

---

# INFECTION EXPÉRIMENTALE DU VEAU PAR LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN : ÉVALUATION DE LA RÉPONSE LYMPHOCYTAIRE PAR IMMUNOPHÉNOTYPAGE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Laurent, Henri, Etienne DORÉ**  
Né, le 15 avril 1972 SOISSONS (Aisne)

---

**Directeur de thèse : M. le Professeur SCHELCHER**

---

**JURY**

PRESIDENT :  
**M. DABERNAT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. SCHELCHER**  
**Mme BOURGES-ABELLA**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur par intérim	: M.	<b>G. BONNES</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>R. LAUTIE</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAU</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **CABANIE Paul**, Histologie, Anatomie pathologique
- M. **CAZIEUX André, (sur nombre)** Pathologie chirurgicale
- M. **DORCHIES Philippe**, Parasitologie et Maladies Parasitaires
- M. **GUELFI Jean-François**, Pathologie médicale des Equidés et Carnivores

**PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **AUTEFAGE André**, Pathologie chirurgicale
- M. **BENARD Patrick**, Physique et Chimie biologiques et médicales
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, Physique et Chimie biologiques et médicales
- M. **CHANTAL Jean**, Pathologie infectieuse
- M. **DARRE Roland**, Productions animales
- M. **DELVERDIER Maxence**, Histologie, Anatomie pathologique
- M. **ECKHOUTTE Michel**, Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale
- M. **EUZEBY Jean**, Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie
- M. **FRANC Michel**, Parasitologie et Maladies Parasitaires
- M. **GRIESS Daniel**, Alimentation
- M. **MILON Alain**, Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie
- M. **PETIT Claude**, Pharmacie et Toxicologie
- M. **REGNIER Alain**, Physiopathologie oculaire
- M. **SAUTET Jean**, Anatomie
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, Physiologie et Thérapeutique

**PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale
- M. **BERTHELOT Xavier**, Pathologie de la Reproduction
- M. **CORPET Denis**, Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, Parasitologie et Maladies parasitaires
- M. **ENJALBERT Francis**, Alimentation
- M. **LIGNEREUX Yves**, Anatomie
- M. **MARTINEAU Guy**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour
- M. **PICAVET Dominique**, Pathologie infectieuse
- M. **SCHELCHER François**, Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour

## PROFESSEUR CERTIFIE DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE

- M. **ASIMUS Erick**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS- BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **GAYRARD Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

## MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **HAY Magali**, *Zootéchnie*  
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

*A notre Jury de thèse,*

**A Monsieur le Professeur Henri DABERNAT**  
Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
Bactériologie - Virologie

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de thèse.*

***Hommage respectueux***

**A Monsieur le professeur François SCHELCHER**  
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour

*Qui a bien voulu nous consacrer son temps et nous a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse.*

***Sincère reconnaissance.***

**A Madame le docteur Nathalie BOURGES-ABELLA**  
Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Histologie - Anatomie pathologique

*Qui nous a fait l'honneur de participer à notre Jury de thèse.*

***Sincères remerciements***



A mes parents, pour m'avoir guidé et encouragé dans mes choix et avoir toujours été présents aux moments où il le fallait. Merci tout simplement de votre patience et de votre générosité.

A ma soeur Corinne et à mon frère Christophe, ainsi que leurs pièces rapportées, pour qui j'exprime toute mon affection et mon estime.

A mes grands parents qui m'ont appris les vraies choses de la vie.

A toute ma famille pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté pendant ces longues années d'études.

A tous mes amis que je remercie pour les bons moments passés et ceux à venir. A Jacques, Pôôl, Benoit, Schnouf, Dauby, Jéjé, Valé, Gaby, Marlène, mais aussi à mes amis qui sont restés en Picardie... et à tous ceux que j'ai pu oublier, qu'ils m'en excusent.

A Laura, pour la place déterminante que tu tiens dans ma vie depuis quelques années. Il y a des passions et des moments que l'on espère durer toujours...  
Et enfin, à toute ta famille (de tous poils !) qui m'apporte soutien et réconfort.





## **TABLE DES MATIERES**

<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>7</b>
<b><u>PREMIERE PARTIE: LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL BOVIN ET LES TROUBLES CLINIQUES DANS L'ESPECE BOVINE</u></b>	<b>8</b>
1/ Espèces infectées	9
2/ Répartition géographique et saisonnalité	9
2.1/ Répartition géographique	9
2.2/ Saisonnalité	11
3/ Virologie	11
3.1/ Classification	11
3.2/ Morphologie	11
3.3/ Structure génétique et protéines virales	11
3.4/ Structures immunogènes	13
3.5/ Culture du virus	13
3.6/ Résistance du virus	13
4/ Etude clinique	14
4.1/ Généralités	14
4.2/ Tableau clinique	14
5/ Lésions	14
5.1/ Lésions macroscopiques	14
5.2/ Lésions microscopiques	15
6/ Epidémiologie	15
6.1/ Transmission du virus	15
6.2/ Transmission interspécifique	15
6.3/ Saisonnalité des épisodes infectieux et persistance	15
6.4/ Influence du taux de renouvellement et de l'introduction	16
7/ Physiopathologie	16
<b><u>DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES</u></b>	<b>19</b>
1/ Animaux	20
1.1/ Caractéristiques individuelles	20
1.2/ Conditions d'élevage	20
1.3/ Identification	20
1.4/ Contrôle sanitaire à l'introduction	21
2/ Examen clinique	21

3/ Prélèvements	21
3.1/ Prélèvements sanguins	21
3.2/ Lavage bronchoalvéolaire-LBA-	23
4/ L'immunophénotypage lymphocytaire	23
4.1/ Anticorps monoclonaux	23
4.2/ Analyses au cytomètre en flux	24
4.3/ Analyses par immunomarquage sur lame	25
4.4/ Infection expérimentale par le VRSB: évolution des sous-populations lymphocytaires du sang et du LLBA	26
4.4.1/ Cellules du sang	26
4.4.2/ Cellules du LLBA	26
5/ Inoculation de VRSB	27
5.1/ Souches virales	27
5.2/ Modalité d'inoculation	27
6/ Calculs et analyses statistiques	27

## **TROISIEME PARTIE: RESULTATS** **28**

1/ Résultats cliniques	29
2/ Résultats virologiques	29
3/ Résultats du contrôle des surinfections virales ou bactériennes	30
4/ Résultats de l'évaluation des populations leucocytaires du sang et du LLBA	30
4.1/ Populations leucocytaires sanguines	30
4.2/ Populations leucocytaires du LLBA	30

## **QUATRIEME PARTIE: DISCUSSION** **40**

1/ Discussion du modèle expérimental	41
1.1/ Les animaux	41
1.2/ Inoculation	42
1.3/ Prélèvements	42
1.3.1/ Prélèvements sanguins	42
1.3.2/ Prélèvements de LLBA	43
1.4/ Identification des sous-populations lymphocytaires	44
1.5/ L'immunomarquage	45
1.5.1/ Cytométrie en flux	46
1.5.2/ Immunomarquage sur lame	49
1.6/ Critères cliniques	49
2/ Etude de la réponse des sous-populations lymphocytaires sanguines et du LLBA par immunomarquage	49
2.1/ Sous-populations lymphocytaires sanguines	49
2.2/ Sous-populations lymphocytaires du LLBA	50

<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>51</b>
--------------------------	-----------

<b><u>ANNEXES</u></b>	<b>52</b>
-----------------------	-----------

Annexe 1: Coloration May-Grunwald-Giemsa	52
------------------------------------------	----

Annexe 2: Composition du milieu de base et du milieu utilisé pour le LBA	53
--------------------------------------------------------------------------	----

Annexe 3: Technique d'identification du VRSB par IFI sur LABTEK	54
-----------------------------------------------------------------	----

<b><u>REFERENCES</u></b>	<b>55</b>
--------------------------	-----------



## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

### **TABLEAUX**

Tableau 1: Caractéristiques individuelles des veaux	20
Tableau 2: Examen clinique standardisé	22
Tableau 3: Anticorps monoclonaux	24
Tableau 4: Titres viraux du VRSB (UFP/ml) à partir du LLBA des veaux 1,2,3,4,5,6	30
Tableau 5: Caractéristiques comparées des infections par le VRSB et le VRSB	41

### **FIGURES**

Fig. 1: Prévalence du virus respiratoire syncytial bovin en Suède	10
Fig. 2: Carte génique des paramyxovirus	12
Fig. 3: Physiopathologie de l'infection par le VRS	18
Fig. 4: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe LBA non inoculé (veaux A,B,C,D,E,F)	32
Fig. 5: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe VRSB+LBA (veaux 1,2,3,4,5,6)	33
Fig. 6: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe VRSB (veaux 7,8,9)	34
Fig. 7: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe LBA + VRSB (veaux 1,2,3,4,5,6), du groupe LBA (veaux A,B,C,D,E,F) et du groupe VRSB (veaux 7,8,9)	35
Fig. 8: Evolution des populations leucocytaires sanguines des veaux 1,2,3,4,5,6 (inoculés) et des veaux A,B,C,D,E,F (témoins)	36
Fig. 9: Evolution des sous populations lymphocytaires sanguines CD3, CD4, CD8, $\gamma\delta$ T et CD21 des veaux 1,2,3,4,5,6 (inoculés) et des veaux A,B,C,D,E,F (témoins)	37

Fig. 10: Evolution de la concentration en leucocytes (a), en neutrophiles (b), en lymphocytes (c), en macrophages (d) du LLBA au cours du temps pour le groupe principal inoculé et le groupe témoin 38

Fig. 11: Evolution de la proportion de lymphocytes CC30 (CD4)(a), et ILA51 (CD8)(b) et de la concentration en lymphocytes CC30 (CD4)(c) et ILA51 (CD8)(d) du LLBA au cours du temps pour le groupe principal inoculé et le groupe témoin 39

Fig. 12: Distribution des sous-populations lymphocytaires dans le sang périphérique chez les bovins 44

Fig. 13: Immunomarquage indirect en deux couches 46

Fig. 14: Principe de fonctionnement du cytomètre en flux (COULTER EPICS C) 47

Fig. 15: Histogramme biparamétrique des leucocytes sanguins bovins. Les fenêtres 1, 2 et 3 définissent respectivement les populations de lymphocytes, monocytes et polynucléaires 48

Fig. 16: Histogramme monoaramétrique de distribution de la fluorescence verte (FITC) conditionné sur la population de lymphocytes 48

## **INTRODUCTION**

La prévalence des affections respiratoires chez les bovins a suscité depuis le début des années quatre-vingts de nombreux travaux fondamentaux et appliqués.

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB) est actuellement considéré comme un des agents majeurs des troubles respiratoires dans l'espèce bovine. L'enjeu en santé animale paraît considérable sur le plan économique.

En outre, les bovins semblent les seuls animaux où existent des troubles spontanés, similaires sur les plans épidémiologique, clinique et lésionnel à l'infection humaine par le Virus Respiratoire Syncytial Humain (VRSH). Le développement de modèles expérimentaux sur bovins s'avère donc potentiellement très intéressant pour mieux comprendre l'épidémiologie mais surtout les aspects immuno-vaccinologiques.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'évolution des sous-populations lymphocytaires à partir d'un modèle expérimental sur veaux, reproductible et expressif sur le plan clinique. Les sous-populations lymphocytaires seront analysées à partir de prélèvements sanguins et de lavage bronchoalvéolaire séquentiels.





**PREMIERE PARTIE**

**le Virus Respiratoire Syncytial Bovin**

**et**

**les troubles cliniques dans l'espèce Bovine**

## **1/Espèces infectées**

Dans les conditions naturelles, le VRSB ne semble atteindre que les bovins.

Quelques cas d'infection caprine et ovine ont été rapportés par des VRS proches sur le plan antigénique (respectivement Virus Respiratoire Syncytial Caprin et Virus Respiratoire Syncytial Ovin). Les troubles cliniques provoqués sont réduits (atteinte de l'appareil respiratoire supérieur).

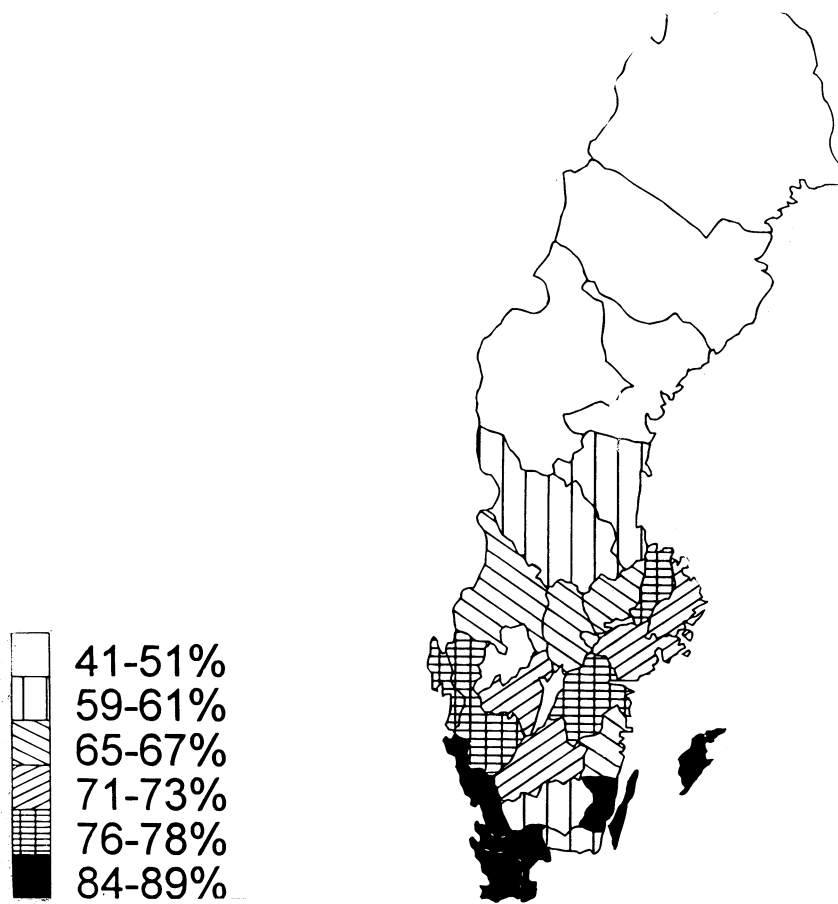
## **2/Répartition géographique et saisonnalité**

### **2.1/Répartition géographique**

La répartition géographique des infections par le VRSB est mondiale. On retrouve cette maladie partout à la surface du globe.

La prévalence sérologique du VRSB est généralement élevée mais semble dépendre de la densité des troupeaux (*Elvander 1996*).

Ainsi, les différents foyers de maladie respiratoire due au VRSB en Suède depuis 1988 ont été recensés. Le virus a été détecté à partir d'écouvillons nasopharyngés durant la phase aiguë de la maladie par culture, immunofluorescence ou RT-PCR. Dans les élevages laitiers isolés, les primo-infections sévères ont été observées souvent suite à l'achat de bovins. La prévalence paraissait plus élevée au Sud, région à forte densité de troupeaux, et plus faible au Nord. (cf. fig. 1)



**Fig. 1: Prévalence du virus respiratoire syncytial bovin en Suède.**

## 2.2/Saisonnalité

Chez les bovins, la saisonnalité d'apparition des troubles respiratoires associés au VRSB est bien marquée, les troubles respiratoires sont les plus fréquents en automne et en hiver. Ceci a fait l'objet d'études épidémiologiques détaillées en Europe et en Amérique du Nord (*Baker & al. 1986-b; Van der Poel & al. 1993-1994*).

Différents facteurs physiques semblent intervenir (comme la pression atmosphérique, les changements climatiques, l'altitude, l'humidité...) mais seules des températures faibles sembleraient réellement significatives (*Verhoeff 1984*).

## 3/Virologie

### 3.1/Classification

Le VRSB est un virus du genre Pneumovirus appartenant à la famille des Paramyxoviridae et à l'ordre des Mononégavirales (*Collins & al. 1991*).

L'ARN est monocaténaire de sens négatif.

### 3.2/Morphologie

Chaque virion est constitué d'une nucléocapside à symétrie hélicoïdale de 12 à 15 nm et d'une enveloppe lipidique provenant de la membrane cellulaire contenant des glycoprotéines de surface.

La forme est assez variable, allant de forme arrondie à des formes filamenteuses.

### 3.3/Structure génétique et protéines virales

Le génome est composé d'environ 15.5 kpb (*Collins & al. 1996*).(cf. fig 2.)

