



INSTITUT DE FRANCE
Académie des sciences

Comptes Rendus

Chimie

Yves Carton

Louis Pasteur face à la maladie du ver à soie (1865–1870) : du chimiste au biologiste

Volume 25 (2022), p. 315-340

Published online: 14 December 2022

<https://doi.org/10.5802/crchim.204>

 This article is licensed under the
CREATIVE COMMONS ATTRIBUTION 4.0 INTERNATIONAL LICENSE.
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Les Comptes Rendus. Chimie sont membres du
Centre Mersenne pour l'édition scientifique ouverte
www.centre-mersenne.org
e-ISSN : 1878-1543



Histoire des sciences / *History of Sciences*

Louis Pasteur face à la maladie du ver à soie (1865–1870) : du chimiste au biologiste

*Louis Pasteur faced with silkworm disease (1865–1870) :
from chemist to biologist*

Yves Carton^a

^a IDEEV (CNRS-Univ. Paris Saclay-INRAE-IRD), Laboratoire Evolution, Génomes,
Comportement et Ecologie, 12 Route 128, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Courriel: ycarton@club-internet.fr

Résumé. Louis Pasteur va être amené en 1865, à la demande du gouvernement, à rechercher les causes d'une maladie, la pébrine, qui frappe les élevages du ver à soie, en particulier dans le midi de la France, et y apporter un remède. Il y consacrera 5 années de sa vie (1865–1870), années où il va découvrir la biologie, ce qui représente pour lui une réelle rupture épistémologique et un profond changement de paradigme : de chimiste qu'il est, il découvre et se convertit à la biologie. Comment cela s'est-il réalisé, et dans quelles conditions ?

Ces 5 ans de travaux sur les maladies du ver à soie apparaissent comme une réponse à un défi que s'est lancé Pasteur, dans un domaine totalement nouveau pour lui. Il a pu apporter une solution originale pour se débarrasser de ces germes qui infestaient durablement les souches françaises du ver à soie, souches longuement sélectionnées pour leur production en soie. Mais ces résultats vont bien au-delà. Il a pu définir une approche rigoureuse de ce que l'on ne connaissait qu'approximativement : l'infection, la contagion et l'hérédité des maladies. Il a pu en dégager des concepts qui auront plus tard une application bien plus large, à toute pathologie animale ou humaine. Il faut souligner cette capacité de Pasteur à changer radicalement de paradigmes, troquant ceux de la chimie pour ceux de la biologie. A ce moment de son parcours, Louis Pasteur est devenu un biologiste !

Abstract. In 1865, at the request of the government, Louis Pasteur was led to investigate the causes of a disease, the “pebrine”, which struck the silkworm farms, especially in the south of France, and to provide a remedy. He devoted 5 years of his life (1865–1870) to it, years in which he discovered biology, which represented for him a real epistemological rupture and a profound paradigm shift: from the chemist he was, he discovered and converted to biology. How did this happen, and under what conditions?

These 5 years of work on silkworm diseases appear as a response to a challenge that Pasteur has launched himself, in a field totally new to him. He was able to bring an original solution to get rid of these germs that permanently infested the French strains of the silkworm, strains long selected for their silk production. But these results go far beyond that. He was able to define a rigorous approach to what was known only approximately: infection, contagion and heredity of diseases. He was able to come up with concepts that would later have a much broader application, to any animal or human pathology. It is necessary to emphasize Pasteur's ability to radically change paradigms, swapping those of chemistry for those of biology. At this point in his career, Louis Pasteur became a biologist !

Mots-clés. Pasteur L., Ver à soie maladie, Microsporidie, Histoire des sciences, Sélection par couple.

Keywords. Pasteur L., Silkworm disease, Microsporidia, Science history, Pair selection.

Note. Cet article complète une étude précédemment publiée et reprend donc pour une large part ce qui est développé dans le chapitre 1 de l'ouvrage « *Immunité innée : De Louis Pasteur à Jules Hoffmann, prix Nobel (1865–2011)* » du même auteur, Editeur ISTE Group, 2019, Londres.

Note. This article expands on a previously published study and thus includes excerpts from chapter 1 of the book “Innate Immunity: From Louis Pasteur to Jules Hoffmann” by the same author, ISTE Press - Elsevier, 2019, London.

Manuscrit reçu le 28 avril 2022, révisé et accepté le 4 juillet 2022.

Avant de se consacrer totalement aux maladies touchant les animaux (le choléra de la poule, le charbon du mouton) et au processus d'infection, mais aussi celles touchant l'homme (la rage), Louis Pasteur va être amené à rechercher les causes d'une maladie, la pébrine, qui frappe les élevages du ver à soie, en particulier dans le midi de la France, et y apporter un remède. Il y consacrera cinq années de sa vie (1865–1870), années où il va découvrir la biologie, ce qui représente pour lui une réelle rupture épistémologique et un profond changement de paradigme : de chimiste qu'il est, il découvre et se convertit à la biologie. Comment cela s'est-il réalisé, et dans quelles conditions ?

L'élevage du ver à soie est une industrie florissante en France, qui s'est vraiment développée dans la première moitié du 19^e siècle. En 1821, 10 000 tonnes de cocons sont produites pour atteindre 26 000 tonnes en 1853. Mais vers 1855, tout va changer, le ver à soie étant la cible d'une maladie mortelle : la pébrine (Figure 1). C'est à partir de cette période que les effets de la pébrine commencent à se faire sentir : on passe à 19 800 tonnes pour l'année 1855, pour tomber à une production de 6500 tonnes en 1863. C'est un désastre national qui s'avère toucher toutes les régions françaises de production de cocons de vers à soie. Chaque famille ou presque de ces régions s'adonnait à cet élevage très saisonnier (mai-juillet) et trouvait un complément de revenu très appréciable.

A partir de 1850, c'est la ruine qui s'installe dans ces régions : on abandonne cette production de cocons de vers à soie, abandonnant par la même la culture du murier, qui couvrait à l'époque des surfaces considérables, jusqu'à 1000 mètres d'altitude dans les Cévennes. Les responsables politiques, pas très au fait des problèmes concernant l'élevage du ver à soie dans ces contrées éloignées de la capitale, vont alors faire appel aux scientifiques pour mieux comprendre cette épizootie et si possible la combattre, à partir des années 1850.

Pasteur est requis en 1865, à la demande du gouvernement, pour étudier la maladie du ver à soie, avec l'obligation de se déplacer sur le terrain. En fait, il est sollicité par son ancien mentor à l'Université, le professeur Jean-Baptiste Dumas (1800–1884), un chimiste renommé, ancien ministre de l'Agriculture et du Commerce et confrère de L. Pasteur à l'Académie des sciences. Il est à l'époque sénateur du Gard, où sévit ce mal : il souhaite trouver un remède à cette maladie, et considère son ancien élève comme l'homme de la situation. Pasteur est, dès cette époque, un chercheur hautement apprécié, en particulier pour ses travaux sur les fermentations, qu'il a développés lors de son séjour à Lille en tant que doyen de la faculté des sciences de la nouvelle Université. Il faut bien comprendre la nature de sa découverte : contrairement aux idées de l'époque (soutenues en particulier par le célèbre professeur de l'université de Giessen, J. von Liebig (1803–1873) qui voit dans la fermentation, un simple processus catalytique, provoqué par un ferment), Pasteur s'oppose totalement à cette conception, reconnaissant à la levure un rôle fondamental dans la fermentation. Pasteur chimiste, a découvert la présence de la levure par l'utilisation du nouveau microscope achromatique : la fermentation est bien l'œuvre d'organismes vivants. C'est donc, auréolé de ces découvertes, que J.-B. Dumas veut lui confier cette mission de lutte contre la maladie du ver à soie.

On comprend que ces recherches sur le ver à soie à partir de 1865 vont détourner L. Pasteur de ses travaux si novateurs sur les fermentations. Mais en fait, ce sera pour lui un véritable apprentissage « biologique » de ce qu'il développera ensuite, concernant ces notions, nouvelles pour l'époque, de germes pathogènes, d'infection, de contagion, de transmission « héréditaire », mais aussi de physiologie.

Pendant cinq ans, de 1865 à 1869, Pasteur va effectuer annuellement un séjour de quatre-cinq mois (sauf deux semaines en 1865) dans la ville d'Alais,



FIGURE 1. (A) Chenille de 5^e stade du ver à soie, l'espèce *Bombyx mori*, sur une branche de feuilles de murier, unique végétal dont se nourrit cette espèce; (B) Chenille de ver à soie « pébrinée » : on reconnaît les taches noires caractéristiques de la maladie (le poivre en patois se nomme pêtre, d'où le nom de la maladie, pébrine, donnée par de Quatrefages) (L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie*, la pébrine et la flacherie, Tome I, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

Gard (renommée Alès de nos jours). Il existe de nombreuses archives et témoignages sur ces séjours. Un excellent ouvrage est paru récemment, relatant tous les détails de la vie et de l'activité de Pasteur, de sa famille et de ses assistants lors de ces cinq séjours, mais avec très peu de données scientifiques précises [1]. Concernant son travail d'investigation scientifique, Pasteur va en rendre compte à l'Académie des sciences, de 1865 à 1870. Pasteur va développer une approche expérimentale rigoureuse, au cours de ces cinq années. Ses comptes rendus et ses lettres à l'Académie n'en restituent souvent que les conclusions, mais il mettra un point d'honneur à publier *in extenso* ses résultats expérimentaux en 1870, dans un ouvrage particulièrement documenté [2,3]. On assiste là aux prémisses de la biologie expérimentale moderne. Il existe d'autre part un compte rendu de ces travaux [4], écrit *à posteriori* en 1896, par son élève préféré, Emile Duclaux (1840–1904), qui a participé aux travaux sur la pébrine à Alais et qui dirigera à partir de 1895, l'Institut Pasteur.

1. Les connaissances actuelles sur la maladie du ver à soie

La maladie, dénommée pébrine à l'époque, est provoquée par la microsporidie *Nosema bombycis* (champignons parasites intracellulaires obligatoires). Le cycle [5] (voir encadré) de la microsporidie

comprend une phase infectieuse, dans le milieu environnant, et une phase intracellulaire dans le ver à soie. La phase infectieuse est représentée par des spores (Figure 2) qui, au contact de l'épiderme de la chenille vont germer, libérant un tube polaire qui pénètre dans les cellules directement accessibles : l'épiderme situé sous une cuticule abrasée, l'intestin moyen, la partie profonde des trachéoles. La spore une fois germée dans les cellules, se divise plusieurs fois (au cours de différents cycles cellulaires, sporogonie, mérogonie). Le sang (hémolymphé) et les cellules sanguines (hémocytes) de la chenille sont aussi porteurs de spores, ce qui représente certainement le vecteur principal d'infection des différents organes. L'infection des hémocytes se réalise suivant deux modes : (1) un mode actif par germination du tube polaire pénétrant dans la cellule hémocytaire ; (2) un mode passif, l'hémocyte phagocytant la spore de *Nosema*, celle-ci devenant alors directement intracellulaire. Cette « germination » est rapide et peut conduire à l'infection de la plupart des tissus ou organes internes, facilement accessibles : la glande de la soie, les tubes de Malpighi, le système nerveux, le vaisseau dorsal et les gonades. On constate alors une auto-infection systémique, c'est-à-dire généralisée. En fin d'évolution, à la mort de la chenille, les spores formées seront libérées dans le milieu externe.

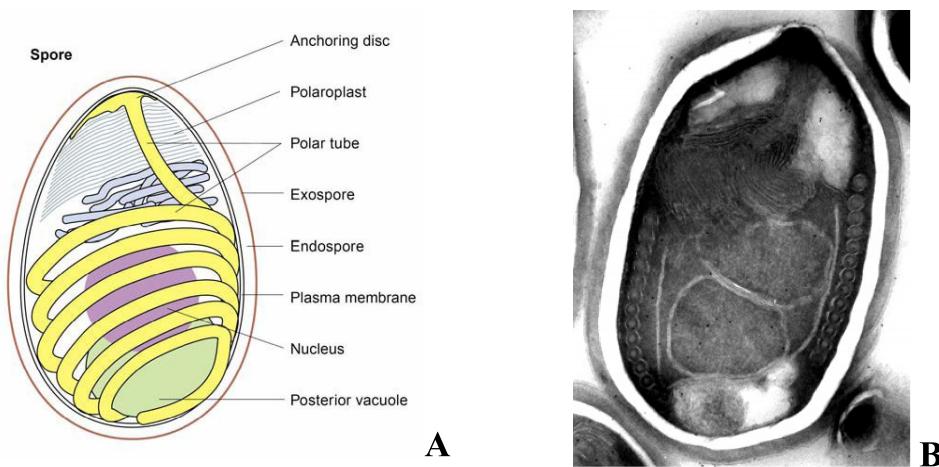


FIGURE 2. (A) Structure schématique d'une spore infestante, avec le système d'injection de son contenu par le tube polaire. (B) Image électronique d'une spore (© Wang [5]). Ces spores, présentes dans les Chenilles pébrinées, ont focalisé l'attention de Pasteur, sous le nom de corpuscules.

Il est utile de préciser encore quelques caractéristiques de la maladie, qui ont été à l'origine de tant de spéculations et d'erreurs chez les auteurs ayant étudié cette maladie. À chaque mue larvaire, les chenilles infestées présentent des taches noires sous la cuticule (on a cru avoir un marqueur de la maladie), mais celles-ci disparaissent sur les larves ayant mué récemment.

