

Bacillus et apparentés

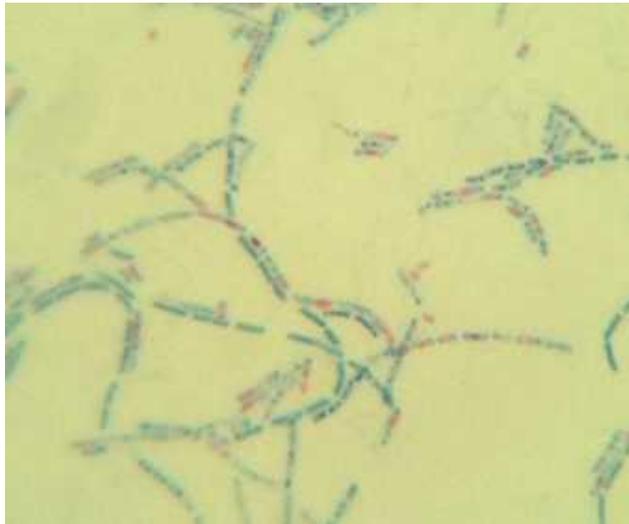
1. MORPHOLOGIE CLASSIFICATION

Ce sont les bacilles Gram + SPORULÉS cultivant en aérobiose ("famille" des *Bacillaceae*).

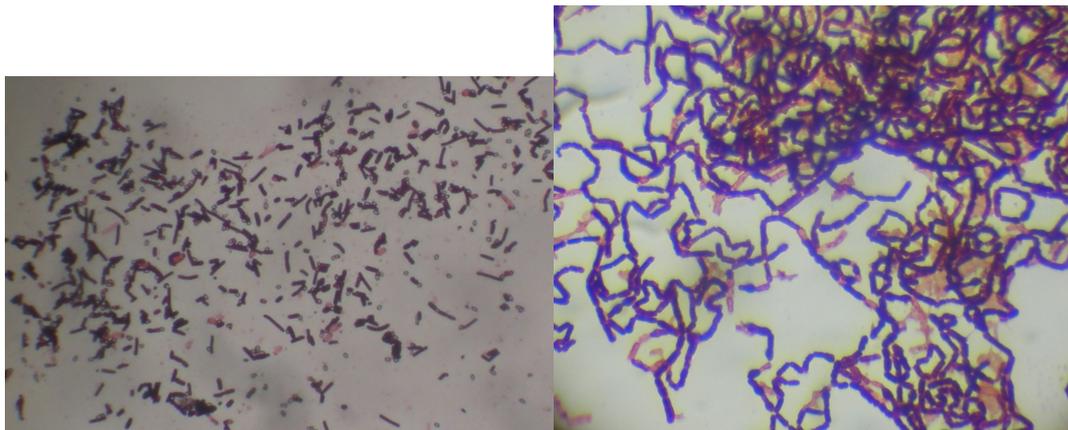
Ils possèdent une catalase et cultivent facilement. Leur type respiratoire est aérobie stricte ou aéroanaérobie : ils sont donc AÉROBIES (cultivent en aérobiose).

Au niveau microscopique, il s'agit généralement de bacilles assez gros, parfois à bouts carrés (cette vision "classique" est illusoire vu la variété des *Bacillus*...). Les cultures de *Bacillus* de tout âge montrent des formes Gram + et Gram -, ces dernières étant probablement des morts ou des jeunes.

L'examen microscopique est très important pour l'identification : on notera en particulier la place, la forme et l'effet de la spore (endospore) sur le "sporange" (bacille porteur).



Coloration des spores



Coloration de Gram (on remarquera les spores d'une part, et les formes roses ("Gram -"))

La classification des "*Bacillus*" a été fortement remaniée depuis quelques années avec les nouveaux genres. Leur taxonomie n'est pas, en effet, simple car on regroupait sous le nom de *Bacillus*, un grand nombre de bacilles Gram + très différents comme le montre l'étalement extrême du GC % de 32 à 69 %. Les analyses des DNA 16S (correspondant aux RNA ribosomal 16S) ont permis la création de nouveaux genres aux côtés d'anciens qui subdivisaient déjà cette famille, avec de nombreux transferts :

- *Bacillus*
- *Alicyclobacillus* (*thermoacidophiles*),
- *Paenibacillus* (incluant d'anciens *bacillus*, *polymyxa*, *macerans*, *alvei*?),
- *Brevibacillus* (ex *B. brevis* et *laterosporus*),
- *Aneurinibacillus*,
- *Virgibacillus*

- *Halobacillus* (ex *sporosarcina*, coques sporulés),
- *Amphobacillus*.
- *Gracilibacillus* (1999),
- *Geobacillus* (2001),
- *Marinibacillus*,
- *Salibacillus* (199),
- *Ureibacillus* (2001),
- *Salibacillus* (1999).

Cette situation complexe montre combien il est difficile d'identifier ces bactéries sporulées dont l'intérêt est avant tout industriel.

Voir : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bacillus.html>

Bergeys :

phylum XIII : Firmicutes	Class I : Clostridia	Ordre I : Clostridiales	famille des Clostridiaceae
			famille des Peptostreptococcaceae
			famille des Eubacteriaceae
			famille des Peptococcaceae
			famille des Acidominococcaceae
	Class II : Mollicutes	Ordre I : Mycoplasmatales	famille des Mycoplasmataceae
		Ordre V : Incerta sedi	famille des Erysipelotrichaceae (genre Erysipelothrix)
	Class III : Bacilli	Ordre I : Bacillales	famille I des Bacillaceae (genres <i>Bacillus</i> , <i>Amphibacillus</i> , <i>Virgibacillus</i> ...)
			famille II des Planococcaceae
			famille IV des Listeriaceae (genre <i>Listeria</i> et <i>Brochothrix</i>)
			famille V des Staphylococcaceae (genres <i>Staphylococcus</i> , <i>Gemella</i> ...)
			famille VII des Paenibacillaceae
		Ordre II : Lactobacillales	famille I des Lactobacillaceae (genres <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> ...)
			famille II des Aerococcaceae
			famille IV des Enterococcaceae (genres <i>Enterococcus</i> ...)
famille V des Leuconostocaceae			
famille VI des Streptococcaceae (genres <i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i>)			

2. HABITAT

Les *Bacillus* sont des germes ubiquitaires de l'environnement, en particulier du sol. Ils sont fréquemment isolés comme **contaminants**. La **sélection par la chaleur** conservant les endospores est un facteur important de la fréquence de leur isolement comme contaminant. Certains sont thermophiles : leur optimum de température de développement est situé vers 55°C (*B. stearothermophilus* par ex. utilisé dans la mise en évidence d'antibiotiques dans le lait)

3. POUVOIR PATHOGENÈ

- *Paenibacillus* (*Bacillus*) *larvae* actif sur les insectes
- *Bacillus anthracis*, *cereus* et *thuringiensis* (bonne orthographe), qui forment un groupe génomique d'après l'analyse de leur génome. Ces différentes bactéries ne sont pas distinguables autrement que par leurs caractères de pathogénicité pour les pathogènes.

Historique du CHARBON (extrait de Bactériologie médicale Flammarion)

En 1780, CHABERT décrit avec détails le charbon animal et insiste sur la coloration noire de tous les organes observés chez les animaux charbonneux, comme sur l'aspect particulier de leur sang, "véritable sang de rate".

En 1785, CHAUSSIER s'attache à préciser chez l'homme les divers aspects et évolutions de la pustule maligne.

De 1823 à 1825, BARTHÉLÉMY expérimente: il réussit à transmettre la maladie par injection de sang d'animal malade au cheval et au mouton; quelque "miasme" existe donc dans ce sang, responsable du charbon.

En 1850, une épizootie de charbon décime les troupeaux beaucerons; pour faire taire les plaintes des éleveurs d'Eure-et-Loir, les Pouvoirs publics décident une mesure énergique: ils nomment une Commission. Des médecins et vétérinaires en font partie, dont RAYER ET DAVAINÉ- ils se mettent aussitôt au travail. Leurs conclusions sont formelles- c'est par contact direct avec le sang des animaux malades ou morts de charbon que les animaux sains et l'homme sont contaminés.

Rentré à Paris, DAVAINÉ, la même année, continue ses recherches : dans le sang d'un mouton charbonneux provenant des abattoirs, il met en évidence, à côté des globules rouges, de petits bâtonnets hyalins, du même ordre de grandeur que le diamètre d'une hématie. Davaine se contente de noter la présence de ces filaments immobiles.

En 1855, BRAUELL retrouve les filaments de DAVAINÉ- mais il les confond avec les "vibrions de la putréfaction" (le futur "vibron septique" ou *Clostridium septicum*) qui pullulent après la mort.

C'est seulement en 1863 que DAVAINÉ, ayant pris connaissance des travaux de Pasteur sur les ferments reprend ses études sur les filaments hyalins observés par lui treize ans plus tôt; il les retrouve dans le sang de tous les animaux morts de charbon- mieux: ayant inoculé, chez un cobaye épilé, dans des phlyctènes (des "ampoules") artificiellement provoquées du sang d'animal charbonneux, il détermine l'apparition d'une pustule maligne, qui contient les mêmes filaments; il ose donc affirmer que la bactérie hyaline immobile est responsable à la fois du charbon animal et de la pustule maligne humaine et—chose qui paraît difficilement admissible à l'époque— que ce petit bâtonnet de moins d'un millimètre est capable de déterminer en quelques jours la mort d'un bœuf de 600 kg.

En 1876, Robert KOCH apporte deux faits nouveaux sur la bactérie: il réussit à la cultiver in vitro; il découvre, observant sous le microscope la formation des filaments, qu'au contact de l'air ils donnent lieu à la formation de grains réfringents, les spores.

En 1877, les études précises de PASTEUR, JOUBERT, CHAMBERLAND ET ROUX devaient définitivement confirmer les notions précédentes, distinguer de manière indubitable la bactérie immobile des vibrions septiques mobiles de Brauell, agents de la putréfaction anaérobie; enfin, grâce aux cultures en série in vitro du germe sans perte de son pouvoir pathogène, démontrer que la bactérie charbonneuse était bien la cause exclusive et suffisante de la maladie charbonneuse.

De 1953 à 1958, SMITH et KEPPIE mettent en évidence la toxine élaborée par *Bacillus anthracis* :

Ils ont d'abord essayé de préciser quelle était la cause de la mort des cobayes inoculés avec *B. anthracis*, l'opinion couramment admise était qu'à la phase terminale de l'infection expérimentale, la multiplication des bactéries dans le sang était si grande qu'un blocage mécanique des capillaires en résultait, d'où anoxie et suspension de tout métabolisme. La mise en œuvre chez le cobaye malade, 8 heures avant la mort prévue d'un traitement massif par la streptomycine, leur permit de sauver les animaux dont le sang contenait moins de 3 millions de germes au cm³; par contre, si le chiffre de 3 millions de germes au cm³ était dépassé, la mort survenait, malgré que fût obtenue la stérilisation de l'animal. Ainsi s'avérait fautive l'hypothèse du blocage mécanique des capillaires, et vraisemblable l'existence d'un produit toxique libéré par la lyse des germes.

Pour l'isoler, les auteurs recoururent à la filtration du plasma des cobayes charbonneux sur le point de mourir; ce filtrat, par inoculation sous-cutanée au cobaye neuf provoque un œdème sous-cutané, par injection intraveineuse à la souris et au cobaye la mort des animaux; il contient donc bien une toxine. Et cette toxine est spécifique, car, mise en contact de sérum anticharbonneux, obtenu par injection au cheval de vaccin de STERNE (fait de bactéries vivantes non capsulées), elle est neutralisée par lui.

