

Vaccination contre les colibacilles entérotoxigènes du veau

M. CONTREPOIS

*Laboratoire de Microbiologie, INRA, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand-Theix,
63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

RÉSUMÉ – Dans la période néonatale, la protection immunitaire du veau repose essentiellement sur l'immunité maternelle transmise par le colostrum. Les colibacilles entérotoxigènes (ECET) provoquent la diarrhée en se multipliant sur la surface de l'intestin grêle où ils sécrètent l'entérotoxine TS. La protection contre les ECET doit s'exercer par les anticorps colostraux qui arrivent dans l'intestin. C'est seulement pendant les 4 à 5 premiers jours qui suivent la naissance que le veau est sensible aux infections par les ECET, période où il peut être protégé par les anticorps colostraux qui inhibent la colonisation de la paroi de l'intestin par les ECET. L'immunisation des vaches gestantes avec une formule vaccinale qui contient les antigènes O (4 sérogroupes O), K (5 à 6 sérogroupes K) et les facteurs d'attachement K99, F41, F31A (CS31A) et Fy (F17-A), permet d'enrichir le colostrum en anticorps protecteurs. Le vaccin commercial formulé sur cette base à partir du brevet INRA en 1979 a prouvé son efficacité.

Les progrès de la vaccinologie permettent d'obtenir de nouveaux vaccins contre différents pathogènes en faisant exprimer les déterminants antigéniques pertinents par des bactéries recombinantes. L'utilisation de la protéine porteuse CS31A de *E. coli* (brevet INRA en 1995) permet le développement de projets dans ce sens.

Vaccination against enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf diarrhea

M. CONTREPOIS

*Laboratoire de Microbiologie, INRA, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand-Theix,
63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

SUMMARY – Immune protection of the calf during the neonatal period depends only on the maternal colostrum. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) induce diarrhea by colonisation of the small intestine epithelium and the secretion of the TS enterotoxin. Colostral antibodies are protective against ETEC when acting in the intestine. Calves are sensitive to ETEC infections during the 4 to 5 first days of life. Colostral antibodies inhibiting ETEC colonisation of the small intestine are protective during this neonatal period. Immunisation of pregnant cows with a vaccine containing O antigens (4 O serogroups), K antigens (5 to 6 K serogroups) and colonisation factors K99, F41, F31A (CS31A) and Fy (F17-A) enhance protective colostrum antibodies. Commercial vaccine formulation on the basis of INRA patent in 1979 has proven its efficiency.

Progress in vaccinology enables to make vaccine against different pathogens using recombinant bacteria expressing pertinent antigenic determinants. *E. coli* carrier protein CS31A (INRA patent in 1995) is a tool for the development of projects in this way.

INTRODUCTION

Les gastroentérites diarrhéiques représentent 60 à 80 % des affections observées chez les veaux nouveau-nés. Les causes associent plusieurs agents infectieux et de nombreux facteurs de risques liés à la conduite d'élevage. Les gastroentérites surviennent précocement dans la vie néonatale. La stratégie vaccinale doit se définir par rapport à l'induction d'une immunité passive (vaccination des gestantes) et/ou active (vaccination du veau). Le développement et l'utilisation des vaccins impliquent donc une connaissance préalable des causes infectieuses, des mécanismes du pouvoir pathogène des microorganismes et de la physiologie des bovins conduisant à l'acquisition de l'immunité néonatale.

1. LES PRINCIPAUX AGENTS INFECTIEUX RESPONSABLES DES DIARRHÉES DES VEAUX

Les connaissances acquises au cours de ces 25 dernières années permettent d'attribuer un rôle majeur aux colibacilles entérotoxigènes (*E. coli*, K99⁺, TS⁺), aux Rotavirus, aux Coronavirus et aux Cryptosporidies dans les pathologies digestives du jeune veau. Le tableau 1 d'après Snodgrass et Browning (1993) en Grande-Bretagne et Portejoie (1995) en France fournit une indication sur la fréquence de ces agents infectieux dans les matières fécales des veaux au cours de ces dernières années. La présence de ces quatre microorganismes dans les matières fécales peut expliquer 75 à 80 % des diarrhées des veaux.

Tableau 1
Fréquence en 1993-1995 des agents infectieux identifiés dans les matières fécales des veaux en France (d'après Portejoie, 1995) et en Grande-Bretagne (d'après Snodgrass *et al.*, 1993).