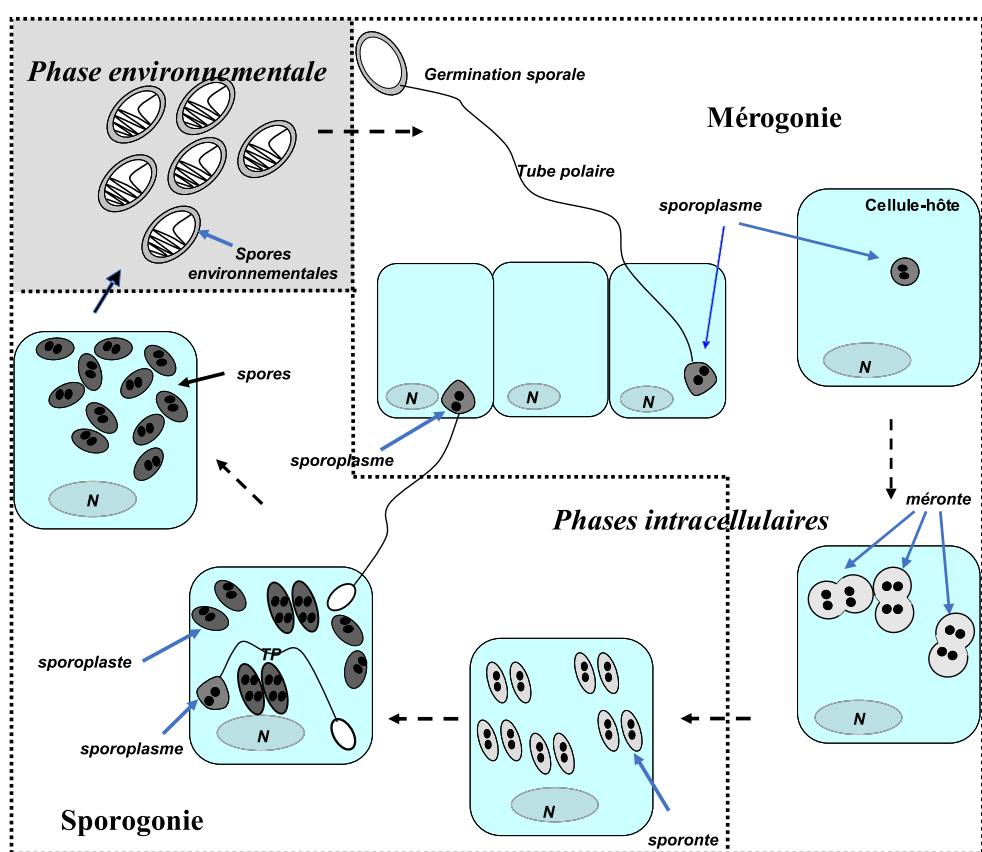
D'autre part, l'infection au niveau de l'intestin ou des trachées, peut se généraliser à tout le corps, les différents organes de la larve ou de l'adulte étant successivement atteints (on parle alors d'infestation « horizontale »). Cela a son importance chez l'adulte concernant les gonades femelles. Si celles-ci sont atteintes, certains ou tous les œufs produits porteront ce parasite, là encore en plus ou moins grande quantité. On a alors une infestation « verticale » par « héritérité ». Il faut noter qu'à l'époque de Pasteur, aucune de ces informations n'étaient disponibles.

D'autre part, le ver à soie présente une particularité biologique : la diapause, c'est-à-dire un arrêt du développement de l'embryon dans l'œuf. Pour faire repartir le développement de l'embryon, il faut mettre les graines en hibernation à une température de 5 ou 6 °C entre 3 et 6 mois maximum, avant de revenir à la température ambiante. Ainsi les œufs n'éclosent pas l'année de la ponte, mais l'année suivante.

2. La trajectoire scientifique de L. Pasteur avant 1865

Il est utile de revenir sur le parcours de L. Pasteur, avant qu'il soit sollicité en 1865 par Louis Behic, Ministre de l'Agriculture, du Commerce et des Travaux publics (certainement sur les conseils de J.-B. Dumas), pour étudier la maladie du ver à soie.

Né à Dole (Jura) en 1822, il fait ses études secondaires à Besançon puis à Paris. Il intègre l'Ecole normale supérieure en 1843. Il a suivi avec passion les cours de J.-B. Dumas, chimiste à la Sorbonne avec qui il se liera. De 1845 à 1847, il est agrégé-préparateur à l'Ecole de la rue d'Ulm. En 1847, il soutient deux thèses d'état (physique et chimie) où il établit un parallèle entre la forme extérieure d'un cristal (acide tartrique), sa constitution moléculaire et son action sur la lumière polarisée : les cristaux dissymétriques font dévier la lumière polarisée tandis que les cristaux qui ont un plan de symétrie en sont incapables. Après un an à Dijon, il est nommé professeur à l'université de Strasbourg en 1849. Travaillant alors sur l'alcool amylique (produit par la fermentation de l'amidon de la pomme de terre), il fait l'hypothèse, vérifiée, que la dissymétrie moléculaire de l'alcool amylique est due à l'action de « ferment » (bactéries ou levures), la dissymétrie moléculaire étant encore étroitement liée à la vie.



Cycle de vie de *Nosema bombycis* (redessiné par C. Texier d'après Cali et Takvorian (1999) et Wang Jian-Yang (2007)).

Le cycle de vie de *N. bombycis* se divise en une phase environnementale (infectieuse) et une phase intracellulaire (mérogonie et sporogonie). Tous les stades de développement de *N. bombycis* sont diplocahydriotes. Au cours de la phase environnementale infectieuse, des conditions environnementales appropriées sont requises pour activer les spores matures, ce qui conduit à l'extrusion du tube polaire (germination) et au dépôt du sporoplasm dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Pendant la phase intracellulaire, le sporoplasm de *N. bombycis* (comme les autres stades) est en contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte. Il mature en méronte qui se multiplie par fission binaire (mérogonie). La paroi commence à se mettre en place au début de la sporogonie. Chaque sporonte produit alors deux sporoblastes qui chacun forme deux spores matures (sporogonie). Dimorphisme sporal : *N. bombycis* termine son cycle de vie par deux séquences de sporulation qui conduisent à la formation de deux types de spores : (i) une « spore primaire ou spore interne » avec un tube polaire présentant un petit nombre de tours de spires, et qui peut germer rapidement après sa formation et permettre l'infection des cellules voisines, et (ii) une « spore environnementale ou spore externe ». Tous les stades de développement de *N. bombycis* peuvent être présents dans une même cellule-hôte : (1) méronte, (2) méronte et sporonte, (3) méronte, sporonte et sporoblaste, (4) méronte, sporonte, sporoblaste et spore. N, noyau de la cellule-hôte; TP, tube polaire touchant tous les organes.

(Mes remerciements à C. Texier, laboratoire des microorganismes, Université Clermont-Ferrand, pour m'avoir fourni ce schéma)

En 1854, il est nommé professeur de chimie à l'Université de Lille dont il devient le Doyen. Il va alors s'intéresser à la fermentation de la betterave (l'alcool produit peut prendre un goût acide) et à la conservation de la bière (pendant l'été, les bières s'acidifient sans cause apparente). Travaillant à la demande des industriels de la région, Pasteur va faire, entre 1854 et 1857, des observations fondamentales sur les fermentations (alcoolique, lactique et acétique), montrant le rôle joué par les levures. Il va s'emparer aussi d'un nouvel outil, geste peu commun pour un chimiste : le microscope. Cela lui permet de visualiser les germes à l'origine de la fermentation.

En 1857, il est de retour à Paris, étant nommé administrateur chargé de la direction des études à l'École normale supérieure. Dès 1863, il s'intéresse à la fermentation du vin, et le problème de son acidification. Il propose de chauffer le vin à 57 °C afin de tuer les germes et résout ainsi le problème de sa conservation et de son transport, c'est la pasteurisation (ce procédé de conservation, utilisé jusqu'aux années 1930, fut peu à peu abandonné). Ce principe sera aussi appliqué à la fabrication de la bière. En 1862, il est élu à l'Académie des sciences, mais dans la section de minéralogie !

En 1865, Pasteur (Figure 3), tout auréolé par ces découvertes, est donc sollicité par le Ministre de l'agriculture et du commerce, pour reprendre la question de la pébrine, pour laquelle aucune solution n'a été proposée. Cette maladie est apparue vraisemblablement dès 1843, divisant par quatre la production de soie, entre 1855 et 1865 [6] ! En fait, c'est le professeur J.-B. Dumas, alors sénateur du Gard et ancien Ministre de l'Agriculture et du Commerce, qui propose Pasteur pour entreprendre ce travail. Il le fréquente aux réunions de l'Académie des sciences et apprécie son ancien élève pour sa capacité d'approche originale des problèmes. Il est chaudement recommandé au ministre, comme l'homme de la situation. Pasteur est au départ peu enthousiaste, avançant son incomptérence totale dans ce domaine et alléguant qu'il n'a jamais vu de sa vie une chenille du ver à soie ou son cocon ! Dumas lui répondra : « tant mieux, vous n'aurez d'idées que celles qui vous viendront de vos propres observations. » Pasteur voit peut-être dans cette mission une occasion de se familiariser avec les processus biologiques qu'il maîtrise encore mal. Il écrit dans sa



FIGURE 3. Louis Pasteur en 1872 à la fin de sa mission officielle, à la demande du gouvernement, de venir étudier la maladie qui ravage les élevages du ver à soie dans le Midi de la France (© livre de R. Vallery-Radot, *La vie de Pasteur*, Flammarion, 1900).

réponse à Dumas : « [ce sujet] est peut-être dans le cadre de mes études présentes. »

3. Les travaux réalisés sur la maladie avant 1865

L'Académie des sciences, saisie par le gouvernement concernant les dégâts que cause cette maladie dans les élevages semi-industriels du ver à soie, avait nommé en 1858 une commission de trois membres, dont Armand de Quatrefages (1810–1892), médecin, professeur d'anthropologie au muséum, qui devra se déplacer sur le terrain dès le 27 avril 1858. La mission doit comprendre l'origine de cette pathologie, et si possible la combattre : « Il était nécessaire de recueillir des faits précis qui permettent de décider si le mal était ou non épidémique et héréditaire. » [7] Une première piste, suggérée par de nombreux éleveurs de terrain (on les nomme éducateurs), concerne le mûrier lui-même : une feuille malade

ne serait-elle pas à l'origine de cette maladie ? Cela expliquait la présence des deux premiers commissaires botanistes qui concluent : « Elle [la Commission] n'a pu voir entre l'état de la feuille et les maladies des vers à soie aucune relation directe, bien que cette opinion soit encore celle de quelques éducateurs. » [8] La mission de ces deux autres membres s'arrêtera donc après ce constat.

C'est donc au zoologiste de Quatrefages, qu'est revenue la tâche de mieux comprendre cette maladie, et si possible d'y porter remède. Après un séjour de trois mois à Valleraugue (département du Gard en mai, juin et juillet 1858) il est en mesure d'en faire un compte rendu préliminaire à l'Académie le 26 juillet 1858 [8, p. 140]. Ce rapport contient déjà des détails intéressants : « Un premier fait général ressort de ces investigations, c'est que les désastres [...] sont le résultat non pas d'une seule maladie, mais bien de plusieurs maladies. » L'auteur suggère aussi la possibilité d'une transmission verticale de la maladie : « La mauvaise qualité des œufs des vers à soie tachés rentre donc dans la catégorie de ces faits d'hérédité ». Un autre aspect de la maladie, signalée par les auteurs italiens, concerne la présence de corpuscules (ce sont les spores), qui vont beaucoup les intriguer. Ces corpuscules, décrits sous diverses appellations : « M. de Quatrefages a trouvé dans les vers atteints de diverses maladies, et en particulier de nigrone, les corpuscules regardés par M. Lébert (professeur à l'Université de Zurich) comme un champignon monocellulaire, et appelés par lui panhistophyton. »

De Quatrefages va compléter son étude dans un rapport présenté le 21 mars 1859 devant l'Académie [9]. Il va très vite déduire de ses observations (ou le plus souvent d'observations qui lui sont rapportées par des éducateurs), sans pour autant avoir réalisé lui-même des expériences, que la pébrine se transmet soit par contagion : « Placés sur la même litière que les vers très malades, ils ont bientôt été tachés, mais ils ont conservé les allures de vers bien portants, et la maladie n'a pas pris chez eux une grande gravité » [10] soit par infection : « une maladie est infectante lorsqu'elle peut se communiquer à des distances plus ou moins éloignées [...] les vers provenant de la graine la plus saine par son origine et sa provenance, élevée dans un pays où règne le mal actuel, sont presque universellement atteints à des degrés divers », ou par hérédité « je crois pouvoir

tirer des faits précédents la conclusion suivante : le mal présente tous les caractères d'une affection héreditaire. » [10, p. 83] Toutefois, de Quatrefages aurait pu avoir une hypothèse de travail intéressante, qui restera sans suite : il faut « opérer avec des œufs fécondés et pondus par des parents entièrement exempts de la maladie. »

En effet, la question qui reste en suspens porte sur la recherche d'un diagnostic fiable de la maladie, permettant de reconnaître les individus indemnes de la maladie. Dans ses observations lors de sa mission de 1858, de Quatrefages porte toute son attention sur les taches noires qui apparaissent sous l'épiderme des vers pébrinés : De ce que l'on sait maintenant [5] ces taches foncées correspondent très certainement à un phénomène de mélanisation de l'hémolymphe de la chenille, avec dépôt de ce matériel mélanique noir sous la cuticule, en réaction à la présence de la microsporidie. Toutefois, ces taches ne subsistent pas après les mues (l'ancienne cuticule est remplacée par une nouvelle cuticule), ce qui empêchera d'avoir un diagnostic précis.

De Quatrefages rédigera alors deux rapports conséquents, de 380 pages et 120 pages, respectivement, sur ses missions de 1858 et 1859, publiés en 1860 [10, p. 83], [11] ! Dans cette abondante littérature, où se côtoient anecdotes et observations, il est difficile de se faire une idée précise de l'approche scientifique qu'il veut donner à son travail sur cette maladie. Pasteur ne manquera pas d'ailleurs de montrer combien ces travaux sont imprécis. Toutefois, certains indices qui auront leur importance par la suite sont déjà relevés par de Quatrefages, en particulier cette présence de corpuscules observés par les auteurs italiens. Toutefois, il ne les retrouve pas toujours dans les Chenilles infestées : « Plusieurs vers, même fortement pébrinés, dont j'ai examiné le sang, n'en présentaient aucune trace. » [10, p. 83] De Quatrefages a donc observé sans le savoir l'agent de la maladie, n'y accordant aucune importance. Suite à sa mission de 1859, il va proposer quelques pistes pour traiter la maladie, en particulier comment produire de la graine saine. Il veut insister sur la taille des élevages, de petites éducations lui paraissant beaucoup moins sujettes à la maladie.