Enfin SMITH et KEPPIE (8) réussirent à obtenir cette toxine in vitro par culture de bactéries en milieu enrichi de plasma de cobaye; elle est très instable, apparaît dans les cultures de 4 à 5 heures, mais disparaît à la 7^e heure; elle peut être conservée à moins 20°C, mais non à 0°C; elle est formée de deux facteurs: l'un lipoprotéique, l'autre protéique, et est sans rapport avec le composant glutamique capsulaire de la bactérie.

[Lecture d'un ouvrage de 3^e des années 1961 complété d'informations sur le pouvoir pathogène du germe](#)
[texte de Frédéric GIRARD \(complet\) sur le Charbon et les toxines en jeu](#)

Le pouvoir pathogène des *Bacillus* est très restreint sauf pour :

Bacillus anthracis

Résumé

Bacillus immobile et capsulé cause du **charbon** ou **anthrax** maladie redoutable mais aujourd'hui rare. On peut le considérer comme un pathogène strict (BPS).

Cette maladie est une **zoonose** particulièrement grave chez le mouton, le cheval et les bovins. Le bacille sporulé pénètre par une blessure, se multiplie, protégé de la phagocytose par sa capsule, et libère la toxine, composée de trois molécules, toxine peu stable in vitro, qui est mortelle.

La toxinogénèse est bien la cause de la mort : l'injection d'antibiotique à la phase septicémique stérilise le cobaye mais il meurt tout de même à cause de la toxine.

Chez l'homme la contamination résulte le plus souvent d'une blessure cutanée : un **pustule** se forme, sur le bras par exemple, devenant **noire**. L'inhalation de spores peut donner le **charbon pulmonaire**. La mortalité n'est pas aussi importante que le suggère l'utilisation guerrière du bacille.

- Dernier cas français mortel en février 1996 : une fillette maghrébine de 11 ans qui aurait été contaminée par consommation de viande non contrôlée. Source inconnue.
- Dernière épizootie en France : 1997 en Savoie et dans les Pyrénées atlantiques. Pas de cas humains (Le Monde du 12 octobre 2001).
- Statistiques sur 1980-2000 : 114 foyers animaux dans 23 départements dont 44 en 1998-2000, environ 19 cas humains dont deux mortels. (Médecine et Maladies infectieuses mars 2001)

[texte de Henri MONTEIL d'après Vallery RADOT](#)

Bacillus cereus

Bacillus cereus est un germe qui peut être responsable d'**intoxications alimentaires** généralement **bénignes**. Les symptômes cliniques sont dus à l'action de deux toxines produites par ce bacille (en même temps ou séparément) :

- une toxine proche de l'entérotoxine staphylococcique (superantigène ???), dite émétique, 1 à 5 heures après le repas ou/et
- une entérotoxine proche de la toxine de *Clostridium perfringens* cause d'intoxication alimentaire 8 à 16 heures après le repas, provoquant une diarrhée.

Les aliments en cause sont avant tout des aliments contaminés au départ, bouillis puis conservés dans de mauvaises conditions, en particulier de température, conditions pendant lesquelles les spores pourront germer puis les bacilles se multiplier.

Note : la toxine émétique agit soit par le canal superantigène soit, plus probablement et dans l'attente d'informations plus précises, par excitation du nerf pneumogastrique (X) et de récepteurs à la sérotonine (5HT3). Il s'agit d'un peptide cyclique de 12 acides aminés [D-O-Leu-D-ALA-L-O-VAL-L-VAL]₃, très proche d'un antibiotique la valinomycine, ionophore du potassium, stable 90 min à 126°C, insensible à la pepsine et la trypsine et aux pH extrêmes.

Bacillus thuringiensis

Bacillus pathogène chez les lépidoptères (papillons, les chenilles formant leur premier stade de développement avant la métamorphose).

Ce *Bacillus* produit, lors de la sporulation, un cristal parasporal. Les insectes qui avalent le *Bacillus* voit cette protéine libérée dans leur intestin : elle provoque la mort de l'insecte.

On utilise donc ce *Bacillus* comme insecticide biologique (Bactospeine®). Il est particulièrement utile contre les chenilles processionnaires du pin et la tordeuse du mélèze.



Insecticide biologique à base de spores de *Bacillus thuringiensis*



Chenilles processionnaires dans un Pin du Vercors

Le maïs transgénique dit BT utilise cet insecticide... : les gènes correspondant à la toxine ont été "clonés" dans le maïs où ils s'expriment.

Paenibacillus (Bacillus) larvae subsp larvae

Bacillus pathogène chez les abeilles provoquant la loque américaine. *P. alvei* était considéré comme l'agent de la loque européenne mais s'avère n'être qu'un bacille indicateur.

Voir : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/paenibacillus.html>

4. ISOLEMENT

Les *Bacillaceae* cultivent en général sur GO. C'est un contaminant banal de l'air. Il donne souvent de **grandes colonies R** mais il faut se méfier d'une généralisation abusive...



Colonies de *Bacillus nato* sur GO

5. IDENTIFICATION

La galerie la plus simple est composée de :

- Gélose ordinaire (un disque de Pénicilline G sera placé au début de l'isolement dans la partie riche)
- VF, CTA glucosé
- galerie API20E ou/et API 50CH de préférence
- gélose au jaune d'oeuf (recherche de la **lécithinase**)

L'identification repose sur la morphologie (spore) et sur quelques caractères biochimiques. Elle n'est pas très facile en raison de bases de données limitées.

Elle est très rarement réalisée en pratique médicale : les *Bacillus* sont le plus souvent considérés comme des **contaminants banals** de l'environnement. Il sera donc exceptionnel de trouver cette bactérie le jour d'un examen en souche pure !!!

6. TRAITEMENT ET ANTIBIOGRAMME

L'antibiogramme n'a guère de sens pour les mêmes raisons. La pénicilline G est généralement active, sauf sur *Bacillus cereus*.

7. PROPHYLAXIE

La prophylaxie du charbon est passée par l'**éradication de la maladie animale** rendue possible par la vaccination pastorienne et la destruction des cadavres d'animaux morts par incinération ou enfouissement, après couverture par la chaux vive, dans la terre. Malheureusement, l'éradication planétaire n'est pas possible en raison de la grande résistance du bacille sporulé et de l'utilisation possible comme arme de guerre bactériologique.

L'**hygiène alimentaire** classique limite la portée des rares intoxications à *Bacillus cereus*. En France, le nombre de cas est estimé à 500 (contre 40 000 salmonelloses et 500 listérioses). Le nombre de décès est NUL.

COMPLÉMENTS

Utilisation industrielle de certaines souches de *Bacillus*

par Frédéric GIRARD

De très nombreux microorganismes sont utilisés dans l'industrie comme producteurs de métabolites : enzymes, antibiotiques, acides aminés, vitamines... Les principaux micro-organismes utilisés sont des mycètes. Cependant certains genres bactériens, au premier rang desquels les bactéries du genre *Streptomyces* et celles du genre *Bacillus*, présentent aussi un intérêt industriel.

1. Production de protéases

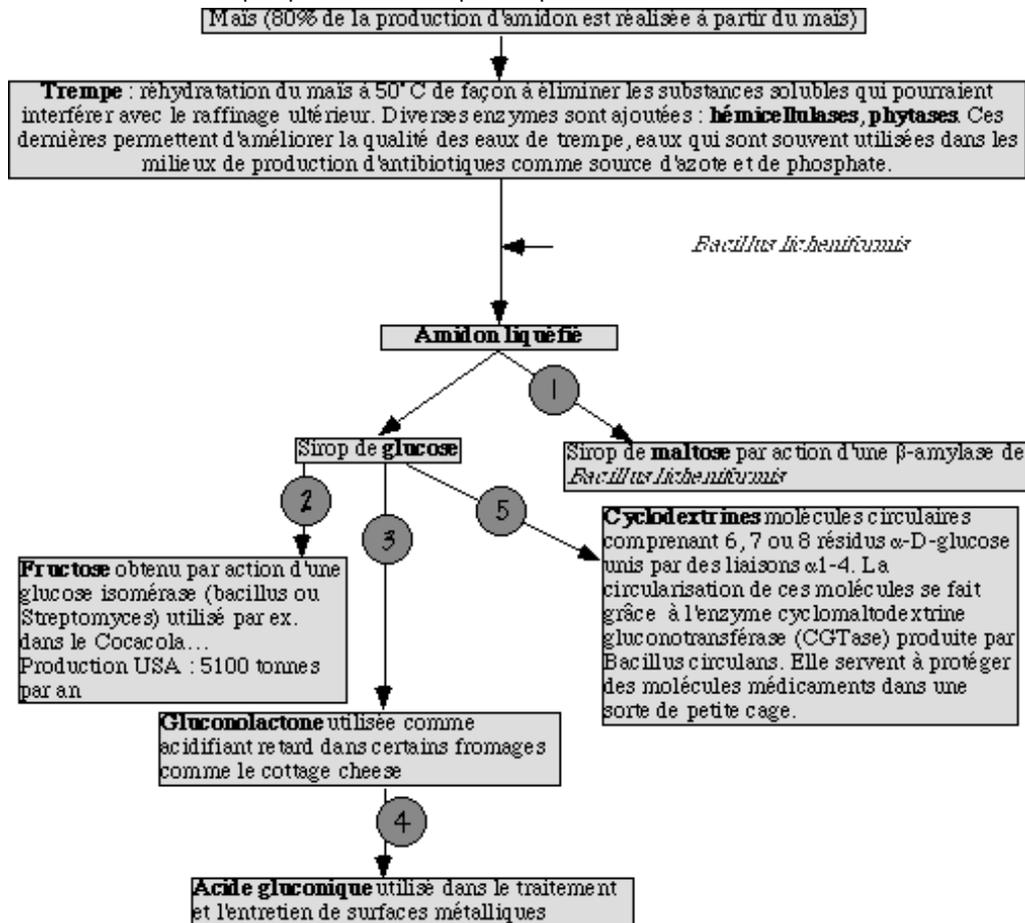
Bacillus subtilis est utilisé dans l'industrie pour produire la subtilisine, protéase produite par ce germe et quelques autres *Bacillus* apparentés. Cette protéase est très stable, et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification. La production de subtilisine était estimée en 1991 à 500 tonnes par an, ce qui représente 60% de la totalité de la production d'enzymes à des fins industrielles. Ses domaines d'utilisation sont très variés :

- utilisation dans les lessives : c'est l'essentiel du marché, 80% de la production de subtilisine étant dévolue à ce secteur.
- utilisation dans les tanneries : permet d'attendrir les peaux.
- utilisation dans les conserves : la subtilisine est utilisée comme additif dans les conserves alimentaires pour détruire les spores des germes du genre *Clostridium*.

2. Production d'amylases

La production d'alpha-amylase est très importante pour son utilisation dans les industries agro-alimentaires de traitement de l'amidon. Le principal germe producteur d'alpha-amylase est *Bacillus licheniformis*. Cette enzyme est thermostable et est fonctionnelle à 110°C. Elle est aussi ajoutée dans certains liquides vaisselle.

Le tableau suivant en montre quelques utilisations pour la production d'autres molécules.



3. Production d'antibiotiques

Certains antibiotiques (rares) sont produits par des souches du genre *Bacillus* : la gramicidine S (*Bacillus brevis*), la bacitracine (*Bacillus subtilis*), la polymyxine B (*Bacillus polymyxa*).

Extrait d'Anatomie et Hygiène "Le CHARBON", manuel de 1961 pour les classes de 3°, complété par F. Girard

Cette maladie qui atteint surtout les Bovidés et les moutons est transmissible à l'homme. Elle régnait autrefois à l'état endémique dans nos régions d'élevage. En Beauce, en Brie, en Champagne, elle causait d'énormes pertes à l'agriculture, enlevant en une seule année dans l'arrondissement de Pithiviers plus de 23 000 moutons. Comme pour la variole, la vaccination systématique l'a pratiquement fait disparaître.