		Agents infectieux			
		<i>E. coli</i> K99	Rotavirus	Coronavirus	Cryptosporidies
Pourcentage de veaux diarrhéiques positifs en France	Troupeaux allaitants	14,3	20,8	16,6	23,3
	Troupeaux laitiers	7,5	22,4	6,25	16,9
Pourcentage de veaux diarrhéiques positifs en Grande Bretagne	Veaux sains	< 1	14	1	9
	Veaux diarrhéiques	3	46	12	22

Ces résultats soulignent aussi que l'efficacité d'une vaccination dirigée contre l'un ou l'autre de ces pathogènes doit être appréciée et jugée, en cas d'échec apparent, seulement après étude de l'étiologie infectieuse des diarrhées qui surviennent dans les troupeaux ayant fait l'objet d'une vaccination.

2. LES DIARRHÉES COLIBACILLAIRES

2.1. LES COLIBACILLES DES DIARRHÉES DU VEAU

Escherichia coli est un hôte normal de l'intestin de la plupart des mammifères. Les critères classiques de la microbiologie permettent depuis longtemps d'isoler et d'identifier l'espèce bactérienne *Escherichia coli* dans les matières fécales. A partir de 1950, des critères immunologiques reposant sur la distinction des antigènes de la surface bactérienne ont conduit à une classification sérologique définissant des sérotypes (Ørskov et Ørskov, 1984). Les antigènes O sont les constituants polysaccharidiques du lipopolysaccharide (LPS ou endotoxine) de la membrane externe. Plus de 170 variants sérologiques (sérogroupes O) ont été décrits. Les antigènes K sont définis à partir des constituants capsulaires qui enveloppent la cellule bactérienne (capsule). Environ 72 capsules de compositions différentes correspondent à 72 sérogroupes K. Les colibacilles qui ne produisent pas de capsules sont classés K⁻. Les antigènes H sont les protéines des flagelles utilisés par la bactérie pour se déplacer. Environ 60 protéines flagellaires différentes conduisent à distinguer une soixantaine de séro-

groupes H. Les colibacilles sans flagelles sont classés H⁻. La combinaison de ces différents sérogroupes permet de définir un très grand nombre de sérotypes OKH. Cette « carte d'identité antigénique » des sérotypes OKH n'a pas permis de différencier des colibacilles pathogènes et non pathogènes mais constitue un support très utile pour différencier les colibacilles (sérovars ou sérotypes) et pour formuler la composition des vaccins anti-colibacillaires. Il a fallu attendre la découverte des entérotoxines colibacillaires (Smith et Gyles, 1970) puis des facteurs de colonisation (Smith et Linggood, 1972) pour différencier les colibacilles qui sont pathogènes chez le veau. Des protéines filamenteuses différentes des flagelles et appelées fimbriae sont produites à la surface de la bactérie. Ces protéines reconnaissent des ligands sur la paroi de l'intestin. En adhérant à la paroi de l'intestin grêle, les colibacilles ne sont pas entraînés par les effets mécaniques du péristaltisme intestinal et colonisent massivement la paroi de l'intestin grêle. En sécrétant une entérotoxine qui provoque un appel d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale ces colibacilles dits entérotoxigènes (ECET pour *Escherichia Coli EntéroToxinogènes*) engendrent la diarrhée. Ces mécanismes du pouvoir pathogène sont communs à plusieurs types de colibacilles entérotoxigènes responsables de diarrhées chez différentes espèces animales et chez l'homme. Deux entérotoxines dont l'une est thermostable (TS) et l'autre thermolabile (TL) sont produites isolément ou simultanément par les ECET. Les ECET du veau produisent uni-

quement la toxine thermostable. Les fimbriae sont, eux, très diversifiés. En reconnaissant des ligands propres à l'intestin des différentes espèces animales, ils confèrent une spécificité

d'hôte (tableau 2). Les fimbriae qui ont reçu l'appellation K99 (Ørskov *et al.*, 1975) sont les facteurs de colonisation majeurs et communs à tous les ECET du veau.

Tableau 2
Facteurs de colonisation et types d'entérotoxines des ECET selon les espèces animales

	Facteurs de colonisation	Entérotoxines
Porcelet	K88, 987P (quelquefois K99 et/ou F41)	TS et TL
Veau	K99, F41	TS
Agneau	K99, F41	TS

2.2. ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS COLIBACILLAIRES DU VEAU
Les techniques de diagnostic pour la recherche systématique de K99 et des virus entéropathogènes mises au point à la fin

des années 1970 ont permis de préciser l'importance et les caractéristiques des infections dues aux ECET et aux virus (tableau 3).

