

Les vaccins contre la fièvre charbonneuse des animaux, de Louis Pasteur à nos jours

E. SHLYAKHOV *, J. BLANCOU ** et E. RUBINSTEIN *

Résumé : Les auteurs rapportent l'histoire de la vaccination contre la fièvre charbonneuse des animaux, de la fin du XIX^e siècle à nos jours. Les trois principales étapes de production des vaccins spécifiques sont décrites en détail : production de vaccins à bactéries vivantes et capsulées, puis production de vaccins à bactéries vivantes acapsulées et, enfin, production de vaccins sous-unitaires. Les avantages et inconvénients respectifs de ces trois types de vaccins, dont certains sont encore à l'étude de nos jours, sont rapportés et discutés.

MOTS-CLÉS : Bacillus anthracis – Fièvre charbonneuse – Histoire – Pasteur – Vaccins.

INTRODUCTION

L'histoire des vaccins contre la fièvre charbonneuse est sans doute l'une des plus riches qui soient, tant par la variété des produits proposés et utilisés, que par la complexité des mécanismes mis en jeu dans l'immunisation des animaux ou de l'homme.

Pour lutter contre la fièvre charbonneuse des animaux, deux types de vaccins ont été utilisés au cours du temps : des produits à base de bactéries vivantes, de virulence atténuée (bactéries capsulées ou acapsulées) et des produits sous-unitaires, avirulents. Ces derniers, dont l'innocuité est garantie, n'ont pas encore rempli toutes leurs promesses sur le plan immunogène, mais font encore l'objet de recherches actives.

Les termes « charbon bactérien », « charbon » ou « fièvre charbonneuse » sont employés indifféremment ici, sachant que c'est cette dernière désignation qui est recommandée par les organisations internationales.

LES VACCINS À BACTÉRIES VIVANTES ET CAPSULÉES

Ces vaccins furent les premiers utilisés avec succès contre la fièvre charbonneuse, avant le début du XX^e siècle.

* Unité des maladies infectieuses, The Chaim Sheba Medical Center, Sackler School of Medicine, Tel-Hashomer 52621, Israël.

** Office international des épizooties, 12, rue de Prony, 75017 Paris, France.

Les origines

Bien que la fièvre charbonneuse soit connue depuis l'Antiquité, la description de la maladie reste controversée jusqu'en 1790, date où Chabert la distingue clairement du charbon symptomatique. La découverte du germe causal et de ses deux formes, végétative et sporulée, entre 1849 et 1876, confirme sans équivoque que le charbon bactérien est une entité nosologique à part entière (5).

Au XIX^e siècle, l'élevage du bétail devint, dans beaucoup de pays, l'une des principales sources de la richesse nationale. C'est pourquoi les grandes épizooties de fièvre charbonneuse constitueront un fléau redoutable pour les animaux et une menace pour l'économie rurale, ainsi qu'un grave danger pour l'homme. Les pertes annuelles causées à cette époque, en Europe, par le charbon des animaux domestiques étaient énormes. Elles se chiffraient, en Prusse, à plus de 1,5 million de marks et en France (Beauce) à 7 millions de francs. En Russie, la seule région de Novgorod (près de Saint-Petersbourg) enregistra une perte d'un million de roubles d'or à la suite d'une vaste épizootie de charbon qui anéantit près de 60 000 chevaux entre 1867 et 1869 (11, 19, 20, 29).

Dès 1876, grâce aux travaux de Pasteur (1822-1895) et de Koch (1843-1910), on connaissait le germe responsable du charbon bactérien (*Bacillus anthracis*) et les caractéristiques épizootiologiques de la maladie. Mais, malgré ces progrès scientifiques, la lutte contre la maladie rencontrait peu de succès. Les méthodes de prophylaxie sanitaire (hygiène générale, restriction des déplacements d'animaux, quarantaine, destruction des matières virulentes, etc.) décrétées par les autorités, restaient largement insuffisantes (29).