En fait, de Quatrefages propose de faire produire de la graine exempte de la maladie, en retenant des parents sains : « et n'hésite pas à déclarer que par un examen sérieux des insectes, on peut prévoir si

la graine pondue par eux sera mauvaise, c'est-à-dire infectée du vice héréditaire. » Mais comme on le constate, ses critères de diagnostic ne sont pas les plus adéquats. Son attention va se concentrer sur la présence ou non de taches, en ne retenant pas la présence de corpuscules : « La présence de ces corpuscules serait-elle, comme ils [les auteurs italiens] le pensent, un signe réel d'infection [...] Mes recherches personnelles ne me permettent pas encore de répondre à cette question. »

Voilà, énoncé de façon très succincte, l'état des connaissances vers 1860, au moment où Pasteur va être désigné pour prendre en charge cette épizootie. On se rend compte que les propositions de De Quatrefages, noyées dans des textes fleuves, ne peuvent en aucun cas être vraiment comprises et appliquées par les éducateurs du midi de la France, souvent très éloignées des centres urbains et peu au fait de ce que peuvent proposer les scientifiques.

4. L'année 1865. Le premier contact de Pasteur avec la maladie : élaboration d'un véritable programme de recherches

Avant son départ, il a lu les travaux réalisés en France ou à l'étranger sur le sujet, en particulier ceux de De Quatrefages. Pasteur arrive à Alès le 7 juin 1865, à une période où la plupart des éducations sont sur le point de se terminer avec la formation de cocons. A Alès, Il va séjourner jusqu'au 15 juin, pour revenir ensuite le 25 juin pour trois jours (pour être auditionné par le Comice agricole).

Dès son retour, il est en mesure de faire une communication à l'Académie [12] texte fondateur qui préfigure son projet de recherches pour les années à venir. De suite, il a voulu établir quelques pistes d'investigation. L'une d'elles, qui s'avérera la plus déterminante, concerne les corpuscules : « Une chose m'avait particulièrement frappé à la lecture des travaux de M. de Quatrefages; c'était l'existence, dans le corps des vers malades, de corpuscules microscopiques regardés par beaucoup d'auteurs comme indice de la maladie, bien qu'une grande obscurité règne encore sur la nature, la signification et l'utilité pratique que l'on peut tirer de la présence ou de l'absence de ces petits corps singuliers [...] en premier soin, dès que je fus installé dans une petite magnanerie aux environs d'Alais, fut d'apprendre à les reconnaître et à les distinguer. [...] J'acquis peu à peu

la conviction que la présence des corpuscules doit être regardée, en effet, comme un signe physique de la maladie régnante. » Toutefois, il doit absolument accumuler des faits pour confirmer cette idée, qui reste une hypothèse en 1865 : « Néanmoins, c'est là une opinion dont la certitude importe à un tel degré, que j'ai l'intention de rechercher de nouveaux faits qui la confirment. On ne saurait trop l'étayer de preuves péremptoires. » Une occasion favorable va se présenter. Dans la magnanerie où il s'est installé, deux chambrées (élevages) sont menées en parallèle, le propriétaire les ayant démarrees avec des graines d'origine différente. L'une (a) est issue de graines japonaises d'origine connue et apparemment saines et qui s'est développée à merveille donnant de nombreux cocons alors que l'autre (b), issue de graines japonaises d'origine inconnue, a un développement très retardé et produira peu de cocons. A sa grande surprise, car contraire à ce qu'il espérait les individus (a) présentent par analyse microscopique de nombreux corpuscules alors que les individus (b) n'en contiennent que très peu. Il en déduit donc dans un premier temps « qu'une chambrée peut aller très-mal, sans que ses vers montrent le caractère physique des corpuscules; qu'au contraire une chambrée peut aller très-bien, et que presque tous ses papillons, même les plus beaux, peuvent contenir de ces mêmes corpuscules. »

Etant en fin d'éducation, cela va le favoriser : il peut analyser les chrysalides et les papillons pour la chambrée (a) alors que pour la chambrée (b), il ne peut rechercher les corpuscules que dans des chevilles âgées : Il en déduit « que ce n'est pas dans le ver qu'il faut chercher les corpuscules, indice de l'affaiblissement de l'animal, mais dans la chrysalide, dans la chrysalide à un certain âge, et mieux encore dans le papillon. » Un de ses points de vue mérite qu'on s'y attarde : « Si les vers de la deuxième et mauvaise chambrée n'avaient pas de corpuscules, ils portaient cependant en eux-mêmes la constitution physiologique maladive qui devait les faire apparaître plus tard en abondance. » Pasteur, à cette date, ne croit pas que le corpuscule est à l'origine de la maladie, mais découvre que les corpuscules peuvent apparaître que tardivement, chez le papillon ! D'ailleurs, contrairement à ses travaux précédents sur les fermentations, il peut écrire : « Je me hasarde à dire que mon opinion présente est que les corpuscules ne sont ni des animaux ni des végétaux, mais des corps plus ou

moins analogues aux granulations des cellules cancéreuses ou des tubercules pulmonaires. »

Duclaux résume bien la situation et les convictions de Pasteur, en cette année 1865 : « Corpuscules et maladie des vers à soie étaient donc deux choses distinctes. On pouvait s'être très bien porté et comporté, comme les vers de la première éducation, et donner cependant des chrysalides corpusculeuses. On pouvait se porter très mal, comme les vers de la seconde, et ne pas contenir de corpuscules ? Nous savons aujourd'hui que si Pasteur n'en trouvait pas, c'est qu'il les cherchait mal, ou encore qu'il confondait, dans son inexpérience, deux maladies, l'une où le corpuscule a un rôle, l'autre où il n'en a point. Mais cela, Pasteur ne le savait pas, ne l'ayant découvert que plus tard. » [4, p. 195] Pasteur note toutefois un fait qui s'avérera fondamental plus tard concernant ces corpuscules, mais qu'il ne retient pas : « J'aurais désiré pouvoir traiter ici de la nature des corpuscules [...] Ils ne m'ont point paru être libres, comme les auteurs le pensent, dans le corps de l'animal, mais bien contenus dans des cellules de volumes très-variables à parois fort lâches. » Ce qu'il voit certainement, ce sont des mérontes intracellulaires de la microsporidie *Nosema*.

Ses écrits reflètent sa ferme croyance dans le raisonnement déductif, se basant avant tout sur l'observation. Il peut dégager un résultat très utile pour la suite : « La présence des corpuscules devient un indice manifeste du mal lorsqu'on le recherche dans les chrysalides âgées, et principalement dans les papillons. » On retrouve les prémisses de sa démarche scientifique qui va le guider au cours des quatre prochaines années : « La graine malade est-elle celle qui renferme des corpuscules, et la graine saine celle qui n'en contient pas ? » ou encore « Si les papillons sont peu chargés de corpuscules, leur graine fournira des vers qui n'en montreront pas ou qu'en montreront qu'exceptionnellement tout à la fin de leur vie, et la chambrée pourra se bien comporter. »

Il va donc, à partir de ce diagnostic de la maladie, qui reste encore à confirmer, proposer une solution pour « guérir » les souches contaminées. Cela a déjà été proposé par les auteurs italiens, mais sans résultat probant, faute d'une bonne connaissance de l'étiologie de la maladie et d'un diagnostic précis et sûr. Il propose, toujours dans la même communication : « Si ces principes sont vrais, si j'ai bien observé les faits sur lesquels ils s'appuient, il doit y avoir un

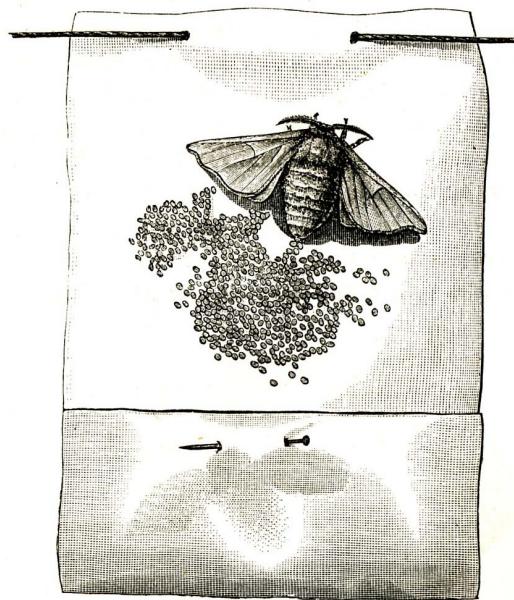


FIGURE 4. Femelle de *Bombyx mori*, le ver à soie, en train de pondre sur un linge devant recueillir les œufs pondus. Le mâle a été désaccouplé de la femelle et est placé dans un repli du linge, où viendra le rejoindre la femelle. Ce système proposé par Pasteur, permet d'analyser un broyat de la femelle et du mâle sous le microscope, plusieurs jours ou mois après leur mort. Il a été montré que les corpuscules, agent de la maladie de la pébrine, se conservaient parfaitement dans un organisme mort. Si ces broyats révèlent la présence de corpuscules, les œufs pondus seront aussi porteurs de ces germes, donc détruits (L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie, la pébrine et la flacherie*, Tome I, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

moyen infaillible d'obtenir une graine privée absolument de toute constitution maladive originelle, résultat précieux, industriellement parlant, puisque les graines saines donnent toujours une récolte la première année, même dans les localités les plus éprouvées. Ce moyen consistera à isoler, au moment du grainage, chaque couple mâle et femelle (Figure 4). Après le désaccouplement, la femelle, mise à part, pondra ses graines, puis on l'ouvrira, ainsi que le mâle, afin d'y rechercher les corpuscules. S'ils y sont absents et également dans le mâle, on numérottera cette graine qui sera conservée comme graine abso-

lument pure et élevée l'année suivante avec des soins particuliers. » Ce travail, écrit après à peine deux semaines d'observations précises, contient en quelque sorte le projet de recherches des années futures.

5. L'année 1866 : Que de problèmes à résoudre ?

Pasteur rejoint Alès le 8 février 1866 pour s'installer dans de mauvaises conditions, dans un petit hôtel bruyant et une magnanerie peu fonctionnelle. Il est accompagné par deux de ses agrégés-préparateurs de l'école de la rue d'Ulm : Désiré Gernez (1834–1910) et Eugène Maillot (1841–1889), ainsi qu'un photographe. Gernez prend vite conscience de l'exaspération de son patron par les mauvaises conditions de travail; prospectant le dimanche, il découvre (Figure 5) une maison sise dans les faubourgs d'Alès, au Pont-Gisquet, beaucoup plus confortable, possédant une orangerie qui deviendra le laboratoire avec une magnanerie au premier étage. Pouvant s'installer dès le 18 février dans cette nouvelle demeure, l'ambiance de travail va grandement s'améliorer : « Je ne crois pas qu'il y ait eu jamais, réuni autour d'un chef, une communauté plus unie et plus laborieuse » [13, p. 465] écrira Emile Duclaux (1840–1904), le plus brillant des assistants, qui a rejoint Pont-Gisquet en avril 1866, en remplacement de Maillot. Dès leur emménagement, Pasteur fait procéder à une désinfection des locaux au soufre et à la chaux, en particulier la magnanerie installée au 1^{er} étage. Il faut bien comprendre l'ambiance studieuse et parfois tendue qui règne dans cette équipe. Pasteur sait qu'on attend très vite des résultats tangibles, ce qui le rend très nerveux. Heureusement, Madame Marie Pasteur, accompagnée de sa fille Louise âgée de 8 ans, a pu enfin rejoindre son mari début juin. Mme Pasteur va alors participer à la vie de cette communauté, prenant en charge la gestion de la maison.

Il connaît aussi un surcroit de tension par l'hostilité de certains éleveurs qui ne comprennent pas qu'on puisse approcher cette maladie grâce à un microscope, en plus utilisé par un savant arrivé de Paris ! L'un des chefs de file de la contestation est Eugène de Masquard, un personnage singulier; il se définit comme agriculteur, ancien filateur à Alais et ancien graineur en Briance (Lombardie) ! Il s'est lancé dans le commerce de la graine dès le début de la crise et voit certainement d'un mauvais œil tout ce



FIGURE 5. Maison de Pont-Gisquet à Alès (Gard) dans laquelle, Pasteur, sa famille et ses assistants, ont séjourné chaque année pendant plusieurs mois, de 1866 à 1869. On reconnaît derrière la maison principale, le bâtiment qui abritait une orangerie en rez-de-chaussée (où Pasteur et ses assistants ont développé leurs recherches) et à l'étage une magnanerie (où s'effectuaient les éducatives, c'est-à-dire les élevages du ver à soie) (L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie*, la pébrine et la flache-rie, Tome I, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

qui peut contrarier son lucratif commerce. De plus, il a proposé son « bienveillant concours » à Pasteur qui ne répond pas à ses avances, « avec la morgue qui distingue les gens officiels. » Il lui fera parvenir toutefois une épreuve de son ouvrage [14] que Pasteur retournera avec ce commentaire peu encourageant : « Dieu me garde de suivre le conseil que vous me donnez dans votre ouvrage, de substituer à mes expériences de laboratoire des courses dans deux ou trois villages [...] j'ai mon idée et je la poursuis. » [1, p. 99] On prend conscience avec ce personnage de l'hostilité latente qui sévissait dans la communauté des éleveurs, mais surtout de graineurs.

Quelles sont les avancées scientifiques obtenues au cours de cette mission de 1866 ?

