



HAL
open science

Évolution des sous-populations lymphocytaires dans le lait de brebis au moment de l'excrétion du virus Maedi

R Ouzrout, F Guiguen, C Lerondelle

► **To cite this version:**

R Ouzrout, F Guiguen, C Lerondelle. Évolution des sous-populations lymphocytaires dans le lait de brebis au moment de l'excrétion du virus Maedi. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1991, 22 (4), pp.379-386. hal-00902042

HAL Id: hal-00902042

<https://hal.science/hal-00902042>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Évolution des sous-populations lymphocytaires dans le lait de brebis au moment de l'excrétion du virus Maedi

R Ouzrout *, F Guiguen, C Lerondelle

École nationale vétérinaire de Lyon, laboratoire associé INRA, pathologie des petits ruminants, BP 83, 69280 Marcy-l'Étoile, France

(Reçu le 18 avril 1991, accepté le 9 juillet 1991)

Résumé — Le lait représente, chez la brebis comme chez la chèvre, la voie de diffusion principale des lentivirus du groupe Caev-Maedi. Nous avons suivi l'évolution des populations cellulaires du sang et du lait au moment de l'agnelage chez 4 brebis séropositives primipares. Deux des brebis (3/4 demi-mamelles) excrétaient des cellules infectées dans leur lait. Le nombre de cellules/ml de lait est plus élevé dans les 3 demi-mamelles excrétrices que dans les 5 demi-mamelles non excrétrices. Ce sont les lymphocytes CD8 qui augmentent de façon importante et régulière dans le sang et le lait des animaux producteurs de virus. Si la sérologie détecte les animaux infectés, une augmentation des lymphocytes CD8 dans le lait accompagne l'évolution de l'infection qui se traduit par l'excrétion du virus.

brebis / Maedi / lymphocyte CD8 / lait

Summary — **Lymphocyte subpopulations in milk from ewes producing Maedi virus at parturition.** Milk is the most important route of lentivirus spread in sheep and goat. Blood and milk cell populations were characterised with specific monoclonal antibody at lambing time in 4 primiparous seropositive ewes. Two of the ewes (3/4 half udders) produced milk with infected cells. The cell number/ml was always higher in milk and blood from virus-producing animals. In ewes which spread infected macrophages CD8 lymphocyte number was increased in blood and milk. Serological tests are able to detect infected animals but virus production is reflected immediately by an increase of CD8 lymphocytes in milk.

ewe / Maedi / CD8 lymphocyte / milk

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

Les lentivirus des petits ruminants Caev-Maedi sont présents dans les macrophages du colostrum et du lait comme dans les macrophages du lavage broncho-alvéolaire des brebis et des chèvres infectées. Chez les animaux, on met en évidence des lésions de la mamelle, du poumon et des articulations qui se caractérisent par une infiltration de cellules mononucléées : monocytes-macrophages et lymphocytes (Van der Molen et Houwers, 1987; Lerondelle *et al*, 1989).

L'activation des monocytes, des macrophages (Cordier *et al*, 1990) et des lymphocytes (Cordier, comm pers) retrouvés dans le lavage broncho-alvéolaire des animaux infectés par les lentivirus a été démontrée *in vivo* et *in vitro* (Kennedy *et al*, 1985; Narayan *et al*, 1985).

Les lymphocytes CD8 des membranes synoviales infectées présentent *in vitro* un pouvoir cytotoxique sur les macrophages infectés (Kennedy-Stroskopf *et al*, 1989). Pour un autre lentivirus (HIV), les lymphocytes CD8 du lavage broncho-alvéolaire des individus séropositifs sont de la même façon cytotoxiques pour les macrophages infectés (Hoffenbach *et al*, 1989).

Nous avons suivi l'évolution des différentes populations cellulaires du sang et du lait chez des brebis primipares séropositives au moment de l'agnelage, période où l'on observe avec la plus grande fréquence l'expression du virus dans les macrophages du lait et dans les monocytes du sang.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux et protocole expérimental

L'étude a porté sur 4 brebis Lacaune gestantes primipares séropositives Visna Maedi, en immu-

nodiffusion sur gélose (Crawford *et al*, 1981). Le sang et les sécrétions mammaires ont été prélevés 10 j avant la mise-bas et pendant 2 mois alors que les brebis allaitaient leurs agneaux.