Les précurseurs

Les travaux de Pasteur sur le choléra aviaire (*Pasteurella multocida*) aboutirent à l'obtention d'un vaccin à bactérie vivante atténuée par la chaleur. C'est en 1879 que l'illustre vétérinaire français Chauveau (1827-1917), père de la pathologie comparée, démontra que certains animaux pouvaient résister à l'inoculation expérimentale du bacille du charbon. Les animaux survivant à cette inoculation devenaient, par la suite, résistants à une seconde inoculation virulente.

En 1880, son assistant Toussaint (1847-1890), vétérinaire et médecin, professeur à l'école vétérinaire de Toulouse, va s'inspirer de la méthode pastorienne pour proposer un vaccin. En juillet 1880, il inocule cinq moutons avec 3 ml de sang infectieux défibriné et chauffé dix minutes à 55 °C et constate que cette inoculation les rend définitivement résistants à une épreuve ultérieure par le bacille du charbon. Mais Toussaint ignorait, comme l'a démontré Pasteur l'année suivante, que les bactéries avaient survécu au chauffage et qu'en réalité il avait utilisé un vaccin à germes vivants atténués (5).

Cependant, ces expériences ne suscitèrent pas d'autres travaux, ni de Toussaint ni de ses collaborateurs, et c'est à Pasteur qu'il revint de découvrir un véritable vaccin contre le charbon après atténuation par la chaleur (29).

Les mérites respectifs de Toussaint et de Pasteur dans cette découverte ont fait l'objet d'une vive controverse à l'occasion d'une conférence donnée par Geison, le 13 février 1993, à Boston (Etats-Unis d'Amérique) et présentée par Anderson dans *Science* (1). La vérité a été clairement rétablie par Valléry-Radot dans un article

intitulé : « Après les propos diffamatoires récemment tenus sur Pasteur : rétablissement des faits » (30).

Les réalisateurs

En effet, dix mois après l'expérience de Toussaint, Pasteur entreprendra la préparation d'un vaccin constitué de bactéries atténuées par la chaleur, selon le principe qui lui avait réussi pour le vaccin contre le choléra aviaire. Lui et ses proches collaborateurs, Chamberland (1851-1908) et Roux (1853-1933), proposèrent une méthode permettant de surmonter l'obstacle qui s'opposait à la production d'un vaccin : la sporogénèse. C'est en cultivant les germes à 42,5-43 °C qu'ils réussirent à obtenir simultanément un double résultat : l'arrêt de la sporogénèse et l'affaiblissement du pouvoir pathogène. Pour la première fois au monde, un vaccin à bactérie vivante était obtenu contre le charbon, avec deux niveaux d'atténuation : un « premier » vaccin, très affaibli, et un « deuxième » vaccin, plus virulent.

La découverte de Pasteur et de ses collaborateurs eut un grand retentissement et nombre de vétérinaires offrirent alors leur concours pour évaluer l'efficacité des vaccins sur le terrain. A l'appel du vétérinaire Rossignol, rédacteur de la *Presse vétérinaire*, la Société d'agriculture de Melun organisa une épreuve dans une ferme de la région à Pouilly-le-Fort. Le 5 mai 1881, 24 moutons, une chèvre et six vaches furent inoculés avec cinq gouttes du « premier » vaccin ; le 17 mai, la procédure fut répétée avec le « deuxième » vaccin. L'inoculation d'épreuve, aux 31 animaux vaccinés, d'une triple dose (à la demande des adversaires de Pasteur !) d'une souche sauvage de bacille du charbon fut effectuée le 31 mai. La même dose virulente fut inoculée à des animaux non vaccinés (témoins) : 24 moutons, une chèvre et quatre vaches (11, 12, 13). Le 2 juin on comptait déjà 18 cadavres parmi les moutons témoins tandis que les autres agonisaient. Le 5 juin, le triomphe de Pasteur atteignit son apogée : tous les animaux vaccinés se portaient parfaitement bien, alors que tous les ovins témoins avaient succombé à l'inoculation virulente. Les vaches témoins survécurent à l'épreuve malgré d'énormes œdèmes au point d'inoculation. Le 13 juin 1881, Pasteur et ses collaborateurs présentèrent un compte rendu à l'Académie des sciences de Paris sur les résultats obtenus à Pouilly-le-Fort. C'est ce succès, parmi tant d'autres, qui valut à Pasteur le grand cordon de la Légion d'honneur et la décoration de ses collaborateurs. De 1882 à 1884, les essais furent poursuivis en France et dans d'autres pays, notamment en Belgique, sous la direction de Pasteur (14, 29).