Un exemple de transmission à l'homme. – Résumons le cas suivant qu'il nous a été donné d'observer vers 1932.

Dans une ferme bourguignonne une vache malade meurt après quelques saignements noirâtres de la bouche et des naseaux. Le vétérinaire autopsie l'animal et prélève la rate grosse et noire. Il fait enterrer le cadavre dans la chaux désinfecter l'étable et cour de ferme et recommande au cultivateur qui l'avait aidé un soigneux lavage antiseptique des mains et avant-bras.

L'examen bactériologique de la rate ayant confirmé le diagnostic du Charbon le vétérinaire revient vacciner les autres animaux du hameau. A ce moment le paysan présente à l'avant-bras droit une petite tache rouge qui "démange" mais il n'en parle pas (Si le paysan avait signalé sa tache rouge au vétérinaire, celui-ci lui aurait aussitôt fait administrer du sérum anticharbonneux qui à ce moment, l'aurait sauvé).

Quelques jours après la tache devenue vésicule crève en laissant une cicatrice jaunâtre qui noircit. Des petites vésicules apparaissent autour de la croûte qui s'étend; l'avant-bras gonflé est d'un rouge livide sur lequel se dessinent les vaisseaux.

Bien que peu douloureux ces signes inquiètent le paysan qui se sent malade et fiévreux. Il consulte son médecin qui reconnaît une **pustule maligne** et l'envoie d'urgence à l'Hôpital.

Trop tard hélas! Malgré l'amputation du bras et les injections massives de sérum anticharbonneux le malade succombe deux jours après de septicémie.

1. caractères de la maladie

1. Chez le mouton

La maladie est encore appelée "sang de rate"; à partir d'une plaie buccale infectée par l'herbe ou le fourrage contaminé par les spores, l'invasion est particulièrement rapide et l'animal malade tombe presque foudroyé en marche, au pâturage, rejetant par les naseaux un mucus sanguinolent. L'autopsie montre un sang noir, visqueux, incoagulable; la rate, très grosse, est remplie d'une bouillie noirâtre— d'où les appellations de charbon et sang de rate. Le microscope révèle que sang et rate (très grosse) fourmillent de bacilles encapsulés. Il y a septicémie qui fait suite à l'invasion lymphatique.

2. Chez l'homme.

Le charbon est accidentel et débute par une inflammation localisée au foyer d'infection. C'est la **pustule maligne**. Au point d'inoculation (généralement écorchure insignifiante), apparaît un bouton rouge qui grossit, devient noirâtre et s'ulcère. Trois ou quatre jours après, le malade, fiévreux, éprouve de la courbature, des frissons, des vertiges. Le plus souvent, la mort survient par asphyxie ou arrêt du cœur (10 à 20 % de mortalité en absence de traitement). La septicémie n'apparaît ici que dans la phase terminale de la maladie.

D'autres formes rares sont possibles : charbon pulmonaire par inhalation des spores, gastro-intestinal par ingestion de viande contaminée, méningites liées à la septicémie.

2. LE MICROORGANISME

Dans les cultures aérobies liquides, les bacilles forment de longues chaînes. En présence d'oxygène libre, entre 18° et 42°C, apparaissent des spores très résistantes, contenues dans le filament "comme des pois dans leur gousse".

Le microbe du charbon est un bacille rectiligne, flexible et immobile.

Les toxines excrétées par *Bacillus anthracis* sont un exemple de toxines multiprotéiques. Trois chaînes polypeptidiques sont excrétées **séparément** dans le milieu :

	Masse molaire
Facteur EF : facteur oedématogène ayant une activité adényl cyclase en présence de calmoduline.	89 kDa
Facteur PA : facteur antigène protecteur.	85 kDa
Facteur LF : facteur létal	83 kDa

L'association au niveau cellulaire de ces facteurs entraîne l'activité toxique. Les étapes de l'action de la toxine, imparfaitement connues en 1997, sont les suivantes : le facteur PA se lie à un récepteur cellulaire inconnu, est coupé par une protéase cellulaire ce qui est nécessaire à la fixation des facteurs EF et PA. Le complexe

récepteurs-facteurs est internalisé et les facteurs libérés dans le cytoplasme où ils exercent leurs effets (activité adényl cyclase en présence de calmoduline, etc...)

Deux plasmides sont fondamentaux, les produits des gènes portés par ces plasmides rendant compte de la pathogénicité de *Bacillus anthracis*, le plasmide pX01 codant pour les facteurs protéiques toxiques et le plasmide pX02 codant pour les composants de la capsule. (F. Girard)

3. CONTAGION

Pasteur fut chargé de mettre un terme aux épidémies de charbon qui décimaient les troupeaux. Il fallait, pour cela, découvrir les causes de contagion. Deux de ses élèves, Chamberland et Roux, vont s'installer près de Chartres (1878). Pasteur vient chaque semaine donner la direction et suivre les travaux.

Il interroge fermiers et domestiques, écoute les bergers qui, à cause de leur vie solitaire, donnent toute leur attention à leurs troupeaux et deviennent souvent des observateurs sagaces.

On expérimente. De la luzerne arrosée de culture de bacilles charbonneux provoque rarement la mort. Il n'en est pas de même si le fourrage contient des plantes piquantes (chardon, épis d'orge, etc...). On en conclut que le germe est inoculé par les blessures qu'elles produisent dans la bouche des moutons.

Champs maudits

Mais d'où vient que certaines régions se montrent particulièrement dangereuses? Il y a des fermes à charbon. On parle aussi de champs maudits et de montagnes maudites, comme si un mauvais sort était jeté sur les animaux assez hardis pour les traverser.

Pasteur remarque dans ces champs des emplacements où la terre est un peu plus foncée, où l'herbe pousse plus haute et plus verte. C'est qu'on a enfoui là des moutons morts du charbon. Il y observe **les tortillons cylindriques que les vers de terre** excrètent à la surface, en recueille quelques-uns, y découvre des spores charbonneuses. Il en retrouve dans le canal intestinal des vers. *Le secret des champs maudits est là.* Les animaux qui s'arrêtent volontiers au-dessus des fosses où l'herbe est plus drue parce que le terrain fumé, risquent ainsi leur vie. *Les excréments des vers, délayés par la pluie, contaminent l'herbe et les animaux qui la broutent.*

Chez l'homme, le charbon apparaît surtout chez les individus qui manipulent les cadavres, les peaux, les cornes d'animaux morts du charbon.

Les trieurs de laine peuvent contracter un charbon pulmonaire en respirant **les poussières des toisons d'animaux charbonneux.**

4. LUTTE CONTRE LE CHARBON

1 Mesures à prendre contre la contagion.

Une fois la maladie déclarée **l'abattage est la règle absolue.** Le cadavre charbonneux doit être incinéré ou enfoui entier dans une fosse et recouvert de chaux vive; peaux, laines, crins, ne doivent pas être livrés à l'industrie, pas plus que la viande à la consommation. On flambe les endroits qui ont été souillés par le sang ou l'urine de l'animal, on désinfecte l'étable ou la bergerie.

La loi interdit toute vente de produits dérivés (viandes, peaux, laines..) provenant d'animaux contaminés.

2. Traitement

En cas d'escarre bégnine on utilise habituellement chez l'adulte la pénicilline G (1 million d'unités par jour par voie musculaire pendant 5 jours). En cas d'allergie à la pénicilline on peut utiliser l'érythromycine ou la tétracycline.

En cas d'attaque interne on utilise la pénicilline G par voie veineuse à haute dose (20 millions d'unités par jour chez l'adulte). On peut associer une sérothérapie à base de sérum anticharbonneux de cheval.

3. Vaccination

Le charbon, comme la variole, est une maladie qui ne récidive pas. Une première atteinte confère une immunité acquise.

Frappé par cette analogie et par la découverte de Jenner, Pasteur cherche à vacciner contre le charbon.

Le hasard le mit sur le chemin de la réussite. Il poursuivait l'étude d'une maladie qui décimait les basses-cours : le choléra des poules. **Fidèle à sa méthode des cultures pures**, ilensemence le microbe sur bouillon et reproduit la maladie en l'inoculant à des oiseaux sains.

Au retour de vacances, une culture préparée avant son départ sert à l'inoculation. Elle se montre peu nocive: la poule se rétablit vite. On prépare une culture fraîche, virulente celle-là. La poule de l'épreuve précédente sert encore de sujet: elle ne meurt pas! Pourtant la culture employée tue infailliblement une poule "neuve", c'est-à-dire qui n'a jamais été en contact avec le microbe. Une culture vieille qui n'a pu tuer l'animal l'a rendu réfractaire à l'action d'une culture virulente. Elle l'a "vacciné".

Pasteur a l'idée d'appliquer cette méthode au charbon. Mais à l'air à 37°, le bacille forme des spores qui gardent leur virulence indéfiniment, d'où échec. C'est alors que, soumettant les cultures aux actions les plus diverses, Pasteur et ses collaborateurs, Chamberland et Roux, étudient méthodiquement le comportement du microbe. Ils découvrent qu'il ne forme plus de spores au dessus de 42°C. Une culture aérobie de bacilles charbonneux maintenue à 42°5 perd progressivement sa virulence. Au bout de dix jours, elle est inoffensive pour le mouton, et lui confère l'immunité.

Cette culture pure de bacilles charbonneux, atténuée par chauffage et vieillissement à l'air, était le vaccin qui allait sauver des millions de têtes de bétail dans le monde entier.

Pratique de la vaccination anticharbonneuse

Cette découverte bouleverse tellement les idées de l'époque qu'elle rencontre dans les milieux vétérinaires et paysans un scepticisme que Pasteur se doit de vaincre. Il n'hésite pas à répondre à l'offre de la Société d'Agriculture de Seine-et-Marne de faire une grande expérience publique. Le 15 mai 1881, à la ferme de Pouilly-le-Fort près de Melun devant une nombreuse assistance de médecins, vétérinaires, éleveurs, les uns hostiles les autres incrédules quelques-uns enthousiastes il vaccine 25 moutons sur un troupeau de 50 têtes. Le 31 mai, les 25 animaux vaccinés qu'on avait marqués à l'oreille et les 25 non vaccinés sont inoculés avec une culture de charbon très virulente. Rendez-vous est pris pour le 2 juin. Au jour fixé par Pasteur, sa prédiction s'est réalisée. Les 25 moutons non vaccinés sont morts, les 25 animaux vaccinés sont bien portants. Pasteur est accueilli dans la cour de la ferme par les acclamations de l'assistance tout entière. Grand fut le retentissement de cette expérience. La pratique de la vaccination anticharbonneuse se répandit rapidement; on ne vaccina pas moins de trois millions de moutons en France pendant les douze années qui suivirent.

Aussi ce fléau de nos fermes est-il devenu très rare. Cependant on vaccine encore chez nous chaque année (1961) 400 000 moutons et quelques dizaines de milliers de boeufs et de chevaux et les troupeaux sont revaccinés dès qu'un cas de charbon s'est **déclaré dans la région**.

La vaccination s'opère en deux temps: on inocule sous la peau du mouton, à la face interne de la cuisse, un huitième de centimètre cube d'une culture maintenue à 42,5°C pendant vingt jours. Une deuxième injection est faite douze jours plus tard avec une culture plus virulente chauffée pendant dix jours. L'immunité est complète dix à quinze jours après la deuxième inoculation et dure environ un à deux ans. Il est nécessaire de revacciner en cas d'épidémie pour renforcer l'immunité.