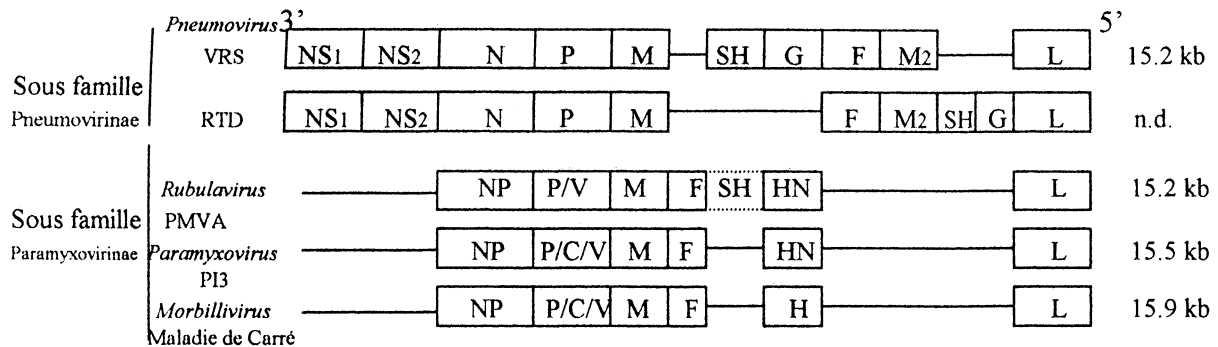
Dix gènes sont identifiés (fig. 2). Sur les dix protéines virales, huit sont structurales (N, P, M, SH, F, M<sub>2</sub>, L) et deux non structurales (NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub>).

Ainsi, la protéine G serait impliquée dans l'attachement aux cellules cibles. Elle est fortement glycosylée. Ceci faciliterait la pénétration du virus dans le mucus de la muqueuse respiratoire. On peut noter également une grande variabilité de localisation des chaînes glucidiques qui pourrait contribuer à la variabilité antigénique.

La protéine F assure la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire et des cellules infectées entre elles lors de formation des syncytia.

La protéine SH est présente sous une forme glycosylée et non glycosylée, à la surface des cellules infectées.

Comme pour la variabilité antigénique du VRSH, les différentes souches du VRSB ont été classées en différents sous-groupes A, AB, B (Valarcher & al. 2000). L'établissement de ces sous-groupes repose essentiellement sur la variabilité de G.



**Fig. 2: Carte génique des paramyxovirus (sl) (Collins P.L. & al. 1996)**

Virus:            VRSB    Virus Respiratoire Syncytial Bovin  
                     RTD    Rhinotrachéite de la dinde  
                     PMVA   Paramyxovirus aviaire 1 (Newcastle)

Protéines:    NS    non structurale  
                   N/NP   nucléocapside  
                   P    phosphoprotéine  
                   M    matrice  
                   SH   small hydrophobic  
                   G, HN, H   attachement  
                   F    fusion  
                   M2   2° protéine de matrice  
                   L    large polymerase protein

### 3.4/Structures immunogènes

Des anticorps se développent essentiellement contre F et N bien que des anticorps contre les autres protéines soient également détectés (*Kimman & Westenbrink 1989-1990*)

La glycoprotéine G s'avère moins immunogène que F. Ainsi, les anticorps dirigés contre G diminuent très rapidement par rapport aux anticorps dirigés contre F (*Schrijver & al. 1996a*).

Ces deux dernières glycoprotéines induisent une réponse protectrice fondées sur les anticorps neutralisants.

Les protéines F, M et N induisent une réponse lymphocytaire cytotoxique.

La Protéine F exprimée par un virus vaccine recombinant induit primitivement une réponse de type Th1 alors que G induit une réponse de type Th2 (*Alwan & al. 1993*).

### 3.5/Culture du virus

Le virus cultive sur cellules diploïdes d'origine respiratoire (poumon foetal de veau), rénale ou testiculaire; mais également sur lignées Bovine Turbinate, MDBK, Vero.

L'effet cytopathogène se caractérise par la formation de syncytia.

Lors d'isolement l'ensemencement doit être réalisé sous deux heures maximum (les prélèvements pouvant être conservés à + 4 °C avant inoculation aux cultures ).

### 3.6/Résistance du virus

C'est un virus très labile dans le milieu extérieur.

Il est très sensible à la chaleur, à un pH inférieur ou égal à 3, à certains produits chimiques (éther, chloroforme...).

Par contre, les cations divalents le protégeraient en partie contre l'inactivation (*Stott et Taylor 1985*).

Lors d'isolement l'ensemencement doit être réalisé sous deux heures maximum (les prélèvement pouvant être conservés à + 4 °C avant inoculation aux cultures).

## 4/Etude clinique

### 4.1/Généralités

Dans les conditions naturelles, l'infection par le VRSB peut avoir deux issues possibles.

Elle peut rester subclinique. Les animaux sont alors infectés mais sans symptômes.

Mais il peut apparaître également des symptômes sévères et quelques cas de mortalité (*Kimman et al 1988, Schelcher et al 1990*).

Les troubles cliniques sont surtout observés sur des veaux de 1 à 8 mois (*Bryson & al 1978*). Il est toutefois possible que des veaux très jeunes (quelques jours) ou des adultes soient cliniquement atteints et parfois de manière grave.

Les anticorps d'origine maternelle sont décelables jusqu'à l'âge de 3 mois, mais ils ne protègent pas efficacement contre la maladie (*Van der Poel & al 1994*).

Les anticorps neutralisants n'empêchent pas la réinfection aussi bien chez l'homme (*Hall & al. 1991*) que chez les bovins (*Westenbrink & al. 1989*).

### 4.2/Tableau clinique

Le tableau clinique est caractérisé par une apparition et une évolution rapide, un abattement minime et une atteinte du tractus respiratoire profond.

En début d'évolution, il apparaît une anorexie et une hyperthermie assez fugaces (moins de trois jours). Les troubles respiratoires comprennent une polypnée, une dyspnée abdominale, de la toux et parfois des bruits surajoutés (sifflements, crépitations...) perçus à l'auscultation.

Le VRSB peut conduire à une broncho-pneumonie aiguë avec parfois des complications d'emphysème. Cependant, l'infection par le VRSB est un prélude de complications bactériennes (pasteurelles).

## 5/Lésions

### 5.1/Lésions macroscopiques

Le virus peut provoquer une broncho-pneumonie grave, diffuse, avec habituellement un certain degré d'emphysème et d'oedème.

Cette pneumonie est qualifiée de bronchiolo-interstitielle et se caractérise par une densification modérée des lobes cranio-ventraux et un emphysème sur les lobes diaphragmatiques.

## 5.2/Lésions microscopiques

Lors d'infection naturelle par le VRSB, une bronchite et une bronchiolite nécrosante avec des syncytia (cellules multinucléées) d'évolution aiguë peuvent être observées. La lumière est obstruée par des cellules épithéliales, des neutrophiles, des macrophages (*Castelman & al 1985-a*). Des fausses membranes éosinophiles tapissent le contour alvéolaire.

Si l'évolution est plus longue on note une hyperplasie épithéliale et une infiltration principalement par des cellules mononucléées dans l'interstitium interalvéolaire.

## 6/Epidémiologie

Des épizooties de VRSB peuvent apparaître et on ne sait pas encore exactement quels sont les facteurs responsables de la sévérité de la maladie lors de primo-infection. La présence de surinfections (virales, bactériennes et mycoplasmiques), ainsi que les conditions de logement peuvent toutes jouer un rôle.

### 6.1/La transmission du virus

Chez le veau, l'infection par aérosol a longtemps été pressentie comme pouvant être un mode important de transmission (*Bryson & al. 1978*). La transmission par voie aérienne a récemment été confirmée après infection expérimentale.

La transmission peut être influencée par un certains nombre de facteurs comme les changements climatiques et la densité de population.

A l'heure actuelle, aucune preuve d'une transmission vectorielle n'a été apportée chez les bovins.

L'existence d'infection congénitale par le VRSB n'a jamais été rapportée.

La dose infectante de VRSB par animal lors d'expérimentation chez les bovins varie de  $10^3$  TCID<sub>50</sub> à  $10^7$  TCID<sub>50</sub>.

### 6.2/La transmission interspécifique

Les bovins sont les hôtes naturels du VRSB.

Quelques animaux de laboratoires peuvent être infectés expérimentalement avec le VRSB, et la transmission des ovins vers les bovins a été décrite (*Stott et Taylor 1984, Van der Poel 1994*), mais aucun de ces animaux n'a été reconnu comme étant un hôte naturel.



Hormis les bovins, seules les chèvres ont des anticorps spécifiques naturels du VRSB. Cependant, dans la plupart des pays comme la cohabitation des chèvres et des bovins est rare, la transmission du VRSB entre bovins et chèvres semble d'un intérêt pratique mineur (*Van der Poel & al. 1996*).

### 6.3/saisonnalité des épisodes d'infections et persistance

L'apparition de la maladie respiratoire associée au VRSB culmine en automne et en hiver. Les primo-infections sont rares pendant les autres saisons.

La récurrence des épisodes infectieux à VRSB, d'une ampleur et d'une saisonnalité constantes ne peut s'expliquer que par l'existence de processus sous-jacents responsables de cette périodicité.

L'analyse par modélisation d'épisodes infectieux suggère que la transmission continue du VRSB entre bovins séropositifs n'est pas un mécanisme plausible. L'infection chronique, c'est-à-dire la persistance du virus chez certains individus, serait considérée comme plus plausible (*De Jong & al. 1996*).

Certaines études sembleraient indiquer qu'une réexcretion du VRSB est possible, mais celui-ci n'a jamais été isolé à partir de bovins supposés infectés chroniques (*Kimman & al. 1987*).

A 7 jours post inoculation, une détection des protéines virales est possible ce qui suggère une dégradation très lente ou une persistance du virus (*Schrijver & al. 1995*).

### 6.4/Influence du taux de renouvellement et de l'introduction

L'introduction aussi bien que le renouvellement des animaux au sein d'un troupeau représentent un risque majeur d'infection par le VRSB et de troubles respiratoires associés (*De Jong 1996, Elvander 1996 b*).

## **7/ Physiopathologie**

La physiopathologie liée à l'infection par le VRSB est grandement influencée par l'immunité à médiation cellulaire.

Ainsi, deux catégories de cellules T peuvent être définies : les lymphocytes CD4, dont le TCR reconnaît l'antigène présenté par les molécules de classe II du CMH; les lymphocytes CD8, dont le TCR reconnaît l'antigène en association avec les molécules du CMH de classe I.

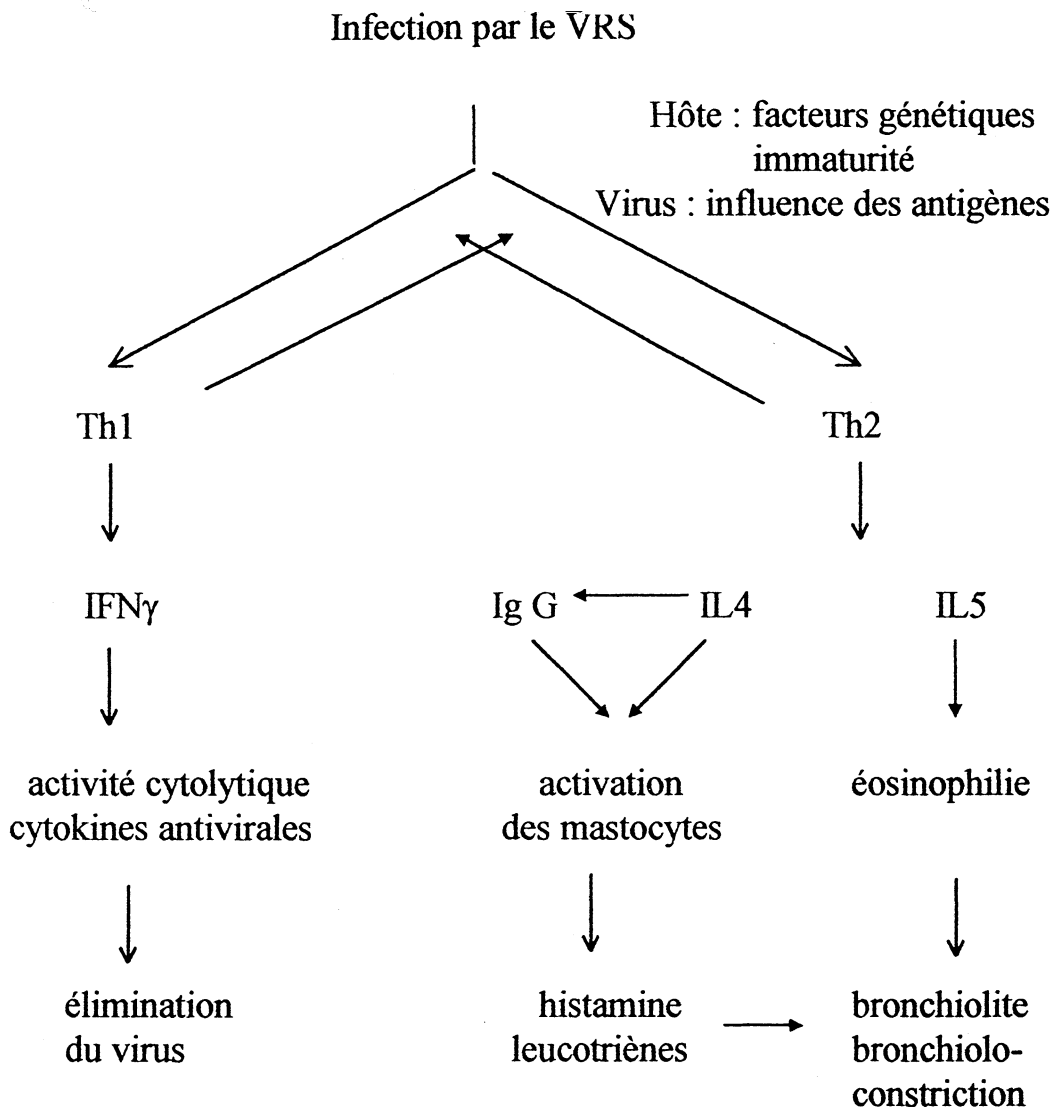
Les lymphocytes T auxiliaires (T helper -Th-) sont définis par le type de cytokines sécrétées. La figure 3 (d'après *Graham 1996*) nous permet d'affirmer que les Th 1 produisent de l'interleukine 2 (IL 2) et de l'interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) induisant une activité cytolytique des cytokines antivirales. Les Th 2 produisent de l'interleukine 4, 5 et 10 (IL 4, IL 5, IL 10) orientant vers une réponse de type allergique et activant les mastocytes.

Les cytokines majoritairement retrouvées dans le LLBA lors d'infection de la souris par le VRSH sont l'IFN  $\gamma$ . La guérison de l'infection est associée à une prédominance de CD4+ et CD8+ produisant de l'IFN  $\gamma$ . La réponse semble donc être de type Th 1 (*Hussel & al. 1996, Kimpfen & al. 1993*).

Chez l'homme l'activité cytolytique est maximale une semaine après l'infection (*Chiba & al. 1989*). Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ permettent l'élimination du VRSH mais provoquent des lésions pulmonaires (*Cannon & al. 1987-1988*). Les lymphocytes T CD4+ ont le même effet mais les lésions pulmonaires sont exacerbées (*Alwan & al. 1992-1994*).

Ces différents auteurs font référence à une infection primaire. D'autres ont étudié la réponse des lymphocytes T lors de réinfection par le VRSB (*Graham & al. 1991b*).

Chez les bovins l'influence des lymphocytes T CD4+ et CD8+ semble suivre le même schéma (*Taylor & al. 1995, Thomas & al. 1996*). Toutefois la déplétion des lymphocytes CD 8+ semble avoir un effet plus marqué que celle des CD4+.



**Fig. 3: Physiopathologie de l'infection par le VRS (Graham 1996)**



## **DEUXIEME PARTIE**

### **MATERIEL ET METHODES**

## 1/Animaux

### 1.1/Caractéristiques individuelles

Les caractéristiques individuelles (race, âge, sexe poids ) des bovins sont rapportées dans le tableau 1.

**Tableau 1** Caractéristiques individuelles des veaux

Veau	Race	Sexe	Age (j)	Poids (kg)	Ac VRSB à J0	SN anti	Groupe expérimental
1	PH	M	64	101	<2		1
2	PH	M	61	98	<2		1
3	PH	M	51	70	2		1
4	PH	M	59	78	2		1
5	PH	M	50	71	2		1
6	PH	M	58	76	4		1
7	PH	M	56	67	<2		2
8	PH	M	54	71	<2		2
9	PH	M	49	64	<2		2
A	PH	M	58	70	2		3
B	PH	M	78	110	<2		3
C	PH	M	63	90	<2		3
D	PH	M	62	83	2		3
E	PH	M	60	78	<2		3
F	PH	M	55	72	4		3

PH: Prim'Holstein

M: Mâle

Groupe 1: inoculé VRSB et LBA (Lavage Broncho Alvéolaire)

Groupe 2: inoculé VRSB

Groupe 3: LBA

### 1.2/Conditions d'élevage

Les veaux sont élevés dans cinq box paillés de 15 m<sup>2</sup> de surface au sol, d'environ 45m<sup>3</sup>, en ventilation statique. Les lots expérimentaux sont strictement séparés. Les veaux sont répartis à raison de 3 par box.

L'alimentation est à base de foin de prairie permanente, disponible à volonté et d'un aliment complémentaire sous forme de granulé ( 1 UFL , 18 % MAT ) à raison de 1.5 kg / veau / jour.

### 1.3/Identification

Tous les veaux sont réidentifiés par une boucle auriculaire portant un chiffre ou une lettre (cf. tableau 1).