On apprend par Duclaux [4, p. 200] que Pasteur a produit à Paris à son retour de mission de 1865 de la graine avec son procédé de grainage, espérant cette année une graine indemne de corpuscules. Mais la méthode utilisée pour rechercher les corpuscules dans les tissus sous le microscope n'est pas adéquate : « C'est qu'en effet, à ce moment-là, on enlevait avec des ciseaux une partie de la peau de l'abdomen : on étalait ce lambeau sur la lame de verre, on raclait un peu du tissus adipo-cellulaire qu'il emporte avec lui, et on examinait ce fragment après l'avoir étalé sous la lamelle. » En fait, Pasteur à cette époque ne croit absolument pas à l'origine parasitaire de la maladie mais simplement une réaction de l'organisme à la maladie. Voilà ce qu'écrivit Duclaux : « Si Pasteur avait considéré ces corpuscules comme des parasites, il aurait sûrement conclu qu'il pouvait y en avoir ici et non là, et qu'il fallait les chercher autrement qu'en un point. Mais il était convaincu que le corpuscule, signe tardif d'une maladie préexistante, était un produit de transformation, ou, pour employer l'expression médicale, un produit de régression des cellules des tissus. Or dans cette hypothèse, il devait y en avoir partout. La méthode de recherche, imparfaite parce qu'elle était née d'une idée fausse, trompa Pasteur et l'enfonça davantage dans son idée. » Pasteur est conforté dans son idée par le fait qu'ayant rapporté à Paris des cocons apparemment indemnes de la maladie, il analyse les adultes après éclosion : « En réalité, elle [la femelle] en contenait aussi, comme le montra [en 1866] le résultat des éducatrices, où quelques corpuscules apparurent non chez les vers et les chrysalides provenant de cette graine, mais chez les papillons. Cette apparition, spontanée en apparence, des corpuscules dans une éducation qui semblait devoir en être exempte, confirma naturellement Pasteur dans son opinion au sujet de l'origine intérieure du corpuscule. » On comprend mieux cette erreur d'interprétation par ce que l'on connaît maintenant de la maladie : elle progresse lentement de tissu en tissu pour se généraliser, en particulier chez le papillon adulte.

En fait, cette difficulté sera levée quand Pasteur choisira de faire un broyage de l'individu, comme le souligne Duclaux : « Ce n'est que plus tard qu'on s'est mis à broyer le papillon dans un mortier pour étudier

une goutte de la bouillie au microscope. Le second procédé est le seul à peu près sûr. »

Pasteur va faire connaître ses résultats de ses cinq mois de recherches par une communication faite à l'Académie le 23 juillet 1866, et publiée sous la forme exceptionnelle d'un article de dix-sept pages, dérogeant à la règle des quatre pages, ce qui montre l'importance qu'attachent les Académiciens à ces travaux [15]. Pasteur veut chercher à confirmer son hypothèse au sujet des corpuscules, à savoir qu'ils sont un marqueur de la maladie : « Il n'y a donc pas à conserver le moindre doute sur cette assertion, les vers corpusculeux sont des vers très-malades. En d'autres termes, la présence des corpuscules est un signe de maladie. » Mais une difficulté surgit : « Je viens de dire que le ver corpusculeux était toujours malade. Mais la réciproque n'est pas vraie. Un ver malade n'est pas toujours corpusculeux. », ou encore « je prétends que le mal existe le plus souvent en l'absence des corpuscules. » Nous verrons plus tard que se greffe peut-être sur ces chambrées malades, une autre pathologie, celles des morts-flats. Mais pour l'instant, Pasteur n'envisage absolument pas cette éventualité, que de Quatrefages avait pourtant signalée, comme vu précédemment. Mais il va pouvoir apporter une première explication à ce dilemme : « Ces chambrées dont je parle, issues de graines sans corpuscules, composées de vers non corpusculeux, dont les cocons nouvellement formés contiennent des chrysalides non corpusculeuses, sont des chambrées malades, parce que, si au lieu de nous borner à observer au microscope les graines, les vers, les chrysalides jeunes, nous observons les chrysalides âgées et les papillons, tous sans exception offriront des corpuscules en plus ou moins d'abondance. Or j'ai prouvé tout à l'heure que la présence des corpuscules était le signe certain d'un mal profond chez le ver. Il n'est pas possible que leur présence ne soit pas également un signe de maladie chez les papillons. » Il précise sa pensée : « L'Académie doit voir clairement où est le point vif de mon raisonnement et de mes observations. Elle doit pressentir la conséquence à laquelle je veux arriver. C'est que le papillon sain est le papillon non corpusculeux [...] L'on peut trouver dans la connaissance de ce simple fait le salut de la sériciculture. » Pasteur entrevoit là ce phénomène de contamination progressive des tissus, jusqu'à l'atteinte des organes reproducteurs. Il assiste au phénomène sans en connaître l'origine : « Je crois que les

papillons étaient fréquemment corpusculeux, pas assez cependant pour altérer la graine au point de faire échouer les chambrées. » Il saisit que la contamination ne touche pas tous les ovocytes : « Cela tient-il à ce que, parmi les œufs d'une ponte appartenant à un mâle et à une femelle très malades, il peut y avoir quelques œufs sains. » Pasteur est témoin de cette progression de la maladie au sein d'un même individu, au cours de ses différents stades : « Le développement des corpuscules altère, selon moi, à des degrés très divers les humeurs et les liquides du corps des papillons. Sans doute ils peuvent assez peu se multiplier, ou se multiplier dans des organes qui intéressent à un assez faible degré la fonction de reproduction pour que la graine des parents corpusculeux ne soit pas malade sensiblement. »

Fort de son diagnostic qu'il pense fiable, Pasteur va mettre en pratique la méthode qu'il a exposée l'année précédente pour produire une graine saine, le grainage cellulaire : « Peut-on préparer de bonne graine tout à fait pure en petite quantité, on procédera par grainage cellulaire. Les mâles et les femelles des divers couples, qui auront été numérotés, seront étudiés après la ponte, et l'on mettra à part la graine des couples sains. » (Figure 6) D'ailleurs cette analyse des adultes morts peut se faire après un long délai. Il a pu constater que les corpuscules se conservent très bien dans les animaux morts conservés à sec ou dans l'alcool : « Les corpuscules ne sont nullement détruits, même par un long séjour dans l'alcool. J'ai trouvé ces petits corps en grande abondance dans des papillons qui m'ont été remis par mon savant confrère, M. Peligot, et qu'il avait conservés dans l'alcool depuis l'année 1852. » En fait, les corpuscules issus des animaux morts correspondent aux spores décrites dans le cycle lors de la phase infectieuse, présente dans le milieu externe.

Pasteur pense déjà à la manière dont il fera bénéficier la population de ses découvertes : « Si des études ultérieures sanctionnaient l'efficacité de ce moyen, on pourrait peut-être placer des microscopes, un ou deux, dans les mairies ou dans les comices, à l'époque des grainages, sous la direction d'une personne qui se serait rendu familier l'emploi de cet instrument pour la reconnaissance du caractère dont nous parlons. On viendrait là étudier les papillons destinés au grainage. » Il fait déjà produire par son équipe des graines par cette méthode du grainage cellulaire, qu'il conservera jusqu'à l'année suivante,



Lackerbauer phot.

Photogravure Dujardin, Pdé Garnier

FIGURE 6. Procédure de sélection cellulaire proposée par Pasteur. Il suggère de réaliser un tel élevage, couple isolé dès l'éclosion, pour le mettre à l'abri de toute contamination par la pébrine et la maladie des morts-flats. Ceci est particulièrement recommandé pour régénérer une race indigène du ver à soie, lorsque celle-ci est sévèrement infestée (L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie, Tome I La pébrine et la flacherie*, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

prouvant le bien-fondé de sa méthode. Il apparaît que le broyage des adultes est maintenant la technique retenue, permettant de relever toute présence

de corpuscules, aussi rares soient-ils. Mais Pasteur va consacrer une grande partie de son temps à préciser la nature des corpuscules : « Je me suis attaché uniquement, cette année comme l'an dernier, à l'étude de ces petits corps, appelés de divers noms, corpuscules vibrants, corpuscules de Cornalia ». Nous allons constater que son intuition concernant la nature des corpuscules va le conduire dans une impasse.

Il semble être parti d'un *a priori* dont il ne peut pas se défaire, basé sur un faux constat : « Je prétends que le mal existe le plus souvent en l'absence des corpuscules. » Pasteur maintient son opinion de 1865, à savoir que ces corpuscules ne sont ni des animaux, ni des végétaux : « Mes observations de cette année m'ont fortifié dans l'opinion que ces organites ne sont ni des animalcules ni des végétaux cryptogamiques. » Cela est d'autant plus étonnant qu'à plusieurs reprises dans son texte, il est amené à parler d'infection : « [...] ce qui tend à établir l'infection dans les chambrées ».

Il va alors être confronté aux travaux d'autres auteurs, dont ceux d'Edouard Balbiani (1825–1899), professeur au Collège de France, qui considère les corpuscules comme des parasites. Dans une communication faite le 27 août 1866 à l'Académie [16], Balbiani écrit, certainement en référence aux travaux de Pasteur : « Parmi toutes les opinions contradictoires qui ont été émises sur la nature des corpuscules de la pébrine, la plus discutable, à mon avis, est celle qui consiste à les assimiler à des éléments anatomiques soit normaux, soit plus ou moins altérés [...] Il y a plus de huit ans que cette opinion a été réfutée par M. le professeur Lebert. » De plus, il propose une méthode colorimétrique qui permettrait de reconnaître les œufs sains des œufs contaminés. Pasteur, piqué au vif, lui répond dans une communication [17], au sujet de cette méthode : « Malheureusement, les observations dont il s'agit sont inexactes, et il n'y a rien à en attendre, selon moi, pour la distinction de la bonne et de la mauvaise graine. » On reconnaît là le ton cassant de Pasteur, voulant réaffirmer la justesse de sa méthode toujours contestée : « Quant à la production de la bonne graine, point capital pour l'industrie, que tout ce qui a été écrit à l'Académie depuis la lecture de ma Note sur la maladie dite actuelle des vers à soie concourt à établir directement ou indirectement qu'un moyen assuré d'avoir de la graine irréprochable, dans l'état actuel des choses, consisterait à faire grainer des papillons privés de

corpuscules. » Toutefois, ses conceptions sur les corpuscules semblent évoluer : « Pour ce qui est des opinions émises par M. Balbiani sur la nature des corpuscules, bien que je ne les partage pas, j'apporterai beaucoup de soin à les examiner, pour deux motifs parce qu'elles sont d'un observateur habile, et que je n'ai encore sur les objets qu'elles concernent que des vues préconçues, auxquelles je ne tiens pas plus que de raison [...]. Si je ne crois pas, quant à présent, que les corpuscules soient des parasites, si je les assimile à des organites, à des globules du sang, à des globules du pus, etc., c'est que je ne les ai jamais vus se reproduire [...] Tant qu'on n'aura pas démontré le mode de génération des corpuscules, l'idée que ce sont des parasites manquera de base » mais il ajoute : « Je suis tout prêt à me ranger à l'avis du savant qui démontrera qu'il a été plus loin que moi sur la génération des corpuscules, que j'ai cherchée, avec l'idée d'un parasitisme possible, sans pouvoir la découvrir. »

On pourrait croire, à la lecture de ces comptes-rendus que la question est réglée. En fait, il n'en est rien. Pasteur n'a toujours pas résolu la relation entre la maladie et la présence de corpuscule. Il semble prendre « l'effet pour la cause et la cause pour l'effet », comme l'écrit E. Duclaux en 1896 [4, p. 197].

Pasteur comme il s'y était engagé, vient avant son départ d'Alais, rendre compte de ses travaux, devant le Comice agricole d'Alais, à sa séance extraordinaire du 26 juin 1866. Cela est nécessaire car la profession est encore bien sceptique sur l'utilité des travaux de ce savant venu de Paris. Pasteur, encore très prudent, tente de faire comprendre aux éducateurs présents le sens de ses travaux. Il insiste sur l'importance des corpuscules, comme moyen de diagnostic (en retenant le papillon adulte pour la diagnose), beaucoup plus que les taches, dont la présence est plus aléatoire. Certainement, il propose l'utilisation d'un microscope qui pourrait être mis à la disposition des éducateurs ou du moins de personnes formées à l'observation des corpuscules.

D'autre part, Pasteur ne néglige certainement pas de rappeler combien est important la propreté des locaux, qui peuvent être contaminés d'une année sur l'autre, si rien n'est nettoyé. Mais ce n'est toujours pas pour autant que Pasteur va accepter la notion de germe infectieux, ce qui reste assez troublant, démontrant par là son esprit entêté : « On serait bien tenté de croire, quand on songe surtout que les corpuscules ressemblent beaucoup à des spores de mu-

cédinées, qu'un parasite analogue à la muscardine a envahi les chambres, et que telle est la source du mal. Ce serait une erreur. Cette poussière était chargée de corpuscules parce qu'il y avait eu dans l'éducation beaucoup de vers corpusculés morts dans les litières, pourris, desséchés, et que les corpuscules de leurs cadavres et de leurs déjections s'étaient disséminés partout. » [18] Pasteur, en scientifique rigoureux, tient à ce que les résultats expérimentaux soient aussi accessibles, et donc publiés. A la séance du 12 janvier 1867, Pasteur présente l'ensemble de ses expérimentations, sous forme de vingt-neuf tableaux. Ceux-ci sont alors publiés dans le numéro de février 1867 du *Messager agricole du Midi* [19] et repris dans leur intégralité dans l'ouvrage de Pasteur [3, p. 181-194] publié en 1870.

A son retour sur Paris, Pasteur dépose un échantillon de ces poussières sur le bureau de l'Académie, le 23 juillet 1866 : « Je dépose sur le bureau de l'Académie un peu de la poussière de la magnanerie dont je parle. En l'examinant au microscope, l'Académie pourra se convaincre de l'effrayante multiplication de ces petits corps que je regarde toujours comme une production qui n'est ni végétale ni animale, incapable de reproduction, et qu'il faudrait ranger dans la catégorie de ces corps réguliers de forme que la physiologie distingue depuis quelques années par le nom d'organites, tels que les globules du sang, les globules du pus. » [15, p. 134] Il évoque déjà, sans le vouloir, l'importante question des germes pathogènes de maladies qui se propagent dans le milieu ou l'air ambients, question qu'il abordera plus tard. Mais il faut préciser que ces corpuscules, présents dans les poussières des magnaneries ne se conservent pas très longtemps vivants.