Bien que le succès ait été complet, le mécanisme intrinsèque de l'atténuation du germe restera obscur jusqu'au début des années 1980. La nature du vaccin réellement administré aux animaux à Pouilly-le-Fort fut, d'ailleurs, également l'objet d'une controverse non encore résolue et décrite par Valléry-Radot (30). Ce n'est qu'en 1983 que Mikesell et coll. (15) élucidèrent le fondement génétique de ce phénomène : le vaccin pastorien obtenu par chauffage était en fait constitué d'une souche bactérienne que le chauffage à 42-43 °C avait débarrassée d'un plasmide thermosensible codant pour les protéines de la toxine charbonneuse (voir ci-dessous).

Les continuateurs

Les vaccins pastoriens contre la fièvre charbonneuse des animaux, à deux degrés d'atténuation, furent largement utilisés pendant un demi-siècle en Europe, dans les Amériques et en Australie. Pour « fixer » le degré de la virulence résiduelle des

vaccins pastoriens, plusieurs modifications furent proposées. En Russie, par exemple, c'est en 1883 que le microbiologiste Tsenkovski (1822-1887) améliora la procédure, substituant aux formes végétatives des souches vaccinales une suspension glycerinée de leurs spores : le « sporovaccin » (11, 16). Aujourd'hui encore, le « double » vaccin de Pasteur est employé en Italie. Mais d'autres souches vaccinales (Carbozoo, Boshoff) furent introduites par la suite. C'est ainsi que Mazzucchi mit au point, en 1935, un vaccin où la souche Carbozoo était présentée dans une suspension aqueuse à 2 % de saponine (9, 10). La saponine provoquait une réaction inflammatoire autour du point de l'injection du vaccin, ralentissant ainsi sa diffusion dans les tissus. En Australie, pays connu pour ses nombreux élevages de moutons, l'introduction des vaccins pastoriens fut assurée par le propre neveu de Pasteur, Adrien Loir. Mais après de multiples péripéties, ce fut finalement le vaccin fabriqué par McGarvie Smith et Gunn qui s'imposa à partir de 1894 : il dut son succès au fait qu'il s'employait en une seule injection et qu'il était sporulé, donc très stable (27).

A côté de Mazzucchi, les tentatives d'améliorer les vaccins de Pasteur par introduction de substances adjuvantes ont été conduites par de nombreux autres chercheurs, notamment Hruška en Tchécoslovaquie (saponine), Ramon et Staub en France (lanoline, tapioca, etc.) (25).

LES VACCINS À BACTÉRIES VIVANTES ACAPSULÉES

Les origines

Bien que les résultats de la vaccination avec des bactéries capsulées aient été, globalement, satisfaisants, les vaccins pastoriens présentaient encore de graves inconvénients. Si l'exposition à des températures élevées augmentait bien la fréquence de l'apparition des mutants avirulents, certains lots de vaccins conservaient une virulence résiduelle marquée.