#### 1.4/Contrôle sanitaire à l'introduction

Les veaux ont été transportés à l'ENVT dans les heures suivant la naissance en provenance de trois élevages naisseurs. Avant la prise colostrale et à partir de prélèvements sanguins sur anticoagulant -EDTA- et tube sec, ont été recherchés respectivement la protéine p80-125 du virus BVD (Bovine Viral Diarrhea) par immunocapture et les anticorps anti p80-125 du BVDV par un test ELISA (LSI, Cergy Pontoise, France). Les résultats ont tous été négatifs.

Du colostrum provenant de vaches séronégatives vis-à-vis du VRSB et préalablement stocké et congelé à -18°C, a été distribué à raison d'environ 4 à 5 litres par veau au total sur 2 jours. La première prise a eu lieu dès l'arrivée à l'ENVT.

Entre 4 et 8 jours après la prise colostrale le statut en anticorps sériques anti VRSB a été contrôlé par une technique ELISA (LSI, Cergy Pontoise, France).

L'ensemble des résultats s'est avéré négatif. Ce contrôle a été refait 1 à 3 jours avant inoculation par une technique de séroneutralisation. L'ensemble des veaux a été considéré comme négatif (cf. tableau 1).

#### 2/Examen clinique

L'examen clinique réalisé quotidiennement pendant la période d'élevage comportait la prise de température rectale, l'évaluation du comportement, et les caractéristiques des fèces.

Pendant l'expérimentation, a été réalisé un examen clinique standardisé, biquotidien, débutant 1 à 3 jours avant l'inoculation et se poursuivant sur les 20 jours post inoculation. Les différents critères cliniques retenus ont été affectés d'une note fonction de la gravité ou de l'intensité (cf. tableau 2). Chaque note ainsi obtenue a été pondérée par un coefficient multiplicateur. L'addition de ces notes conduit à une note moyenne générale (NMG) pondérée, qui permet de suivre l'évolution clinique dans le temps, d'évaluer la gravité et de comparer différents groupes expérimentaux (*Espinasse & al. 1981*). Ainsi un animal en bonne santé a une NMG pondérée de 18. Le maximum possible est de 72.

#### 3/Prélèvements

##### 3.1/Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins ont été réalisés en veillant à une contention minimale afin de limiter les stress. La région jugulaire avait été préalablement rasée. La veine jugulaire est ponctionnée avec des tubes sous vide (Venoject - ND - Terumo, Leuven, Belgique) et des tubes contenant de l'EDTA-K3 ou de l'héparinate de lithium.

**Tableau 2 Examen clinique standardisé**

	Note	Coefficient de pondération
<b>Température rectale</b>		3
<39°5 C	1	
39°5 ≤ <40°C	2	
40°C ≤ <40°5 C	3	
≥40°5 C	4	
<b>Fréquence respiratoire</b>		3
<35/mn	1	
35 ≤ <45/mn	2	
45 ≤ <65/mn	3	
>65/mn	4	
<b>Refus alimentaire</b>		3
0	1	
0 < <30%	2	
30 ≤ <60%	3	
>60%	4	
<b>Comportement</b>		3
normal	1	
abattement léger	2	
modéré	3	
marqué	4	
<b>Jetage</b>		3
absent	1	
léger	2	
modéré	3	
marqué	4	
<b>Toux</b>		3
absente	1	
légère (<5/20 mn)	2	
modérée (5 < <10/20 mn)	3	
marquée (>10/20 mn)	4	
<b>Dyspnée</b>		3
absente	1	
abdominale légère	2	
modérée	3	
marquée	4	



### 3.2/Lavage bronchoalvéolaire-LBA-

Après anesthésie à la kétamine (Imalgene 1000 -ND -, Rhône-Mérieux) à la dose de 4 mg/kg par voie veineuse, les veaux ont été couchés en décubitus latéral sur un plan de travail.

Les fibroscopes utilisés ont été, selon la taille des bovins, des gastroscopes (GifQ) ou des colonoscopes (Olympus).

Le fibroscope était passé à l'intérieur d'un tuyau rigide, placé dans la bouche et destiné à le protéger, avant d'être dirigé dans le larynx puis la trachée.

Le liquide de lavage était du MEM (Minimum Essential Medium) contenant des sels de Earle, de la L- glutamine (Ref. 31095-029-Gibco Cergy Pontoise, France), 200µg/ml de gentamicine (Gibco), 0.2 µg/ml d'enrofloxacin ( Baytril 10% inj.-ND-, Bayer ) et 2.5 µg/ml de fungizone (Gibco).

Trois fois 60 ml de liquide de lavage, à température ambiante, ont été successivement injectés et réaspirés, à l'aide de seringues stériles, par le canal à biopsie. Une quatrième seringue était finalement utilisée pour aspirer le liquide qui n'avait pu être remonté avec les précédentes. Le prélèvement proprement dit a duré moins de 5 minutes.

Les LBA ont été réalisés à l'aide de deux à quatre fibroscopes différents selon le nombre de veaux, pour permettre une désinfection satisfaisante du matériel entre chaque LBA.

Le canal à biopsie était savonné et écouvillonné puis l'endoscope était immergé dans une solution contenant un détergent (ammoniums) à 0.5% (Hexanios gr-ND-Anios). Un rinçage du canal à biopsie avec 500 ml d'un soluté stérile puis de la gaine externe avec 1 litre de soluté était réalisé. La désinfection proprement dite consistait à une immersion pendant 15 minutes dans une solution de glutaraldéhyde (Steranios -ND- Anios ). Ultérieurement le canal à biopsie et la gaine externe ont été rincés avec respectivement deux litres et un litre de soluté salé stérile.

## 4/L'immunophénotypage lymphocytaire

### 4.1/Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (Acm) utilisés au cours de ce travail étaient spécifiques d'antigène leucocytaires bovins. Il ont été choisis en fonction de leur importance immunologique. La spécificité de chaque Acm figure dans le tableau 3. Ces Acm sont produits par IAH (Institute of Animal Health, Compton, Great Britain) et déposés chez ECACC (European Collection of Animal Cell Culture, PHLS, Porton Down, England) ou VMRD (Pullman, Washington, USA).

**Tableau 3 Anticorps monoclonaux**

Anticorps monoclonal	Isotype	Spécificité
MM1A	IgG1	Bo CD3, T
CC30 CC8	IgG1	Bo CD4, sous-population de T (reconnaissance CMH de classe II restreinte)
CC63 ILA51	IgG2a IgG1	Bo CD8, sous-population de T (reconnaissance CMH de classe I restreinte)
ILA29 CC15	IgG1 IgG2a	Bo WC1, cellules exprimant les chaînes $\gamma$ et $\delta$ du récepteur T
CC21	IgG1	Bo WC3, B mûres (Bo CD21?)

T: lymphocyte T

B: lymphocyte B

#### 4.2/Analyses au cytomètre en flux

L'immunomarquage à partir du sang ou du LLBA a été réalisé sur environ  $10^6$  cellules. Ces cellules ont été incubées 30 mn à 4°C avec l'anticorps monoclonal dilué, spécifique de CD leucocytaire. Les cellules ont été soumises ensuite à deux lavages dans du tampon phosphate salé (TPS)(PBS Dullbecco's, Gibco BRL, Cergy Pontoise, France), contenant 1% de sérum albumine bovine (SAB).

Les cellules ont été remises en suspension dans 100  $\mu$ l d'immunoglobulines de chèvre anti-souris conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (GAM-FITC, Immunotech, Marseille, France).

Lors de chaque analyse, un témoin négatif était réalisé. Dans ce cas, à l'anticorps monoclonal spécifique de CD, était substituée une immunoglobuline de souris de même isotype, mais dénuée de spécificité vis-à-vis des antigènes membranaires des leucocytes bovins.

Les cellules marquées ont été ensuite analysées avec un cytomètre EPICS Coulter (Coulter, Hialeah, Floride) équipée d'un laser argon de 20 mW (Cyomics Uniphase) qui émet à 488 nm.

Les populations lymphocytaires de l'échantillon ont été repérées sur un cytogramme biparamétrique (diffraction de la lumière dans l'axe-FLS-/diffraction de la lumière à 90°-LS-).

La population de lymphocytes était délimitée sur l'écran (fenêtre) et l'acquisition de la fluorescence était conditionnée sur cette population.

Pour les échantillons sanguins, en moyenne  $10^4$  lymphocytes (soit environ 2 % des lymphocytes prélevés) ont été analysés. Pour les échantillons de LLBA la fenêtre qui délimite l'emplacement des lymphocytes était positionnée légèrement au dessus de celle du sang (FLS plus élevée). Le nombre de lymphocytes analysés par échantillon a été plus faible que pour le sang (en moyenne  $10^3$ ).

La délimitation des fenêtre de lecture était réalisée par le même opérateur. Sur les histogrammes monoparamétriques (amplitude de fluorescence en fonction du nombre de cellules ayant donné la même amplitude de fluorescence), les curseurs d'analyse ont été ajustés de manière à ce que moins de 2% des lymphocytes marqués par le témoin d'isotypie soient inclus dans la zone d'analyse spécifique de réponse.

#### 4.3/Analyses par immunomarquage sur lame

Cette technique a été utilisée pour l'identification des sous populations lymphocytaires du LLBA.

Après dénombrement en cellule de Malassez, la suspension cellulaire était ajustée à  $5.10^4$  cellules par lame. Lors de concentrations cellulaires trop élevées, les cellules ont été diluées en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Life Technologies, Cergy Pontoise, France). La cyto centrifugation (Cytospin 3, Shandon, Life Sciences International, Cergy Pontoise, France) durait 8 mn à 450 tpm.

Les lames utilisées étaient des Superfrost Plus (CML, Nemours, France) fixées dans l'acétone 10 mn à  $+4^{\circ}\text{C}$  puis congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Après décongélation, les lames étaient ramenées à température ambiante et réhydratées dans un tampon Tris (0.05M) NaCl (0.15M) à pH 7.6 pendant 5 mn. Les lames étaient d'abord incubées avec du sérum normal de lapin (X902 Dako, Trappes, France) dilué au 1/5 en Tris-HCl salé pendant 20 mn afin de bloquer le bruit de fond. Etaient ensuite successivement mis à incuber:

- anticorps primaire: anticorps monoclonal de souris dilué dans le tampon Tris-HCl salé additionné de 10% de sérum de bovin et de 1% de sérum albumine bovine (SAB)(Réf. A3299, anticorps Sigma St Quentin Fallavier, France) pendant 30 mn.
- anticorps secondaire: anticorps de lapin anti souris biotinylé (Réf. E413 Dako, Trappes, France) dilué au 1/200e dans le tampon Tris-HCl salé -SAB (30 mn).
- complexe streptavidine-biotine (K0391 Dako, Trappes, France) dilué dans du tampon Tris-HCl salé (30 mn).

Les lames n'étaient pas rincées entre le sérum normal de lapin et l'anticorps primaire mais systématiquement entre chaque couche. Les rinçages étaient réalisés dans du tampon Tris-HCl salé contenant 0.2% de poudre de lait, sous agitation. La dilution des anticorps primaires et secondaires dans le tampon Tris-HCl salé-SAB contenant du sérum bovin avait pour but de neutraliser les réactivités non spécifiques liées au immunoglobulines du LLBA. Le sérum de bovin était obtenu après une centrifugation de 10 mn (1300 g) d'un échantillon

de sang prélevé sur tube sec et laissé préalablement à 37°C pendant 1 h pour coaguler. Le système de révélation utilisait des esters de phosphate de phénol et la new fuchsine (New Fuchsin Substrate System - K698 Dako , Trappes , France). Une contre coloration des noyaux par l'hématoxyline de Harris (Hématoxyline en solution selon Harris - Merck) était réalisée pour faciliter l'analyse cytologique.

La lecture au microscope était réalisée indépendamment par deux personnes. Pour chaque type de marquage 200 lymphocytes au moins ont été dénombrés et le nombre de lymphocytes considérés comme positifs noté. La valeur finale retenue correspondait à la moyenne obtenue à partir des deux lectures.

#### 4.4/Infection expérimentale par le VRSB : évolution des sous-populations lymphocytaires du sang et du LLBA

##### 4.4.1/Cellules du sang

Les cellules mononuclées après prélèvement sur héparinate de lithium étaient séparées sur gradient de densité 1.077 (Accuspinne système - Histopaque 1077 -Sigma, St Quentin Fallavier, France). Le sang dilué au 1/2 avec du NaCl à 0.9% à température ambiante (3 ml de sang et 3 ml de NaCl à 0.9%) était déposé dans le compartiment supérieur du tube Accuspin puis centrifugé à 1000 g, pendant 30 mn à 25°C. L'anneau cellulaire une fois récupéré a été lavé à deux reprises avec 10 ml de TPS à température ambiante et après centrifugation à 600g pendant 10 mn à 25°C (enceinte thermostatée).

Après le deuxième lavage le culot était repris dans 2 ml de TPS albuminé à 1% (sérum albumine bovine, Sigma, St Quentin Fallavier, France).

Une numération était effectuée en cellule de Malassez.

Pour chaque animal a été réalisé la cyto-centrifugation de  $5.10^4$  cellules/lame préalablement à une coloration au May Grunwald Giemsa (Unipath, Lyon, France) afin de dénombrer les populations leucocytaires.

Pour chaque animal, 7 fractions, ajustées à environ  $10^6$  cellules chacune, ont été destinées à l'immunomarquage préalablement à l'analyse au cytomètre en flux.

##### 4.4.2/Cellules du liquide de lavage bronchoalvéolaire

Le LLBA des 4 seringues était filtré à travers 2 épaisseurs de gaze stérile et divisé en 2 fractions, destinées à la virologie et à l'immunophénotypage lymphocytaire.

Après dénombrement en cellule de Malassez et évaluation de la viabilité cellulaire par exclusion du bleu trypan, la cyto-centrifugation de  $5.10^4$  cellules/lame était réalisée pendant 8 mn à 450 tpm.

Les cellules de 2 lames ont été colorées au May Grunwald Giemsa afin de déterminer les proportions des populations leucocytaires à partir du dénombrement de 200 leucocytes.

## **5/Inoculation de VRSB**

### **5.1/Souches virales**

L'expérience a été réalisée avec la souche A2 isolée et multipliée sur Bovine Turbinate, au 6ème passage à un titre moyen de  $1.25 \cdot 10^5$  UFP/ml.

Le titre a été déterminé sur une fraction de l'inoculum ensemencée à la fin de l'opération d'inoculation.

### **5.2/Modalité d'inoculation**

L'inoculation a combiné la voie endotrachéale et la voie intranasale pendant 3 jours consécutifs (J0, J1, J2)

L'inoculation endotrachéale a été réalisée selon les modalités générales décrites pour les LBA à l'aide d'un gastroscopie GifQ (Olympus). Le volume de l'inoculum injecté par le canal à biopsie a été de 10 ml. Afin de favoriser une dispersion la plus large possible du virus, l'extrémité du fibroscope était localisée en amont de la bronche apicale droite, la moitié de l'inoculum injectée, de l'air insufflé puis le veau était retourné, enfin l'autre moitié était injecté selon le même procédé.

L'inoculation intranasale a été réalisée avec un nébulisateur stérile spécifique de chaque veau. Le volume d'inoculum administré était de 10 ml réparti à part égale entre les deux narines.

Les veaux témoins (groupe 3) ont reçu , selon les même modalités que le groupe principal, une suspension de Bovine Turbinate non infectée par le VRSB. Le matériel était spécifique de ce groupe.

Des précautions particulières (vêtements de travail et matériel spécifiques, hygiène des mains) ont été prises pour éviter la transmission du VRSB entre les lots, durant toute la durée de l'expérience.

## **6/Calculs et analyses statistiques**

Le nombre absolu d'une sous-population de lymphocytes (NAL) a été calculé en multipliant le nombre absolu de lymphocytes (déterminé par numération et formule) par le pourcentage de la sous-population déterminé par l'analyse au cytomètre en flux ou par la proportion des lymphocytes positifs du cytospin.

Les résultats ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA) (*Winer & al. 1991*).

Le seuil de signification a été fixé à 5%.



## **TROISIEME PARTIE : RESULTATS**

Cette expérience comporte 2 groupes témoins. Les 6 veaux (identifiés 1, 2, 3, 4, 5, 6) du groupe principal inoculés avec le VRSB à J0, J1, J2 ont été soumis à des prélèvements par LBA tous les 2 jours à partir de J5 p.i et destinés:

- à la mise en évidence du VRSB, en culture et par détection d'antigène
- à la mise en évidence du BVDV
- à l'identification des sous-populations lymphocytaires CD4 et CD8

Parallèlement des prélèvements sanguins sont destinés à l'évaluation des sous-populations lymphocytaires CD3, CD4, CD8,  $\gamma\delta$ T et CD21 et à la sérologie.

Un groupe de 3 veaux (identifiés 7, 8, 9) était le premier groupe témoin. Le VRSB était inoculé selon le même protocole que pour le groupe principal. Aucun prélèvement de LLBA ou de sang n'a été réalisé.

Un groupe témoin de 6 veaux (identifiés A, B, C, D, E, F) était le second groupe témoin. Une suspension de culture cellulaire sans VRSB était inoculé selon le même protocole que pour le groupe principal. Les LBA et les prélèvements sanguins ont été réalisés selon le même protocole que pour le groupe principal.