Tableau 3
Fréquence des colibacilles K99+ et des Rotavirus dans les matières fécales des veaux en fonction de leur âge (d'après Martel *et al.*, 1981 et Perrin *et al.*, 1981)

		Age des veaux			
		0-4 jours	5-10 jours	> 10 jours	Tous âges confondus
Pourcentage de veaux non diarrhéiques positifs	<i>E. coli</i> K99+	12,5	3,7	3	8,2
	Rotavirus	3,9	16,7	22,7	12,5
Pourcentage de veaux diarrhéiques positifs	<i>E. coli</i> K99+	33,7	11,6	5,3	18,9
	Rotavirus	36,2	58,9	52,9	48,2

Ces résultats font apparaître un portage possible pour *E. coli* K99+ et les Rotavirus chez des veaux sains ou à un stage précédant le déclenchement de la diarrhée, mais surtout une prédominance des infections à *E. coli* K99+ chez les Veaux de moins de 5 jours alors que les Rotavirus sont identifiés majoritairement chez les veaux de plus de 5 jours. Les résultats concernant les colibacilles sont confirmés par des expérimentations *in vivo* et *in vitro* indiquant une sensibilité à l'infection colibacillaire qui diminue avec l'âge du Veau (Runnels *et al.*, 1980). La quantité de sialoglycolipides reconnus à la surface de l'intestin par les fimbriae K99 (Seignole *et al.*, 1991) diminue avec l'âge des animaux (Teneberg *et al.*, 1990). Ces considérations sont importantes dans la perspective d'une vaccination. La protection contre les infections colibacillaires doit s'exercer principalement pendant la première semaine de vie du veau, alors qu'elle doit continuer à s'exercer au-delà d'une semaine dans le cas des infections à Rotavirus.

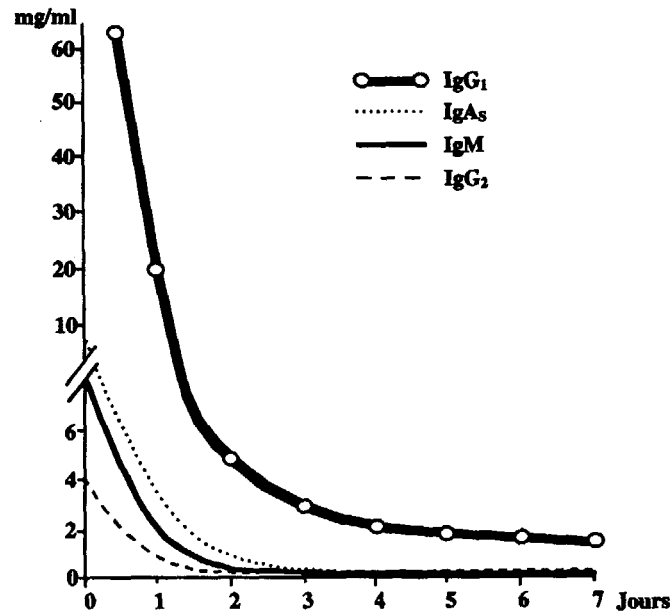
3. CONDITIONS NÉCESSAIRES POUR L'OBTENTION D'UNE PROTECTION VACCINALE

3.1. LA PROTECTION VACCINALE DOIT S'EXERCER DANS L'INTESTIN

Les résultats énoncés précédemment indiquent que le site de multiplication des colibacilles entérotoxigènes est la paroi de l'intestin grêle où ils se fixent grâce à leurs facteurs de colonisation et où ils secrètent l'entérotoxine thermostable. Si une protection par des anticorps est recherchée, elle doit s'exercer dans l'intestin en neutralisant l'attachement des bactéries ou leur entérotoxine thermostable. La pathologie due aux ECET se manifestant pendant les premiers jours de la vie du veau avant qu'on puisse envisager une immunisation active de ce dernier, des anticorps protecteurs peuvent arriver dans la lumière intestinale lorsque le veau boit des sécrétions colostrales riches en immunoglobulines. La vaccination des vaches permet d'obtenir un immunocolostrum assu-

rant une protection du veau par une action des anticorps *in situ* dans l'intestin. Cette protection s'exercera aussi longtemps que des anticorps arriveront dans l'intestin au rythme des tétées. Chez la vache, les concentrations sont élevées en

immunoglobulines, principalement de type IgG1, dans le premier colostrum, mais elles diminuent ensuite très vite. Au-delà de trois jours, les IgG ont presque disparu des sécrétions lactées (Fig. 1).