Mode d'action du vaccin

Metchnikoff, élève de Pasteur, montre dès 1883 que les globules blancs de l'animal vacciné ont acquis au plus haut point le pouvoir d'absorber et de digérer les microbes (l'opsonisation)- Cette phagocytose est faible ou nulle chez l'animal réceptif.

Tout se passe comme si la vaccination, en provoquant une maladie atténuée, avait entraîné l'organisme du malade et ses globules blancs en particulier à la lutte contre l'envahisseur microbien.

Nous savons que la phagocytose n'est pas le seul mécanisme de défense contre l'infection microbienne. Les globules blancs sécrètent des antitoxines. D'autres anticorps apparaissent dans le sang et la lymphe: agglutinines, bactériolysines qui ont la propriété, les premières d'agglutiner les microbes et, les secondes, de les dissoudre à distance. Ainsi l'organisme vacciné lutte victorieusement à la fois par phagocytose et par anticorps.

Notez bien que le vaccin ne déclenche les réactions de défense que contre l'espèce microbienne qui a servi à le préparer. On dit que l'immunité vaccinale est spécifique - (contre une espèce). Ainsi le vaccin du charbon ne protège pas contre le bacille typhoïdique ou le bacille diphtérique.

Les connaissances modernes sur le vaccin

L'analyse des souches pastoriennes montrent quelles sont pXO1 - /pXO2 +, donc toxines - / capsule +.

Des souches vaccinales chinoises ou russe sont de pXO1 + /pXO2 -, donc toxines + / capsule -.

Il semble donc que l'immunogénicité soit liée à la perte d'une des deux fonctions. La culture à 42°C empêche la sporulation donc évite le maintien dans la souche de clones normaux, et déclenche un signal de stress qui induit la perte d'un des plasmides ou des deux. La littérature consultée manque de clarté quant aux mécanismes....

Immunité naturelle

Certains animaux ou certains sujets présentent spontanément une résistance particulière à la maladie. On dit qu'ils ont une immunité naturelle ou spontanée. Ainsi les Oiseaux sont réfractaires au charbon. Cette immunité se manifeste de la même façon que l'immunité acquise. Une poule inoculée avec une culture de bacilles charbonneux montre une phagocytose active.

Les mauvaises conditions hygiéniques entraînent une diminution des défenses naturelles et la disparition de l'immunité.

Pasteur a prouvé qu'une poule, inoculée avec une culture de bacilles charbonneux auxquels elle est réfractaire, contracte la maladie si on la refroidit par un bain prolongé: la poule meurt du charbon et son sang est envahi par la bactérie.

Vous connaissez d'ailleurs le rôle du refroidissement sur le déclenchement des infections microbiennes: rhumes, bronchites, pneumonies, pleurésies, tuberculose, etc... Le surmenage, les intoxications (alcoolisme) agissent de même en paralysant la défense naturelle de l'organisme.

Conclusions

Quatre notions importantes se dégagent de cette première étude des maladies contagieuses:

1° Les maladies sont contagieuses parce qu'elles sont microbiennes.

2° Une espèce animale peut présenter une immunité naturelle vis-à-vis d'un microbe.

3° La vaccination confère une immunité acquise à un individu réceptif.

Un vaccin est une culture microbienne atténuée dont l'inoculation donne une maladie bénigne qui immunise contre la maladie virulente. (définition à prendre au premier degré et qu'il convient évidemment de compléter !)

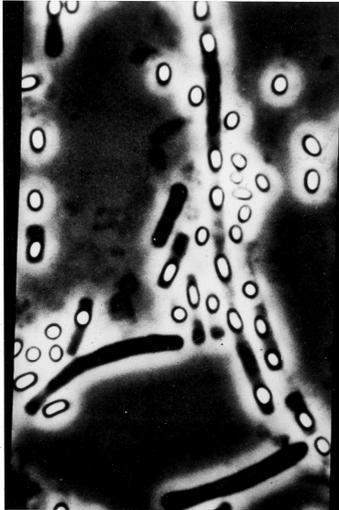
4° L'immunité est le résultat d'une active phagocytose et d'une abondante sécrétion d'anticorps.

Bacillus anthracis, agent causal de l'anthrax (article de L'OPÉRON N°6 par Frédéric GIRARD)

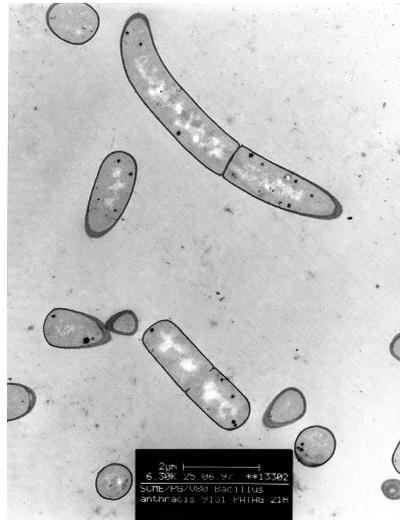
Bacillus anthracis est le pathogène le plus remarquable du genre *Bacillus*, responsable d'une maladie spécifique : l'anthrax ou maladie du charbon, pathologie essentiellement animale qui touche particulièrement les bovins et les ovins. Cette maladie est transmissible accidentellement à l'Homme, par contamination au contact de ces animaux, ou après manipulation des cadavres d'animaux, laines, peaux, cuirs contenant des spores (maladie des trieurs de laine).

ymagier : (photographies gracieusement transmises pour l'Opéron par l'Institut Pasteur)

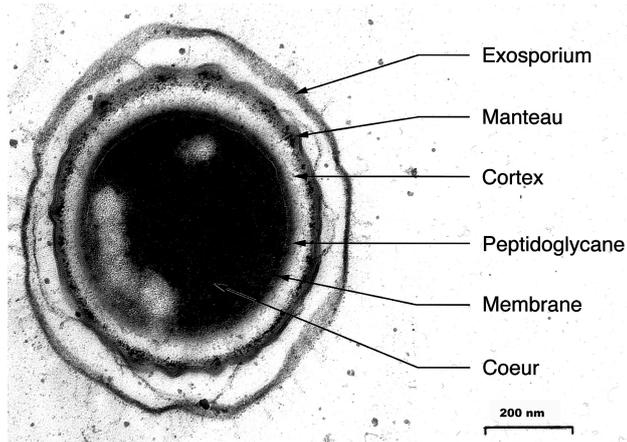
spores au microscope optique



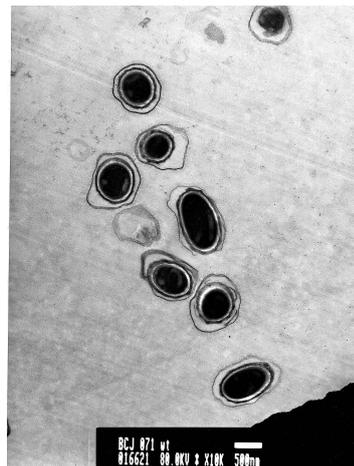
formes végétatives au microscope électronique à transmission



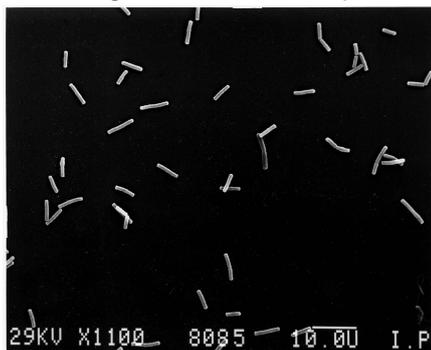
spore au microscope électronique à transmission



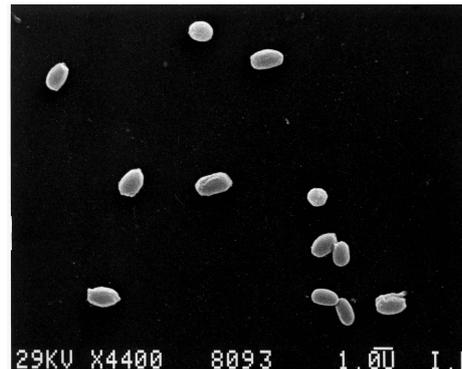
spores au microscope électronique à transmission



formes végétatives au microscope électronique à balayage



spores au microscope électronique à balayage



Éléments de pathologie

Pathologie chez l'animal

Les animaux les plus souvent atteints sont les moutons, les chevaux et les bovins. Ils se contaminent en mangeant de l'herbe ou du fourrage souillés par des spores de *B. anthracis*. Ces spores pénètrent dans les tissus à la faveur le plus souvent d'une plaie buccale. Dans les tissus, les conditions environnementales étant favorables, les spores germent et donnent des bacilles encapsulés qui se multiplient et colonisent dans un premier temps les ganglions lymphatiques afférents. Cette colonisation n'est que passagère et les bactéries infectent rapidement tous les tissus et organes de l'organisme, et la septicémie tardive est d'un pronostic sombre. Le signe le plus évocateur du charbon est l'exudation par les orifices naturels d'un sang noir, poisseux et incoagulable. La mort survient rapidement (quelques heures chez le mouton, quelques jours chez le cheval ou le boeuf). Chez le mouton les signes cliniques sont remarquables : la septicémie est très rapide, et l'animal malade tombe foudroyé, rejetant par les naseaux un mucus sanguinolent. À l'autopsie, on trouve un sang noir et poisseux où fourmillent les germes. La rate est très grosse et noirâtre (d'où le nom de "charbon" donné à cette maladie).

Tous les symptômes et manifestations physiopathologiques sont dus à l'action de toxines produites par *Bacillus anthracis*.

Pathologie chez l'Homme

- le charbon cutané : 95% des cas. L'infection de l'Homme, à l'inverse de celle des animaux qui se fait essentiellement par voie digestive, se réalise le plus souvent par voie cutanée à la faveur d'une plaie. On observe une simple pustule charbonneuse au point de pénétration du bacille, le plus souvent situé sur les mains, les bras ou la face. En l'absence de traitement 10 à 20% des cas sont mortels.
- le charbon pulmonaire : Par inhalation des spores. Forme grave, souvent mortelle.
- le charbon gastro-intestinal : Par ingestion de viande contaminée.
- la méningite charbonneuse : En complication d'une septicémie, ou lors d'une pénétration directe du germe dans le liquide céphalo-rachidien à la faveur d'une plaie à la tête.

Principales toxines produites par *Bacillus anthracis*

Les toxines excrétées par *Bacillus anthracis* sont un exemple de toxines multiprotéiques. Trois chaînes protéiques sont excrétées séparément dans le milieu :

	Masse molaire
Facteur EF (Anthrax Edema Toxin) toxine oedématogène ayant une activité adényl cyclase en présence de calmoduline.	89 Kg.mol ⁻¹
Facteur PA (Protective Antigen): facteur antigène protecteur.	85 Kg.mol ⁻¹
Facteur LF (Anthrax Létal Toxin): facteur létal	83 Kg.mol ⁻¹

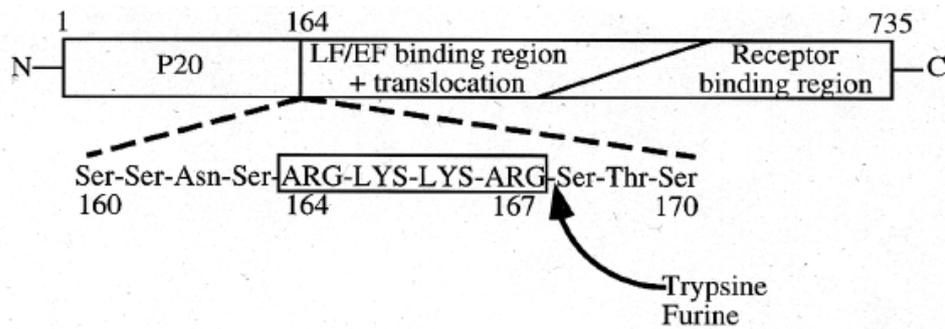
Les gènes codant les protéines EF, PA et LF, respectivement notés *cya*, *pag* et *lef*, sont retrouvés dans un plasmide de 184 kpb noté plasmide pXO1.