### **1/Résultats cliniques**

L'évolution des NMG pondérées du groupe LBA+VRSB, du groupe LBA et du groupe VRSB est rapportée dans les figures 4,5,6 et 7 :

- le groupe LBA a une NMG pondérée constante. Toutes les valeurs sont situées autour de 20. Les petits écarts observés sont probablement dus aux manipulations.
- pour les deux autres groupes les troubles cliniques surviennent à J4 p.i, culminent à J7 p.i, puis déclinent régulièrement jusqu'à J14 p.i. L'augmentation des NMG pondérées est le reflet d'une température rectale élevée, d'une fréquence respiratoire supérieure à 50/mn, d'une toux persistante, d'un refus alimentaire et d'une altération comportementale.
- la courbe du groupe LBA+VRSB est similaire à celle du groupe VRSB. Les troubles cliniques sont cependant plus élevés pour le premier groupe.

### **2/Résultats virologiques**

La recherche du VRSB s'est avérée négative pour le groupe LBA et positive pour le groupe LBA+VRSB (les titres viraux sont maximaux à J5 p.i et chutent à J7 p.i).



**Tableau 4 Titres viraux du VRSB (UFP/ml) à partir du LLBA des veaux 1, 2, 3, 4, 5, 6**

Veau	J5	J7	J9
1	3.1 10 <sup>3</sup>	50	0
2	4.3 10 <sup>3</sup>	161	0
3	8.3 10 <sup>3</sup>	2.5	0
4	6.7 10 <sup>3</sup>	0	0
5	23 10 <sup>3</sup>	88.7	0
6	25 10 <sup>3</sup>	15	2.5

### **3/résultats du contrôle des surinfections virales ou bactériennes**

La recherche de BVDV par RT-PCR, de l'Herpès Virus Bovin 1, du Parainfluenza 3 et des bactéries de l'appareil respiratoire s'est révélée négative.

### **4/Résultats de l'évaluation des populations leucocytaires du sang et du LLBA**

#### 4.1/Populations leucocytaires sanguines

L'évolution des populations leucocytaires sanguines du groupe VRSB+LBA n'est pas significativement différente de celle du groupe LBA (fig. 8).

L'évolution des sous populations lymphocytaires sanguines du groupes VRSB+LBA n'est pas significativement différente de celle du groupe LBA (fig. 9).

#### 4.2/populations leucocytaires du LLBA

La concentration en leucocytes du LLBA du groupe VRSB+LBA est significativement supérieure à celle du groupe LBA à J5, J7 et J9 p.i. (respectivement  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  et  $p < 0.001$ ) (fig. 10a).

La concentration en neutrophiles du LLBA du groupe VRSB+LBA est significativement supérieure à celle du groupe LBA à J9 p.i. ( $p < 0.001$ ) (fig. 10b).

La concentration en lymphocytes du LLBA du groupe VRSB+LBA est significativement supérieure à celle du groupe LBA à J7 et J9 p.i. (respectivement  $p < 0.05$  et  $p < 0.001$ ) (fig. 10c).

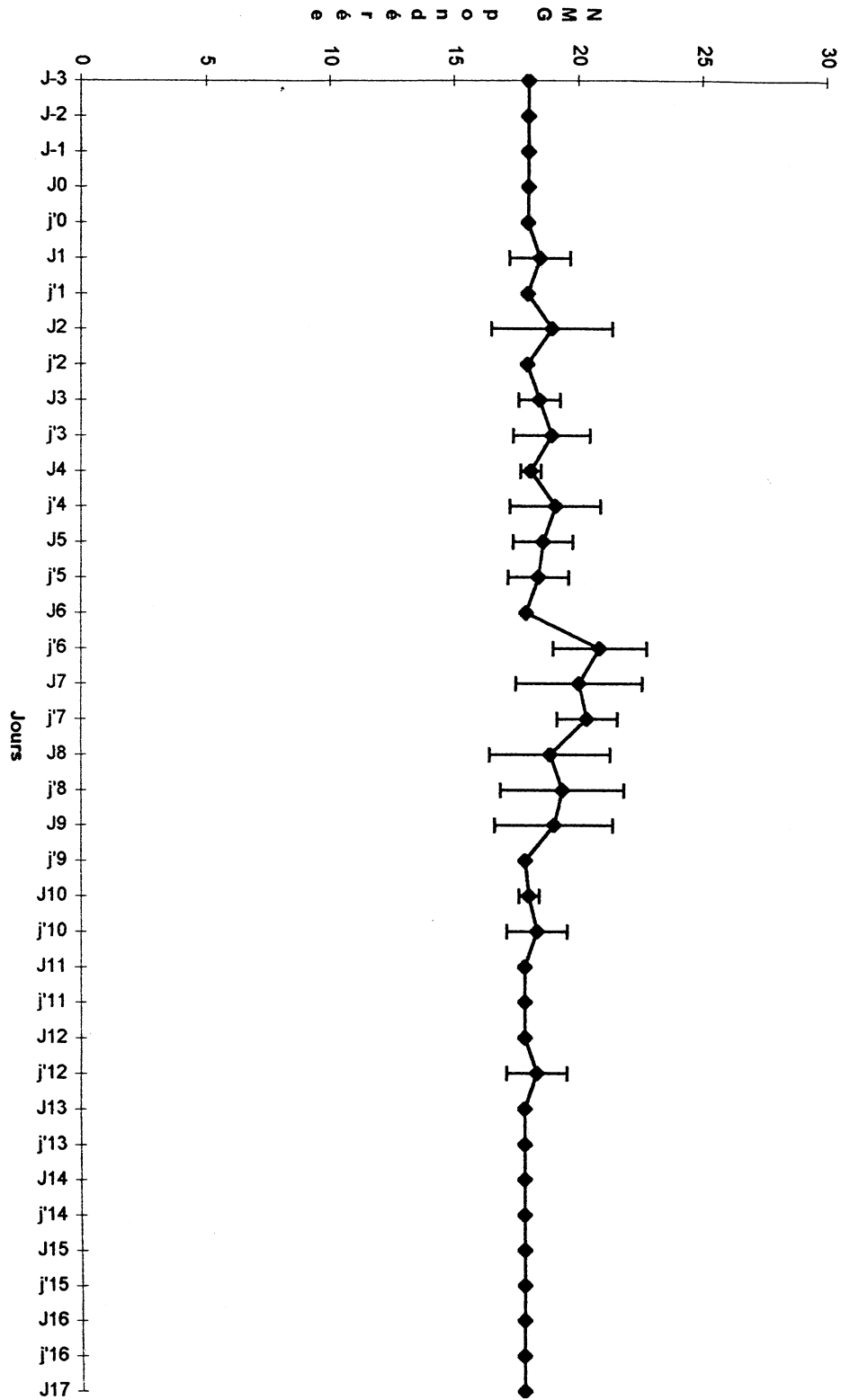
La concentration en macrophages du LLBA du groupe VRSB+LBA, par rapport à celle du groupe LBA, semble culminer à J7 p.i. puis diminuer plus tôt (fig. 10d).

La proportion en lymphocytes CD4 du LLBA du groupe VRSB+LBA est supérieure à celle du groupe LBA à J11 p.i. sans atteindre le seuil de signification (fig. 11a) .

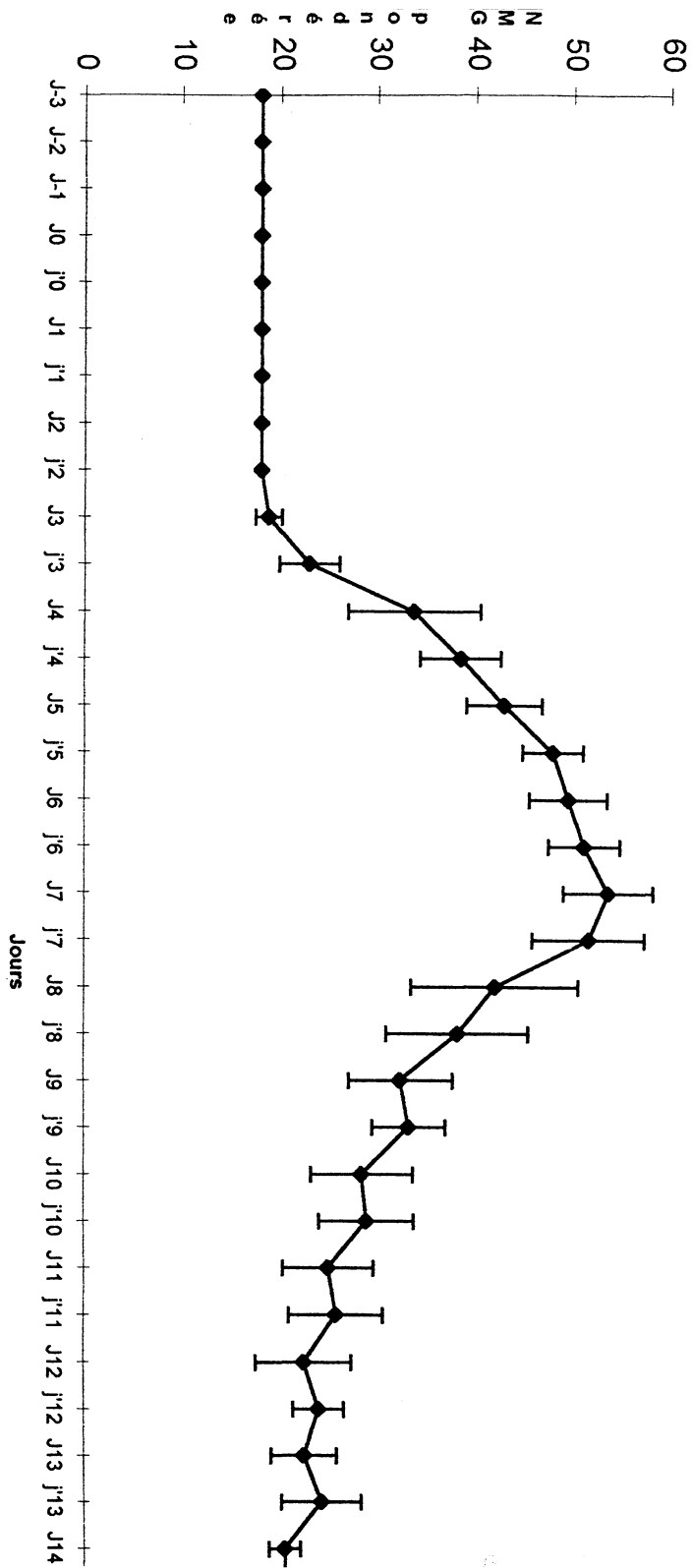
L'évolution de la proportion en lymphocytes CD8 du LLBA du groupe VRSB+LBA paraît significativement différente à J9 et J13 par rapport à celle du groupe LBA ( $p < 0.05$ ). (fig. 11b) .

La concentration en lymphocytes CD4 du LLBA du groupe VRSB+LBA est significativement supérieure celle du groupe LBA à J9 et J11 p.i. ( $p < 0.05$ ) (fig. 11c) .

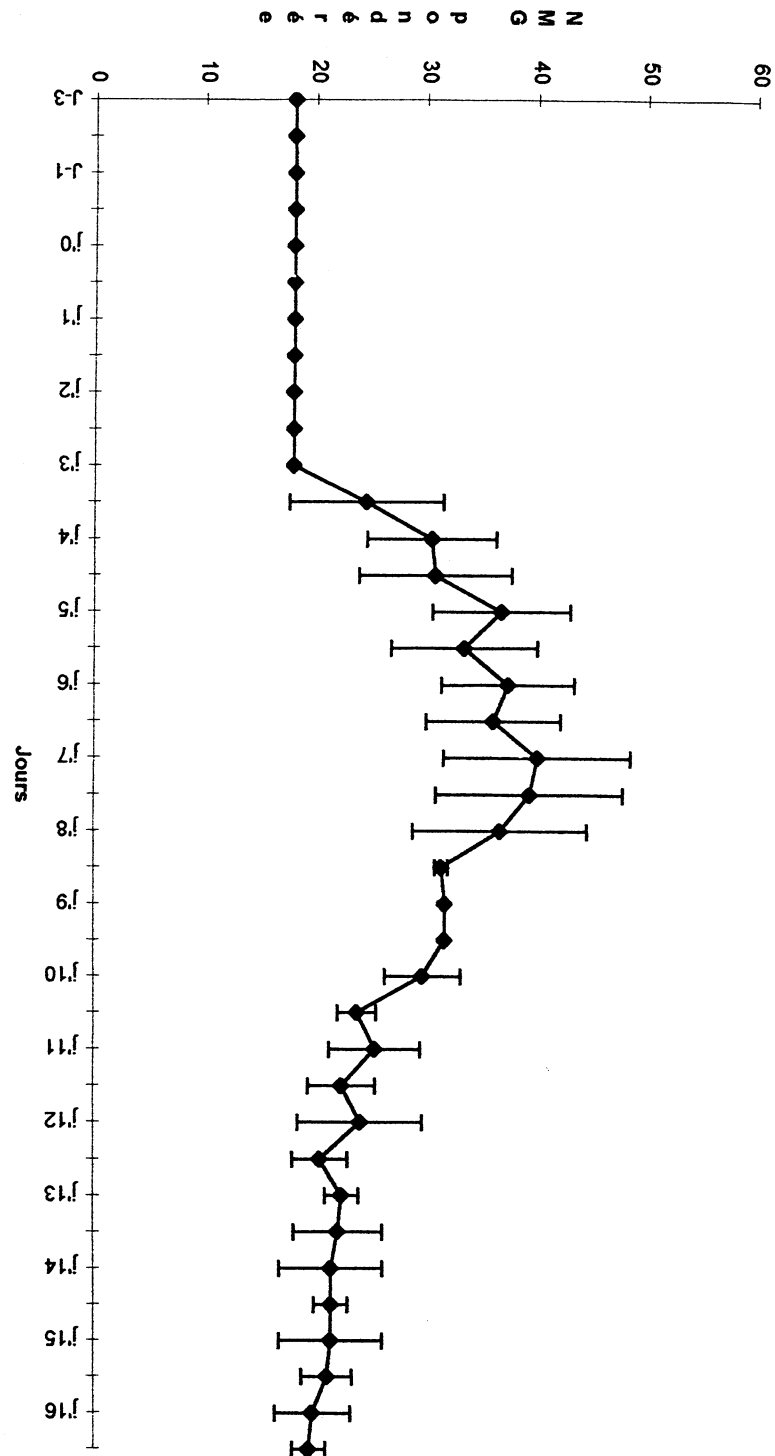
La concentration en lymphocytes CD8 du LLBA du groupe VRSB+LBA est supérieure à celle du groupe LBA à J9 p.i. (fig. 11d) .