Les 4 à 5 premiers jours suivant la naissance sont ceux où la sensibilité des veaux nouveau-nés est maximale pour les infections à ECET mais c'est aussi la période où pourra s'exercer la protection par les anticorps des sécrétions lactées.

3.2. ANTIGÈNES QUI INDUISENT UNE PROTECTION VACCINALE

Le rôle majeur de l'entérotoxine thermostable et des facteurs de colonisation dans la pathogénie des infections à ECET désigne ces deux types d'antigène comme cibles vaccinales. L'entérotoxine TS est un petit peptide de 18 ou 19 acides aminés qui n'est pas immunogène du fait de sa taille (hap-tène). Pour cette raison, les efforts se sont focalisés sur les facteurs de colonisation pour l'obtention d'anticorps se fixant sur la surface bactérienne et empêchant l'attachement des bactéries aux entérocytes.

Après les premiers travaux démontrant le rôle primordial des fimbriae K99 comme facteur de colonisation de l'intestin du veau (Smith et Linggood, 1972 ; Ørskov *et al.*, 1975) des études complémentaires ont montré que le phénomène est plus complexe. Ainsi, Smith et Huggins (1978) ont comparé la colonisation de l'intestin de veau par une même souche *E. coli* de sérotype O9:K30, K99 selon qu'elle combinait ou non l'expression des antigènes O9, K30, K99 (Tableau 4). L'expression de K99 sans les antigènes O9 et K30, ne suffit pas pour la colonisation. L'antigène capsulaire K30 a un rôle important, mais la colonisation optimale est obtenue quand la souche exprime ses trois antigènes O9, K30 et K99. Le rôle des antigènes capsulaires comme facteur de colonisation a été confirmé par d'autres travaux (Haddad et Gyles, 1982).

Tableau 4
Colonisation de l'intestin du veau par *E. coli* O9:K30:K99 et différents variants antigéniques d'après Smith et Huggins (1978)

Variants de <i>E. coli</i> O9:K30, K99	Nombre de <i>E. coli</i> (log ₁₀ /g)					
	Contenu caillette	Associé à la paroi de l'intestin grêle				Côlon
		1 ^a	3	5	7	
O ⁻ , K ⁻ , K99 ⁻	5,3	4,3	4,3	4,2	4,2	5,3
O ⁻ , K ⁻ , K99 ⁺	3,0	2,9	4,4	4,8	4,3	4,6
O ⁺ , K ⁻ , K99 ⁻	5,4	4,6	4,7	4,7	4,0	5,6
O ⁺ , K ⁻ , K99 ⁺	1,8	4,3	6,4	6,3	5,3	6,0
O ⁺ , K ⁺ , K99 ⁻	5,4	6,7	8,0	8,3	8,2	8,6
O ⁺ , K ⁺ , K99 ⁺	6,4	8,3	9,2	9,5	9,2	9,9

a. L'intestin grêle est divisé en 7 parties égales du duodénum (1) à l'iléon terminal (7)

On s'est ensuite interrogé sur les rôles respectifs des différents fimbriae qui sont souvent associés chez les souches ECET du veau. Ainsi, les fimbriae F41 identifiés par Morris *et al.* (1982) sont très souvent associés à K99 chez les souches ECET de sérogroupes O101 ou O9. Les expérimentations avec différents modèles animaux ont montré que F41 est plus important que K99 pour expliquer la virulence de ces souches ECET (Bertin, 1985 ; Runnels *et al.*, 1987).

Les travaux de notre laboratoire ont identifié F(31A) maintenant appelé CS31A et Fy maintenant appelé F17-A comme autres facteurs de colonisation des ECET du Veau (Girardeau *et al.*, 1979, 1988). CS31A est associé à certaines souches ECET de sérogroupes O8 ou O20 (Girardeau *et al.*, 1988). Fy (ou F17-A) (Lintermans *et al.*, 1987 ; Bertin *et al.*, 1996) est associé principalement à un clone ECET de sérotype

O101:K32:H9 qui exprime par ailleurs K99 et F41 (Contrepois, publication en cours). Les anticorps dirigés contre F17-A agissent sans doute également contre des variants de F17-A associés à d'autres pathotypes de *E. coli* (Bertin *et al.*, 1996).