Les trois protéines sont inactives séparément, et leur association deux à deux conduit à l'obtention de deux toxines binaires de type AB :

- la toxine oedématogène formée par l'association PA + EF;
- la toxine létale formée par l'association PA + LF.

L'action de ces deux toxines binaires implique une reconnaissance des cellules cibles, médiée par le facteur PA, suivie d'une endocytose et d'une libération dans le cytoplasme des toxines actives EF et LF.

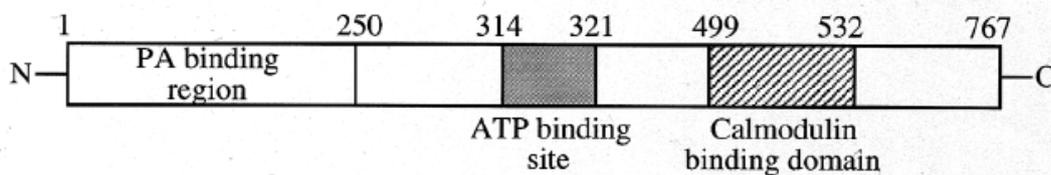
Protective Antigen (PA)



La protéine PA est indispensable à l'internalisation des toxines LF et EF à l'intérieur des cellules eucaryotes. PA est une protéine de 735 acides aminés, à l'intérieur de laquelle peuvent être identifiés plusieurs domaines fonctionnels :

- La région carboxy-terminale est responsable de la liaison au récepteur membranaire présent à la surface des cellules cibles.
- La liaison PA-récepteur est suivie de la protéolyse limitée du facteur PA par une protéase cellulaire ayant une spécificité de type furine. Cette protéolyse limitée consiste en l'hydrolyse de la liaison entre les acides aminés 167 et 168 et aboutit à la libération dans le milieu extérieur d'un fragment de 20 000 g.mol⁻¹ noté P20. Ce clivage est obligatoire pour permettre la fixation du facteur EF ou du facteur PA. L'extrémité C terminale, fragment de masse molaire 63Kg.mol⁻¹ et notée PA63, reste associée au récepteur membranaire.
- PA63 peut lier avec une forte affinité soit la toxine EF soit la toxine LF. La liaison EF/PA63 ou LF/PA63 sera suivie d'une endocytose médiée par récepteur et de l'internalisation de la toxine EF ou LF.

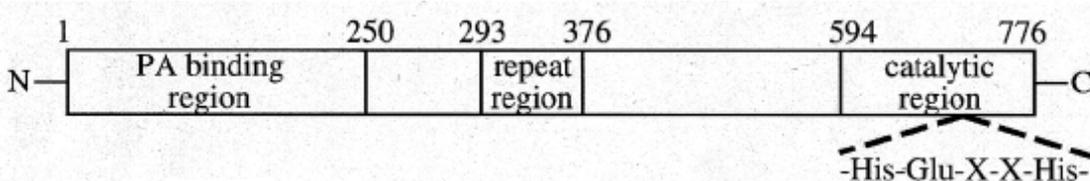
Anthrax Edema Toxin (facteur EF)



L'anthrax Edema Toxin est une toxine à activité adényl cyclase calmoduline dépendante, caractérisée initialement comme responsable d'oedèmes chez le cobaye suite à l'injection intradermique. L'EF peut être internalisée, suite à la liaison au facteur PA63, dans de très nombreux types de cellules eucaryotes. L'activité adényl cyclase du facteur EF conduit à l'augmentation importante de la concentration en AMPc intracellulaire (plus de 1 000 fois in vitro sur les cellules les plus sensibles en culture) et à une activation incontrôlée des kinases AMPc dépendantes. Plusieurs domaines fonctionnels sont identifiés :

- Présence d'une région N terminale de 250 acides aminés impliquée dans la liaison au facteur PA63. Cette région présente une forte homologie de séquence avec la région 1 à 250 du facteur LF, région impliquée dans la liaison du facteur LF au facteur PA63.
- Présence d'une région ATP binding site entre les acides aminés 314 à 321.
- Présence d'une région de liaison à la calmoduline, région située entre les acides aminés 499 et 532. L'activité adényl cyclase du facteur EF est strictement dépendante en ions Ca²⁺ et en calmoduline.

Létal Toxin (LF)



La toxine létale de *Bacillus anthracis* est directement responsable des symptômes de choc septique observés lors des infections systémiques. La cible essentielle du facteur LF semble être les macrophages, et l'activité intracellulaire de ce facteur conduit à la surexpression des cytokines d'alarmes ou cytokines pro-inflammatoires que sont l'interleukine 1, le TNFalpha et l'interleukine 8.

Le facteur LF est une enzyme de 776 acides aminés, récemment identifiée comme étant une métalloprotéase à Zn²⁺. Le facteur LF contient notamment à l'extrémité C terminale la séquence consensus His-Glu-X-X-His, retrouvée chez les métalloprotéases à Zn²⁺ comme les neurotoxines tétanique et botulinique ainsi que la thermolysine. Dans cette séquence pentapeptidique les deux résidus His sont impliqués dans la chélation de l'ion Zn²⁺, le résidu Glu intervenant comme nucléophile lors du clivage de la liaison peptidique cible. Les substrats intracellulaires de la toxine létale n'ont toujours pas été caractérisés. Plusieurs domaines fonctionnels ont pu être caractérisés à l'issue de travaux de mutagenèse dirigée :

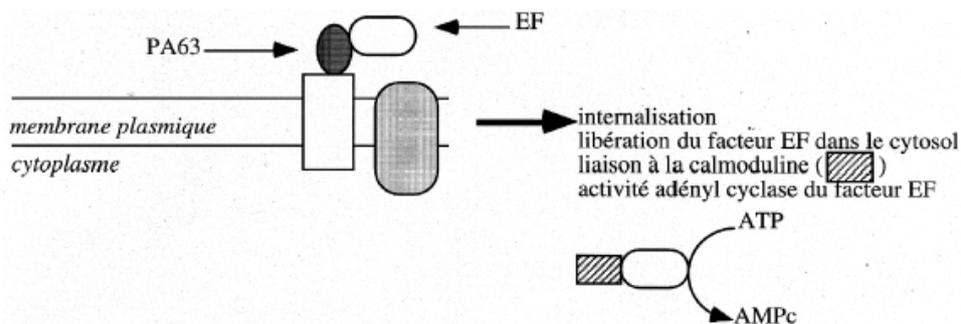
- Présence d'une région N terminale de 250 acides aminés impliquée dans la liaison au facteur PA63. Cette région présente une forte homologie de séquence avec la région 1 à 250 du facteur EF, région impliquée dans la liaison du facteur EF au facteur PA63.
- Présence d'une région répétée entre les acides aminés 293 à 376, dans laquelle sont retrouvées quatre séquences répétées de sept acides aminés.
- La région catalytique à activité métalloprotéase est située à l'extrémité C terminale du LF, entre les acides aminés 594 et 776.

Mode d'action des toxines binaires de *Bacillus anthracis*

4-1) Caractérisation du récepteur cellulaire au PA

Le récepteur cellulaire au PA est un récepteur ubiquitaire, non encore caractérisé. Les travaux de GORDON en 1989 ont montré que ce récepteur était une protéine d'une masse molaire d'environ 90 Kg.mol⁻¹, retrouvée à environ 50 000 unités sur la lignée cellulaire L-6 de myoblastes de rat.

4-2) Clivage protéolytique du facteur PA, obtention du facteur PA63



La protéolyse limitée du facteur PA est essentielle à l'activité toxique des facteurs EF et LF. Le clivage est réalisé par une protéase membranaire de la cellule cible, entre les acides aminés Arg167 et Ser168 de la chaîne protéique. L'importance de ce clivage est clairement démontrée par l'absence totale de toxicité de protéines PA délétées en ces deux résidus.

Les données les plus récentes concernant cette protéase l'identifient comme une protéase de la famille des furines, famille impliquée dans l'export post-traductionnel de certains précurseurs de protéines. Le fragment P20 libéré n'a aucune fonction connue; le fragment PA63 reste lié au récepteur membranaire, et devient apte à fixer soit le facteur EF soit le facteur LF.

4-3) Fixation, translocation et activité des facteurs EF et LF

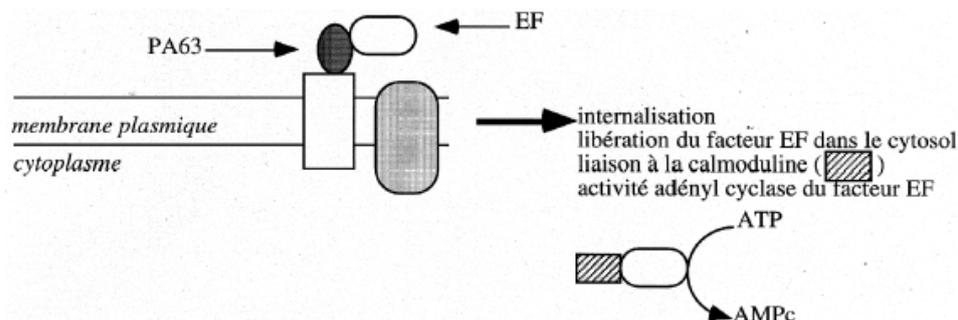
La liaison d'un des deux facteurs EF ou LF au facteur PA63 est suivie de l'endocytose du complexe. Lors de l'acidification de l'endosome le facteur PA63 subit des changements conformationnels induisant une oligomérisation de sept unités du facteur PA63 et la formation d'un pore à activité transport facilité de cations, notamment K⁺. Par des mécanismes encore inconnus, l'acidification de l'endosome conduit à la translocation des facteurs EF et LF dans le cytosol. Il est probable que le mécanisme de translocation soit analogue à celui proposé pour la toxine diphtérique.

Le facteur LF présente une activité métalloprotéase à Zn²⁺ dont les substrats sont encore inconnus. La létalité importante du facteur LF provient du fait que les principales cellules cibles sont les macrophages. L'exacerbation de l'activité des macrophages par le facteur LF conduit à la surproduction des cytokines pro-inflammatoires IL1, TNFalpha et IL8. L'activité incontrôlée de ces cytokines d'alarme entraîne l'apparition d'un choc septique mortel.

Le facteur EF présente une très forte activité adényl cyclase calmoduline dépendante, conduisant à une production non contrôlée d'AMPc, second messager intracellulaire essentiel. Ceci entraîne à une exacerbation de l'activité des protéines kinases AMPc dépendantes.

In vitro les paramètres cinétiques du facteur EF sont les suivants : $KM Mg^{2+}\text{-ATP} = 0,16 \text{ mmol.dm}^{-3}$;

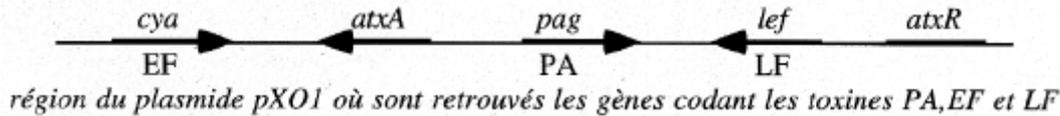
Activité spécifique massique = $12 \text{ mmol AMPc.min}^{-1}.\text{mg enzyme}^{-1}$.