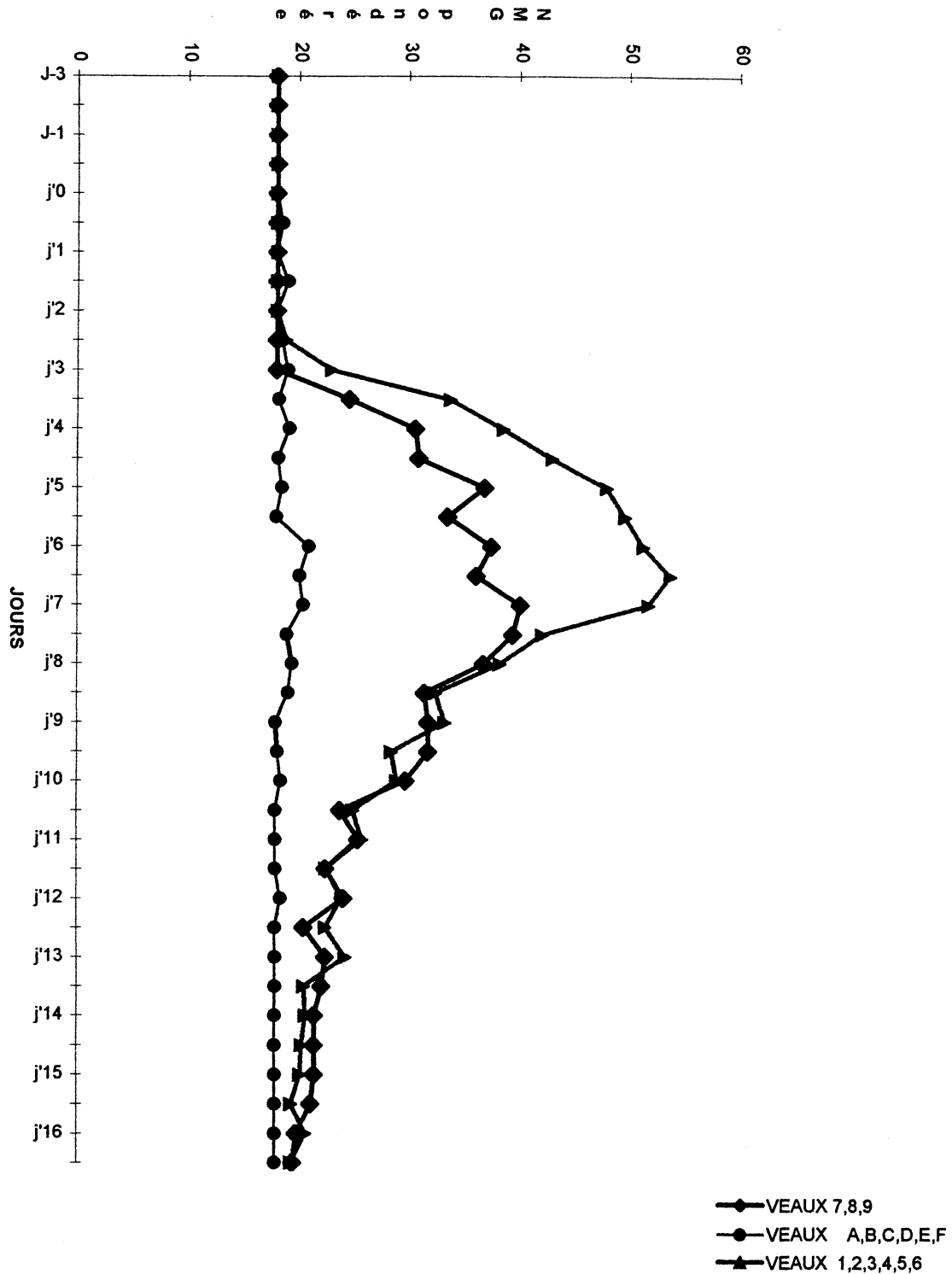
**Fig. 4: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe LBA non inoculé (veaux A,B,C,D,E,F)**



**Fig. 5: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe VRSB+LBA (veaux 1,2,3,4,5,6)**



**Fig. 6: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe VRSB (veaux 7,8,9)**



**Fig. 7: Evolution des notes moyennes générales (NMG) pondérées (score clinique) du groupe LBA + VRSB (veaux 1,2,3,4,5,6) , du groupe LBA (veaux A,B,C,D,E,F) et du groupe VRSB (veaux 7,8,9)**

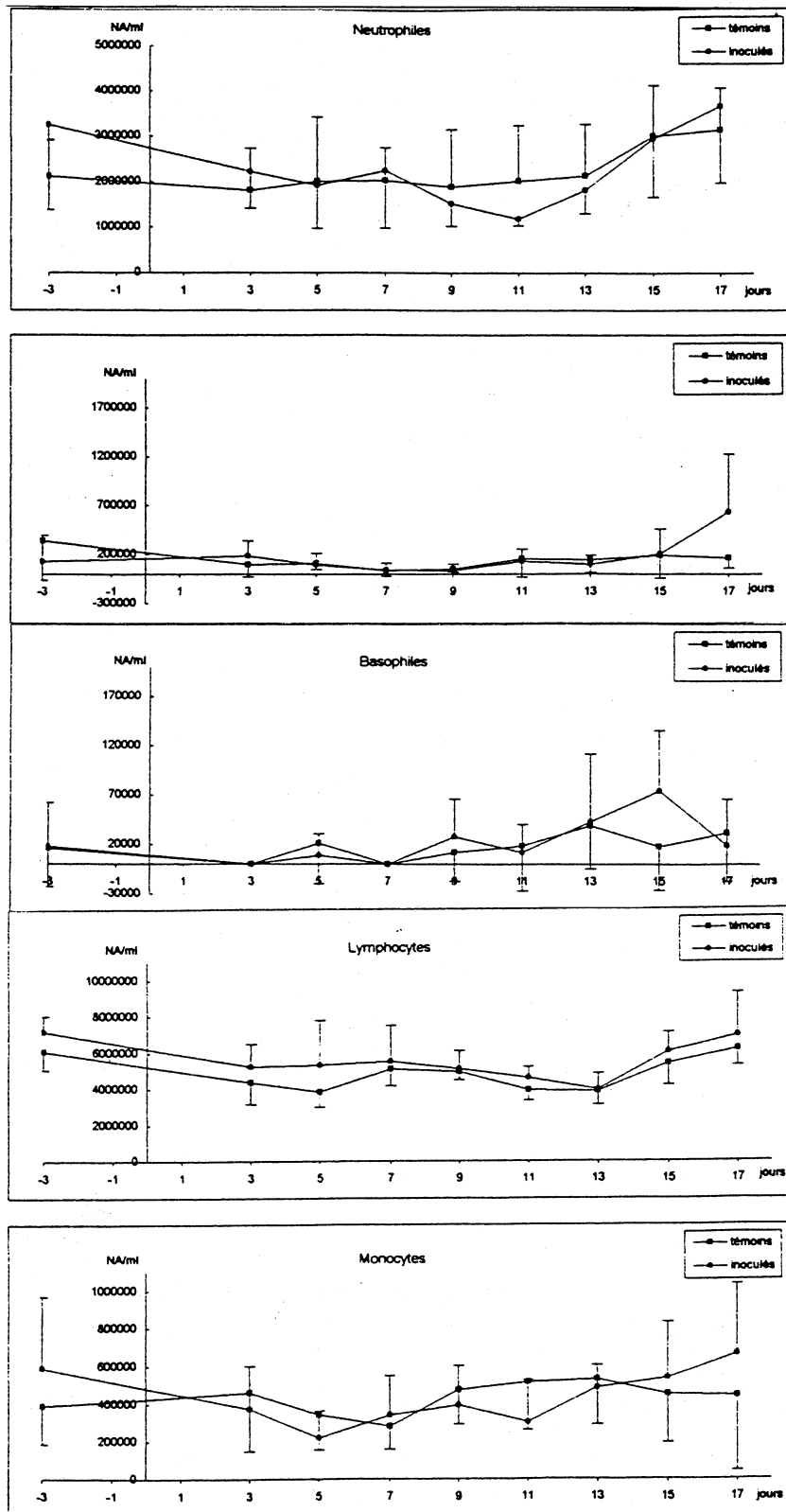


Fig. 8: Evolution des populations leucocytaires sanguines des veaux 1,2,3,4,5,6 (inoculés) et des veaux A,B,C,D,E,F (témoins)

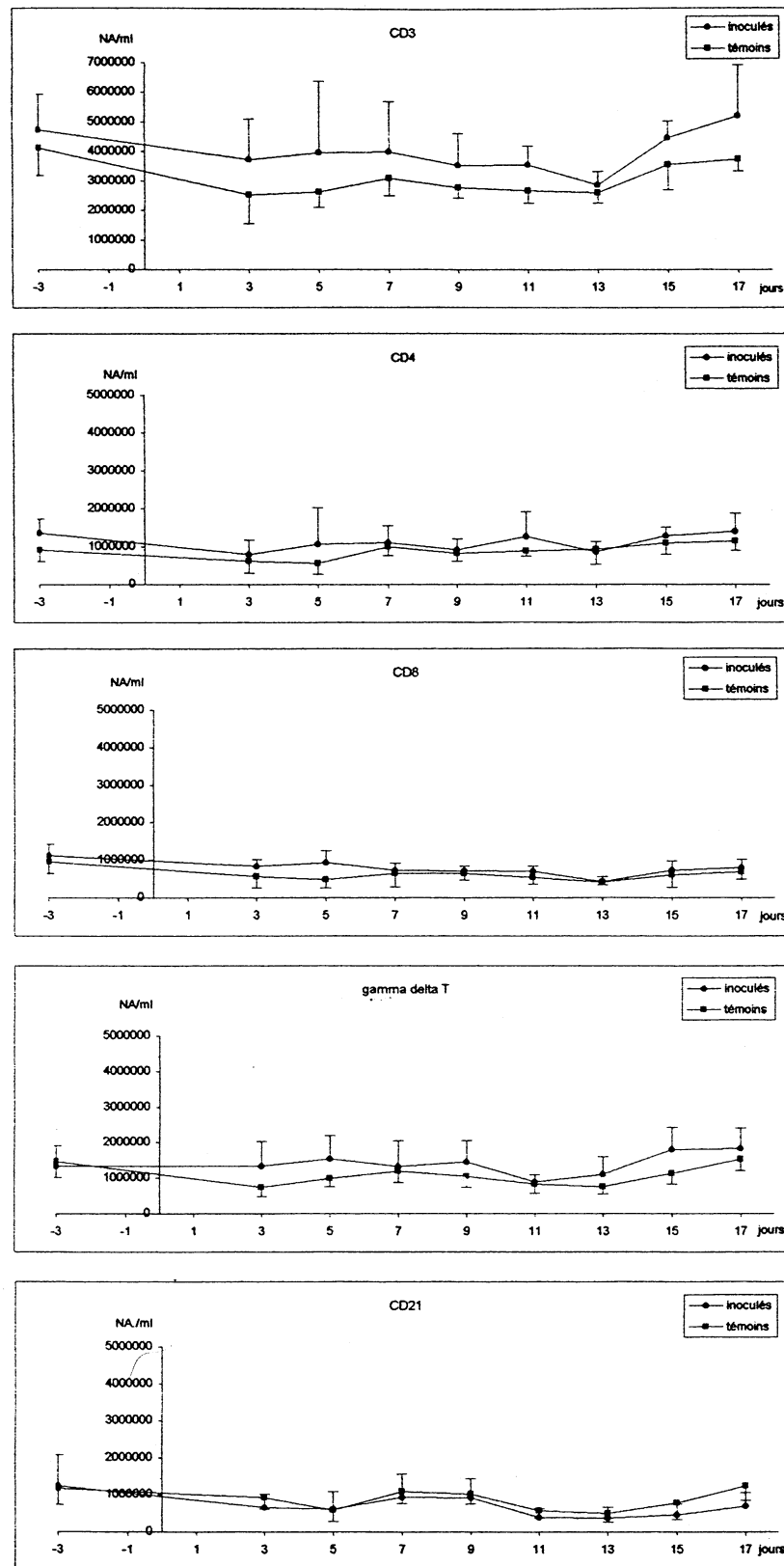
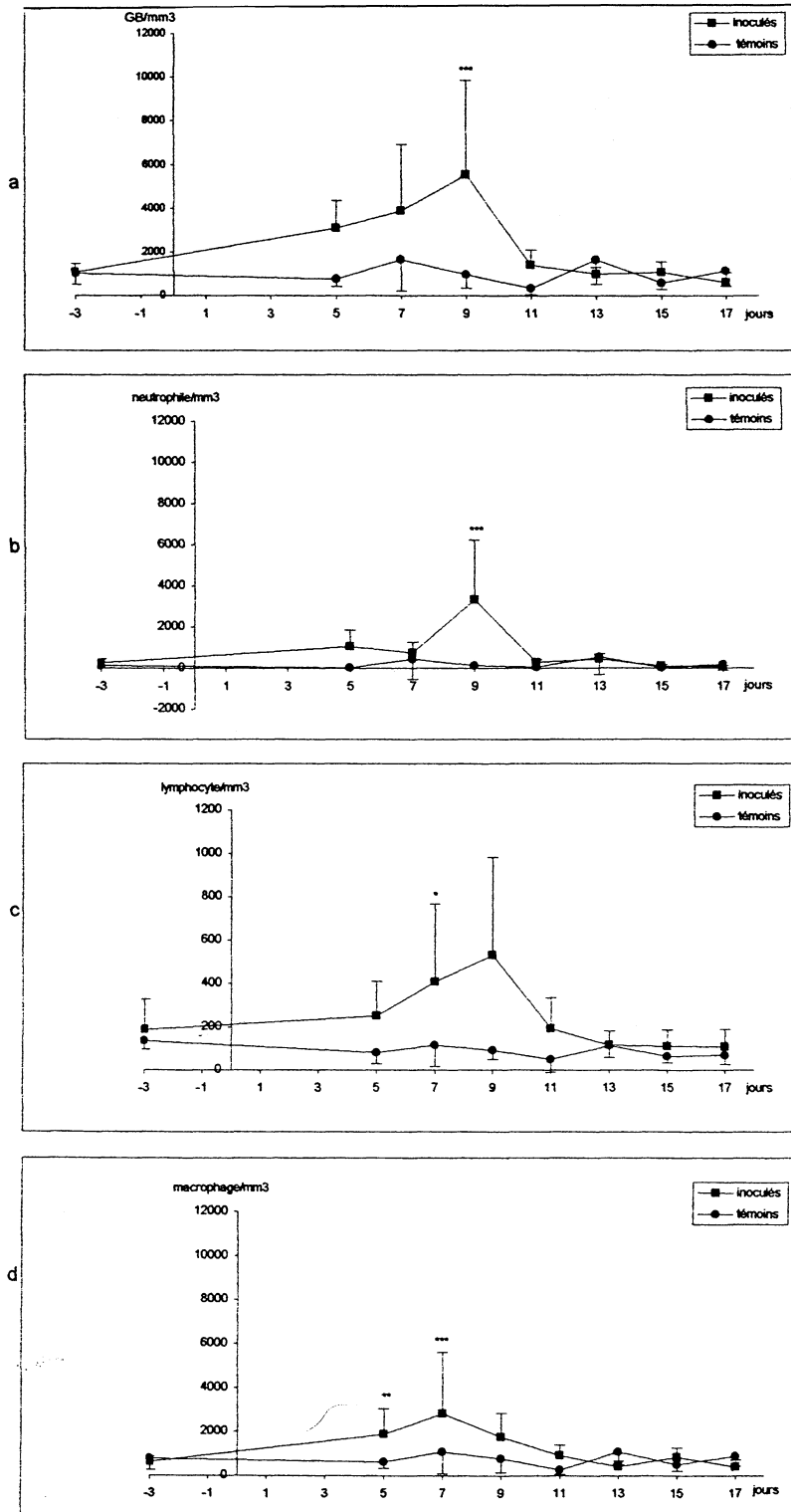


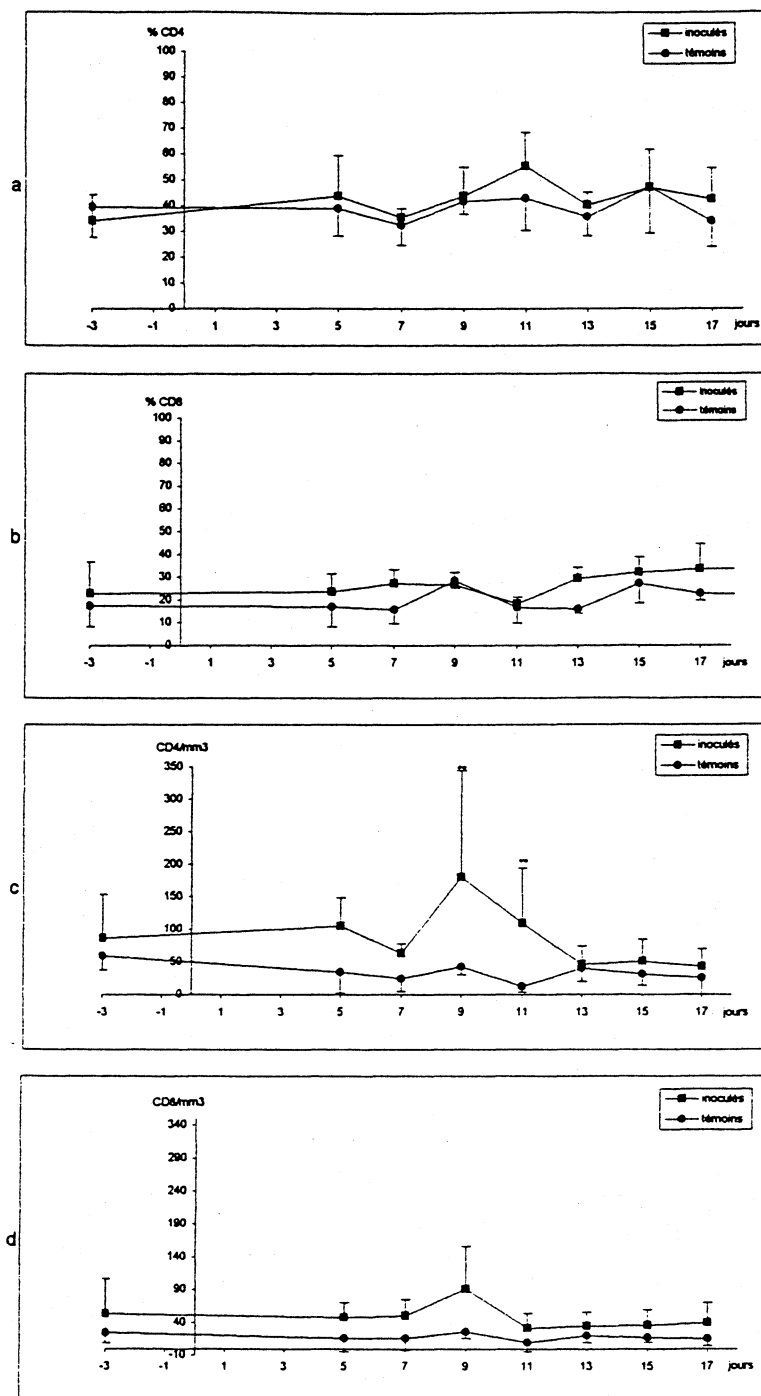
Fig. 9: Evolution des sous populations lymphocytaires sanguines CD3, CD4, CD8,  $\gamma\delta$ T et CD21 des veaux 1,2,3,4,5,6 (inoculés) et des veaux A,B,C,D,E,F (témoins)





**Fig. 10: Evolution de la concentration en leucocytes (a), en neutrophiles (b), en lymphocytes (c), en macrophages (d) du LLBA au cours du temps pour le groupe principal inoculé et le groupe témoin**

**\* significatif  $p < 0.05$ ; \*\* très significatif  $p < 0.01$ ; \*\*\* hautement significatif  $p < 0.001$**



**Fig. 11: Evolution de la proportion de lymphocytes CC30 (CD4)(a), et ILA51 (CD8)(b) et de la concentration en lymphocytes CC30 (CD4)(c) et ILA51 (CD8)(d) du LLBA au cours du temps pour le groupe principal inoculé et le groupe témoin  
 \* significatif  $p < 0.05$ ; \*\* très significatif  $p < 0.01$**

## **QUATRIEME PARTIE**

### **DISCUSSION**

## 1/ Discussion du modèle expérimentale

### 1.1/ Les animaux:

Le VRSB et le VRSH appartiennent à la même famille (Paramyxoviridae) et au même genre (Pneumovirus). Ils partagent de nombreuses similitudes notamment sur les plans virologique et de la maladie (*Baker & al. 1991*). (cf. tableau 5)

**Tableau 5 Caractéristiques comparées des infections par le VRSH et le VRSB**

	VRSH	VRSB
Hôte naturel	Homme	Bovins
Autres espèces	?	?
Age lors de maladie	<1 an	<1 an
Prévalence des anticorps après 3 ans	>95%	>70%
Répartition géographique	mondiale	mondiale
Saisonnalité	automne-hiver	automne-hiver
Transmission	contact, aérosol, vectorielle	contact, aérosol
Durée d'excrétion virale	1 à 21 jours	1 à 12 jours
Réexcrétion virale lors de réinfection	oui	?
Infection persistante	?	?
Troubles cliniques	rhinite, bronchiolite	rhinite, bronchiolite

Ainsi l'infection par le VRSB apparaît comme un modèle d'étude d'autant plus intéressant que les modèles sur animaux de laboratoire (souris, rat des cottonniers...) paraissent artificiels (absence de symptômes, charges virales nécessaires très élevées).