Recherche des cellules infectées dans le lait et dans la mamelle

Mise en évidence de cellules infectées dans le lait et le colostrum

Chez les 4 brebis, chaque demi-mamelle a été étudiée séparément. Nous avons donc disposé de 8 demi-mamelles. Les techniques concernant la mise en culture des cellules du lait et l'isolement du virus ont été décrites (Ouzrout et Lerondelle, 1990).

Mise en culture des explants mammaires

Les côtés droit et gauche des mamelles n'ont pas été étudiés séparément. Un fragment de tissu mammaire d'environ 0,5 cm³ a été prélevé après l'abattage des animaux, découpé finement aux ciseaux dans 2 ml de milieu 199 sans rouge de phénol, à 10% de sérum de veau fœtal puis réparti dans les 24 trous d'une plaque pour culture de cellules. Après 24 h d'incubation à 37 °C en atmosphère humide à 5% de CO₂, le milieu a été remplacé par du milieu à 2% de sérum de veau. Les plaques étaient colorées au May-Grünwald-Giemsa au bout de 15 j d'incubation. L'effet cytopathique du virus a été mis en évidence par la présence de syncytia. Un puits était considéré comme positif s'il contenait au moins 5 syncytia présentant plus de 4 noyaux. Une mamelle était considérée comme négative si moins de 40% des puits présentaient des syncytia. Dans les autres cas, le résultat était considéré comme incertain.

Examen anatomopathologique de la mamelle

Un fragment de tissu mammaire d'environ 1 cm³ prélevé dans la région de la citerne au moment de l'abattage des brebis a été fixé dans une solution de formol à 4%. Des coupes histologiques

colorées à l'hémalum éosine safran ont été réalisées. Les côtés droit et gauche de la mamelle n'ont pas été étudiés séparément. Lorsque le tissu mammaire présentait une infiltration lymphocytaire avec augmentation du tissu fibreux, la demi-mamelle était considérée comme infectée.

Examens cytologiques

Un test de viabilité a été réalisé sur 100 μ l de la suspension finale de cellules du lait (10^6 cellules/ml) après addition de 10 μ l de bleu trypan (Sigma, l'Isle d'Abeau, France).

Les marquages n'ont été réalisés que lorsque 70% des cellules étaient vivantes. La suspension à la concentration de 10^6 cellules/ml a été cytocentrifugée. Ces lames ont été conservées après fixation 10 min à l'acétone. L'identification des cellules a été faite après coloration au May-Grünwald-Giemsa (Les résultats ont été exprimés par rapport à un total de 100 cellules).

Marquage des cellules du lait et du sang

Les anticorps

Nous avons utilisé les anticorps fournis par le docteur Brandon (université de Melbourne, Australie) :

- l'anticorps SBU-T4 qui correspond au groupe de différenciation CD4 marque les lymphocytes auxiliaires (Maddox *et al*, 1985);
- l'anticorps SBU-T8 qui correspond au groupe de différenciation CD8 marque les lymphocytes cytotoxiques (Maddox *et al*, 1985);
- l'anticorps SBU-T1 qui correspond au groupe de différenciation CD5 marque tous les lymphocytes T (Mackay *et al*, 1985);
- l'anticorps SBU-II monomorphe marque les antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité présents à la surface des lymphocytes B et des lymphocytes T et macrophages activés.

Nous avons utilisé également les anticorps produits par l'hybridome 175 marqueur de la lignée myéloïde, notamment des monocytes-macrophages et des polynucléaires (Miyazaka

et al, 1985). Pour identifier les lymphocytes B, nous avons utilisé le fragment F(ab)₂ d'un sérum de lapin anti-IgG de mouton (chaînes lourdes et légères) conjugué à la fluorescéine (Cappel).