Dès le début, diverses complications furent donc signalées parmi les animaux vaccinés. C'est ainsi que lors de la première application de vaccins pastoriens, des incidents malencontreux furent observés en Russie, pays alors fortement affecté par le charbon. En 1882, les moutons d'une importante propriété située à Kherson (Ukraine), qui avaient reçu des vaccins préparés à Paris, périrent tous lors de l'épreuve de contrôle. Peu après, parmi 4 414 moutons auxquels avaient été administrés des vaccins préparés à Odessa à partir de souches reçues de Paris, 3 546 (80,3 %) succombèrent des suites directes de la vaccination (21).

C'est suite à ces accidents fâcheux que l'on tenta de dissocier le pouvoir immunisant de celui de la virulence résiduelle du vaccin. La cible principale de ces tentatives était la capsule bactérienne, responsable de la virulence du germe, car c'est elle qui protège le bacille des défenses naturelles de l'animal.

Les précurseurs

En 1915, Bail, à Prague, cultivant des germes virulents en sérum sanguin, observa leur dissociation : les uns devenaient acapsulés (ou acapsulogènes), alors que les autres conservaient leur capsule. Le rôle de la capsule du germe dans la pathogénie du charbon fut alors l'objet de nombreuses recherches. Dans les années 1930, Tomcsik, Szongot et Bodon, puis Ivanovics et ses collaborateurs à l'Institut de microbiologie de l'université de Szeget (Hongrie), ainsi que Staub et Grabar à l'Institut Pasteur de Paris

ont déterminé la composition chimique de la capsule et son rôle pathogène. Ils démontrèrent, notamment, la présence d'un polypeptide de l'acide gamma-D-glutamique, dénommé « substance P » et possédant une propriété antigénique marquée. La substance P était distincte du polysaccharide du corps bacillaire (substance C) qui n'était qu'un haptène. A la suite de ces travaux, on se rendit compte que la substance capsulaire, tout en constituant le principal facteur de virulence du germe, n'engendrait pas l'immunité contre le charbon : un sérum anticapsulaire ne protège pas l'animal auquel il est administré, sauf la souris (18). Se débarrasser de la capsule de la souche vaccinale vivante du bacille du charbon constituait, donc, un progrès scientifique important.

Les réalisateurs

En 1931, Nicolas Stamatina (1905-1993), microbiologiste roumain de formation française, professeur à la faculté de médecine vétérinaire de Bucarest, observa la dissociation du germe cultivé sur gélose au sang de cheval. En effet, les colonies rugueuses, formées de bacilles acapsulés, avaient perdu à jamais la propriété de former des capsules chez certains hôtes réceptifs (cobayes, souris). L'inoculation de ces bacilles acapsulés entraînait la formation de vastes œdèmes sous-cutanés et une solide immunité contre le charbon. L'auteur obtint, en 1933, une souche vaccinale étalon (1190 R) à partir de laquelle il prépara le premier vaccin vivant, sporulé, acapsulogène mais œdématogène. Ce vaccin vétérinaire, employé en Roumanie à partir de 1938, est encore actuellement en usage dans ce pays (25).

En 1937, le vétérinaire Sterne, réfugié d'Allemagne à Onderstepoort (Afrique du Sud) obtint, indépendamment de Stamatina, des souches acapsulogènes par culture de germes virulents sur une gélose contenant 50 % de sérum de cheval et incubée dans une atmosphère contenant 10-30 % de dioxyde de carbone. A partir de cette souche (34 F2), il prépara un vaccin vivant hautement immunogène et de faible virulence résiduelle. Ce vaccin à usage vétérinaire, nettement supérieur à son prédécesseur capsulé, fut adopté dans de très nombreux pays, contribuant à une baisse spectaculaire de la prévalence de la fièvre charbonneuse animale et, par conséquent, de celle de la maladie chez l'homme. Le succès du vaccin de type Sterne incita d'autres chercheurs à produire des vaccins similaires. Ce fut le cas du vaccin STI, élaboré en Union des républiques socialistes soviétiques par Ghinsburg, suivi du vaccin russe GNKI de Kolessov, du vaccin n° 55 récemment proposé par Bakulov, du vaccin Ikhtiman obtenu en Bulgarie par Russev et Jekov, en France par Delpy, etc. Leur production et leur emploi en médecine vétérinaire doivent être considérés comme un tournant décisif dans la lutte contre la fièvre charbonneuse au niveau mondial.