La réponse immunitaire chez le veau nouveau-né ne possède pas toutes les caractéristiques de l'adulte. Selon les critères retenus (cytologiques, biochimiques, fonctionnels) l'intensité et la durée de cette immaturité néonatale sont variables. La placentation syndesmochoriale des bovins empêche tout passage d'immunoglobuline et de cellule entre les circulations foetale et maternelle. Le colostrum par ses apports en anticorps et en cellules immunitaires va assurer pour une courte période une protection passive.

Dans cette expérience, le colostrum provient de vaches séronégatives pour le VRSB et est issu d'un élevage différent de l'élevage de naissance.

L'immunité passive ainsi apportée a été humorale et non cellulaire. En effet, la congélation du colostrum altère fortement les lymphocytes au contraire des immunoglobulines.

L'immunité active se met en place au cours des premiers mois de la vie avec une augmentation des lymphocytes B et des lymphocytes T (*Yeo & al. 1999*). Vers 4 mois, les concentrations en IgG1, IgM et IgA atteignent les valeurs adultes.

En ce qui concerne l'immunité locale, notamment respiratoire, peu d'études font référence à sa mise en place (*Anderson & al. 1986*). Le tissu lymphoïde associé aux bronches (-BALT-) non décelable à la naissance augmente progressivement avec l'âge. Son extension est environ 6 à 7 fois plus importante à 18 mois qu'à 4 mois.

L'âge des veaux infectés correspond à la tranche d'âge où les troubles naturels sont les plus fréquents (*Baker & al. 1986-b; Bryson & al. 1978*).

La conduite d'élevage au cours de l'expérience vise à éviter la transmission du VRSB au groupe témoin ou entre groupes inoculés. De même, elle a permis de proscrire les coinfections majeures, comme cela a été démontré (recherches d'infections aux BVD, BHV1, PI3, Pasteurelles).

## 1.2/Inoculation

Les troubles respiratoires provoqués expérimentalement par l'inoculation du VRSB restent relativement bénins par rapport à ceux engendrés par une infection spontanée. Néanmoins, aucun modèle expérimental n'a pu observer, en particulier, de mortalité (*Belknap & al. 1995*).

L'inoculation par voie intranasale et intratrachéale pendant 3 jours consécutifs semble permettre de shunter les défenses des premières voies respiratoires (appareil mucociliaire du nez et de la trachée, déglutition) et de savoir assez précisément la quantité de virus instillée. D'autres protocoles d'inoculation, notamment avec le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine, ont été élaborés à partir d'aérosols et de transmissions intranasales (*Forman & al. 1982*). Bien que plus proches des conditions naturelles d'infection ils ne permettent pas de connaître avec précision la dose inoculée.

L'anesthésie générale de courte durée et le passage du fibroscope ne semblent pas avoir d'influence majeure sur la fonction respiratoire.

Néanmoins, l'inoculation endobronchique est éloignée de la transmission par aérosols décrite dans les conditions naturelles.

## 1.3/Prélèvements

### 1.3.1/Prélèvements sanguins

Toute stimulation du système lymphoïde entraîne la production de lymphocytes qui rejoignent les organes cibles (comme le poumon) par la voie sanguine. Ainsi, les prélèvements sanguins devraient permettre d'évaluer la réponse lymphoplasmocytaire lors de processus pathologiques.

Le compartiment sanguin est facile d'accès. Néanmoins, l'interprétation des résultats n'est possible que si l'on respecte certaines règles:

- heure standard de prélèvement dans la journée
- nature de l'anticoagulant (l'ACD est l'anticoagulant de choix)
- durée de la conservation
- limitation du stress (influence des corticoïdes)

Ainsi, chez l'homme, les variations diurnales des résultats s'expliquent essentiellement par celles du nombre de leucocytes et de lymphocytes (*Malone & al. 1990*).

Le choix de prélever les échantillons sanguins sur ACD afin d'avoir une meilleure conservation avant immunomarquage a également été retenu chez l'homme (*Nicholson & Green 1993*).

La fixation par le paraformaldéhyde à 1 % permet une conservation des cellules marquées pendant au moins sept jours (*Lal & al. 1988*).

### 1.3.2/Prélèvements de LLBA

Ainsi, les modifications observées sur le plan sanguin ne représentent pas toujours la situation tissulaire (*Westermann & Pabst 1990*). Il paraît donc nécessaire de ne pas se limiter à l'analyse sanguine car il convient d'étudier les sous-populations lymphocytaires sur le lieu même où elles exercent leur action. Cette démarche semble essentielle dans la compréhension du processus infectieux.

Pour le poumon, l'examen cytologique du LBA semble le plus adéquat. Il permet de faire des analyses successives sur le même animal sans altération majeure des fonctions respiratoires. En outre, il permet un prélèvement plus représentatif que celui obtenu par biopsie.

De plus, un examen nécropsique imposerait un effectif beaucoup trop important financièrement.

L'utilisation des fibroscopes bien que nécessitant une grande technicité reste facile à mettre en oeuvre dans les conditions de cette expérience. La fibroscopie permet de visualiser et de localiser précisément les structures pulmonaires chez les bovins (*Pringle & al. 1988*), les chevaux (*Sweeney & al. 1992*) et l'homme (*Reynolds 1987*). Ceci n'est pas le cas pour la technique d'aspiration transtrachéale.

Il existe une corrélation parfaite entre les modifications tissulaires et les cellules du LLBA (*Weiland & al. 1989*).

La répétition des LBA à 48 h d'intervalle semble possible dans des segments bronchiques contralatéraux pour l'évaluation des populations leucocytaires et lymphocytaires. Ceci a été étudié chez l'homme (*Von Essen 1991*), le macaque (*Haley & al. 1989*), le cheval (*Sweeney & al. 1994*), le chien (*Pinsker & al. 1980*) et le bovin (*Bielefeldt-Ohmann & Babiuk 1986*).

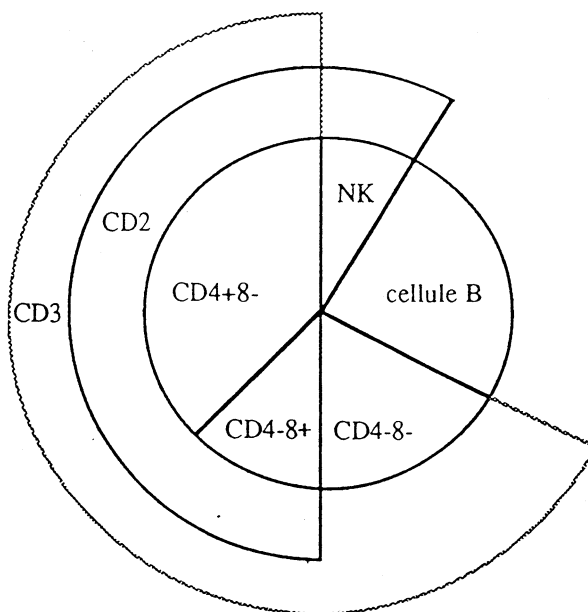
L'évaluation des cellules du LLBA est sujette à de nombreux facteurs de variations : le liquide de prélèvement lui-même (*Brain & Frank 1973*), la quantification du fluide d'origine bronchoalvéolaire (*Von Wichert & al. 1993*) (*Lay & al. 1986*) (*Lam & al. 1985b*), l'effet de la filtration du LLBA (*Willcox & al. 1988*) (*Kelly & al. 1989*) (*Lam & al. 1985a*), l'effet de la cytocentrifugation (*Saltini & al. 1984*).

La conservation du LLBA avant immunomarquage est un facteur limitant. Il est conseillé de traiter rapidement le LLBA et de le conserver à +4°C (Capron 1990).

#### 1.4/Identification des sous-populations lymphocytaires

L'identification des lymphocytes a longtemps reposé sur la technique des « rosettes-mouton » pour les lymphocytes T, et sur la mise en évidence des immunoglobulines de membrane pour les lymphocytes B. La capacité des lymphocytes à être activés par des mitogènes (lectines) représente un autre marqueur de reconnaissance des cellules T et B.

Néanmoins, les meilleurs marqueurs pour distinguer les lymphocytes sont leurs molécules de surface. Ces molécules sont détectées par des anticorps monoclonaux grâce à une réaction antigène-anticorps qui peut être révélée par une technique d'immunofluorescence. Une classe de différenciation (CD) est constituée par le regroupement d'anticorps monoclonaux. Tous les anticorps inclus dans une même CD sont présumés reconnaître une seule et même molécule.



**Fig.12: Distribution des sous-populations lymphocytaires dans le sang périphérique chez les bovins**

Les études sur les anticorps monoclonaux spécifiques des leucocytes bovins sont l'objet d'ateliers internationaux (*Howard & al. 1991*).

Les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et les lymphocytes T suppresseur ou cytolytiques (CD8+) ont une grande importance dans la réponse immunitaire (*Koszinowski & al. 1991*). Les anticorps monoclonaux utilisés sont donc CC8 (CD4) et CC63 (CD8). Ainsi, les résultats obtenus sont spécifiques de ces anticorps monoclonaux, mais pourraient être différents avec d'autres.

### 1.5/L'immunomarquage

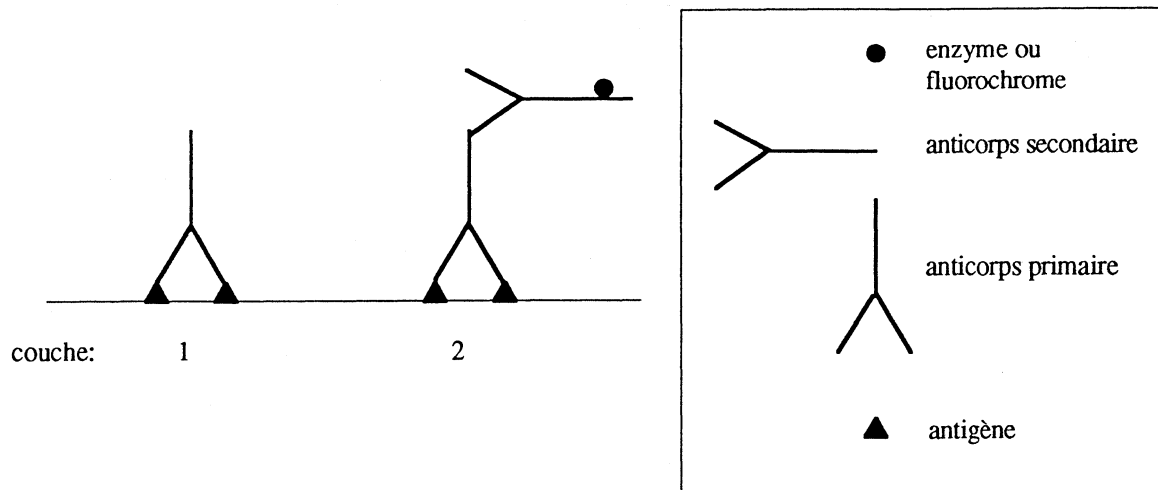
Les techniques de marquage s'effectuent généralement:

- soit à partir du culot leucocytaire avec lyse des globules rouges. Cette technique est fiable et rapide mais nécessite un positionnement correcte de la fenêtre de comptage du cytomètre du fait de la présence de cellules polynuclées ressemblant aux lymphocytes. D'autre part, les cellules doivent être morphologiquement normales et il faut éviter les réactions croisées des anticorps utilisés entre lymphocytes et granulocytes. La lyse érythrocytaire donne néanmoins de bons résultats chez l'homme (*Carter & al. 1992*) et le chat (*Dean & al. 1991*). On peut également utiliser la lyse érythrocytaire après et non avant l'immunomarquage (*Gale & Henry 1992*).
- soit avec la seule fraction des cellules mononuclées isolée sur gradient de densité. Cette technique est plus longue et peut introduire une sélection liée à la densité des cellules (*Dean & al 1991*). De plus, elle permet de visualiser et de sélectionner des cellules morphologiquement anormales. La séparation sur gradient de densité est utilisée dans de nombreuses études fonctionnelles. Le gradient de densité 1.084 semblerait meilleur pour la séparation des cellules mononuclées bovines (*Yang & Rabinovsky 1987*).

L'immunomarquage consiste à révéler des motifs antigéniques présents sur une structure cellulaire ou tissulaire par application d'un antiserum spécifique dont la fixation sera révélée par un marqueur. Les marqueurs sont des fluorochromes (FITC, PE), des radio-isotopes ou des enzymes. L'immunofluorescence est utilisée sur une coupe tissulaire (immuno-histochimie) ou sur des cellules isolées (cytométrie en flux).

Dans cette expérience, nous avons utilisé une technique de séparation très reproductible: le gradient de Ficoll sur tubes Accuspin. Par ailleurs la méthode d'immunomarquage faisait appel à deux couches d'anticorps. La première couche correspond à l'anticorps primaire réagissant avec l'antigène cellulaire. La seconde couche comprend l'anticorps secondaire marqué et dirigé contre les Ig de l'espèce d'où est issu l'anticorps primaire. Cette méthode est plus sensible que la méthode directe car plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer à différents épitopes de l'anticorps primaire. Ainsi, plusieurs molécules marqueurs (enzyme ou fluorochrome) révèlent le site antigénique et amplifient la révélation.