Marquage des cellules du lait (technique de l'immunoperoxydase, Amersham, France)

Les lames conservées à -80 °C ont été réhydratées en PBS. Les cellules ont été marquées avec les anticorps monoclonaux dilués au 1/200 puis avec un sérum de mouton anti Ig de souris biotinilé et avec le complexe streptavidine biotine peroxydase (Amersham, Les Ulis, France). Les résultats ont été lus aux grossissements 400 et 1 000 sur 500 cellules.

Marquage des cellules du sang

Après hémolyse du sang hépariné, les leucocytes ont été marqués (Hoffman *et al*, 1980) soit directement par les anticorps anti-Ig de mouton conjugués à la fluorescéine soit en incubant les cellules successivement avec un anticorps monoclonal produit sur souris et un sérum de chèvre anti-Ig de souris conjugué à la fluorescéine (FITC GAMIG, Biosost, Paris, France). Les cellules ont été analysées en cytométrie de flux à l'aide d'un analyseur de cellules Facscan (Becton Dickinson, France). L'histogramme de fluorescence a été établi par l'étude de 2 000 lymphocytes.

Interprétation des résultats

Pour l'analyse des types cellulaires du lait et de leur évolution en fonction du temps, les valeurs ont été exprimées en % du nombre de cellules marquées par rapport à un total de 500 cellules pour tenir compte de la variabilité des quantités de lait produites par les 4 brebis qui allaitaient 1 ou 2 agneaux (8 demi-mamelles). L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du test *T* de student.

Pour l'analyse des types cellulaires du sang, nous n'avons utilisé que 2 brebis excrétrices et 2 brebis non excrétrices; les moyennes n'ont donc pas fait l'objet d'une analyse statistique.

RÉSULTATS

Isolément du virus

Les cellules du lait produit par les 3 demi-mamelles sur les 8 mises en culture avec des cellules sensibles ont produit du virus à plusieurs (1–6) reprises dans les 15 j qui entourent la mise bas. Ce sont les mamelles excrétrices.

Le virus n'a jamais été isolé à partir des 5 autres demi-mamelles. Ce sont donc les demi-mamelles non excrétrices.

La mise en culture des explants mammaires sans distinction des côtés droit et gauche des 4 brebis n'a pas permis de démontrer clairement la production de virus (1 mamelle a donné un résultat négatif, les 3 autres un résultat incertain).

Sur coupe, 2 des mamelles ayant fourni un résultat incertain en culture ont présenté des infiltrations lymphocytaires évoluant des lésions spécifiques dues au virus. Dans les 2 autres mamelles, l'examen histologique n'a pas décelé de lésion pouvant être attribuée au virus. En ce qui concerne l'expression du virus à partir des cellules du lait par coculture, les 3 demi-mamelles excrétrices appartenaient aux 2 brebis chez lesquelles les explants ont donné en culture des résultats incertains et qui présentaient des lésions mammaires.

Évolution des cellules du lait chez les brebis excrétrices et non excrétrices de virus

Évolution des quantités de cellules au moment de la mise bas (tableau I)

La quantité de cellules est plus importante dans le lait provenant des mamelles excré-

trices que dans le lait provenant des mamelles non excrétrices. Cette différence est significative ($P < 0,01$) de 10 j avant la mise bas jusqu'à 17 j après l'agnelage.

Évolution des types cellulaires du lait au moment de l'agnelage

Types cellulaires présents dans le lait de brebis

Une étude préliminaire du lait provenant d'une brebis non excrétrice de virus a montré que 17 j après l'agnelage, les types cellulaires représentés étaient des lymphocytes (23%), les macrophages (23%), les polynucléaires (54%). Parmi les 90% de lymphocytes identifiés, les lymphocytes CD5 (lymphocytes T) représentaient 67% des lymphocytes (lymphocytes CD4 16%, lymphocytes CD8 44%) tandis que les lymphocytes B (à IgG de surface) représentaient 24% des lymphocytes).

Tableau I. Évolution de la quantité de cellules dans le lait issu de mamelles de brebis excrétrices ou non excrétrices de virus.