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats et les enquêtes épidémiologiques (Renault *et al.*, 1982 ; Gaastra et De Graaf, 1982) qui ont identifié les différents antigènes des ECET du veau, les motifs antigéniques qui sont susceptibles d'induire des anticorps dirigés contre les facteurs de colonisation sont répertoriés dans le tableau 5. En dépit de la grande diversité antigénique théorique pour les ECET du veau, les études épidémiologiques permettent de cibler un nombre limité d'antigènes (tableau 5) pour la formulation des vaccins.

Tableau 5

Antigènes des ECET susceptibles d'induire des anticorps colostraux inhibant la colonisation de l'intestin grêle du veau

Types d'antigènes	Antigènes vaccinnants
Sérogroupe O	O101, O9, O8, O20
Sérogroupe K	K25, K28, K30, K32, K35
Protéines de la famille des fimbriae	K99 ⁽¹⁾ , F41, Fy (F17-A), F31A (CS31A)

(1) Antigène commun à tous les ECET du veau

4. PROTECTION DES VEAUX PAR LE COLOSTRUM DES VACHES VACCINÉES

En réalisant des expérimentations dans des conditions gnotobiotiques où les veaux infectés expérimentalement avec une souche ECET recevaient un colostrum de vaches vaccinées ou non, nous avons été les premiers à démontrer la protection due aux anticorps anti-K99 du colostrum (Contrepois *et al.*, 1978). Nous ferons état des résultats obtenus en insistant sur la nécessité d'une coopération ou d'un effet additif entre les anticorps dirigés contre les différents constituants de la sur-

face bactérienne pour obtenir une bonne protection. Ainsi les résultats rapportés dans le tableau 6 montrent que les veaux recevant le colostrum de vaches vaccinées avec *E. coli* O101:K-, K99, F41 sont protégés à 100 % lorsque la souche infectante est identique à la souche vaccinale mais que la protection est incomplète lorsque la souche infectante est hétérologue pour les antigènes O et K. On peut penser que l'addition des anticorps anti-O101 et anti-(K99 + F41) est nécessaire pour que la protection soit totale (Contrepois *et al.*, 1978, Contrepois *et al.*, 1985a).

Tableau 6

Protection conférée par le colostrum d'une vache vaccinée avec *E. coli* O101:K-, K99+, F41+ chez les veaux infectés expérimentalement

(a) avec la souche homologue O101:K-, K99+, F41+

(b) avec la souche hétérologue O9:K30:K99+, F41+

	Veaux	Diarrhée	Deshydratation	Mort
a	4 témoins	4	3	2
	6 vaccinés	1	0	0
b	7 témoins	7	7	6
	6 vaccinés	3	2	2

Une démonstration du même type est obtenue lorsqu'on étudie expérimentalement la protection contre une souche ECET de sérotype O101:K32:H9 qui exprime les fimbriae K99, F41 et Fy (F17-A). Des vaches vaccinées avec *E. coli* O9:K30:H-, K99+, F41+ ont fourni un colostrum anti-(K99 + F41). D'autres vaches vaccinées avec *E. coli* O2:K7:H42, Fy (F17-A) ont fourni un colostrum anti-Fy (F17-A). Isolément, ces

colostrums anti-(K99 + F41) ou anti-Fy (F17-A) ne protègent pas les veaux éprouvés avec la souche ECET O101:K32:H9 exprimant les trois facteurs de colonisation K99, F41 et Fy (F17-A) (tableau 7). Il faut l'effet additif des anticorps anti-(K99 + F41) et anti-Fy (F17-A) pour que la protection soit bonne (Contrepois *et al.*, 1985b).