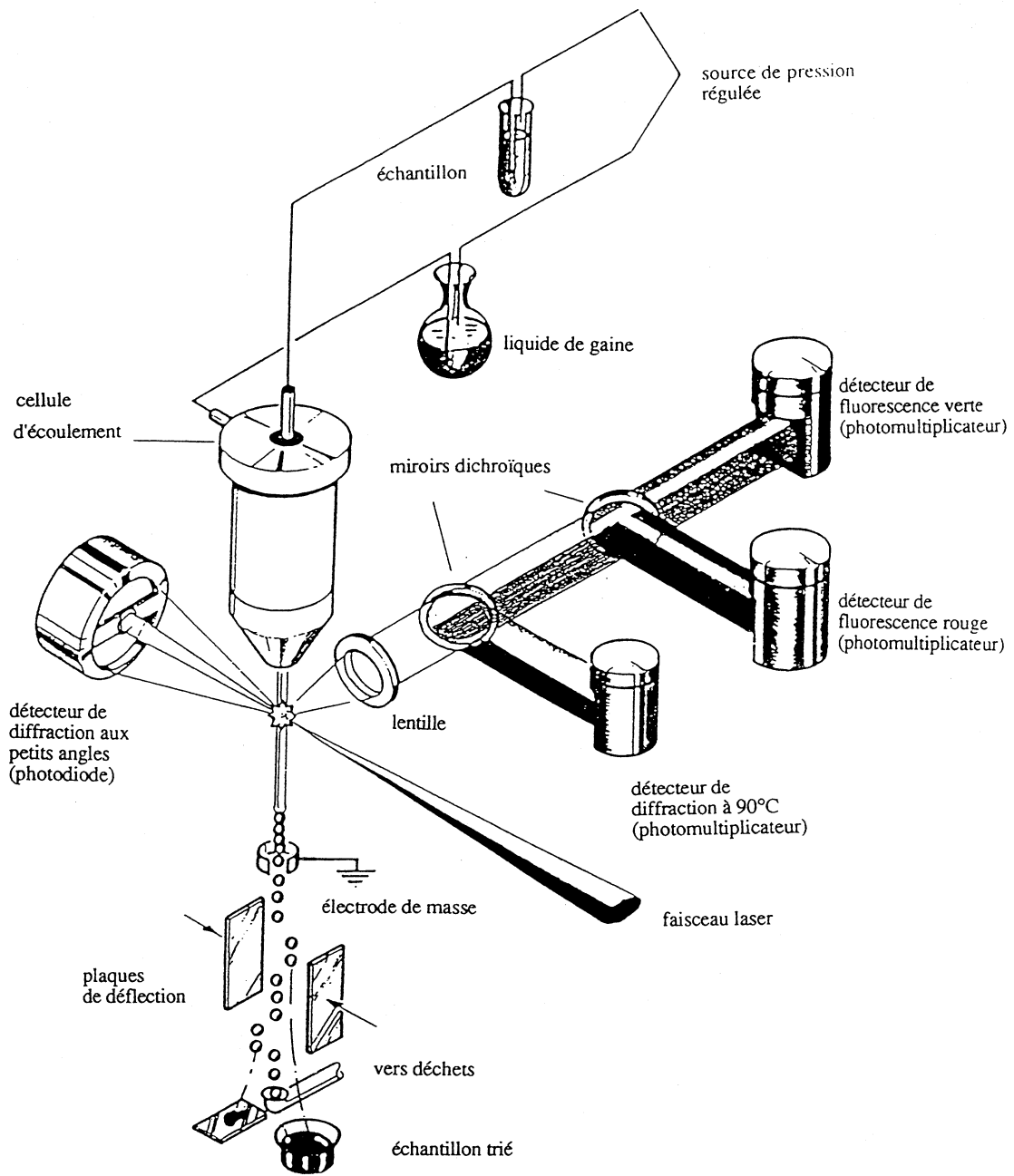
**Fig. 13: Immunomarquage indirect en deux couches**

### 1.5.1/Cytométrie en flux

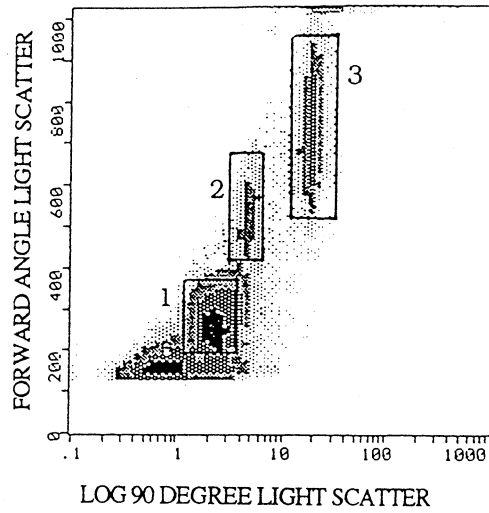
Les particularités de la lecture sont liées aux principes généraux d'un cytomètre en flux. Les cellules en suspension sont envoyées sous pression à très grande vitesse au centre d'une cellule d'écoulement à l'intérieur de laquelle arrive, sous pression également, un liquide de gaine qui enrobe la suspension cellulaire sans toutefois s'y mélanger. Les cellules sont alors canalisées à la sortie de la cellule d'écoulement et défilent une à une devant un faisceau laser. (fig. 14)

La cytométrie en flux représente une méthode fiable et sensible qui permet l'analyse individuelle d'un très grand nombre de cellules et qui permet de bien caractériser les cellules grâce à l'analyse biparamétrique (fig. 15 et 16). Enfin, même si les applications pratiques en médecine vétérinaire sont encore limitées, elles sont en pleine expansion notamment chez les carnivores (*Dean & al. 1991*), et plus particulièrement chez les ruminants (*Ellis & al. 1988*, *Howard & al. 1988*). Cependant, l'analyse de liquides biologiques autre que le sang (lait, LLBA...) est très peu développée.

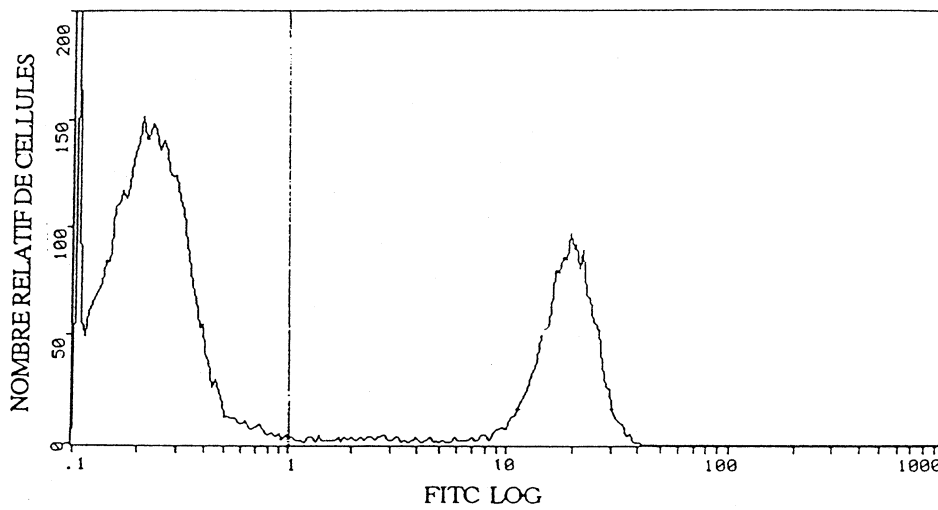
D'autre part, une fixation des cellules après immunomarquage est possible et autorisera une lecture au cytomètre, différée par rapport au marquage (*LAL & al. 1988*).



**Fig. 14: Principe de fonctionnement du cytomètre en flux (COULTER EPICS C)**



**Fig. 15: Histogramme biparamétrique des leucocytes sanguins bovins. Les fenêtres 1, 2 et 3 définissent respectivement les populations de lymphocytes, monocytes et polynucléaires**



**Fig. 16: Histogramme monoaramétrique de distribution de la fluorescence verte (FITC) conditionné sur la population de lymphocytes**

### 1.5.2/Immunomarquage sur lame

Cette technique a été utilisée pour l'identification des sous-populations lymphocytaires du LLBA. En effet, le nombre de lymphocytes recueillis dans le LLBA est faible par rapport au sang. Ainsi, l'immunocytochimie sur lame est préférée à la cytométrie en flux (*Capron 1990*). De plus, il est difficile de délimiter une fenêtre de lecture au cytomètre car les débris cellulaires sont importants et la confusion entre grands lymphocytes et petits macrophages est possible. Ces aléas peuvent conduire à une sous-estimation des sous-populations lymphocytaires T par comparaison à une technique immunocytochimique (*Dauber & al 1992*). Cependant, cette technique est longue et des confusions sont possibles entre certains lymphocytes et macrophages (*Reynolds 1987*) (*Padovan & al. 1992*). Pour limiter ce risque, une double lecture a été appliquée.

### 1.6/Critères cliniques

La mise en oeuvre d'un examen clinique standardisé permet d'évaluer la gravité et de comparer les différents groupes expérimentaux (*Espinasse & al. 1981*).

Ainsi, une différence très significative ( $p < 0.001$ ) est apparue entre les deux groupes inoculés et le groupe témoin entre J5 et J12 p.i.

## **2/Etude de la réponse des sous populations lymphocytaires sanguines et du LLBA par immunomarquage**

### 2.1/Sous-populations lymphocytaires sanguines

Les études des sous-populations lymphocytaires et leucocytaires sanguines dans certaines maladies virales se sont développées depuis quelques années. On peut citer pour exemples, la Maladie des Muqueuses (*Ellis & al. 1988*), la Blue Tongue (*Ellis & al. 1990*).

La réponse à médiation cellulaire a été peu étudiée chez le veau. Des veaux préalablement inoculés avec un antigène VRSB répondent positivement à un test cutané d'hypersensibilité retardée. Les tests d'inhibition de migration des leucocytes sanguins confirment l'existence d'une réaction à médiation cellulaire (*Field & Smith 1984*).

Le rôle des sous-populations lymphocytaires a été évalué dans un essai de déplétion sélective. Un rôle curatif majeur est attribué aux lymphocytes T CD8 (*Taylor & al. 1995*) (*Thomas & al. 1996*).

En ce qui concerne notre expérience, aucune différence significative n'a été observée dans les concentrations ou les proportions des populations leucocytaires et lymphocytaires entre groupe témoin et groupe inoculé.

Ces résultats ne sont pas cohérents avec d'autres modèles animaux:

- ovins infectés par le VRSB (*Sharma & al. 1990b*)
- souris primo-inoculées par le VRSB (*Kimpen & al. 1992*)
- souris réinfectées par le VRSH (*Kimpen & Ogra 1993*)

Aucune explication autre que liée à la spécificité du modèle ne peut être avancée.

L'évaluation des sous-populations lymphocytaires sanguines ne semble donc pas la plus pertinente.

## 2.2/Sous-populations lymphocytaires du LLBA

Chez les bovins, la bibliographie concernant l'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires du LLBA est peu importante. Bien souvent, elle relève d'une simple analyse cytologique (*Allen & al. 1992, Bielefeldt Ohmann & al. 1986, Kimmann & al. 1986, Pringle & al. 1988, Wilkie & Markham 1981, Yeo & al. 1993*). Certains essais concernent l'Herpès Virus Bovin 1 (*Forman & al. 1982*), *Pasteurella Haemolytica* (*Walker & al. 1985, Weiss & al. 1991*) et le VRSB (*Taylor & al. 1989*).

En ce qui concerne notre étude,

- la concentration en leucocytes du LLBA du groupe inoculé est significativement supérieure à celle du groupe témoin à J5, J7 et J9 p.i.
- la concentration en lymphocytes du LLBA du groupe inoculé est significativement supérieure à celle du groupe témoin à J7 et J9 p.i.
- la proportion en lymphocytes CD4 du LLBA du groupe inoculé est supérieure à celle du groupe témoin à J11 p.i. sans atteindre le seuil de signification.
- l'évolution de la proportion en lymphocytes CD8 du LLBA du groupe inoculé paraît significativement différente à J9 et J13 par rapport à celle du groupe témoin.
- la concentration en lymphocytes CD4 du LLBA du groupe inoculé est significativement supérieure celle du groupe témoin à J9 et J11 p.i.
- la concentration en lymphocytes CD8 du LLBA du groupe inoculé est supérieure à celle du groupe témoin à J9 p.i.

Ces résultats sont assez proches des résultats obtenus chez la souris. En effet, la cinétique est similaire. Toutefois, l'amplitude des variations sur les populations lymphocytaires paraît plus marquée dans le modèle souris (*Openshaw 1989*).

Chez la souris lors de primo-infection la cinétique comparée de l'infection virale, des réponses lymphocytaires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et des anticorps neutralisants, suggère un rôle déterminant pour les lymphocytes CD8<sup>+</sup> à activité potentielle cytolytique.

Chez le veau, la conclusion n'est pas aussi nette. En effet, un rôle déterminant est attribué aux lymphocytes CD8<sup>+</sup> au travers de leur activité cytotoxique, mais les lymphocytes CD4<sup>+</sup> participent également à la protection (*Taylor & al. 1995*)(*Thomas & al. 1996*).



## **CONCLUSIONS**

L'analyse des résultats de l'immunophénotypage des lymphocytes sanguins des veaux inoculés par le VRSB et des veaux témoins nous permet d'affirmer que les sous-populations lymphocytaires sanguines n'évoluent pas de façon significativement différente.

En revanche, l'analyse des résultats de l'immunophénotypage des lymphocytes du LLBA des veaux inoculés par le VRSB et des veaux témoins nous permet d'affirmer que les sous-populations lymphocytaires du LLBA évoluent de façon significativement différente. Sur les veaux inoculés le nombre de lymphocytes totaux et le nombre de lymphocytes CD4+ et CD8+ augmentent de J5 à J9 p.i. Cette augmentation coïncide avec la diminution du titre viral à partir de 6 à 7 jours p.i. cet accroissement permet donc d'envisager un rôle curatif pour l'immunité (cellulaire et humorale).

Le modèle expérimental sur veau, reproductible et expressif sur le plan clinique permet d'évaluer l'évolution des sous-populations lymphocytaires.

La pathologie naturelle provoquée par le VRSB chez le veau est très proche de celle observée chez l'enfant. Ainsi, cette étude permettra peut-être de participer à l'élaboration d'un vaccin contre le VRSB et contre le VRSH.

Cependant, une connaissance plus approfondie de l'activité fonctionnelle des lymphocytes du liquide de lavage bronchoalvéolaire permettrait de compléter ces données morphologiques.

**AGREMENT ADMINISTRATIF**

Je soussigné, M. BONNES, Directeur par intérim de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

**M. DORE Laurent**

a été admis(e) sur concours en : 1993

a obtenu son certificat de fin de scolarité le 26 septembre 1997

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

Je soussigné, F. SCHELCHER, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

déclare que j'ai lu la thèse de :

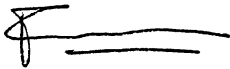
**M. DORE Laurent**

intitulée :

*Infection expérimentale du veau par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin : Evaluation de la réponse lymphocytaire par immunophénotypage*

et que je prends la responsabilité de l'impression.

**Le Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



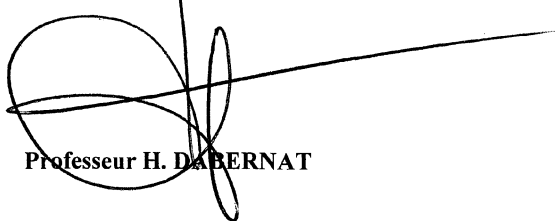
**Professeur F. SCHELCHER**

**Vu :  
Le Directeur par intérim  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



**Professeur Gilbert BONNES**

**Vu :  
Le Président de la thèse :**



**Professeur H. DABERNAT**

**Vu le : 19 avril 2001  
Le Président  
de l'Université Paul Sabatier**



**Professeur R. BASTIDE**





## Annexe 1

### COLORATION MAY-GRUNWALD-GIEMSA

#### 1/ Technique utilisée pour le VRSB

- Colorant de May-Grünwald (RAL)
- Colorant de Giemsa R. (Rapid RAL)
- Tampon Phosphate « Sorensen » pH 7,4
  - A/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.08 g/l (1/15 eM)
  - B/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11.88 g/l si 2H<sub>2</sub>O (1/15 eM)  
23.876 g/l si 12H<sub>2</sub>O
- Pour pH 7,4 : 19.6 ml de (A) + 80.4 ml de (B)

#### Technique de coloration :

- 1/ fixation du tapis cellulaire avec du méthanol 10 mn
- 2/ MG 3 mn
- 3/ ajouter le même volume de tampon phosphate sans jeter le MG 1 mn
- 4/ jeter
- 5/ laver une fois dans tampon phosphate pour éliminer l'excès de colorant
- 6/ G (dilué au 1/20e dans du tampon phosphate let fraîchement préparé 10 mn
- 7/ jeter
- 8/ laver au tampon phosphate 1 mn
- 9/ sécher

#### Volume :

- 1.5 ml/cupule pour une P6
- 1 ml/cupule pour une P1
- 0.75 ml/cupule pour une P24

#### 2/ Technique utilisée sur frottis ou cytopspin

- 1/ recouvrir les lames 3 mn avec 1 ml de MG (Biolyon-unipath SA, Dardilly, France)
- 2/ ajouter 1 ml d'une solution hématologique (Adjuvant pour hématologie Biolyon-Unipath SA, Dardilly, France) goutte à goutte sur lame et laisser 1mn
- 3/ rincer la lame avec la solution hématologique
- 4/ recouvrir la lame avec le colorant de G dilué au 1/10e dans la solution hématologique (Biolyon-Unipath SA, Dardilly, France), laisser 5 mn et sécher

## Annexe 2

### COMPOSITION DU MILIEU DE BASE ET DU MILIEU UTILISE POUR LE LBA

#### 1/ Milieu de base :

- MEM avec sels de EARLE et L-glutamine (GIBCO)	
- AANE (GIBCO)	1 X
- pénicilline (GIBCO)	100 ui/ml
- streptomycine (GIBCO)	100 µg/ml

#### 2/ Milieu utilisé pour le LBA :

- MEM avec sels de EARLE et L-glutamine (GIBCO)	
- AANE (GIBCO)	1 X
- gentamicine (GIBCO)	200 µg/ml
- enrofloxacin (BAYTRIL 10% inj. ND-BAYER)	0.2 µg/ml
- fungizone(GIBCO)	2.5 µg/ml

### Annexe 3

#### TECHNIQUE D'IDENTIFICATION DU VRSB PAR IFI SUR LABTEK

##### 1/ Fixation :

- 1/ éliminer le milieu
- 2/ rincer avec PBS
- 3/ éliminer PBS
- 4/ faire un rinçage avec le mélange éthanol/acétone froid
- 5/ éliminer ce mélange
- 6/ mettre entre 0.5 ml et 1 ml par cupule du mélange éthanol/acétone froid
- 7/ mettre les labtek minim 3 h à -20°C