Contrôle génétique de la synthèse des toxines de *Bacillus anthracis*

Les principaux facteurs de virulence de *Bacillus anthracis* sont portés par deux plasmides :

Le plasmide pXO1 (184 kpb) :



contient les gènes *lef*, *pag* et *cya*. Le gène *cya* code le facteur EF, le gène *pag* le facteur PA, le gène *lef* le facteur LF.

Sur le plasmide pXO1 les trois gènes codant les toxines et deux gènes régulateurs sont localisés dans une région de 20 kpb. Les mécanismes de régulation ne sont pas encore totalement caractérisés. Les données actuelles sont les suivantes :

- la protéine codée par le gène *atxA* est un facteur activateur de la transcription des gènes codant les toxines.
- la protéine codée par le gène *atxR* est un facteur à fonction répresseur.

Le plasmide pXO2 (97 kpb) :

contient les gènes B, C, A codant les enzymes intervenant dans la synthèse de la capsule, capsule formée d'un polymère d'acide glutamique. Seules les souches de *Bacillus anthracis* exprimant simultanément les plasmides pXO1 et pXO2 sont des souches pleinement virulentes. La capsule joue un rôle essentiel dans les premières étapes de l'infection, en limitant l'opsonisation et la phagocytose.

Traitements et prophylaxie

1) Traitements chez l'animal

Une fois la maladie déclarée l'abattage est la règle absolue. Les carcasses sont ensuite détruites par incinération ou par enfouissement dans une fosse recouverte de chaux vive, afin d'éviter toute propagation des bacilles. L'incinération est la méthode la plus efficace, mais elle coûte cher. L'enfouissement peut être à l'origine de terres fortement contaminées par *Bacillus anthracis*. Les bêtes saines, ainsi que l'ensemble des personnes en contact avec les animaux malades, sont vaccinées. Tous les locaux ayant hébergé des animaux malades sont désinfectés. La loi interdit toute vente de produits dérivés (viandes, peaux, laines..) provenant d'animaux contaminés.

2) Traitements chez l'Homme

- En cas d'escarre bénigne on utilise habituellement chez l'adulte la pénicilline G (1 million d'unités par jour par voie musculaire pendant 5 jours).
- En cas d'allergie à la pénicilline il est possible d'utiliser l'érythromycine ou la tétracycline.
- En cas d'attaque interne la pénicilline G est utilisée par voie veineuse à haute dose (20 millions d'unités par jour chez l'adulte). On peut associer une sérothérapie à base de sérum anticharbonneux de cheval.?

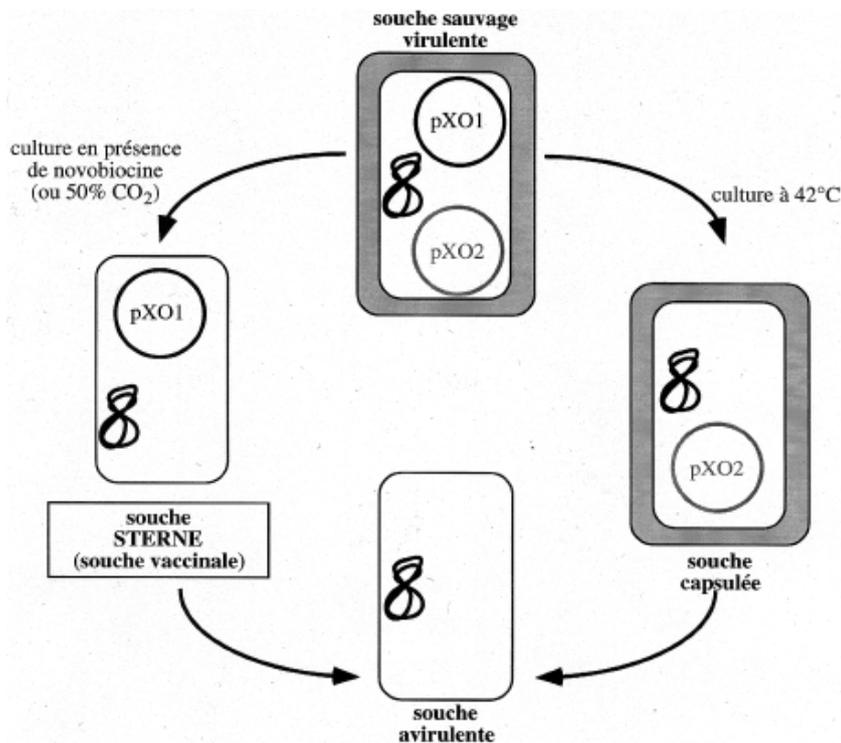
3) Prophylaxie

La vaccination est la seule prophylaxie véritablement efficace. Le vaccin permettant une protection contre *Bacillus anthracis* est un vaccin vivant, utilisant une souche atténuée. Historiquement ce fut le premier vaccin, élaboré par Pasteur en 1887. La souche atténuée est obtenue en cultivant *Bacillus anthracis* à 42°C. La culture à cette température présente deux avantages :

- elle empêche la sporulation;
- elle déclenche un signal environnemental de stress, signal qui induit la perte des plasmides par *Bacillus anthracis*. Si les deux plasmides pXO1 et pXO2 sont perdus la souche est alors non virulente et non protectrice. La perte de pXO1 seulement conduit à l'obtention d'une souche capsulée, non virulente mais qui n'induit pas de protection. Le but recherché est donc une perte uniquement du plasmide pXO2, plasmide portant les gènes codant les protéines de capsule. La souche est alors non virulente et induit une protection contre les toxines. Les études ultérieures ont cependant montré que lors d'une culture de *Bacillus anthracis* à 42°C on enregistre le plus souvent la perte du plasmide pXO1.

Le vaccin développé par Pasteur présentait l'inconvénient majeur de pouvoir être encore virulent pour l'animal. À l'heure actuelle le vaccin atténué vivant utilisé est la souche Sterne de *Bacillus anthracis*, acapsulogène (pXO2-) mais toxinogène (pXO1+). Le vaccin se présente sous la forme d'une suspension de spores en eau physiologique-glycérol 50% -saponine 0,05%. L'animal est immunisé par voie sous-cutanée ou intradermique. Ce vaccin n'est pas d'une totale innocuité et de nombreux effets secondaires sont observés, fièvre, oedème, asthénie. Par ailleurs l'immunité conférée est de courte durée (environ un an), ce qui nécessite des rappels réguliers chez les animaux en zone endémique.

Un vaccin acellulaire, réservé pour le moment à l'utilisation humaine, est aussi disponible à l'heure actuelle. Seule la protéine PA est injectée par voie intramusculaire avec de l'hydroxyde d'alumine (alun), seul adjuvant autorisé chez l'Homme. L'efficacité protectrice de ce vaccin acellulaire a été testée sur le cobaye et sur le bétail et elle apparaît significativement inférieure à celle du vaccin vivant atténué.



Bacillus anthracis et guerre biologique

Les critères requis pour qu'une bactérie puisse devenir une arme biologique ont été définis par Théodore ROSEBURY en 1949. Ces critères sont les suivants :

- un faible seuil infectieux;
- une virulence élevée, provoquant une maladie aiguë, mortelle ou incapacitante;
- un pouvoir pathogène stable pendant la fabrication, le stockage et le transport;
- une période d'incubation courte;
- une faible contagiosité pour éviter l'effet boomerang contre l'attaquant;
- une absence de vaccin ou d'immunité acquise contre cet agent dans la population cible, associée à l'existence d'une protection possible contre cet agent pour les troupes attaquantes (vaccin, antibiothérapie, vêtements protecteurs, masques);
- une résistance de la bactérie aux antibiotiques utilisés classiquement;
- la capacité à supporter l'aérosolisation;
- la capacité à résister aux conditions de l'environnement lors de la dispersion (chaleur, lumière, dessiccation, explosion) pendant un temps assez long pour infecter la population cible;
- un transport facile et la capacité à survivre lors du stockage et de la dispersion sur le champ de bataille.
- un coût de production faible.

Bacillus anthracis est le prototype de l'agent bactériologique militarisable car il répond à l'ensemble des critères de ROSEBURY : il se cultive facilement sur des milieux simples et peu onéreux; il possède un fort pouvoir pathogène (un gramme de spores peut tuer 10 millions de personnes, soit une dose létale 50 d'environ 8000 spores par voie nasale); l'anthrax est relativement peu contagieux; les spores résistent à l'explosion d'une bombe et aux ultraviolets, forment un aérosol stable. Le problème principal est celui de la persistance de la contamination sur les terrains cibles.

Bibliographie

- " Physiopathologie moléculaire de la maladie du charbon "; J.-C SIRARD, M. MALVILLE, A. FOUET & M. MOCK. Revue Méd. Vét. 1996, 147, 10, 653-670.
- " Bacillus anthracis et guerre biologique "; F. RAMISSE, E. HERNANDEZ & J.-L. GOASDOUE. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 1998, 13, 2, 145-150.
- " Armes biologiques : du nouveau, hélas "; T. BARTFAI & B. RYBECK. Biofutur 1998, 178, 14-26.
- " Are bacterial exotoxins cytokine network regulators ? "; B. HENDERSON, M. WILSON & B. WREN. Trends in Microbiology, 1997, 5, 11, 454-457.
- Manuel de Bactériologie Clinique (tome 2); J. FRENEY, F. RENAUD, W. HANSEN & C. BOLLET. Elsevier.
- Médecine Interne, HARRISON (treizième édition).

Photographies

- Photothèque de l'Institut Pasteur (couverture 1 et 2, sommaire, 4).
- Stéphane Mesnage, Docteur en microbiologie, Institut Pasteur (couverture 4, 2-3, 9 : photographies aimablement communiquées).

LE CHARBON par Henri MONTEIL, institut de bactériologie, faculté de médecine, 67000 STRASBOURG

(Texte de conférence pour le centenaire de l'Institut Pasteur par Henri MONTEIL)

Au milieu du XIX^{ème} siècle une maladie mortelle, le charbon (anthrax), continue à s'acharner sur le cheptel ovin sans épargner équidés et bovidés. Il s'ensuit pour l'agriculture française une perte moyenne annuelle de 15 millions de francs germinal. Sous le nom de pustule maligne, ce mal étend ses funestes conséquences aux êtres humains les plus particulièrement en contact avec les animaux contagieux. Le ministre de l'agriculture demande à PASTEUR de se pencher sur cette calamité qui avait déjà fait l'objet de recherches scientifiques sérieuses mais demeurées sans résultats pratiques.

L'an 1850 donne le signal de départ aux études consacrées au charbon. Cette année-là, un professeur à l'école d'Alfort, DELAFOND, observe les " corps particuliers du sang (d'un animal) charbonneux ", principalement des filaments.

D'autres chercheurs vont plus loin. Le professeur RAYER, ancien médecin de Louis-Philippe, rend compte à l'Académie des Sciences qu'à l'occasion de recherches qu'il a entreprises avec son élève DAVAINÉ sur la maladie du sang de rate ou charbon, il a observé dans le sang d'un mouton atteint de cette affection des " petits corps filiformes ayant environ le double en longueur du globule sanguin ". DAVAINÉ ne se soucia guère de cette découverte. C'est seulement à la lecture de la communication de PASTEUR sur l'acide butyrique (1861) qu'il se rappela ses études entreprises sur le charbon avec RAYER en 1850.