	Nombre de cellules ^a /ml de lait	
	Mamelles excrétrices	Mamelles non excrétrices
Avant l'agnelage (10 j)	1,03	0,58
À l'agnelage	1,17	0,74
Après l'agnelage		
10 j	0,93	0,5
17 j	1	0,6
32 j	0,47	0,46
42 j	0,67	0,61

^a : valeurs exprimées en millions de cellules, moyennes obtenues à partir du lait des 3 demi-mamelles de brebis excrétrices de virus et des 5 demi-mamelles non excrétrices.

Évolution des populations cellulaires du lait (figs 1-3)

On observe une augmentation significative ($P < 0,05$) des lymphocytes CD8 chez les brebis excrétrices 17 j après la mise bas. À ce moment, on observe aussi, mais de façon moins constante, une augmentation des macrophages et des lymphocytes CD4 dans le lait de ces demi-mamelles productrices de virus.

L'augmentation des lymphocytes CD8 se maintient jusqu'à 45 j après l'agnelage.

Évolution des cellules dans le sang chez les brebis excrétrices et chez les brebis non excrétrices

Quantité de leucocytes (tableau II)

Dix jours avant la mise bas, le nombre de leucocytes par ml est plus élevé chez les 2 brebis excrétrices de virus.

Au moment de l'agnelage, il est à peu près identique dans les 2 groupes d'animaux (le nombre de leucocytes augmente chez les 2 brebis non excrétrices). Puis dans les 2 groupes de brebis, le nombre

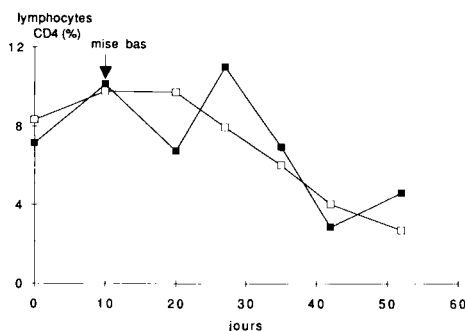


Fig 1. Évolution de la fréquence des lymphocytes CD4 dans le lait de brebis excrétrices (■—■) ou non excrétrices (□—□) de virus à la période de l'agnelage.

de leucocytes/ml de sang diminue progressivement dans les 5 semaines qui suivent l'agnelage.

Évolution des types lymphocytaires

Toutes les populations lymphocytaires diminuent au moment de la mise bas puis augmentent dans les 10 j qui suivent. Cette variation est plus marquée pour les

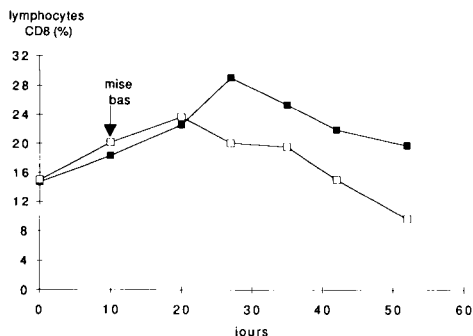


Fig 2. Évolution de la fréquence des lymphocytes CD8 dans le lait de brebis excrétrices (■—■) ou non excrétrices (□—□) de virus à la période de l'agnelage.

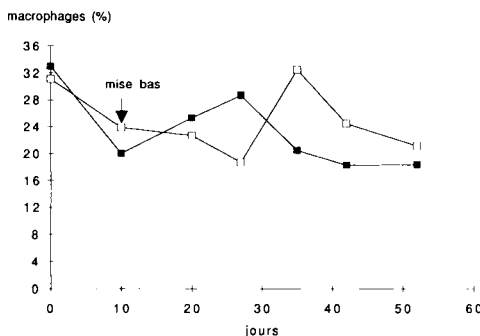


Fig 3. Évolution de la fréquence des macrophages dans le lait de brebis excrétrices (■—■) ou non excrétrices (□—□) de virus à la période de l'agnelage.

Tableau II. Évolution du nombre de leucocytes dans le sang des brebis excrétrices et non excrétrices de virus.