Tableau 7
Evolution clinique des veaux recevant les colostrums anti-(K99 + F41) et/ou anti-Fy (F17-A) éprouvés avec la souche ECET exprimant K99, F41 et Fy (F17-A) d'après Contrepois *et al.* (1985b)

Veaux	Colostrum	Diarrhée	Deshydratation	Mort
2 témoins	Vache non vaccinée	2	2	2
3 « vaccinés »	Anti-(K99 + F41)	3	3	2
3 « vaccinés »	Anti-Fy (F17-A)	3	3	3
4 « vaccinés »	Anti-(K99 + F41) + Anti-Fy (F17-A)	2	0	0

L'ensemble des résultats énoncés ci-dessus nous a permis dès 1979 de déposer un brevet pour un vaccin anti-colibacillaire chez les vaches gestantes associant les antigènes K99 et F41 mais aussi F31A (CS31A) et Fy (F17-A). Le choix des autres valences vaccinales tenant compte des sérogroupes O et K des ECET du veau a permis de proposer un vaccin commercialisé depuis 1982. Son efficacité a été démontrée par des expérimentations sur le terrain (Desmettre *et al.*, 1981) et il est maintenant validé par son succès commercial depuis plus de 10 ans dans sa formulation purement anti-colibacillaire ou plus récemment sous une forme mixte associant les antigènes vaccinaux des colibacilles à ceux des Rotavirus et Coronavirus.

5. AUTRES PERSPECTIVES VACCINALES

Les progrès de la vaccinologie en relation avec l'avènement des techniques du génie génétique permettent aujourd'hui le développement de vaccins contre n'importe quel microorganisme dès lors qu'on connaît l'antigène ou les déterminants antigéniques (épitopes) induisant une protection vaccinale. Différents systèmes d'expression de protéines recombinantes par des bactéries, des virus ou des cellules eucaryotes sont maintenant utilisés.

Pour notre part, nous proposons l'utilisation de la protéine porteuse CS31A pour l'expression de déterminants antigéniques hétérologues pouvant être bactériens, viraux ou parasitaires (Bousquet *et al.*, 1994). La protéine polymérique CS31A produite en grande quantité à la surface de *Escherichia coli* est très immunogène et permet d'exprimer un grand nombre de fois des déterminants antigéniques d'intérêt vaccinal. Un brevet concernant l'utilisation de CS31A comme

protéine porteuse pour l'expression d'épitopes hétérologues a été délivré à l'INRA en février 1995. Avec ce système nous avons déjà montré chez la souris que les protéines CS31A recombinantes comportant des peptides de la protéine S du virus de la gastro-entérite transmissible du porcelet induisaient des anticorps neutralisant le virus *in vitro* et un effet rappel de type vaccinal lorsque les souris étaient ensuite inoculées avec le virus (Der Vartanian *et al.*, 1996).

La protéine porteuse CS31A est actuellement utilisée dans un projet visant à produire une protéine recombinante contenant tout ou partie de l'entérotoxine thermostable de *E. coli* afin d'obtenir à faible coût un composé immunogène induisant la production d'anticorps neutralisant l'activité de l'entérotoxine. On pourrait ainsi disposer d'une valence supplémentaire pour les vaccins anti-colibacillaires.

Les bactéries produisant les protéines recombinantes à leur surface sont aussi un outil pour l'immunisation par voie orale en vue d'une protection contre les pathogènes infectant les muqueuses. La prophylaxie contre les virus entéropathogènes du veau (Rotavirus, Coronavirus) n'est pas totalement satisfaisante aujourd'hui puisque la protection colostrale n'est pas très efficace chez le veau âgé de plus d'une semaine. Un obstacle limitant l'utilisation de virus atténués pour immuniser le veau à sa naissance est la neutralisation de ces virus par les anticorps du colostrum. Des bactéries recombinantes (*E. coli* ou Salmonelles atténuées) exprimant à leur surface quelques épitopes viraux pertinents pourraient être un immunogène plus efficace que les virus atténués pour induire une protection des muqueuses dans la période néonatale. Ce sont là des pistes de recherches où les progrès de la vaccinologie pourraient apporter de nouvelles solutions.