Une expérimentation menée à l'automne 1866 par un de ses assistants, D. Gernez, devrait remettre en cause sa conception sur les corpuscules, prouvant leur caractère infectieux. Pasteur présente ces résultats à la séance de l'Académie le 26 novembre 1866 [20]. Avec des graines saines, Gernez a effectué un élevage, sous deux conditions : Chenilles élevées avec des feuilles de murier, indemnes ou trempées dans une solution aqueuse de poussières de magnaneries contaminées. Alors que le premier lot se développe parfaitement, le 2^e lot de chenilles ne donne que quelques cocons avec des chrysalides toutes corpusculeuses, donnant des papillons malades, ne pouvant s'accoupler. Pasteur reconnaît un

« genre d'infection par les voies digestives » et considère que « c'est un mode d'inoculation de la maladie régnante que l'on pourrait appeler naturel, inhérent aux éducations de mauvaises graines, bien qu'il ait échappé jusqu'à présent à l'attention des praticiens et des savants. »

6. L'année 1867 : Les premiers résultats obtenus sur la pébrine

Le séjour de Pasteur s'effectue du 21 janvier au 25 juin 1867. Il est accompagné de son épouse et de sa fille Marie-Louise, âgée de neuf ans. Il retrouve dans la maison de Pont-Gisquet Gernez, son assistant, arrivé le 17 janvier. Duclaux, son autre assistant, ne pourra le rejoindre que le 5 juin. Il continue à faire des visites de magnaneries, cherchant à voir les résultats obtenus par les éducateurs qui ont accepté de suivre ses recommandations, en particulier pour le grainage. En particulier, le 6 mars, il entreprend une grande tournée dans le département avec Gernez, et bien au-delà puisqu'il poursuivra jusqu'à Perpignan [1, p. 134].

La mission de 1867 va être décisive pour Pasteur. Il va, comme le prouvent les trois communications sous forme de lettres adressées à Dumas, entre le 24 avril et le 21 mai, publiées dans les comptes rendus de l'Académie, reconnaître enfin le statut parasitaire de la maladie et l'existence souvent concomitante de deux maladies dans les mêmes éducations : la pébrine et la maladie des morts-flats.

Pasteur, après avoir réussi de bonnes préparations de corpuscules pour l'observation au microscope, écrit : « Vous savez que jusqu'à présent j'ai considéré les corpuscules des vers à soie, dits de Corinalia, comme des organites que l'on devait ranger à côté de tous ces corps réguliers de forme, mais ne pouvant s'engendrer les uns les autres, tels que les globules du sang, les globules du pus, les granules d'amidon, les spermatozoïdes, que les physiologistes désignent sous le nom d'organites [...]. Ces études nouvelles m'ont offert l'occasion de constater rigoureusement la génération des corpuscules par scissiparité, tout au moins dans les circonstances que je vais indiquer [...]. Je viens de reconnaître qu'il est très facile de rencontrer, en nombre immense, des corpuscules à tous les états d'une division spontanée [...]. J'ai observé dans les corpuscules un détail de structure qui avait passé inaperçu. Je veux parler de

l'existence dans chaque organe d'un noyau dont la netteté de contour ne le cède en rien à celui des corpuscules eux-mêmes [...] Les noyaux ont exactement la forme ovalaire des corpuscules. Or, il est possible de reconnaître, et cela confirme, ce me semble, la réalité de l'existence du mode de génération dont je parle, que ces noyaux se divisent en même temps que les corpuscules; en outre, il arrive fréquemment qu'il y a dans le noyau des traces de divisions, avant même qu'on en aperçoive dans les corpuscules. » [21] Il est indéniable qu'une étape est franchie par Pasteur dans son approche de la maladie : il vient indéniablement d'observer des mérontes en division en cours pour produire des sporontes. Le statut parasitaire de ces corpuscules, agent de la pébrine, lui permet enfin de résoudre cette contradiction qu'il entretenait sur les capacités infectieuses réelles de ces corpuscules.

Il peut d'ailleurs s'en convaincre avec les résultats qu'il obtient à partir de la graine qu'il a sélectionnée l'année précédente, par sa méthode de grainage cellulaire (Figure 6), justifiant aussi par là-même l'efficacité de sa méthode. Il peut écrire à Dumas dès le 30 avril 1867 [22] : « C'est l'an dernier seulement que j'ai pu me procurer convenablement des graines provenant de papillons privés de corpuscules [...] pourvu que dans la chambrée on n'élève que des graines provenant de papillons non corpusculeux, la maladie des corpuscules ne se déclarera, ni dans les vers, ni dans les chrysalides, ni dans les papillons; en d'autres termes, le procédé de grainage que j'ai indiqué peut prévenir d'une manière absolue la maladie des corpuscules. » Il va enfin pouvoir réaliser sans contestation possible une expérience de contamination : « Car je m'empresse d'ajouter que, s'il est facile d'éloigner cette maladie d'une manière plus ou moins complète, il n'est pas moins aisé de la faire naître quand on veut et où l'on veut. »

L'expérience suivante est des plus significatives : « A une portion d'un de ces lots de vers qui devaient conduire à des papillons privés de corpuscules d'une façon si radicale, j'ai donné au moment de la montée un seul repas de feuilles corpusculées. A cet effet, j'ai passé sur les feuilles un pinceau trempé dans de l'eau où j'avais broyé un ver chargé de corpuscules. Or, il est arrivé que tous les papillons fournis par cette portion de vers se sont montrés corpusculeux. Le but de la recherche que je

me suis proposée dans ces dernières années est donc atteint. »

Pasteur annonce aussi dans sa lettre qu'il a découvert que les éducations pouvaient souffrir de la présence de deux maladies, ce qui conduisait à une certaine confusion dans l'ignorance de cette situation, comme on l'a vu, pour l'interprétation de ses résultats. Pasteur va alors s'employer dans sa nouvelle communication du 21 mai 1867 [23] à montrer comment il a découvert cette situation nouvelle pour lui : « J'ai ajouté, contrairement à l'opinion générale, que cette maladie des corpuscules n'était pas tout le mal dont souffrait la sériciculture, qu'elle était associée à une autre affection confondue à tort avec elle, mais qu'il faut soigneusement en distinguer, parce que dans un grand nombre de circonstance deux maladies n'ont pas de rapport, au moins direct. » Duclaux cite d'ailleurs le désarroi de Pasteur quand il découvre cette double infestation dans ses éducations, ce qui apparaît pour lui la négation de toutes les expériences qu'il a réalisées jusqu'à maintenant : « Il n'y a rien de fait, il y a deux maladies. » [4, p. 219] Pasteur a eu l'occasion de visiter autour d'Ales divers magnaneries. Pour certaines éducations malades, il reconnaît les signes caractéristiques de la pébrine. Par contre pour d'autres chenilles, l'étiologie de la maladie est totalement différente. Il doit alors admettre qu'une autre forme de pathologie touche certaines de ces éducations, la flacherie, dont on sait maintenant que c'est une maladie virale et/ou bactérienne.

Pasteur, dès son retour, adresse le 25 juillet le premier rapport officiel de mission au Ministre de l'agriculture, du Commerce et des Travaux publics : « Aujourd'hui que je crois être arrivé, sous les réserves que je ferai en terminant ce Rapport, à une solution qui me paraît définitive, je m'empresse d'en informer votre Excellence. » [2, p. 214–228] Il annonce sa découverte comme quoi seule une analyse par broyat des papillons adultes permet de détecter une souche infestée. Il explique, contrairement à tout ce qui a été proposé jusqu'à maintenant, en particulier la recherche des corpuscules dans des graines saines ou infestées (c'était la méthode proposée par les scientifiques italiens), combien le grainage cellulaire a l'énorme avantage de produire exclusivement de la graine saine.

Il met aussi en garde sur l'aspect contagieux de la maladie et les précautions à prendre : « Jusqu'ici j'ai donné ma principale attention au caractère

contagieux de la maladie des corpuscules. Les expériences dont je vais parler ne laissent aucun doute quant à la réalité de ce caractère et elles jettent un jour tout nouveau sur la maladie sur son apparition et sa propagation dans les chambres. » Il insiste sur les conséquences plus ou moins néfastes du développement de la maladie suivant le stade infesté : « Quant à l'intensité de la maladie, elle dépend de l'âge auquel les vers sont soumis à l'empoisonnement. » Si l'infection se fait après la 4^e mue, cela aura peu de conséquences et la montée des Chenilles sur les rameaux pour se muer en chrysalides fera sans problème (Figure 7). On voit que Pasteur comprend certains aspects de l'étiologie du Bombyx : il pointe du doigt sans le comprendre vraiment cette gradation dans l'infection des tissus de la Chenille.

Il retrouve encore cette opposition à l'Académie, avec certains de ses confrères. Ainsi, le professeur Nicolas Joly de l'université de Toulouse qui deviendra membre correspondant en 1873, et qui s'est occupé aussi de la maladie du ver à soie [24] met en doute l'originalité des résultats de Pasteur : « Il vient de paraître dans les Comptes rendus de l'Institut (séance du 23 juillet 1866), un travail auquel ce corps savant a fait l'accueil le plus favorable, on pourrait dire le plus exceptionnel. L'auteur de ce travail a été proclamé et s'est proclamé lui-même le sauveur de la sériciculture en détresse [...] [je me suis] empressé de lire l'œuvre nouvelle de M. Pasteur, espérant y trouver la solution des difficultés [...] Eh bien ! je le dis avec autant de regret que de franchise, mon espoir a été déçu [...]. J'ai acquis la conviction qu'aucun des faits qui s'y trouvent n'est entièrement nouveau, qu'aucune des idées qu'il exprime (une ou deux peut-être exceptées), n'appartient en propre à l'auteur [...]. Le sage n'affirme rien qu'il ne prouve [...] il n'a rien découvert et malheureusement rien sauvé. » [25] Pasteur peut constater que la partie n'est pas encore gagnée ! Mais cela semble renforcer sa détermination à vaincre cette maladie.

7. L'année 1868 : Le grainage industriel et la maladie des morts-flats

Pasteur et sa famille rejoignent la villa de Pont-Gisquet à Alais (Gard) le 17 mars 1868, accompagnés par Maillot, son agrégé-préparateur à l'Ecole Normale Supérieure. Pasteur voit avec une réelle satisfaction, suite à sa demande faite au



FIGURE 7. Montée de la Chenille du 5^e stade du ver à soie sur la bruyère, pour se transformer en chrysalide et tisser son cocon. Ici sont représentés des Chenilles atteintes de la maladie des morts-flats (L. Pasteur, Etudes sur la maladie des vers à soie, la pébrine et la flacherie, Tome I, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

gouvernement, l'arrivée à la préfecture du Gard à Nîmes de caisses renfermant quarante microscopes. Le Préfet, avec l'accord de l'Inspecteur d'académie, décide que les instituteurs, en cours de formation à l'Ecole Normale ou déjà en poste, recevront une formation dans ce sens.

Sur le plan scientifique l'année 1868 va se révéler particulièrement féconde pour la résolution des différents problèmes encore en suspens : le grainage industriel, c'est-à-dire à grande échelle et la flacherie. Pas moins de quatre communications sont soumises à l'Académie ; Pasteur est en mesure, dans une lettre du 20 mars 1868 présentée en séance du 6 avril [26], de communiquer sur la réussite de sa méthode concernant le grainage industriel. Il est alors constaté par la profession la réussite de ce grainage développée à partir de chambrées entières : « Le grainage de la chambrée de Sauve s'est accompli dans les meilleures conditions, et la graine qui en est résulté [...] C'est une nouvelle épreuve publique, et sur une vaste échelle, des moyens de régénération que je préconise » [...] « en m'appuyant sur les résultats de mes recherches antérieures, je dois regarder comme démontré qu'aucune des deux cent cinquante éducations faites avec la graine de la chambrée de Sauve ne pourra périr de la maladie des corpuscules » [...] « cela posé, vous apprendrez avec une grande satisfaction que je viens de visiter les établissements d'essais précoces de Saint-Hippolyte et de Ganges [...] que la graine dont il s'agit y a été éprouvée, que l'éducation est terminée dans le premier de ces établissements, qu'elle s'achève dans le second, et que dans l'un et dans l'autre tout a marché à souhait. » Pasteur a tout lieu d'être satisfait : Il a fait tester sa propre méthode par les professionnels eux-mêmes : « elle constitue [...] la première graine industrielle sur laquelle une épreuve publique ait été faite pour juger en dernier ressort la valeur pratique de mes opinions. »

Pasteur doit aussi s'intéresser à la flacherie, une pathologie présente qu'il a beaucoup de mal à maîtriser (Figure 8). Il y a un aspect de cette maladie qui l'intrigue : la transmission verticale ou non du germe ? : « Désirant élucider cette question si importante de l'hérédité de la maladie des morts-flats, j'ai préparé, en 1867, plusieurs pontes provenant de celles de mes petites éducations qui avaient eu cette maladie, mais dont quelques vers avaient résisté, formé de beaux cocons et fourni des papillons de bel aspect, privés de corpuscules. J'ai envoyé aux essais précoces de Saint-Hippolyte plusieurs lots de semblables pontes réunies. Sur sept lots ainsi choisis dans sept éducations distinctes, six ont échoué à divers âges, surtout à la quatrième mue, de la maladie des morts flats. Plus de doute par conséquent la ma-

ladie des morts-flats peut être héréditaire et frapper une chambrée, indépendamment de toutes conditions sur le mode d'éclosion de la graine, sur l'aération de la chambrée, sur le trop grand froid ou sur la trop grande chaleur que les vers ont à supporter, conditions qui peuvent sans doute provoquer d'une manière accidentelle cette même maladie. » En effet, une croyance est vivace chez les éducateurs comme quoi la maladie apparait en fonction de « mauvaises » conditions d'élevage. En fait, il observe là sans le savoir, la flacherie typique, avec une action pathogène de virus actuellement reconnus, certainement transmissibles via les œufs.