De cette communication il ressort que la fermentation butyrique est provoquée par des ferments vivants, vibrions analogues à ceux que l'on trouve dans le sang charbonneux. DAVAINÉ se demandait si les vibrions de la fermentation butyrique (due à *Clostridium butyricum* : le ferment butyrique) inoculés à un animal ne joueraient pas le rôle de ferment quand, en 1863, un médecin de Dourdan lui envoya du sang charbonneux. Il y retrouva les vibrions de 1850 auxquels il attribua la cause du mal. Il leur donna le nom de bactériidies charbonneuses. En 1864 deux professeurs au Val de Grâce, JAILLARD et LEPLAT, contestent le bien fondé des conclusions de Davainé. Après plusieurs péripéties ces deux médecins inoculent du sang de vache charbonneux à des lapins. Les lapins meurent, mais le sang est indemne des bactériidies (ou bactéries). Celles-ci ne causent donc pas de maladie charbonneuse. " Vous n'avez pas inoculé le charbon ", réplique DAVAINÉ à ses contradicteurs. Les deux professeurs du Val de Grâce renouvellent alors leurs expériences avec du sang de mouton charbonneux. Mêmes résultats.

Au moment où DAVAINÉ rend les armes, Paul BERT lui donne le coup de grâce. Le biologiste auxerrois affirme en effet qu'il peut faire périr la bactériidie dans sa goutte de sang par de l'oxygène comprimé, inoculer ce qui reste et reproduire ainsi la maladie et la mort en l'absence de la bactériidie. Il s'ensuit que la bactériidie n'est ni la cause ni l'effet de la maladie, attribuée dès lors à un virus inconnu. La même année, en 1876, un jeune médecin allemand, le docteur KOCH, démontre que les microorganismes observés par DAVAINÉ en 1850 avaient un double mode de reproduction, soit par scission, soit par formation dans le bâtonnet de corpuscules brillants ou spores qui se séparent et constituent des amas de points paraissant inertes.

PASTEUR avait fait la même découverte en ce qui concerne le vibron de la fermentation butyrique. Lors de ses études sur les maladies des vers à soie il avait démontré que les corpuscules brillants peuvent subir une dessiccation prolongée sans périr. En définitive, les études sur le charbon débouchaient dans une impasse. PASTEUR s'intéresse au problème. Il ensemence une goutte de sang charbonneux dans de l'urine stérilisée. Cette goutte donne naissance en quelques heures à des myriades de bactériidies. PASTEUR renouvelle ces cultures jusqu'à ce que la bactériidie soit débarrassée de substances étrangères (1877 en collaboration avec Joubert).

Il injecte alors quelques gouttes de la dernière culture sous la peau d'un lapin ou d'un mouton et ceux-ci meurent du charbon en deux ou trois jours. La cause était entendue : le charbon est la maladie provoquée par la bactériidie. Davainé avait raison. Mais comment expliquer dès lors que Jaillard et Leplat aient provoqué la mort de lapins par l'inoculation de sang charbonneux sans découvrir la bactériidie dans le sang des lapins morts? Comment expliquer également que Paul Bert ait tué la bactériidie contenue dans une goutte de sang charbonneux en la soumettant à l'oxygène comprimé et que cette goutte débarrassée de son parasite conserve sa virulence ?

Cette situation apparemment inextricable pique la curiosité de PASTEUR. Il savait depuis ses études sur les ferments que ceux de la putréfaction sont des anaérobies qui vivent à l'abri de l'oxygène. Après la mort ces anaérobies pénètrent dans le sang, désormais privé d'oxygène, des veines mésentériques puis dans divers organes. De tous ces microbes, il en est un, découvert par PASTEUR, le vibron septique, plus pressé que les autres d'attaquer le cadavre. L'impatience de ce vibron explique que, douze à vingt heures après la mort, selon la température ambiante, le sang d'un animal charbonneux dans lequel pullule la seule bactériidie du charbon, devient en outre la proie du vibron septique.

L'oxygène du sang non renouvelé par l'action des poumons disparaît progressivement et entraîne dans sa disparition celle des bactéries aérobies avides de ce gaz cependant que les vibrions anaérobies occupent le terrain à leur place.

De ces constatations PASTEUR déduisit que si l'on inoculait du sang charbonneux prélevé moins de quinze heures environ après la mort, selon la température ambiante, on provoquerait la mort par le charbon de l'animal inoculé (1877 en collaboration avec JOUBERT). En revanche, si l'on prélève du sang d'un animal charbonneux plus de quinze heures après sa mort pour l'inoculer à un animal, cet animal meurt de septicémie, exceptionnellement de l'une et l'autre maladie.

Ainsi PASTEUR expliquait l'apparente contradiction entre les faits observés par DAVAINÉ puis par JAILLARD et LEPLAT. Aucun n'avait entièrement tort. Davaine qui avait inoculé du sang prélevé moins de quinze heures après la mort de l'animal, provoqua la mort de l'animal inoculé par le charbon. En inoculant du sang prélevé trop tard, JAILLARD et LEPLAT avaient provoqué la mort non par le charbon mais par septicémie. Il restait à PASTEUR une dernière question à élucider, celle que posait l'expérience de Paul BERT. PASTEUR en découvrant pendant cette période le mode de reproduction du vibron septique démontra que les conclusions de son ami Paul Bert étaient exactes, mais incomplètes.

En effet les vibrions septiques se reproduisent par scissiparité ou par sporulation. Par scissiparité : le bâtonnet, en se séparant en deux parties, fait naître deux nouveaux bâtonnets. Par sporulation : les vibrions entretiennent leur espèce par des points brillants ou spores dont ils sont parsemés. Ces spores qui ont la vie dure supportent l'épreuve de l'oxygène comprimé et peuvent subsister pendant longtemps dans l'atmosphère (on sait depuis que le vibron septique de PASTEUR et JOUBERT est *Clostridium septicum*, bactérie anaérobie stricte impliquée, entre autres, dans les gangrènes gazeuses). Or, le sang utilisé par Paul BERT était certes charbonneux mais déjà septique. Par la compression de l'oxygène Paul Bert avait tué les bactéries du charbon et les bâtonnets du vibron septique, mais non les spores de celui-ci. PASTEUR était parvenu en effet à cultiver les vibrions à l'abri de l'oxygène soit sous vide, soit sous gaz carbonique. Dans le cas du sang charbonneux cette méthode avait l'avantage de séparer des bactéries aérobies du charbon, les vibrions anaérobies qui seuls survivaient.

Des résultats aussi concluants qu'inattendus ne suffisent pas à PASTEUR qui désormais entreprend de circonscrire le milieu favorisant de la bactérie charbonneuse. Il constate que plusieurs animaux sont plus ou moins réfractaires au charbon. Les gallinacées le sont totalement. Il remarque que la culture de la bactérie du charbon est impossible quand elle se pratique à une température de 44°C. Or, la température des oiseaux oscille entre 41°C et 42°C. Alors Pasteur se pose la question de savoir si le motif pour lequel les poules sont réfractaires au charbon ne serait pas simplement tiré du fait que leur température est voisine de celle qui ne convient plus à la culture de la bactérie charbonneuse. La résistance vitale des poules ne compenserait-elle pas l'écart réduit de 42°C à 44°C ?

En se posant ces questions PASTEUR (en collaboration avec JOUBERT et CHAMBERLAND) eut l'idée d'abaisser la température d'une poule de 42°C à 37°C en la maintenant dans de l'eau à 25°C. La poule ainsi refroidie fut alors inoculée avec du sang charbonneux. Elle mourut dans les 48 heures, le sang infesté de bactéries charbonneuses. Inversement PASTEUR inocula une poule refroidie et, au moment où les premières atteintes du mal qui aurait dû l'emporter se révélèrent, il la réchauffa et la mourante reprit vie. L'examen de son sang ne révéla aucune présence de bactéries charbonneuses. Celles-ci avaient péri, victimes de l'élévation de la température.

Le charbon appelait encore l'examen de deux derniers points : la prévention de la maladie et son étiologie. Pourquoi, se demandaient PASTEUR et ses collaborateurs, la méthode qui avait si bien réussi pour découvrir le vaccin du choléra des poules ne permettrait-elle pas d'en faire autant pour le vaccin du charbon ? Un obstacle barrait la route des chercheurs. Ils ignoraient si le charbon récidivait ou non. En cas de récurrence établie, la poursuite des recherches devenait inutile. Une fois encore la fortune sourit au laboratoire de la rue d'Ulm qu'elle tira de sa perplexité. Au début de 1879, le ministre de l'agriculture demande à Pasteur son avis sur un traitement anti-charbonneux des bovidés mis au point par M. LOUVRIER, vétérinaire dans le Jura. Accompagné de son collaborateur CHAMBERLAND, PASTEUR se rend sur le terrain en juillet 1879. Il fait inoculer un lot de vaches avec une forte dose de bactéries charbonneuses virulentes. La moitié des vaches inoculées est soumise au traitement de M. LOUVRIER. L'autre moitié ne reçoit aucun soin. Il y eut des rescapées dans l'un et l'autre camp.

Note sur la récurrence de l'affection charbonneuse (Compte Rendu de l'Académie des Sciences, 27 Septembre 1880) : " sur la valeur d'un procédé de guérison du charbon des vaches, imaginé par un habile vétérinaire du Jura, M. LOUVRIER. M. CHAMBERLAND a bien voulu s'adjoindre à moi pour ces recherches, et c'est en mon nom et au sien que j'en communique à l'Académie les résultats. Le procédé de M. Louvrier a été décrit dans le Recueil de médecine vétérinaire de notre confrère M. BOULEY. L'auteur s'efforce de maintenir l'animal à une température élevée par des frictions, par des incisions à la peau dans lesquelles il introduit un liniment à la térébenthine, enfin en recouvrant l'animal, la tête exceptée, d'une couche épaisse de 20 centimètres de regain, préalablement humecté de vinaigre chaud, qu'on retient par un drap qui enveloppe tout le corps. "

Si l'expérience ainsi tentée révélait l'inefficacité du traitement, elle présentait au moins l'avantage de mettre à la disposition de PASTEUR des vaches qui, après avoir été très gravement atteintes du charbon, en étaient guéries. Après leur guérison on les réinocula avec une dose semblable à la précédente. Aucune vache ne contracta le charbon, dont PASTEUR venait de prouver ainsi qu'il ne récidivait pas.

La route était dès lors ouverte pour l'étude d'un vaccin. Une difficulté non rencontrée à l'occasion des travaux sur le choléra des poules se présenta aux chercheurs auxquels PASTEUR venait d'adjoindre M. ROUX. Contrairement au mode unique de reproduction du microbe du choléra des poules, la bactérie charbonneuse se perpétue par scissiparité et par sporulation ainsi qu'il a été déjà précisé. Dans la culture, au contact de l'air, les bâtonnets se reproduisent d'abord par scissiparité. Dans un délai de 24 heures la sporulation commence et les bâtonnets tendent à disparaître. Les spores survivent et si l'on repique alors la culture les spores germent et donnent naissance à des bâtonnets. Les spores de la bactérie du charbon peuvent supporter pendant des

années le contact de l'air sans perdre leur virulence. Comment dès lors appliquer à la bactériémie du charbon la méthode d'atténuation de la virulence du bacille du choléra ?

Pasteur raisonna par analogie. Il se prévalut de la similitude qui existe entre les bâtonnets filamenteux de la bactériémie et ceux du bacille du choléra pour en déduire qu'il serait possible d'atténuer la virulence de la bactériémie du charbon au stade des bâtonnets de la même manière qu'il avait atténué celle du bacille du choléra des poules. Mais il fallait alors s'efforcer de maintenir en vie les bâtonnets du charbon en empêchant la naissance des spores. Pour ce faire, il convenait de tenir compte de l'importance du facteur "température" sur la culture de la bactériémie charbonneuse. Au delà de 44°C cette culture est impossible. À 42°C elle est aisée et la bactériémie ne produit plus de spores. Il est donc possible de conserver au contact de l'air pur à 42°C une culture de bactériémies charbonneuses sous forme de bâtonnets sans la présence de spores.