##### 2/ IFI :

- 1/ sortir les labtek de -20°C
- 2/ éliminer le mélange éthanol/acétone
- 3/ faire 3 lavages en PBS (1X)
- 4/ déposer de 150 µl à 200 µl par cupule d'Ac Mn anti HRSV au 1/40e en PBS, 1 h à 37°C
- 5/ éliminer l'Ac
- 6/ faire 3 à 4 lavages en PBS Tween
- 7/ déposer de 150 µl à 200 µl par cupule d'Ac poly anti IgG+IgM anti souris FITC au 1/100e 1 h à 37°C
- 8/ éliminer cet Ac anti souris et faire 2 lavages PBS Tween + 2 lavages en eau du robinet
- 9/ montage des lames avec PBS/Glycérol



## REFERENCES

- ALLEN J.W. & al. Cytological findings in bronchoalveolar lavage fluid from feedlot calves : associations with pulmonary microbial flora. *Can.J. Vet. Res.* 1992, 56 : 122-126.
- ALWAN W.H & al. CD4+ T cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus. Comparison with the effects of CD8+ T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1992, 88 : 527-536.
- ALWAN W.H & al. Phenotypic and functional characterization of T cells lines specific for individual respiratory syncytial virus proteins. *J. Immunol.* 1993, 1450 : 5211-5218.
- ALWAN W.H & al. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J. Exp. Med.* 1994, 179 : 81-89.
- ANDERSON M.L & al. Bronchus associated lymphoid tissue in the lung of cattle : relationship to age. *Res. Vet. Sci.* 1986, 41 : 211-220.
- BAKER J.C Human and bovine respiratory syncytial virus : immunopathologic mechanisms. *Vet. Quart.* 1991, 13 : 47-59.
- BAKER J.C & al. Study on the etiologic role of respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1986b, 189 : 66-70.
- BELKNAP E.B & al. Experimental respiratory syncytial virus infection in calves and lambs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1995, 7 : 285-298.
- BIELEFELDT - OHMANN H. & BABIUK L.A Alveolar macrophage characteristics : effect of repeated lavages on cell activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1986, 13 : 331-346.
- BRAIN J.D. & FRANK R. Alveolar macrophage adhesion : wash electrolyte composition and free cell yield. *J. Appl. Physiol.* 1973, 34 : 75-80.
- BRYSON D.G. & al. Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves. Epidemiological and clinical findings. *Vet. Rec.* 1978, 103 : 485-489.
- BURRELLS C. Cellular and humoral elements of the lower respiratory tract of sheep. Immunological examination of cells and fluid obtained by bronchoalveolar lavage of normal lungs. *Vet. Immunol. Immunopath.* 1985, 10 : 225-243.
- CANNON M.J. & al. Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells. *Immunology* 1987, 62 : 133-138.
- CANNON M.J. & al. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J. Exp. Med.* 1988, 168 : 1163-1168.

- CAPRON F. Le lavage bronchoalvéolaire (LBA). *Ann. Pathol.* 1990, 10 : 232-246.
- CARTER P.H. & al. Flow cytometric analysis of whole blood lysis, three anticoagulants and five cell preparations. *Cytometry* 1992, 13 : 68-74.
- CASTLEMAN W.L. & al. Experimental Bovine respiratory syncytial virus infection in conventional calves : light microscopic lesions, microbiology, and studies on lavaged lung cells. *Am. J. Vet. Res.* 1985a, 46 : 547-553.
- CHIBA Y. & al. Development of cell mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J. Med. Virol.* 1989, 28 : 133-139.
- COLLINS P.L. The molecular biology of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) of genus Pneumovirus in D.W. KINGSBURY . *The Paramyxoviruses*, 1991 : 103-162, Plenum Press, New York, USA.
- COLLINS P.L. & al. Respiratory syncytial virus in B.N. FIELDS, D.M. KNIPE, P.M. HOWLEY & al. *Fields Virology* 3rd ed.1996 : 1313-1351, Lippincott raven Publ., Philadelphia, USA.
- CONNORS M. & al. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin 4 (IL4) and interleukin 10 (IL10) . *J. Virol.* 1994, 68 : 5321-5325.
- CORSTVET R.E. & al. Recovery of pulmonary alveolar macrophages from non anesthetized calves. *Am. J. Vet. Res.* 1982, 43 : 2253-2254.
- DAUBER J.H. & al. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in bronchoalveolar lavage fluid : comparison of a two color technique with a standard immunoperoxidase assay. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992, 7 : 531-541.
- DEAN G.A. & al. Flow cytometric analysis of T lymphocyte subsets in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991, 28 : 327-335.
- DE JONG M.C.M. & al. A quantitative investigation into outbreaks of bovine respiratory syncytial virus infections in cattle herds. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57 : 628-633.
- ELLIS J.A. & al. Flow cytofluorimetric analysis of lymphocyte subset alterations in cattle infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet. Pathol.* 1988, 25 : 231-236.
- ELLIS J.A. & al. T lymphocyte subset alteration following blue tongue virus infection in sheep and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1990, 24 : 49-67.
- ELVANDER M. & al. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Rec.* 1996, 138 : 101-105.

ESPINASSE J. & al. L'examen clinique dans les bronchopneumonies enzootiques des jeunes bovins. Proc. Soc. Belge de Buiatrie, Bruxelles, Belgique, 1981.

FIELD E.W., SMITH M.H. Cell mediated immune response in cattle to bovine respiratory to syncytial virus. Am. J. Vet. Res. 1984, 45 : 1641-1643.

FLORMAN A.L., Mc LAREN L.C. The effect of altitude and weather on the occurrence of outbreaks of respiratory syncytial virus infections. J. Infect. Dis., 1988, 158: 1401-1402.

FORMAN A.J. & al. Effect of infectious bovine rhinotracheitis virus infection of calves on cell populations recovered by lung lavage. Am. J. Vet. Res. 1982, 43 : 1174-1179.

GALE H.B., HENRY K. Measuring percent lymphocytes by flow cytometry to calculate absolute subsets count for HIV + specimens. Cytometry 1992, 13 : 175-181.

GRAHAM B.S. & al. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. J. Clin. Invest. 1991b, 88 : 1026-1033.

GRAHAM B.S. Immunological determinants of disease caused by respiratory syncytial virus. Trends in Microbiol. 1996, 4 : 290-294.

HALEY P. J. & al. Bronchoalveolar lavage cytology in Cynomogus Monkeys and identification of cytologic alterations following sequential saline lavage. Vet. Pathol. 1989, 26: 265-273.

HALL C. B. & al. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. J. Inf. Dis. 1991, 163 : 693-698.

HAWKINS E. C. Bronchoalveolar lavage in the evaluation of pulmonary disease in the dog and cat. J. Vet. Int. Med. 1990, 4 : 267-274.

HEIN W. R. & MACKAY C. R. Prominence of  $\gamma\delta$ T cells in the ruminant system. Immunology Today 1991, 121 : 30-34.

HOWARD C. J. & al. In vivo depletion of B<sub>0</sub> T4 (CD4) and non T4/T8 lymphocyte subsets in cattle with monoclonal antibodies. Europ. J. Immunol. 1989, 19 : 757-764.

HOWARD C. J. & al. Summary of workshop findings for leukocyte antigen of cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 1991, 27 : 21-27.

HUSSEL T. & al. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol. 1996, 77 : 2447-2455.

KELLY C. & al. The effect of filtration on absolute and differential cells counts in fluid obtained at bronchoalveolar lavage. Respi. Med. 1989, 83 : 107-110.

KIMMAN T. G. WESTENBRINK F. Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. Arch. Virol. 1990, 112 : 1-25.

KIMMAN T. G. The immune response to and pathogenesis of BRSV infections. *Vet. Med.* 1993, 1196-1204.

KIMMAN T. G. & al. Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47 : 143-147.

KIMMAN T. G. & al. Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25 : 1097-1106.

KIMMAN T. G. & al. Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves : influence of maternal antibodies on the outcome of disease. *Vet. Rec.* 1988, 123 : 104-109.

KIMMAN T. G. & al. Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves : morphologic and serologic findings. *Am. J. Vet. Res.* 1989b, 50 : 684-693.

KIMPEN J. L. L. & OGRA P. L. T cell redistribution kinetics after secondary infection of BALB/c mice with respiratory syncytial virus. *Clin. Exp. Immunol.* 1993, 91 : 78-82.

KIMPEN J. L. L. & al. Mucosal T cell distribution during infection with respiratory syncytial virus. *J. Med. Virol.* 1992, 36 : 172-179.

KOSZINOWSKI U. H. & al. The role of CD4 and CD8 T cells in viral infections. *Curr. Op. Immunol.* 1991, 3 : 471-475.

LAL R. B. & al. Fixation and long-term storage of human lymphocytes for surface marker analysis by flow cytometry. *Cytometry* 1988, 9 : 213-219.

LAM S. & al. Effect of filtration and concentration on the composition of bronchoalveolar lavage fluid. *Chest* 1985a, 87 : 740-742.

LAM S. & al. Effect of bronchial lavage volume on cellular and protein recovery. *Chest* 1985b, 88 : 856-859.

LAY J. C. & al. Volume-controlled bronchopulmonary lavage of normal and pneumonic calves. *Vet. Pathol.* 1986, 23 : 673-680.

LE JAN C. & al. Characterization of cells from the respiratory tract of calves. *Ann. Rech. Vet.* 1980, 11 : 301-306.

MALONE J. L. & al. Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus type 1-infected patients : total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. *J. Acq. Immun. Def. Synd.* 1990, 3 : 144-151.



MINTON J. E. & al. Repeated restraint and isolation stress alters adrenal and lymphocyte functions and some leukocyte differentiation antigens in lambs. *J. Anim. Sci.* 1992, 70 : 1126-1132.

NICHOLSON J. K. A., GREEN T. A. Selection of anticoagulants for lymphocytes immunophenotyping. *J. Immunol. Methods* 1993, 165 : 31-35.

OPENSHAW P. J. M. Flow cytometric analysis of pulmonary lymphocytes from mice infected with respiratory syncytial virus. *Clin. Exp. Immunol.* 1989, 75 : 324-328.

OPENSHAW P. J. M. Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. *Springer Semin. Immunopathol.* 1995, 17 : 187-201.

PADOVAN C. S & al. Immunophenotyping of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid. Comparison of flow cytometric and immunocytochemical techniques. *J. Immunol. Methods* 1992, 147 : 27-32.

PINGLETON S. K. & al. Effect of location, pH, and temperature of instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1983, 128 : 1035-1037.

PINSKER K. L. & al. Cell content in repetitive canine bronchoalveolar lavage. *Acta Cytologica* 1980, 24 : 558-563.

PRINGLE J. K. & al. Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves : cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. *Can. J. Vet. Res.* 1988, 52 : 239-248.

REYNOLDS H. Y. Bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1987, 135 : 250-263.

SALTINI C. & al. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984, 130 : 650-658.

SCHELCHER F. & al. Approche séroépidémiologique des troubles respiratoires épizootiques des « veaux d'aveyron » : rôle du virus respiratoire syncytial. *Rev. Med. Vet.* 1990, 141 : 117-123.

SCHRIJVER R. S. & al. Bovine respiratory syncytial virus replicates minimally in bovine alveolar macrophages. *Arch. Virol.* 1995, 140 : 1905-1907.

SCHRIJVER R. S. & al. Antibody response against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1996a, 3: 500-506.

SHARMA R. & al. Lymphocyte subpopulation in peripheral blood of lambs experimentally infected with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1990b, 24 : 383-391.

STOTT E. J. & TAYLOR G. Respiratory syncytial virus. Brief review. *Arch. Virol.* 1985, 84 : 1.-52.

SWEENEY C. R. & al. Effect of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am. J. Vet. Res.* 1992, 53 : 1376-1379.

SWEENEY C. R. & al. Effect of prior lavage on bronchoalveolar lavage fluid cell population of lavaged and unlavaged lung segments in horses. *Am. J. Vet. Res.* 1994, 55 : 1501-1504.

TAYLOR G. & al. Effect of vaccination on cell populations in lung washes from calves after infection with respiratory syncytial virus. *Res. Vet. Sci.* 1989, 47 : 231-235.

TAYLOR G. & al. Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. *J. Virol.* 1995, 69 : 6658-6664.

THOMAS L. H. & al. Influence of selective T-lymphocyte depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus. *Res. Vet. Sci.* 1996, 61 : 38-44.

VALARCHER & al. Evolution of Bovine Respiratory syncytial Virus. *J. Virol.* 2000, 74 : 10714-10728.

VAN der POEL W. H. L. & al. Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections : a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Arch. Viro.* 1993, 133 : 309-321.

VAN der POEL W. H. L. & al. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. *J. Inf.* 1994, 29 : 215-228.

VAN der POEL W. H. L. & al. Experimental reproduction of respiratory disease in calves with non-cell-culture-passaged bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Quart.* 1996, 18 : 81-86.

VERHOEFF J. & al. Clinical signs following experimental lungworm infection and natural bovine respiratory syncytial virus infection in calves. *Vet. Rech.* 1988, 123 : 346-350.

VON ESSEN S. G. & al. Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage causes neutrophil recruitment to the lower respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991, 144 : 848-854.

VON WICHERT P. & al. Bronchoalveolar lavage. Quantitation of intraalveolar fluid ? *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993, 147 : 148-152.

WALKER R. D. & al. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 1985, 46 : 2429-2433.

WEILAND J. E. & al. Validity of bronchoalveolar lavage in acute lung injury : recovered cells accurately reflect changes in the lung parenchyma. *Pathology* 1989, 21 : 59-62.

WEISS D. J. & al. Changes in blood and bronchoalveolar lavage fluid components in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.* 1991, 52 : 337-344.

WESTENBRINK F. & al. Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus protein in calves. *J. Gen. Virol.* 1989, 70 : 591-601.

WESTERMANN J. & PABST R. Lymphocyte subsets in the blood : a diagnostic window on the lymphoid system ? *Immunology Today* 1990, 11 : 406-410.

WILKIE B. N., MARKHAM R. J. F. Bronchoalveolar washing cells and immunoglobulins of clinically normal calves. *Am. J. Vet. Res.* 1981, 42 : 241-243.

WILLCOX M. & al. Quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. Comparison of cytocentrifuge preparations with the filter method. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988, 138 : 74-80.

WINER B. J. & al. *statistical principles in experimental design* 3rd Ed. 1991 : p.153-194, Maidenhead, Mac Graw Hill.

YANG T. J. T., RABINOVSKY E. D. Separation and identification of bovine lymphocyte populations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1987, 14 : 77-84.

YEO S. P. & al. Maturation of cellular defence in the respiratory tract of young calves. *Res. Vet. Sci.* 1993, 55 : 292-297.







Toulouse, 2001

NOM : DORE

PRENOM : Laurent

**TITRE : Infection expérimentale du veau par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin : Evaluation de la réponse lymphocytaire par immunophénotypage.**

RESUME :

Dans la première partie, les principaux aspects de l'infection par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB) sont rappelées. Les caractéristiques étiologiques, cliniques, virologiques, pathogéniques et épidémiologiques sont successivement abordées au sein de l'espèce bovine.

Dans une seconde partie sont présentés les différents aspects méthodologiques de l'expérimentation. Cette étude évalue les sous-populations lymphocytaires du sang et du liquide de lavage bronchoalvéolaire lors de l'infection expérimentale par le Virus Respiratoire Syncytial Bovin.

La troisième partie est consacrée aux résultats de l'expérimentation. Aucune modification n'est notable sur les lymphocytes sanguins. Par contre, des modifications sont perceptibles sur les lymphocytes du liquide de lavage bronchoalvéolaire. Ainsi, les lymphocytes CD4+ et CD8+ augmentent significativement de 5 à 9 jours post inoculation, alors que le titre viral diminue à partir de 6 à 7 jours post inoculation.

Enfin, dans une dernière partie, les aspects méthodologiques et les résultats de l'expérimentation sont discutés. Cette étude permet d'envisager l'utilisation du veau comme modèle expérimental dans l'étude des réactions immunitaires cellulaires vis-à-vis du Virus Respiratoire Syncytial.

MOTS-CLES : Virus Respiratoire Syncytial, Veau, Lymphocytes, Immunophénotypage

---

**ENGLISH TITLE : Experimental infection of cattle by Bovine Respiratory Syncytial Virus : Evaluation of the lymphocytary response by immunophenotyping.**

ABSTRACT :

The main aspects of infection by Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) are first reminded and etiological, clinical, virological, pathological and epidemiological characteristics are successively studied on cattle.

In a second part the different methodological aspects of the experiment are examined. This study tests lymphocytary sub-population of the blood and bronchoalveolar washing fluid during experimental infection by BRSV.

The third part is devoted to experimental results. No modification are noticeable on blood lymphocytes. However some modifications were found on bronchoalveolar washing fluid lymphocytes. Therefore, CD4+ and CD8+ lymphocytes increase significantly within 5 to 9 days p.i. whereas the viral titer decreases within 6 to 7 days p.i.

Finally, methodological aspects and experiment' results are discussed. This study suggests that the use of calves as an experimental model is possible in the study of cellular immunity reactions after infection by Respiratory Syncytial Virus.

KEY WORDS : Respiratory Syncytial Virus, Cattle, Lymphocyte, Immunophenotyping