RÉFÉRENCES

- BERTIN A., 1985. *J. Gen. Microbiol.*, 131, 3037-3045
- BERTIN Y., GIRARDEAU J.P., DARFEUILLE-MICHAUD A., CONTREPOIS M., 1996. *Infect. Immun.*, 64, 332-342.
- BOUSQUET F., MARTIN C., GIRARDEAU J.P., MÉCHIN M.C., DER VARTANIAN M., LAUDE H., CONTREPOIS M., 1994. *Infect. Immun.*, 62, 2553-2561.
- CONTREPOIS M., GIRARDEAU J.P., DUBOURGUIER H.C., GOUET P., LEVIEUX D., 1978. *Ann. Rech. Vet.*, 9, 385-388.
- CONTREPOIS M., GIRARDEAU J.P., DUBOURGUIER H.C., GOUET P., 1985a. *Ann. Rech. Vet.*, 16, 41-46.
- CONTREPOIS M., GIRARDEAU J.P., 1985b. *Infect. Immun.*, 50, 947-949.
- DER VARTANIAN M., GIRARDEAU J.P., MARTIN C., ROUSSET E., CHAVAROT M., LAUDE H., CONTREPOIS M., 1996. *Vaccine* (sous presse)
- DESMETTRE P., TIXIER G., VALETTE L., CONTREPOIS M., GOUET P., DUBOURGUIER H.C., 1981. *G.T.V.*, 81, 4-B-224, 69-81.
- GAASTRA W., DE GRAAF F.K., 1982. *Microbiol. Rev.*, 46, 129-161.
- GIRARDEAU J.P., DUBOURGUIER H.C., CONTREPOIS M., 1980. *G.T.V.*, 80, 4-B-190, 49-60
- GIRARDEAU J.P., DER VARTANIAN M., OLLIER J.L., CONTREPOIS M., 1988. *Infect. Immun.*, 56, 2180-2188.
- HADDAD J.J., GYLES C.L., 1982. *Can. J. Comp. Med.*, 46, 21-26.
- LINTERMANS P., POHL P., DEBOECK F., BERTELS A., SHLICKER J., VANDEKERCKHOVE J., VAN DAMME J., VAN MONTAGU M., DE GREVE H., 1988. *Infect. Immun.*, 56, 1475-1484.
- MARTEL J.L., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., GIRARDEAU J.P., GOUET P., BORDAS C., HAYERS F., QUILLERET-HELIEZ A., RAMISSE J., SENDRAL R., 1981. *Ann. Rech. Vet.*, 12, 253-257.
- MORRIS J.A., THORNS C., SCOTT A.C., SOJKA W.J., WELLS A.G., 1982. *Infect. Immun.*, 36, 1146-1153.
- ØRSKOV I., ØRSKOV F., SMITH H.W., SOJKA W.J., 1975. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, B83, 31-36.
- ØRSKOV I., ØRSKOV F., 1984. In BERGMAN T. (Editor), *Methods in Microbiology*. Academic Press, vol 14, 43-142.
- PERRIN B., MARTEL J.L., SOLSONA M., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., GIRARDEAU J.P., GOUET P., BORDAS C., HAYERS F., QUILLERET-HELIEZ A., RAMISSE J., SENDRAL R., 1981. *Ann. Rech. Vet.*, 12, 259-263.
- PORTEJOIE Y., 1995. In SNGTV (Editor), *Journées Nationales des G.T.V., Pathologies et Chirurgies Néonatales*. Angers, France. 175-177.
- PORTER P., 1972. *Immunology*, 23, 225-231.
- RUNNELS P.L., MOON H.W., SCHNEIDER R.A., 1980. *Infect. Immun.*, 28, 298-300.
- RUNNELS P.L., MOSELEY S.L., MOON H.W., 1987. *Infect. Immun.*, 55, 555-558.
- RENAULT L., CONTREPOIS M., DUBOURGUIER H.C., GOUET P., BORDAS C., LE BOURHIS E., 1980. *Proceedings of the 2nd International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. Lucerne, Switzerland. 420-423.
- SEIGNOLE D., MOURICOUT M., DUVAL-IFLAH Y., QUINTARD B., JULIEN R., 1991. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1591-1601.
- SMITH H.W., GYLES C., 1970. *J. Med. Microbiol.*, 3, 387-392.
- SMITH H.W., LINGGOOD M.A., 1972. *J. Med. Microbiol.*, 8, 243-250.
- SMITH H.W., HUGGINS M.B., 1978. *J. Med. Microbiol.*, 11, 471-491.
- SNODGRASS D.R., BROWNING G., 1993. In PETERS A.R. (Editor), *Enteric vaccines for farm animals and horses in vaccines for veterinary applications*. Butterworth Heinemann, Oxford, United Kingdom. 116-122.
- TENEBERG S., WILLEMSEN P., DE GRAAF F.K., KARLSSON K.A., 1990. *FEBS Lett.*, 263, 10-14.