L'association des vaccins contre la fièvre charbonneuse avec les vaccins contre le charbon symptomatique (*Clostridium chauvei*) constitua également un progrès significatif dans la prophylaxie combinée des deux maladies (4).

LES VACCINS SOUS-UNITAIRES

Les origines

Malgré l'évidente efficacité des vaccins à bacilles acapsulés, les chercheurs anglo-américains restaient insatisfaits de leur innocuité. Ils considéraient notamment que ces vaccins étaient inacceptables chez l'homme, qui restait la cible finale de la vaccino-

prévention de cette zoonose. La recherche d'un vaccin efficace, dépourvu de tout corps bactérien, était d'ailleurs la conséquence logique de l'analyse des travaux menés, dès le début du XX^e siècle, sur le pouvoir vaccinal du liquide de l'œdème charbonneux (Bail, Futaki, Gruber, Preisz, Weil, entre autres) (21).

Les précurseurs

C'est l'œdème séro-hémorragique gélatineux, qui se développe au niveau de la lésion cutanée chez les animaux réceptifs et l'homme atteints de charbon bactérien, qui fut l'objet de l'étude la plus approfondie. Bail et Weil (1911) pensaient qu'il existait, dans le liquide de l'œdème, des substances antigéniques capsulaires (« agressines ») capables d'interférer avec les phagocytes, facilitant ainsi l'agression du microbe (2). Cela fut confirmé et développé par Salisbury (19), puis par Cromartie et coll. (7) aux Etats-Unis d'Amérique dans les années 1940. Leurs recherches sur le liquide de l'œdème aboutirent à la mise en évidence des deux facteurs solubles actifs sur les animaux de diverses espèces (lapins, cobayes, souris, hamsters, moutons) : l'un, doué de propriétés toxiques mais qui pouvaient être neutralisées par l'adsorption sur phosphate de calcium, l'autre, non toxique, possédant les propriétés d'un « antigène protecteur » (PA) (9, 10, 22). Un apport capital à ces recherches fut l'œuvre de Gladstone à Porton Down en Grande-Bretagne (8). En 1946, il démontra la possibilité d'obtenir le PA *in vitro* sur un milieu constitué de plasma ou de sérum sanguin enrichi par du bicarbonate de soude, ce dernier produit étant jugé comme un facteur essentiel pour l'élaboration du PA. Gladstone démontra également que le PA pouvait être produit aussi bien par des souches virulentes que par des souches vaccinales vivantes acapsulogènes (8).

Les recherches ultérieures aboutirent à la découverte et à la caractérisation génétique, biochimique et pathogénique d'une toxine trivalente de *Bacillus anthracis* composée de trois facteurs : l'antigène PA, le facteur létal (LF) et le facteur œdématogène (LE), qui agissent de concert. De ces trois composants, le plus immunogène est le PA (9, 10, 17).

Les réalisateurs

Les premiers essais réalisés dans les années 1950 par Belton et Strange (3), puis par Smith et Gallop (24), n'eurent qu'un succès relatif en raison des difficultés rencontrées pour purifier le produit. En revanche, Boor et Tresselt (6) obtinrent, vers 1954, la première préparation vaccinale efficace. Leur vaccin s'avéra protecteur sur des cobayes, des lapins, des moutons et des singes, qui résistèrent à l'inoculation de 10⁴ spores de bacille de charbon virulent. Les chercheurs avaient utilisé un nouveau milieu nutritif pour la multiplication des bacilles, constitué d'hydrolysats de caséine et d'extrait de levure, source d'acides aminés, d'acides nucléiques et de thiamine. L'addition de charbon de bois augmenta le rendement des cultures. Le PA était concentré par lyophilisation ou précipité par l'alun de potassium. En outre, suite aux résultats de Thorne et coll., le facteur toxique résiduel du vaccin était éliminé par simple filtration (26).