	Nombre de leucocytes ^a	
	Brebis excrétrices	Brebis non excrétrices
Avant l'agnelage (10 j)	10,15	6,2
À l'agnelage	9,7	9,7
Après l'agnelage		
10 j	8,7	9,2
17 j	6,1	6,9
32 j	6,1	7,4

^a : valeurs exprimées en millions de cellules. Moyenne de 2 brebis.

lymphocytes T que pour les lymphocytes B, 17 j après l'agnelage. Les lymphocytes CD4 varient peu en fonction du temps mais de façon plus importante chez les 2 brebis excrétrices. Les lymphocytes CD8 sont plus nombreux chez les brebis excrétrices 10 j avant la mise bas. À l'agnelage, tous les animaux ont un nombre comparable de lymphocytes CD8 du fait de la diminution de ce nombre chez les brebis excrétrices. Le nombre de lymphocytes CD8 dans le sang augmente après la mise bas chez les brebis excrétrices tandis qu'il reste stable ou diminue chez les non excrétrices (fig 4).

DISCUSSION

Chez 4 brebis primipares gestantes séropositives pour le virus Maedi, nous avons étudié l'excrétion du virus dans le lait au moment de l'agnelage. Dans le lait produit par 3 demi-mamelles, nous avons retrouvé de façon régulière des macrophages infec-

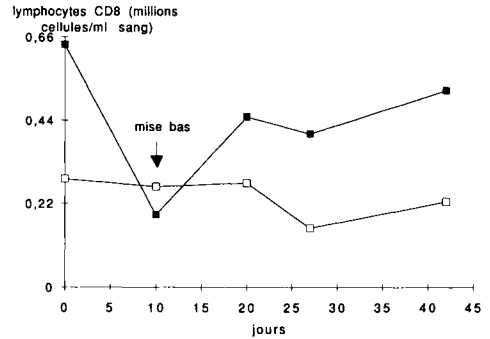


Fig 4. Évolution de la fréquence des lymphocytes CD8 dans le sang de brebis excrétrices (■—■) ou non excrétrices (□—□) de virus à la période de l'agnelage.

tés dans les semaines qui précèdent et qui suivent la mise bas.

Dans le lait des 5 autres demi-mamelles, nous n'avons jamais mis en évidence de cellules infectées. Nous avons donc 2 brebis séropositives excrétrices de virus et 2 brebis séropositives non excrétrices de virus. Chez les 2 brebis excrétrices, le nombre de leucocytes du lait est toujours plus élevé que chez les 2 brebis non excrétrices.

Pour déceler l'excrétion du virus, si l'on compare les résultats obtenus par la recherche du virus dans les cellules du lait avec la mise en évidence de syncytia dans les explants mammaires ou la détection de lésions spécifiques dans la mamelle, il apparaît que la mise en culture des cellules du lait est la plus efficace au moins chez les animaux primipares.

Pour le lait, nous avons considéré séparément les 3 demi-mamelles dont la sécrétion contenait des cellules infectant la culture cellulaire sensible et les 5 demi-mamelles dont le lait n'était pas infectueux.

Dans les sécrétions mammaires contenant du virus il y a 2 fois plus de cellules que dans les sécrétions non infectées. Quand on suit l'évolution des différentes sous-populations cellulaires dans le lait, on voit que le pourcentage de CD8 augmente progressivement lorsque le virus est excrété (60% des lymphocytes T sont des CD8 au 17^e j après l'agnelage). Cette augmentation est bien moins marquée chez les animaux non-excréteurs de virus. On peut penser que les CD8 participent à l'augmentation de la cellularité du lait chez les animaux excréteurs.

Dans le sang, 10 j avant la mise bas le nombre de leucocytes/par ml est plus élevé chez les animaux excréteurs même si l'on tient compte des variations individuelles et du petit nombre de brebis étudiées.

Chez les 2 brebis excréteur de virus, le nombre de lymphocytes CD8 très élevé dans le sang avant la mise bas diminue de façon importante au moment de l'agnelage puis augmente progressivement dans les semaines qui suivent.