20 jours plus tard, le 10 avril, Pasteur envoie un nouveau rapport à l'Académie qui est présenté à la séance du 15 avril 1868 [27]. Il rappelle les résultats récents et insiste sur cette erreur qui est souvent faite par les graineurs, à savoir si une chambrée est un succès, on peut la destiner au grainage : « neuf fois sur dix au moins la graine se montrera détestable à la récolte suivante, et beaucoup d'éducateurs assuraient même que dix fois sur dix il en sera ainsi. » Il évoque alors ce commerce des graines achetées dans d'autres pays, soi-disant indemnes de la maladie. Ces graines dont on ne connaît ni la provenance exacte ni la qualité sanitaire se retrouvent sur les marchés français : « Cette situation, aggravée par toutes sortes de fraudes, est intolérable. »

Mais Pasteur n'oublie jamais de rappeler les conditions d'élevage qui peuvent déterminer la réussite ou non d'une chambrée, compte tenu des conditions d'hygiène maintenues ou non dans les élevages. Une expérience démonstrative est citée, illustrant parfaitement la contamination possible d'une chambrée lorsque celle-ci est élevée dans une magnanerie qui développe d'autres chambrées. Deux éducateurs, M. Mazel et Mme Meynadier ont démarré leur chambrée à partir d'un même lot de graines acheté à Montpellier (M. Poujol). En juin 1867, ces chambrées sont particulièrement réussies avec des cocons de taille exceptionnelle. Pasteur est sollicité pour analyser ces cocons par divers acheteurs potentiels pour les destiner au grainage. Il constate que la chambrée Mazel est indemne de corpuscules alors que la chambrée Meynadier est fortement infectée. Pasteur veut absolument éclaircir ce mystère et visite les deux magnaneries : « La graine Poujol n'avait pas la maladie des corpuscules; cela est prouvé par la chambrée Mazel. Mme Meynadier

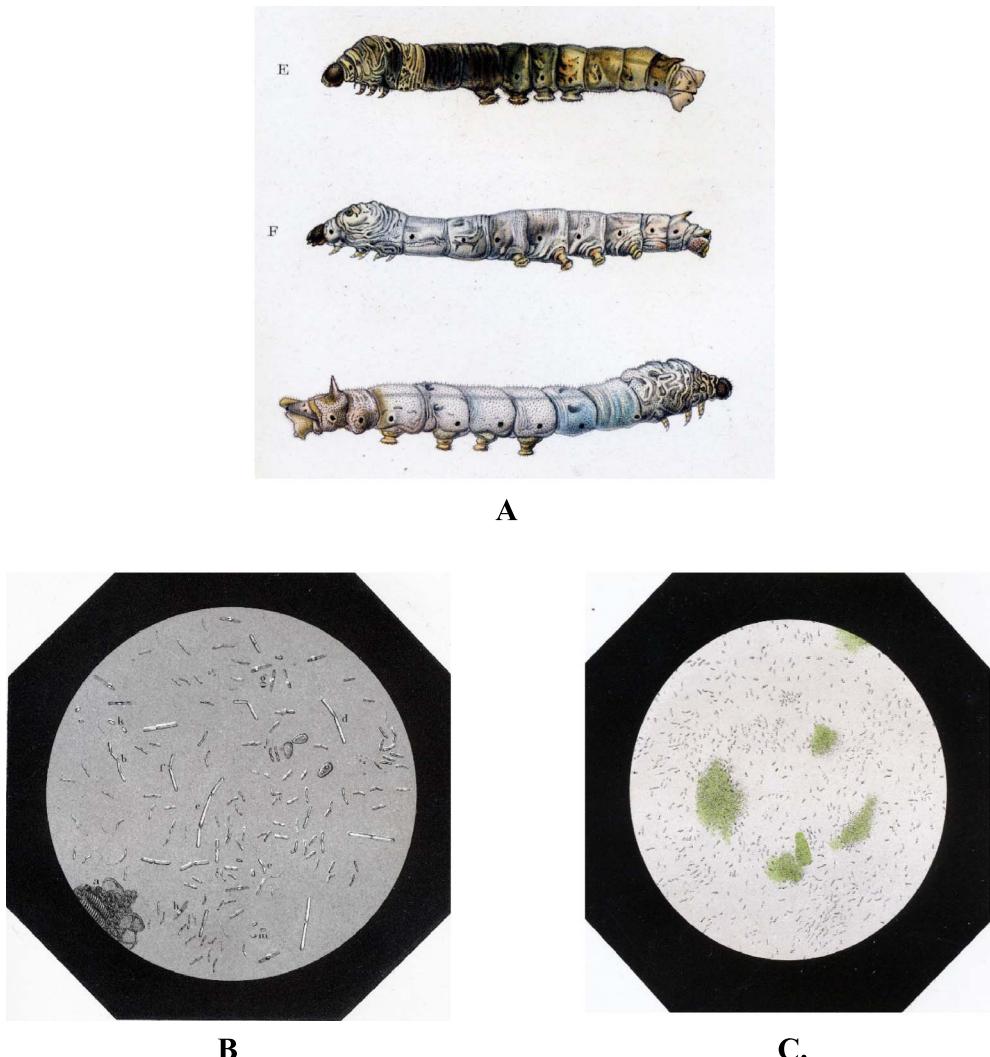


FIGURE 8. (A) chenilles de 5^e stade atteintes de la maladie des morts-flats ou flacherie. (B) germes présents dans le tube digestif de la chenille malade, décrits par Pasteur sous le nom de vibrions, correspondant à des bacilles en sporulation. (C) germes présents dans le tube digestif de la chenille malade, décrit par Pasteur sous le nom de ferment en chapelet, correspondant à un streptocoque (L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie*, la pébrine et la flacherie, Tome I, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

a élevé la graine Poujol sous le même toit que deux autres graines de Portugal et de pays, qui avaient, elles, au plus haut degré, et déjà sous forme de vers, la maladie des corpuscules. L'échec de ces graines a été complet. » Pasteur sur le terrain, comprend alors ce que peut être une contamination horizontale.

Pasteur n'a toujours pas réussi à déterminer l'agent de la flacherie et donc de proposer un diagnostic. Sa 3^e communication présentée à la

séance de l'Académie le 29 juin 1868 [28] s'intéresse à cette maladie, confirmant ce qu'il a déjà constaté au niveau de l'intestin moyen de la chenille, à savoir différentes formes de bactéries. Il est bien sûr à l'époque impossible pour Pasteur d'envisager l'existence de virus filtrants, autre germe de cette maladie. Il teste l'influence de hautes températures sur les œufs; à partir d'un même lot d'œufs, une moitié est soumise pendant 48 h à une température variante

entre 34 et 40 °C alors que l'autre moitié est maintenue à 16 °C. Ensuite les deux lots sont mis en développement dans des conditions identiques mais seule la graine chauffée donnera une descendance sans maladie. Cette piste de recherche semble n'avoir pas été poursuivie.

Pasteur rentre à Paris le 5 juillet 1868 et rédige son rapport officiel au ministre de l'Agriculture [3, p. 247–282], compte rendu scientifique très complet avec tableaux d'expériences. Ce rapport est présenté à la séance du 14 septembre 1868 de l'Académie [29]. Il reprend toutes les données obtenues au cours de l'année 1868, en particulier les premiers essais de grainage industriel. Pasteur fait remarquer toutefois que la mise en place d'une telle production de graines sera d'autant plus indemne de la maladie des corpuscules que le graineur s'astreindra à démarer sa souche avec sa méthode proposée dès 1865 : il veut parler du grainage cellulaire par couples isolés, certainement la méthode la plus rationnelle pour « curer » une souche, même si : « confectionner une aussi grande quantité de graines par couples isolés paraît être au premier aperçu un travail excessif. Sa réalisation est cependant très facile. » Dans ce rapport, Pasteur abordera aussi la maladie des morts-flats, dont il a déjà montré l'aspect héréditaire. Pasteur, dès le mois d'octobre doit reprendre ses cours à la Sorbonne. En plus il doit suivre les travaux qui se réalisent à la rue d'Ulm pour la construction de son nouveau laboratoire; Enfin, il est toujours critiqué si ce n'est harcelé, pour « sa méthode microscopique » dans le traitement de la pébrine, dont plusieurs éducateurs ou journalistes se gaussent. Pasteur, furieux, peut leur répondre sur un ton acerbe. Ainsi, un certain marquis de Bimard commente sans le comprendre le dernier rapport de Pasteur. Ce dernier lui répond : « Laisser-moi vous le dire, Monsieur le marquis, sans aigreur et avec toute la déférence que comporte votre honorabilité à laquelle je crois autant que vous voulez bien croire en la mienne, vous ne connaissez pas le premier mot de mes recherches, de leurs résultats, des principes certains qu'elles ont établis et de l'importance pratique qu'elles ont déjà acquise. » [1, p. 160]

On comprend que Pasteur avec tous ces soucis, vit dans un stress permanent. Le 19 octobre 1868, au retour d'une séance à l'Institut, il est atteint d'une hémorragie cérébrale, conduisant à une paralysie de la partie gauche de son corps. Au cours des jours

qui suivent, son état s'améliore mais il lui reste une paralysie de l'avant-bras et de la main ainsi qu'une gêne dans sa jambe gauche. Il est en mesure de dicter à Gernez son assistant, une courte communication présentée à la séance du 26 octobre 1868 de l'Académie [30]. Il suggère une procédure pour diagnostiquer une infection de morts-flats dans une graine exempte de corpuscules. Pasteur n'a pas poursuivi, en particulier rechercher au niveau de la poche stomacale la présence du streptocoque en chapelet. Mais dans toutes ces expériences sur les morts-flats, l'hypothèque virale n'est pas levée et ne peut l'être, puisque inconnue à l'époque.

8. L'année 1869 : faire approuver sa méthode par les éducateurs

Pasteur, toujours déterminé à faire valoir sa méthode, envisage dès décembre de rejoindre le Gard, malgré son handicap physique. Le départ est fixé au 18 janvier 1869, accompagné de son épouse et de sa fille ainsi que des domestiques. Ses assistants sont aussi de la mission : Gernez et Maillot font partie du voyage alors que Raulin et Duclaux viendront plus tard; Pasteur a souhaité séjourner d'abord à Saint Hippolyte-du-Fort, localité où s'effectuent divers essais d'élevage et de grainage sous la supervision de M. Jeanjean, le maire et ami de Pasteur. En fait, l'hébergement à étage ne convenant pas vraiment à Pasteur, l'équipe rejoint avec plaisir la grande propriété de Pont-Gisquet dès fin mars, très confortable pour un convalescent.

Toutefois le laboratoire de l'orangerie est déplacé au collège d'Alès, où vont travailler les assistants sous la direction de Pasteur, lui interdisant ainsi toutes ces expériences fastidieuses qui empiétaient souvent sur son sommeil les années précédentes et lui évitant trop de fatigue. Il va consacrer son temps à faire accepter sa méthode au sein de la profession, n'hésitant pas à utiliser toutes ses relations pour y parvenir. Ainsi, il s'adresse à l'Empereur, Napoléon III, qui a toujours porté une oreille attentive et bienveillante à ses travaux : « Je viens demander à L'Empereur de faire en sorte que la justice et la lumière soient faites sur la valeur et l'utilité pratique de mes études. » [31] Il sera de retour à Paris le 30 juin 1869.

Les publications de Pasteur pour cette année 1869 vont se partager entre ses résultats scientifiques et ses lettres-plaidoyers pour faire accepter sa méthode

de sélection pour le grainage. Le 11 janvier, il fait publier sa correspondance [32] avec le maréchal Vaillant, ministre de la maison de l'Empereur, très versé sur l'éducation du ver à soie, qu'il pratique aux Tuilleries et son chalet de Vincennes. Il rappelle qu'il a proposé au maréchal Vaillant d'analyser ses papillons avant grainage pour les répartir en deux classes, indemnes ou porteurs de corpuscules, pour ensuite pratiquer une sélection cellulaire. Les résultats prédis par Pasteur se révèlent totalement vérifiés : « Les papillons des premiers vers, de ceux qui étaient exempts de maladie, sont eux-mêmes irréprochables, et j'affirme, par avance, que la graine qu'ils ont pondue, si vous voulez bien l'élever en 1869, vous donnera les plus beaux produits. Quant aux papillons sortis de la graine que j'avais condamnée, ils étaient tellement mauvais pour la reproduction, malgré la réussite partielle que vous avez obtenue, que je me crois autorisé à prédire l'échec le plus radical de leur graine. »

Pasteur, à la séance du 19 juillet 1869 de l'Académie, est en mesure de communiquer [33] la lettre reçue du maréchal Vaillant sur les données obtenues, à partir des prédictions qu'il avait formulées sur les deux lots de graines sélectionnées en 1868. Vaillant lui communique ces résultats par une lettre qui est aussi publiée aux Comptes Rendus de l'Académie des Sciences [34]. Les prédictions de Pasteur s'avèrent totalement justes : « Vous m'aviez prévenu, les choses se sont passées, en 1868, absolument comme vous les aviez annoncées. » Certainement Pasteur ressent un vif plaisir à présenter lui-même ces résultats à la séance, obtenus par une tierce personne, de surcroît un personnage important de l'Empire. Il fait la démonstration qu'à partir d'une souche contaminée, il est possible en trois ans de sélectionner une lignée stable et indemne de corpuscules. Cela est extrêmement important pour les éducateurs qui ont alors la possibilité de régénérer les races indigènes françaises, auxquelles ils tiennent tant pour leur productivité, bien supérieure aux races japonaises importées.