Le vaccin restait stable au moins 30 mois. Employé par Simpson sur des animaux domestiques en Afrique du Nord, les réponses sérologiques des animaux vaccinés (mesurées par immuno-diffusion en gélose) furent peu concluantes, mais cela tenait sans doute au manque de sensibilité du test (23). A l'heure actuelle, le vaccin

sous-unitaire proposé par Belton et Strange est élaboré à partir d'une souche acapsulée de type Sterne, cultivée sur un milieu neutre à l'hydrolysate de caséine, additionné de bicarbonate de soude, de sels anorganiques et de charbon de bois (28).

Le vaccin sous-unitaire développé par Wright et coll. est produit à partir d'une souche acapsulée cultivée sur un milieu synthétique exempt de protéines (28).

Le vaccin de Belton et Strange, précipité par l'alun, contient, outre le PA, des traces d'EF et de LF. Le vaccin de Wright, adsorbé sur hydroxyde d'aluminium, ne contient que le PA. Ces vaccins ne contenant aucun bacille vivant peuvent être utilisés aussi bien chez l'animal que chez l'homme, mais une ou deux injections de rappel sont nécessaires.

L'estimation de l'efficacité immunisante reste, cependant, controversée (18). Les méthodes immuno-enzymatiques les plus récentes utilisées pour mesurer les réponses sérologiques de sujets vaccinés fournissent des résultats variables, qui ne correspondent pas toujours au niveau de protection réellement observé lors de l'épreuve virulente. Les recherches doivent donc être poursuivies dans ce domaine.

Les continuateurs

Turnbull a publié, en 1991 (28), les résultats de l'étude du pouvoir protecteur comparé de quatre vaccins sur cobayes : deux vaccins sous-unitaires (celui de Belton et Strange et celui de Wright) et deux vaccins à bacilles vivants acapsulés (de type Sterne et le vaccin STI), un lot de cobayes non vaccinés servant de témoins. Les cobayes immunisés par le vaccin de Belton et Strange ont survécu dans la proportion de 33 % à l'épreuve virulente et les animaux possédaient (avant l'épreuve) un titre moyen d'anticorps PA égal à 1/16 400. Les animaux vaccinés avec le vaccin de Wright (titre moyen d'anticorps PA : 1/32 800) ont survécu dans 17 % des cas. Ceux vaccinés avec le vaccin de Sterne (titre moyen d'anticorps PA : 1/4 096) ainsi que ceux immunisés avec le vaccin STI (titre moyen d'anticorps PA : 1/4 096) ont résisté à l'épreuve dans, respectivement, 65 % et 72 % des cas. Tous les cobayes témoins sont morts. L'auteur en a conclu que les vaccins à bacilles vivants (de type Sterne ou STI) étaient plus efficaces que les vaccins chimiques et qu'il n'existait pas de corrélation entre le titre des anticorps PA et le niveau réel de protection des animaux vaccinés. Il a également conclu que le pouvoir protecteur des vaccins chimiques restait à améliorer et que les recherches devaient donc être poursuivies dans ce but.

Néanmoins, au Royaume-Uni, le vaccin chimique est actuellement préféré au vaccin à bacilles vivants de type Sterne (28).

Des vaccins chimiques analogues ont été obtenus dans nombre d'autres pays : au Japon, par Kaga (milieu à base d'œuf, à partir de la souche du deuxième vaccin Pasteur) ; en Hongrie, par Molnar (milieu Boor et Tresselt, à partir de la souche Sterne) ; en Bulgarie, par Kolev et ses collaborateurs (milieu Belton et Strange, à partir de la souche Ikhiman) ; en Union des républiques socialistes soviétiques, par Aleksandrov et ses collaborateurs (milieu à base de lactose, à partir de la souche STI-1), etc. (22).

