 2. Masson & Cie ed., Paris, 1953, 1042-1060.
- 11.- GRIYAGUEY U. P., SENGUPTA K. - Studies on the transmission of *Nosema* sp. in tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* D. Sericologia, 1989, 29 (3), 383-387.
- 12.- HAN M. S., WATANABE H. - Immunoperoxidase-staining methods for discrimination of microsporidian spores in the pebrine infection of silkworm mother moths. J. Seric. Sci. Jpn., 1987, 56 (5), 431-435.
- 13.- HAN M. S., WATANABE H. - Transovarial transmission of two microsporidia in the silkworm *Bombyx mori* and disease occurrence in the progeny population. J. Invert. Pathol., 1988, 51 (1), 41-45.
- 14.- HAYAZAKA S., AYUZAWA C. - Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species, by antibody-sensitized latex. J. Seric. Sci. Jpn., 1987, 56 (2), 169-170.
- 15.- HAYAZAKA S., AYUZAWA C. - Frozen storage of *Nosema bombycis* at ultra-low temperature. Acta Seric. Entomol., 1990, 2, 53-61.
- 16.- HSIAO T. H., HSIAO C. - Benomyl : a novel drug for controlling a microsporidian disease of the Alfalfa Weevil. J. Invert. Pathol., 1973, 22, 303-304.
- 17.- ISHIHARA R. - Growth of *Nosema bombycis* in primary cell cultures of mammalian and chicken embryos. J. Invert. Pathol., 1968, 11, 328-329.
- 18.- ISHIHARA R. - The life cycle of *Nosema bombycis* as revealed in tissue culture cells of *Bombyx mori*. J. Invert. Pathol., 1969, 14 (3), 316-320.
- 19.- JOLLY M. S. - Pebrine and its control. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, 1986, 34 pages.

- 20.- KAWARABATA T., HAYASAKA S. - An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface antigens of strains of *Nosema bombycis*.
J. Invert. Pathol., 1987, 50, 118-123.
- 21.- KRISHNASWAMI S. et al. - Manuel de sériciculture, volume n° 2, FAO, Rome, 1974, 121 pages (Bulletin des services agricoles, 15).
- 22.- KURISU K., IMANISHI H., HAMAZAKI M. - Group-in group sequential pebrine inspection table of the grouping mother moths method in the silkworm.
J. Seric. Sci. Jpn., 1986, 55 (6), 525-526.
- 23.- LOM J., VAVRA J. - The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores.
Acta Protozool., 1963, 1 (10), 81-90.
- 24.- MANCHEV M., VANGELOV S. - Essais d'utilisation de médicaments dans la lutte contre les maladies des vers à soie. Test de tolérance et de pharmacocinétique d'antibiotiques : tétracycline, doxacycline, streptomycine, gentamycine. Animal Science, 1978, 16 (5), 111-116.
- 25.- MIKE A., OHMURA H., OHWAKI M., FUKADA T. - A practical technique of pebrine inspection by microsporidian spore specific monoclonal antibody-sensitized latex.
J. Seric. Sci. Jpn., 1989, 58 (5), 392-395.
- 26.- MIKE A., OHWAKI M., FUKADA T. - Preparation of monoclonal antibodies to the spores of *Nosema bombycis*, M11 et M12.
J. Sci. Jpn., 1988, 57 (3), 189-195.
- 27.- MIYAMOTO K. - The detection of spores of *Nosema bombycis* (Microspora : *Nosematidae*) by enzyme immunoassay (EIA).
Acta. Seric. Entomol., 1989, 1, 11-19.
- 28.- OMURA S. - Introduction à l'élevage du ver à soie.
The Japan Silk Association, Inc. Tokyo, 1986, 130 pages.
- 29.- OZIL H. - Magnaneries et vers à soie. Editions de Candide, Lavilledieu, 1986, 175 pages.
- 30.- PASTEUR L. - Oeuvres. Tome 4 : Etudes sur la maladie des vers à soie. Masson & Cie ed., Paris, 1926, 761 pages.

- 31.- PATIL S. C. - Review on pebrine, a microsporidian disease in silkworm *Bombyx mori* L.
Sericologia, 1991, à paraître.
- 32.- PATIL S. C., GEETHA BAI M., KASTURI BAI A. R. - Une nouvelle méthode pour détecter facilement les spores de pébrine.
Sericologia, 1985, 25, 297-300.
- 33.-QUATREFAGES A. de - Nouvelles recherches faites en 1859 sur les maladies actuelles du ver à soie. Firmin Didot Frères, fils & Cie ed., Paris, 1860, 120 pages.
- 34.- SATO R., KOBAYASHI M., WATANABE H., FUJIWARA T. - Serological discrimination of several kinds of microsporidian spores isolated from the silkworm *Bombyx mori* by indirect fluorescent antibody technic.
J. Seric. Sci. Jpn., 1981, 50 (3), 180-184.
- 35.- SATO R., MASAHIKO K., WATANABE H. - Structure interne des spores de microsporidies isolées du ver à soie *Bombyx mori*.
J. Invert. Pathol., 1982, 40 (2), 260-265.
- 36.- SECRETAIN C. - Recherches séricicoles. Tome 2. Brabo-Compan ed., Alès, 12938, 88 pages.
- 37.- SINHA A. K., SINHA U.S.P, GUPTA K.S. - Changes in free amino acids in developing pebrinised embryos of *Antherae mylitta* drury.
Indian
J. Seric., 1988, 22 (2), 109-112.
- 38.- TAKIZAWA H., VIVIER E., PETIPREZ A. - Recherches cytochimiques sur la microsporidie *Nosema bombycis* au cours de son développement chez le ver à soie *Bombyx mori*.
J. Protozool., 1975, 22 (3), 359-368.
- 39.- UNDEEN A.H., AVERY S.W. - Continuous flow-density gradient centrifugation for purification of microsporidian spores.
J. Invert. Pathol., 1983, 42, 405-406.
- 40.- WANG S. M. - Silkworm egg production. Volume n° 3, FAO, Rome, 1989, 64 pages (bulletin des services agricoles, 673/3).

41.- XIAN LIU SHI. - The effect of chemotherapy on pebrine disease of *Bombyx mori*. 15th international sericultural congress. Sericologia, 1987, 27 (3), 405-410.

42.- YUN J. S., LIM J. S. - Pathological studies on the new microsporidia K79 isolated from the silkworm *Bombyx mori* L.

I : Purification and serological discrimination of microsporidian spores.

Korean J. Seric. Sci., 1984, 26 (2), 1-6.

43.- YUN J. S., LIM J. S. - Pathological studies on the new microsporidia K79 isolated from the silkworm *Bombyx mori* L.

II : Pathogenicity and developmental progress of the microsporidia.

Korean J. Seric. Sci., 1985, 27 (1), 1-11.