Pasteur recherche tous les travaux réalisés par d'autres scientifiques confirmant l'efficacité de sa méthode. Un appui important va venir du Professeur Cornalia, directeur du Muséum d'Histoire Naturelle de Milan et spécialiste incontesté en sériciculture. Ce dernier lui a adressé une lettre, approuvant la recherche des corpuscules par broyat de papillons

adultes : « Le Rapport [...] a vraiment marqué un grand progrès dans la question [...] vous avez établi comme un axiome que la graine saine provenant de papillons sains et cultivés avec des soins particuliers doit fournir non seulement un bon produit, mais encore des papillons sains, qui, à leur tour, donneront de la graine saine. C'est ainsi qu'est proclamée, avec l'autorité de votre parole, l'utilité du microscope. » Cette lettre, très détaillée, est présentée et intégralement publiée (à la demande de Pasteur ?) lors de la séance du 15 mars 1869 [35], et lui apporte un soutien appuyé : « Rien de mieux que d'examiner les papillons avant ou après la ponte, afin de refuser tout ce qui proviendra d'un couple infecté. Cette méthode, plus rationnelle quoique plus difficile à suivre, que vous avez proclamée, et que je crois la seule capable de régénérer nos races, si on la combine avec les soins d'éducation, a été expérimentée à Milan l'année dernière, avec un succès complet. » Pasteur est là encore ravi de transmettre cette lettre, si élogieuse, à ses collègues de l'Académie.

Pasteur, compte tenu de cette dernière remarque de Cornalia, en cette année de 1869, doit devoir apporter des preuves sur les deux types de transmissions de la flacherie, par infection et par mode héréditaire. C'est ce qu'il relate dans sa communication transmise pour lecture à la séance du 31 mai 1869 [36]. Il a transmis des lots de graines à Cornalia, provenant de papillons présentant dans l'intestin ce germe en chapelet, provoquant la maladie des morts-flats. Il teste lui-même ces graines, convaincu du résultat prédit : « Les sept lots de graine ont péri de cette maladie alors que des graines de même race et de même origine, mais dont les papillons producteurs étaient sains, ont donné de très-belles réussites. » Il reconnaît que la maladie des morts-flats se présente sous deux formes différentes : l'une présentant des vibrios à noyaux, l'autre des ferments en chapelet, observations qu'il a déjà faites en 1868. Il insiste aussi sur les risques d'infection dès le premier stade, en enjoignant aux éducateurs à ce que les chenilles nouvellement écloses ne s'agglomèrent pas. Il doit aussi répondre [37] à M. Raybaud-Lange, homme très respecté dans la profession, pour couper court à sa « découverte », comme quoi la flacherie est provoquée par les gaz ammoniacaux ! : « Or il est évident à priori que le contenu du canal intestinal de vers sains qui ne renferme aucun organisme. » Tant de spéculations circulent dans la presse locale, ce qui oblige souvent

Pasteur à batailler et à rectifier des propositions faites par des personnages ou des institutions de la profession.

En terminant sa mission, lorsqu'il rédige cette lettre à Dumas le 22 mai 1869, et que son travail se termine à Alès définitivement, Pasteur va rendre un hommage appuyé à ses collaborateurs, qui tout au long de ces cinq années, ont secondé le « maître » avec dévouement, abnégation et parfois sans retour : « En communiquant à l'Académie les résultats qui précèdent, et dont vous avez bien voulu contrôler vous-même quelques-uns au milieu de nous, dites bien, je vous prie, à nos savants Confrères avec quel zèle je suis secondé ici par le dévouement de MM. Gernez, Duclaux, et Raulin (Figure 9). N'oubliez pas davantage M. Maillot, qui, sur la demande de M. le Sénateur Comte de Casabianca, a consenti à s'éloigner de nous pour aller en Corse appliquer mon procédé de grainage. Ses éducations sont achevées, et toutes avec succès, tandis que les échecs sont généraux dans l'île cette année. M. Maillot a élevé six lots de graines toutes confectionnées en France d'après ma méthode. »

Pasteur, revenu à Paris, doit le 4 octobre 1869 [38] dans une séance de l'Académie, répondre au scepticisme des auteurs d'un rapport en 1868 de la Commission des soies de Lyon : « Le compte rendu qu'elle fit paraître au mois de septembre de l'an dernier était loin d'être favorable à ma méthode de grainage. » Il propose alors l'envoi de sept lots de graines, dont il connaît l'état sanitaire, saine ou infectée. Cette expérience à l'aveugle va se réaliser à Lyon. En octobre 1869, la Commission lui fait connaître les résultats qu'elle a obtenus : « Les tableaux de la marche de nos éducations, notés jour par jour et joints à ce Rapport, vous démontrent avec quelle saisissante exactitude les prédictions de M. Pasteur se sont réalisées. » Pasteur, très satisfait, ajoute à ces propos lors de la séance : « Émanant d'une Commission d'autant plus scrupuleuse dans la recherche de la vérité, que son précédent Rapport la rendait circonspecte et lui donnait moins de confiance dans l'exactitude de son appréciation nouvelle, les conclusions de la Commission confirment d'une manière éclatante celles des Communications de notre illustre confrère M. le Maréchal Vaillant, de MM. Cornalia et Henri Mares [...]. Je puis donc assurer avec confiance à l'Académie que le problème que je me suis posé, il y a cinq ans, est résolu. La Sériciculture peut faire revivre, si elle le



FIGURE 9. Un des agrégés-préparateurs au microscope dans le laboratoire de l'orangerie de la maison de Pont-Gisquet à Alès (Gard). Cette photographie, non légendée, ne permet pas de reconnaître le personnage (certainement Duclaux ?) (L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie, tome 2 Notice et documents*, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

veut, son ancienne prospérité, non par la connaissance d'un remède que, pour ma part, je n'ai jamais cherché, mais par l'application d'une méthode sûre et pratique de confection de la bonne graine. » Nous avons, à cette séance du 4 octobre 1869, le moment tant attendu depuis cinq ans par Pasteur, de prouver à ses collègues académiciens que ses travaux de recherches ont porté leurs fruits.

9. L'année 1870 : séjour à Villa Vicentina (Trieste, Italie)

Le maréchal Vaillant, son confrère à l'Institut, président du Comité de sériciculture, l'entretient aussi dès octobre, d'un projet qui lui tient à cœur : « Au

moment d'une reprise d'attaques contre Pasteur, le maréchal eut l'idée de provoquer une expérience décisive qui rendrait service à tous, aux Français comme aux étrangers. Il y avait en Illyrie, à six lieux de Trieste, une terre appelée Villa Vicentina, qui appartenait au prince impérial, la vigne et le mûrier poussaient sur ce vaste domaine. Depuis des années, le produit des cocons y était nul. Le maréchal Vaillant, ministre de la maison de l'Empereur, désira, d'une part, ne pas laisser improductif le domaine princier et, d'autre part, mettre à même son confrère de l'Institut de vaincre d'une manière sans réplique l'opposition faite par l'ignorance et la jalouse. » [39] L'Empereur sousscrit avec ferveur à ce projet, tenant en haute estime le scientifique. Pasteur saisit cette opportunité, trouvant ce lieu propice à sa convalescence, voyant qu'il pourrait répéter à un niveau industriel ses essais, et ayant la possibilité de terminer son ouvrage. Il se procure des graines dans des éducations du Midi, dont il est certain qu'elles appliquent sa méthode de sélection, pour les importer dans la propriété à Villa Vicentina, près de Trieste (Italie nord-orientale). Le 25 novembre 1869, Pasteur et sa famille au complet s'installent à la villa Elisa du domaine. Toutes les installations sont disponibles dans le domaine pour l'élevage du ver à soie, adossée à une cinquantaine d'ouvriers agricoles formés à l'élevage du ver à soie. Pasteur va passer plus de sept mois dans cette propriété magnifique, au milieu d'un parc de 60 hectares, sa santé s'améliorant et son moral aussi. Il sera de retour le 7 juillet 1870.

Là encore, Pasteur va transformer ce séjour en véritable mission scientifique. Il donnera un compte rendu détaillé de l'ensemble de ses expérimentations effectuées à Villa Vicentina, lors la séance du 18 juillet 1870 de l'Académie [40] : « Au mois d'octobre dernier, M. le Maréchal Vaillant me fit part du désir de l'Empereur, de soumettre à une grande expérience pratique mon procédé de confection de la semence saine des vers à soie, procédé qui résume l'ensemble de mes études de ces dernières années [...]. Il fallait que, par des éducations dirigées en vue de la reproduction, j'établisse la possibilité de la préparation sur place d'une quantité de graines plus ou moins considérable, tout au moins suffisante pour les besoins de la propriété de Villa-Vicentina en 1871. En résumé, [...] l'épreuve tentée à la demande de l'Empereur a eu le résultat le plus satisfaisant. L'Académie ne s'étonnera pas que je lui offre les pré-

misses du Rapport par lequel je devais rendre compte à M, le Maréchal Vaillant de la mission que Sa Majesté avait daigné me confier. L'intérêt persévérant que la Compagnie a témoigné à l'étude de la maladie des vers à soie et à mes propres travaux, m'obligeait à l'instruire la première du succès qui couronne ses efforts et les miens. » On assiste lors de cette séance du 17 juillet 1870 à la consécration de Pasteur devant ses pairs, qui a voué ces cinq dernières années à résoudre le problème lié aux maladies du ver à soie.

Pasteur a souhaité aussi laisser une synthèse de ces cinq années de recherches, sous forme d'un ouvrage. Dès l'automne 1869, Pasteur avait commencé à dicter à Madame Pasteur les premières lignes d'un ouvrage qu'il souhaite rédiger sur l'éducation du ver à soie. C'est une compilation de l'ensemble de ses travaux qu'il va mettre à la disposition des scientifiques et des éducateurs. Au départ prévu comme un petit opuscule, cela devient un ouvrage en deux volumes [2,3] totalisant 607 pages. Seul le volume I a une vocation scientifique (le volume II rassemble les notes, rapports, communications, notices publiées dans divers journaux, officiels ou non). Ce volume reflète parfaitement l'esprit de synthèse de Pasteur qui, après cinq années, de prospections, d'essais, de tâtonnements et de fausses voies d'investigation mais aussi de réussites scientifiques, est en mesure de proposer une synthèse de ses travaux, en deux parties consacrées respectivement à la pébrine et à la flache. Cet ouvrage présente tous les résultats quantitatifs des expériences réalisées (ce qui ne figurait que rarement dans ses communications souvent lues à l'Académie). Ceci est fait avec méthode, l'expérience témoin étant toujours rappelée pour montrer la signification du résultat.

Un chapitre traite d'une question encore peu abordée et intitulée : « *De la nature des corpuscules et de leur mode de génération* ». Il va reconnaître enfin que ces corpuscules sont des parasites avec un cycle de reproduction. Bien sûr ses moyens d'investigations ne lui permettent pas de comprendre la totalité du cycle complexe des microsporidies, mais « j'ai donné une grande attention à ce difficile sujet d'études, et M. Duclaux, de son côté, dans les divers séjours qu'il a faits dans le Midi avec moi, a employé également un temps considérable dans cette recherche. » [2, p. 151] Pasteur observe « des corpuscules ovales, les uns très-pâles et homogènes, d'autres également pâles, mais avec une ou plusieurs

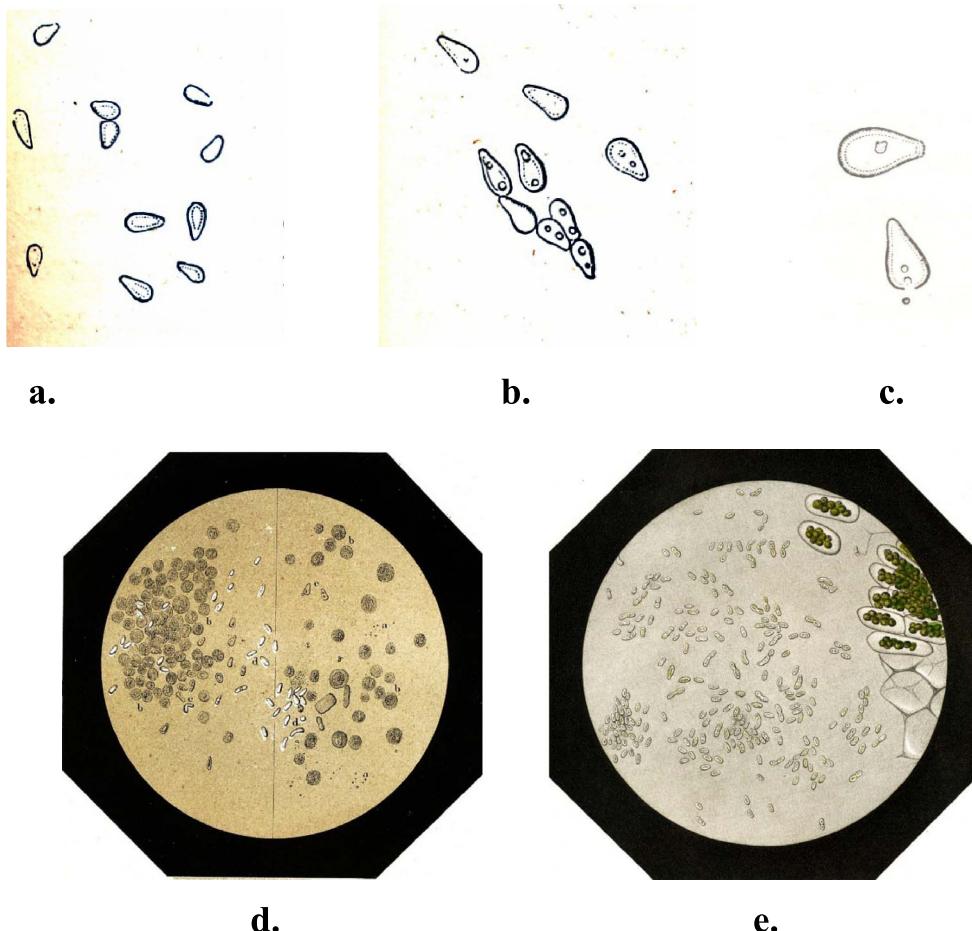


FIGURE 10. Illustration des corpuscules de la pébrine, avec les légendes originales de Pasteur. (a) *Corpuscule pyriforme à double membrane*; (b) *Corpuscule pyriforme à double membrane, il y a deux granulins*; (c) *corpuscule avec deux granulins intérieurs*; (d) *corpuscule avec un granulin extérieur, comme si ce dernier granule était sorti du corpuscule à cet endroit*; (e) *formation et développement des corpuscules, en voie de division spontanée* (L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie*, tome 1, la pébrine et la flacherie, Gauthier-Villars, Paris, 1870).