Malgré leur efficacité démontrée chez l'animal, la protection conférée par les vaccins sous-unitaires apparaît encore faible et de trop courte durée (9, 10). Par ailleurs, l'extrapolation aux êtres humains des résultats obtenus sur les animaux est risquée.

Mais, à l'heure actuelle, de nouvelles perspectives semblent s'ouvrir et, en conséquence, le perfectionnement des vaccins sous-unitaires se poursuit sans relâche, notamment au Royaume-Uni et aux Etats-Unis d'Amérique.

*
* *

VACCINES AGAINST ANTHRAX IN ANIMALS, FROM LOUIS PASTEUR TO DATE. – E. Shlyakhov, J. Blancou and E. Rubinstein.

Summary: The authors outline the history of vaccination against anthrax in animals, from the end of the 19th century to the present time. The three main steps in the production of specific vaccines are described in detail: production of vaccines from live, encapsulated bacteria, followed by vaccines from live, unencapsulated bacteria and, finally, subunit vaccines. Advantages and disadvantages of these three types of vaccine, some of which are still in use today, are described and discussed.

KEYWORDS: Anthrax – Bacillus anthracis – History – Pasteur – Vaccines.

*
* *

LAS VACUNAS CONTRA EL CARBUNCO BACTERIDIANO DE LOS ANIMALES, DE LOUIS PASTEUR A NUESTRO TIEMPO. – E. Shlyakhov, J. Blancou y E. Rubinstein.

Resumen: Los autores relatan la historia de la vacunación contra el carbunco de los animales desde finales del siglo XIX hasta nuestros días. Efectúan una detallada descripción de las tres etapas principales en lo que se refiere a la producción de vacunas específicas: producción de vacunas con bacterias vivas y encapsuladas, después producción de vacunas con bacterias vivas no encapsuladas y, por último, producción de vacunas por subunidades. El artículo presenta y examina las ventajas e inconvenientes de estos tres tipos de vacuna, en algunos casos todavía hoy sometidos a estudio.

PALABRAS CLAVE: Bacillus anthracis – Carbunco bacteridiano – Historia – Pasteur – Vacunas.