Dans ces conditions la virulence s'atténue progressivement en attendant la mort de la culture qui intervient dans un délai de quelques semaines. Pasteur décida d'éprouver sur des moutons la valeur vaccinnante d'une culture dont la virulence avait été atténuée par un vieillissement de 44 jours au contact de l'air pur à une température de 42°C.

Au jour J, il inocule 25 moutons avec 5 gouttes de cette culture. Les moutons résistent. Au jour J + 7, il les inocule avec 5 gouttes d'une culture vieille de 8 jours. Les 25 moutons résistent encore mais l'inoculation de cette culture tue un " mouton neuf ". Au jour J + 21, Pasteur inocule une culture fraîche donc très virulente aux 25 moutons vaccinés et à 25 moutons témoins. Les vaccinés résistent toujours, les autres succombent.

Quand, le 28 février 1881, Pasteur annonça cette découverte sans précédent à l'Académie des Sciences, il y déclara l'enthousiasme. La nouvelle se répandit bientôt dans les milieux agricoles. Elle y provoqua une stupéfaction générale teintée d'incrédulité qui le céda rapidement à la curiosité de tenter l'expérience sur le plan pratique. Le baron DE LA ROCHETTE, président de la Société d'Agriculture de Melun, propose à Pasteur de faire une expérience publique de vaccination charbonneuse. Sûr de sa méthode, PASTEUR accepte d'emblée. Le 28 avril, LA ROCHETTE et PASTEUR conviennent de s'accorder sur les clauses suivantes :

1. La Société d'Agriculture de Melun met 60 moutons à la disposition de M. PASTEUR.
 2. 25 moutons ne subiront aucun traitement.
 3. 25 moutons subiront deux inoculations à 12 ou 15 jours d'intervalle par deux bactériémies charbonneuses inégalement atténuées.
 4. Après un nouvel intervalle de 12 à 15 jours, les 25 moutons inoculés et les 25 moutons non inoculés seront inoculés par du charbon virulent. Et Pasteur de prophétiser : les 25 moutons non vaccinés périront tous, les 25 moutons vaccinés résisteront.
 5. À la suite de l'inoculation générale de la bactériémie très virulente on réunira les 50 moutons ainsi traités en distinguant les vaccinés par un trou pratiqué dans l'oreille à l'emporte-pièce.
 6. Les moutons morts seront enfouis dans des fosses séparées, mais groupées dans un enclos palissadé.
 7. Au mois de mai 1882, soit un an après l'expérience, on parquera dans cet enclos 25 moutons neufs, c'est à dire n'ayant jamais fait l'objet d'expériences.
- Ces moutons contracteront le charbon par les germes charbonneux provenant des cadavres enfouis l'année précédente, germes ramenés à la surface du sol par les vers de terre.
8. 25 autres moutons neufs seront parqués sur le terrain contigu à l'enclos contaminé. Aucun d'eux ne mourra du charbon.

On décida d'un commun accord de tenter la même expérience avec dix vaches.

" Ce programme, j'en conviens, confessa PASTEUR à l'Académie des Sciences, avait des hardiesses de prophétie qu'un éclatant succès pouvait seul faire excuser. Plusieurs personnes eurent l'obligeance de m'en faire la remarque, non sans y mêler quelque reproche d'imprudance scientifique ". Il fit taire ces bons apôtres en leur rappelant que la fortune favorise ceux qui osent. Les expériences commencèrent le 5 mai 1881 à Pouilly-Le-Fort, près de Melun, dans la ferme d'un vétérinaire, M. ROSSIGNOL, et se déroulèrent selon le programme convenu.

On inocula ce jour-là, avec la seringue de Pravaz, cinq gouttes de bactériémie charbonneuse atténuée à 24 moutons plus 1 chèvre et 6 vaches par application de la convention ainsi modifiée du 28 avril. Le 17 mai, on réinocula les 31 animaux avec une bactériémie encore atténuée, mais plus virulente que la précédente. Le 31 mai, on injecta aux animaux inoculés et non inoculés la bactériémie très virulente.

Cette inoculation devait juger de l'efficacité des vaccins préventifs administrés les 5 et 17 mai. Cette bactériémie très virulente utilisée le 31 mai provenait, précise PASTEUR, d'une culture régénérée des bactériémies charbonneuses débutée le 21 mars 1877. Le 2 juin, date de l'expiration du délai mortel, devait être révélé au public le succès ou l'échec de la méthode. Si la prophétie de PASTEUR se réalisait, on pourrait, ce jour-là, constater la survie des vaccinés et la mort des non vaccinés. On prit donc rendez-vous pour le 2 juin. Pasteur, jusqu'à lors sûr de lui, c'est à dire de sa méthode, fut soudain en proie à de vives inquiétudes en attendant l'heure fatidique à laquelle lui parviendrait le verdict par voie télégraphique. " Pendant quelques instants, écrit ROUX, sa foi chancela comme si la méthode expérimentale pouvait le trahir ".

Le fatal télégramme expédié de Melun parvient au laboratoire de la rue d'Ulm le 2 juin à 9 heures. On le communique à 9 h 05 à Madame Pasteur qui "passe par toutes les couleurs de l'arc en ciel". C'est le bulletin de la victoire. Pasteur se précipite à la gare de Lyon, accompagné de CHAMBERLAND et de ROUX. Deux cents personnalités l'attendaient à Pouilly-Le-Fort pour acclamer son triomphe. Les 25 moutons non vaccinés étaient déjà morts ou mourants. La chèvre avait succombé. Les vaches non vaccinées plus que dolentes étaient frappées d'œdèmes volumineux, de fièvre violente, d'inappétence totale. Les moutons et les bovidés vaccinés se portaient fort bien. La plupart des vétérinaires jusqu'alors sceptiques étaient muets de stupeur. " Allons ! " dit à l'un d'eux Bouley, Inspecteur Général des Écoles Vétérinaires lui même vétérinaire de grande classe et ami de PASTEUR,

"êtes-vous converti ? Il ne vous reste plus qu'à vous incliner devant le maître et à vous écrier : Je vois, je sais, je crois, je suis désabusé !". Rapidement la France rurale se convertit au vaccin anticharbonneux et dès 1882 on vaccina près de 400 000 animaux.

Le point 7 de la convention PASTEUR-LA ROCHETTE du 28 avril 1881 concernant l'expérience de Pouilly-Le-Fort stipulait qu'en mai 1882 on parquerait 25 moutons dans l'enclos où l'année précédente on avait enfoui les moutons morts du charbon à l'occasion de cette expérience. On prévoyait que ce nouveau lot contracterait le charbon à la suite de l'ingestion des herbes polluées par les spores de la bactérie charbonneuse, remontées des cadavres au sol par les vers de terre.

Comment Pasteur en était-il arrivé à découvrir ainsi l'origine du charbon ? Que venaient donc faire dans cette affaire les vers de terre ? Les réponses à ces questions nécessitent un retour en arrière. En août accompagné de CHAMBERLAND et de ROUX s'était rendu à Saint-Germain la Gâtine, commune située à quelques kilomètres au nord de Chartres. Il y avait acquis un lot de moutons. Le maire de la commune, M. MAUNOURY, propriétaire d'une ferme sise sur le territoire de Saint-Germain, avait mis à la disposition des chercheurs le terrain nécessaire à l'élevage de ces ovins. PASTEUR nourrit son cheptel de luzerne arrosée de cultures artificielles de bactéries charbonneuses et de leurs spores.

L'expérience fut jugée intéressante mais non décisive. Il se résolut alors à mêler, avec de la luzerne, des végétaux piquants également empoisonnés : feuilles de chardon desséchées, barbes d'épis d'orge coupées en petits fragments. Il prévoyait que les moutons se blesseraient légèrement en mangeant ces "piquants" et que ces blessures seraient autant de portes ouvertes pour les bactéries du charbon et leurs spores mortelles. L'expérience réalisa la prévision : de très nombreux moutons périrent.

PASTEUR avait artificiellement créé ce que les paysans appelaient avec inquiétude les terres maudites ou les montagnes noires. Mais il n'avait pas encore découvert comment le microbe du charbon se répandait sur la surface de ces sols malfaisants. En effet les moutons morts de charbon étaient toujours enfouis sur place à une profondeur minimum de 50 centimètres. Les vétérinaires pensaient qu'ainsi l'hygiène trouvait son compte. Pasteur ne partageait pas cette opinion. Il supposait qu'avant d'être enfoui le mouton charbonneux avait pu répandre du sang et d'autres liquides à la surface du sol. Dans ces conditions devait se constituer une véritable culture de bactéries sur la surface du sol. L'expérience confirma la supposition. PASTEUR répandit du sang charbonneux sur de la terre préalablement arrosée d'eau de levure ou d'urine, à des températures estivales.

Cet épandage produisit en 24 heures une multiplication de bactéries et de leurs spores. Si intéressant qu'il fût, ce résultat ne résolvait pas le problème.

La question bien que précisée demeurait entière : comment la nature pouvait-elle réaliser cette opération de laboratoire ? Pasteur envisagea d'enfouir à la belle saison dans un écart de la ferme de Saint-Germain un mouton mort du charbon contracté naturellement. La surface de la fosse rebouchée devait demeurer intacte. Dix mois, puis quatorze mois après l'enfouissement, PASTEUR prélève un peu de terre à la surface de la fosse. Après lui avoir fait subir des lavages appropriés, il constate que ce prélèvement contient des spores de la bactérie charbonneuse dont il inocule des cochons. Ceux-ci meurent du charbon. Il renouvelle cette expérience et découvre encore la présence de spores à la surface de la fosse, deux ans après l'enfouissement d'un mouton charbonneux. Il remarque l'absence totale de spores sur les sols qui environnent l'emplacement de la fosse.

Les spores remontaient donc du cadavre à la surface du sol en employant l'itinéraire le plus court.

Mais quel était donc leur ascenseur ? PASTEUR n'avait-il pas récemment affirmé, le 29 janvier 1877, devant l'Académie des Sciences, que les eaux de source ne renferment aucune trace de bactéries dès lors que ces eaux avaient été filtrées lors de leur descente dans la terre ? Cette remontée des spores posait une nouvelle énigme. Pasteur la résolut : les ascenseurs des spores, ce sont les vers de terre. Après la rosée du matin ou à la suite d'une averse les vers de terre déposent sur le sol leurs excréments, petits cylindres terreux qui s'enroulent en prenant une forme conique et contenant en grand nombre les spores de la bactérie charbonneuse auxquelles se joignent les germes de la putréfaction et des septicémies.

Aujourd'hui

Un mot sur la compréhension actuelle du charbon. L'infection est transmise par les spores selon trois voies, cutanée, digestive, respiratoire. La contamination par voie digestive ou respiratoire entraîne des formes graves très souvent mortelles à la suite d'une septicémie massive. *Bacillus anthracis* est une bactérie sporulante possédant deux types de facteurs de virulence : une capsule et des toxines. La capsule s'oppose aux systèmes de défense dont la phagocytose. Les toxines sont au nombre de deux, une toxine létale et une toxine oedématogène. Deux plasmides (éléments extrachromosomiques) dits de virulence (*pXO1* et *pXO2*) codent la synthèse des toxines et de la capsule. Il est possible aujourd'hui de répondre à la question que se posait Pasteur : l'atténuation par la chaleur entraîne la perte du plasmide codant la synthèse de la capsule alors que la souche vaccinnante garde le plasmide codant les toxines, ce qui permet l'induction de la formation d'anticorps neutralisants et protecteurs.

Texte de conférence pour le centenaire de l'Institut Pasteur Le 4 septembre 2000