vacuoles, [...] d'autres enfin ayant la forme brillante des corpuscules ordinaires. » Cela correspond aux différents stades de développement reconnus actuellement, méronte, sporonte et sporoplaste (Figure 10). La forme brillante correspond à une spore prête à être libérée dans le milieu externe, protégée par ses coques. Plus intéressante est cette observation où le développement de la microsporidie est reconnu comme endocellulaire : « Mais ce qui frappe surtout l'attention, c'est une foule de cellules rondes. Les unes paraissent pleines et homogènes, les autres finement granuleuses; enfin, il en est beaucoup qui montrent dans leur contenu des formes plus ou

moins accusées de corpuscules ovales, lesquels, à leur tour, ont des granulations dans leur intérieur [...]. Tout annonce par conséquent que les corpuscules, du moins ceux qui sont encore très-pâles et qui se trouvent libres en dehors des cellules, ont été engendrés dans celles-ci et que les granulins (nucléoles) de ces corpuscules sont en relation directe avec les granulations propres à ces mêmes cellules. » [2, p. 153] Il faut très certainement considérer ces « granulins » comme les deux noyaux des formes dikaryotiques ? mais l'observation avec le microscope dont il dispose ne peut aller beaucoup plus loin : « Avec un fort grossissement et un objectif à immersion, ce

granulin se montre muriforme à sa surface et quelquefois, un peu allongé, comme s'il était formé de deux ou trois petites masses ajoutées bout à bout. On a essayé de figurer ces apparences dans le premier des contours ci-joints. L'autre représente fidèlement un corpuscule avec deux granulins intérieurs. » [2, p. 155] Il va apercevoir, sans vraiment l'interpréter, des sporontes associés deux à deux « Quelquefois même, on voit des cellules qui ressemblent à des abricots, et qui sont comme formées de deux corpuscules associés, voyageant ensemble dans le liquide. » [2, p. 166]

Le développement intracellulaire de la microsporidie est aussi approché, sans qu'il puisse apporter un enchainement logique à ces différentes formes de développement, maintenant reconnu comme un cycle très complexe pour la microsporidie : « Maintenant, comment ces corpuscules, une fois formés à l'intérieur de la cellule, se séparent-ils ? Les cellules paraissent formées d'une espèce de sarcode, de matière diffluente et gélatineuse douée d'une certaine cohésion, il semble donc que le corpuscule se sépare de la cellule à l'état sarcodique, et que ce soit ensuite qu'il prenne la forme et l'aspect ordinaire, après s'être plus ou moins divisé transversalement lorsqu'il était encore sous sa forme jeune et pâle. » [2, p. 167]

L'ouvrage représente la somme de tous les travaux réalisés par Pasteur et ses collaborateurs, qu'il souhaite associer à ce travail, non dans les publications, ce qui ne se faisait pas à l'époque, mais dans sa conclusion : « Au premier rang je dois placer mes chers élèves et amis, MM. Gernez, Duclaux, Maillot et Raulin, qui, ensemble, ou séparément, ont partagé avec moi, depuis 1866, la tâche ardue que j'avais acceptée, en 1865, avec tant d'hésitation. Sans leur collaboration active et intelligente, il m'eût été impossible de mener à bonne fin une entreprise qui, depuis quinze années, avait déroulé tant d'efforts. Je me souviendrai toujours que c'est par les échanges de notre mutuelle et sincère affection que nous avons souvent réussi à charmer notre solitude de Pont-Gisquet. »

10. Conclusion

Ces cinq ans de travaux sur les maladies du ver à soie apparaissent comme une réponse à un défi que s'est lancé Pasteur en 1865, dans un domaine totalement nouveau pour lui. Il a pu apporter une solution originale pour se débarrasser de ces germes qui

infestaient durablement les souches françaises du ver à soie, souches longuement sélectionnées pour leur production en soie. Mais ces résultats vont bien au-delà. Il a pu définir une approche rigoureuse de ce que l'on ne connaissait qu'approximativement : l'infection, la contagion et l'hérédité des maladies. Il a pu en dégager des concepts qui auront plus tard une application bien plus large, à toute pathologie animale ou humaine. Il faut souligner cette capacité de Pasteur à changer radicalement de paradigmes, troquant ceux de la chimie pour ceux de la biologie. A ce moment de son parcours, Louis Pasteur est devenu un biologiste !

Les processus infectieux qu'il a découverts, il les mettra à profit dans ses études ultérieures sur le choléra de la poule, le charbon du mouton, le rouget du porc et enfin la rage chez l'homme. Il va très vite prendre conscience de ces notions encore très vagues de la résistance de l'hôte et de la virulence du parasite. En fait, il en a saisi la portée avec ses investigations sur la pébrine : « Un ver qui aurait de rares corpuscules à sa naissance peut-il les perdre et se guérir ? C'est un point que je réserve. Je n'ai pas d'exemples avérés de ce fait. » [15, p. 127] Il est en mesure d'envisager un état de défense chez le ver à soie, on ne parle pas encore d'immunité, qui pourrait éliminer, ou du moins neutraliser, le germe infestant : « Ou bien quelques œufs moins malades donnent-ils des vers qui reviennent à la santé pendant l'éducation ? » [15, p. 131] Nous verrons que ce questionnement chez Pasteur concernant la résistance reviendra dans les années suivantes avec beaucoup plus d'acuité. Il est aussi conscient d'une immunité dite naturelle qui pourrait exister dans certaines races : « Il y aurait un intérêt majeur à pouvoir comparer, avant toute éducation, la vigueur relative des diverses races de ver à soie. » [3, p. 265] Le recrutement d'E. Metchnikoff en 1888, un chercheur venu de Russie, répondra en quelque sorte à cette permanente interrogation de Pasteur concernant l'immunité [41]. Ce chercheur jouera un rôle considérable au sein de ce nouvel Institut récemment construit, en particulier dans le domaine de l'immunité. C'est en 1908 qu'il se verra attribuer le prix Nobel pour ses travaux sur la phagocytose.

Les travaux sur ces deux maladies du ver à soie ont certainement préparé Pasteur à ses recherches futures, car il vient de découvrir une maladie infectieuse, la flacherie, provoquée par un agent banal,

qui se trouve dans l'environnement. Son élève Duclaux, totalement associée à ces recherches de 1866 à 1869, le fera très justement remarquer : la maladie des morts-flats a été un véritable apprentissage pour Pasteur vis-à-vis des futures maladies infectieuses qu'il allait étudier dans les années à venir. Duclaux, dans son ouvrage [4, p. 225–228] dédié à son Maître, peut faire le rapprochement avec celles-ci : « Le plus simple examen montre que, comme dans le typhus, le choléra, ce sont les organes digestifs qui sont malades [...] son siège est dans l'intestin, et le temps qui sépare le moment de la contagion de celui de la mort peut varier de 12 heures à trois semaines et même davantage, car toujours quelques vers échappent à la mort. » L'équipe a certainement pris conscience très tôt qu'une variabilité existait parmi les vers à soie du point de vue de leur résistance : « Des vers qui se ressemblaient vis-à-vis du corpuscule ne se ressemblent donc plus vis-à-vis des germes de la flacherie. Et c'est ainsi que Pasteur rencontrait pour la première fois cette notion si neuve de la réceptivité microbienne, différente dans les divers individus d'une même espèce. » Une autre notion émergera aussi avec ces recherches sur la flacherie : « Des bacilles empruntés à une fermentation artificielle de feuilles de mûrier, amènent, par exemple, la mort en 8 ou 15 jours. Si on contagionne des animaux nouveaux avec la matière du canal digestif des premiers, la mort survient en 6 à 8 jours. Le virus a donc augmenté d'intensité par suite de son passage au travers de l'organisme. » Ils décèlent là une notion qui prendra toute son importance en pathologie microbienne ou virale : l'augmentation de la virulence d'une souche par passages successifs sur l'hôte.

Pasteur a été très marqué par ces recherches sur le ver à soie. Duclaux le résume très bien avec cette anecdote : « On voit quelle préparation excellente lui avaient fait ces études sur la flacherie, et combien il avait raison de recommander aux jeunes médecins, qui plus tard apprirent le chemin de son laboratoire, de lire ces deux volumes sur la maladie des vers soie : les grands enseignements de la pathologie microbienne s'y trouvent déjà. »

L'auteur

Y. Carton, diplômé de sérologie et immunologie de l'Institut pasteur (1965) et docteur d'état de l'Université Paris VI (1968). Il a travaillé sur la génétique de la

drosophile (gènes de résistance). Pour son éméritat, il s'est intéressé à l'histoire des sciences dans différents domaines (darwinisme, entomologie, immunité innée).

Conflit d'intérêt

L'auteur n'a aucun conflit d'intérêt à déclarer.

Références

- [1] J. Drulhon, *Louis Pasteur, Cinq années dans les Cévennes au pays de l'arbre d'or*, Hermann, Paris, 2009, 265 pages.
- [2] L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie, Tome I La pébrine et la flacherie*, Gauthier-Villars, Paris, 1870, 322 pages.
- [3] L. Pasteur, *Etudes sur la maladie des vers à soie, Tome II Notes et documents*, Gauthier-Villars, Paris, 1870, 285 pages.
- [4] E. Duclaux, *Pasteur, histoire d'un esprit*, Charaire, Sceaux, 1896, 400 pages.
- [5] J.-Y. Wang, « Interactions Microsporidies-insectes in vivo : dissémination de *Nosema bombycis* (Microsporidia) dans son hôte *Bombyx mori* (Lepidoptera) et caractérisation de protéines structurales majeures de *N. bombycis* impliquées dans l'invasion », Thèse, Université d'Auvergne, 2007 (disponible sur : <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.593.62&rep=rep1&type=pdf>), 133 pages pages.
- [6] J.-M. Legay, G. Chavancy, *Nat. Sci. Soc.*, 2004, **12**, 413-417.
- [7] J. Decaisne, E.-M. Peligot, A. de Quatrefages, *C. R. Acad. Sci.*, 1859, **XLVIII**, 552-573.
- [8] A. de Quatrefages, *C. R. Acad. Sci.*, 1858, **XLVII**, 140-144.
- [9] A. de Quatrefages, *C. R. Acad. Sci.*, 1859, **XLVIII**, 552-573.
- [10] A. de Quatrefages, *C. R. Acad. Sci.*, 1860, **XXX**, 3-382.
- [11] A. de Quatrefages, *C. R. Acad. Sci.*, 1860, **XXX**, 521-640.
- [12] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1865, **LX**, 506-512.
- [13] E. Duclaux, « Le laboratoire de M. Pasteur », in *Le centenaire de l'Ecole normale (1795-1895)*, Ecole Normale Supérieure, Paris, 1895, 458-468.
- [14] E. de Masquard, *Les maladies des vers à soie (Muscardine, Gatine, Pébrine, Corpusculine, Morts-flats, Grasserie, Négrone, etc.) : causes, nature et moyen de les prévenir ou d'en diminuer considérablement les ravages, avec l'exposé pratique de nouvelles règles pour la culture du murier, les magnaneries, l'éducation et le grainage, et précédées d'un aperçu historique sur l'art d'élever les vers à soie en France, depuis leur introduction jusqu'à nos jours*, Librairie agricole de la maison rustique, Paris, 1868, 58 pages.
- [15] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1866, **LXIII**, 126-142.
- [16] E. Balbiani, *C. R. Acad. Sci.*, 1866, **LXIII**, 388-391.
- [17] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1866, **LXIII**, 441-444.
- [18] L. Pasteur, *Bull. Comice d'Alais*, 1866, **1**, 517-525.
- [19] L. Pasteur, « Nouvelle note sur la maladie du ver à soie, présentée par M. L. Pasteur à la Commission impériale de sériciculture dans sa séance du 12 janvier 1867 », in *Messager agricole du Midi*, Imprimerie Gras, Montpellier, 1867.
- [20] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1866, **LXIII**, 898-903.
- [21] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1867, **LXIV**, 835-836.

- [22] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1867, **LXIV**, 1109-1113.
- [23] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1867, **LXIV**, 1114-1120.
- [24] N. Joly, *Journal d'agriculture pratique et d'économie rurale pour le midi de la France*, 4ème série, 1876, **4**, 35.
- [25] N. Joly, *Journal d'agriculture pratique et d'économie rurale pour le midi de la France*, 1866, **XVIII**, 385-403.
- [26] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1868, **LXVI**, 690-695.
- [27] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1868, **LXVI**, 721-729.
- [28] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1868, **LXVI**, 1289-1292.
- [29] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1868, **LXVII**, 581-583.
- [30] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1868, **LXVII**, 814-815.
- [31] L. Pasteur, *Correspondance de Pasteur, 1840-1895, tome II*, Pasteur Valery-Radot, Flammarion, 1931, 451-452 pages.
- [32] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1869, **LXVIII**, 79-82.
- [33] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1869, **LXIX**, 158-160.
- [34] J. B. P. Vaillant, *C. R. Acad. Sci.*, 1869, **LXIX**, 160-163.
- [35] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1869, **LXVIII**, 628-639.
- [36] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1869, **LXVIII**, 1229-1234.
- [37] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1869, **LXVIII**, 1433-1434.
- [38] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1869, **LXXIX**, 744-748.
- [39] R. Valéry-Radot, *La vie de Pasteur*, Flammarion, Paris, 733 pages.
- [40] L. Pasteur, *C. R. Acad. Sci.*, 1870, **LXXI**, 182-185.
- [41] Y. Carton, *Immunité Innée : de Louis Pasteur à Jules Hoffmann, prix Nobel (1865-1870)*, Iste Londres, 309 pages.