*
* *

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDERSON C. (1993). – Pasteur notebooks reveal deception. *Science*, **259**, 1117.
2. BAIL O. & WEIL E. (1911). – Beitrage zum Studium der Milzbrandinfektion. *Arch. Hyg.*, **73**, 218-264.
3. BELTON F.C. & STRANGE R.E. (1954). – Studies on a protective antigen produced *in vitro* from *Bacillus anthracis*: medium and methods of production. *Br. J. expl Pathol.*, **35**, 144-155.
4. BLANCOU J. (1974). – Etude d'un vaccin mixte contre le charbon bactérien et le charbon symptomatique. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **27**, 183-187.
5. BLANCOU J. (1995). – Les anciennes méthodes de surveillance et de contrôle de la fièvre charbonneuse. *Ann. Méd. vét.*, **139**, 39-48.
6. BOOR A.K. & TRESSELT H.B. (1955). – Protection of sheep against anthrax by immunization with antigen prepared *in vitro*. *Am. J. vet. Res.*, **16**, 425-428.
7. CROMARTIE W.J., WATSON D.W., BLOOM W.L. & HECKLY R.I. (1947). – Studies on infection with *Bacillus anthracis*. I. The immunological and tissue damaging properties of extracts prepared from lesions of *Bacillus anthracis* infection. *J. infect. Dis.*, **80**, 14-27.
8. GLADSTONE G.P. (1946). – Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. *Br. J. expl Pathol.*, **27**, 394-418.
9. HAMBLETON P., CARMAN J.A. & MELLING J. (1984). – Anthrax: the disease in relation to vaccines. *Vaccine*, **2**, 125-132.
10. HAMBLETON P. & TURNBULL P.C.B. (1990). – Anthrax vaccine development: a continuing story. *In* Bacterial vaccines, Vol. 13. Alan Liss, New York, 105-122.
11. HUTYRA F. VON & MAREK J. (1922). – Milzbrand. Anthrax. *In* Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere, Vol. 1. Gustav Fischer, Iéna, 1-36.
12. KLEMM D.M. & KLEMM W.R. (1959). – A history of anthrax. *J. Am. vet. med. Assoc.*, **135**, 458-462.
13. LECHEVALIER H.A. & SOLOTOROVSKY M. (1974). – Three centuries of microbiology. Dover Publ. Inc., New York, 536 pp.
14. MAMMERICKX M. (1995). – Les expériences de vaccination contre le charbon des animaux réalisées sous la direction de Pasteur dans les pays de Herve de 1882 à 1884. *Ann. Méd. vét.*, **139**, 147-157.
15. MIKESSELL P., IVINS B.E., RISTROPH J.D. & DREIER T.M. (1983). – Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect. & Immunity*, **39**, 371-376.
16. MILES A. & WILSON G.S. (1975). – Anthrax. *In* Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, 6^e éd., Vol. 2. Edward Arnold, Londres, 2208-2224.
17. PEZARD C., LABRUYERE E. & MOCK M. (1994). – La maladie du charbon : données récentes sur *Bacillus anthracis*. *Bull. Soc. fr. Microbiol.*, **9**, 7-11.
18. RAFFEL S. (1953). – Immunity. Hypersensitivity. Serology. Appleton, New York, 531 pp.
19. SALISBURY C.E. (1926). – Anthrax agressin. *J. Am. vet. med. Assoc.*, **68**, 755-757.
20. SHLYAKHOV E.N. (1960). – Epidémiologie, diagnostic et prévention du charbon bactérien (en russe). Kartia Moldoveniaska, Kichinev, 115 pp.

21. SHLYAKHOV E.N. (1968). – Anthrax allergy (en russe). Kartia Moldoveniaska, Kichinev, 188 pp.
 22. SHLYAKHOV E.N. & KIKOU V.F. (1984). – Stimulation of the post-vaccinal process (en russe). Chtiintza, Kichinev, 198 pp.
 23. SIMPSON R.M. (1966). – The use of the agar gel diffusion test to detect anthrax-precipitating antibodies in cattle sera. *Bull. epiz. Dis. Afr.*, **14**, 391-393.
 24. SMITH H. & GALLOP R.C. (1956). – The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. VI. An extracellular immunizing agressin isolated from exudates of infected guinea pigs. *Br. J. expl Pathol.*, **37**, 144-155.
 25. STAMATIN N. (1957). – *Bacillus anthracis* (en roumain). In *Microbiologie veterinara*, Vol. 2. Editura Academiei, Bucarest, 569-655.
 26. THORNE C.B., MOLNAR D.M. & STRANGE R.E. (1960). – Production of toxin *in vitro* by *Bacillus anthracis* and its separation into two components. *J. Bacteriol.*, **79**, 450-475.
 27. TODD J.H. (1992). – Adaptation to environment – the Pasteur anthrax vaccine in Australia. *Aust. vet. J.*, **69**, 318-321.
 28. TURNBULL P.C.B. (1991). – Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*, **9**, 533-539.
 29. VALLERY-RADOT P. (1946). – La vie de Pasteur. Flammarion, Paris, 172 pp.
 30. VALLERY-RADOT P. (1993). – Après les propos diffamatoires récemment tenus sur Pasteur : rétablissement des faits. *Assoc. Anc. El. Inst. Pasteur*, **35**, 107-116.
-