Chez les 2 brebis n'excrétant pas de virus, le nombre de lymphocytes CD8 reste toujours plus faible et ne présente pas de variation au moment de la mise bas.

Si l'on compare l'évolution du nombre de leucocytes dans le sang et dans le lait :

– chez les brebis excréteur de virus après l'agnelage, le nombre de lymphocytes CD8 augmente progressivement dans le sang et dans le lait jusqu'à 17^e j. Le nombre de CD8 reste alors à un taux élevé dans le sang mais il diminue dans le lait ce qui correspond peut-être à l'augmentation de la production de lait;

– chez les brebis n'excrétant pas de virus, le nombre de CD8 diminue dans le lait dès le 10^e j après l'agnelage alors que l'on n'observe pas de variation notable des CD8 dans le sang.

Dans le lait et le sang d'origine humaine (Richie *et al*, 1982), les CD8 sont minoritaires par rapport aux CD4. Chez la brebis, l'étude sur coupe de mamelle des sous-populations lymphocytaires infiltrant l'épithélium mammaire montre une forte population de CD8 (Lee *et al*, 1989). Cette importance des CD8 chez les brebis excrétrices et non excrétrices de virus serait due alors à une distribution particulière des lymphocytes de la mamelle dans cette espèce. L'importance de la population CD8 dans le lait de brebis tient peut-être à ce que tous les animaux que nous avons utilisés étaient séropositifs. Il est possible que la population des lymphocytes CD8 participe à l'augmentation du nombre de cellules dans le sang et dans le lait des brebis qui produisent des cellules infectées dans leur lait : les cellules CD8 ont d'abord été considérées comme des effecteurs cytotoxiques limitant la diffusion de l'infection par leur action sur les cellules productrices de virus (Plata *et al*, 1987). Les cellules CD8 sont aussi immunosuppressives (Hoffenbach *et al*, 1989) et leur activité pourrait conduire au déficit immunitaire observé dans les infections à lentivirus mais apparemment pas aux premiers stades de l'infection.

L'excrétion du virus peut persister plusieurs mois dans le lait de certaines brebis ou chèvres et correspond ainsi à une infection chronique. De la même façon, certaines brebis porteuses de lésions pulmonaires libèrent dans leur lavage broncho-alvéolaire de façon constante des macrophages produisant du virus en culture cellulaire. Dans les lavages broncho-alvéolaires comme dans le lait, on trouve en même temps beaucoup de lymphocytes CD8. Si la sérologie détecte les animaux infectés (séropositifs), l'augmentation de CD8 dans le lait (ou le sang) pourrait accompagner et signaler une évolution active de l'infection.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été en partie réalisé avec l'aide d'un contrat ANRS (1990-1991).

RÉFÉRENCES

- Cordier G, Cozon G, Greenland T, Rocher F, Guiguen F, Guerret S, Brune J, Mornex JF (1990) *In vivo* activation of alveolar macrophages in ovine lentivirus infection. *Clin Immunol Immunopathol* 55, 355-367
- Crawford TB, Adams DS (1981) Caprine arthritis encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J Am Vet Med Assoc* 178, 713-719
- Hoffenbach A, Langlade-Demoyen P, Dadaglio G, Vilmer E, Michel F, Mayaud C, Autran B, Plata F (1989) Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J Immunol* 142, 452-462
- Hoffman RA, Kung PC, Hansen WP, Goldstein G (1980) Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and subclasses in peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4814-4818
- Kennedy PGE, Narayan O, Ghothi Z, Hopkins J, Gendelman HE, Clements JE (1985) Persistent expression of the antigen and viral genome in Visna-Maedi virus induced inflammatory cells: possible role of lentivirus-induced interferon. *J Exp Med* 162, 1954-1969
- Kennedy-Stroskopf S, Zink C, Narayan O (1989) Pathogenesis of ovine lentivirus-induced arthritis: phenotypic evaluation of T lymphocytes in synovial fluid, synovium, and peripheral circulation. *Clin Immunol Immunopathol* 52, 323-330
- Lee CS, Meeusen E, Brandon MR (1989) Subpopulations of lymphocytes in the mammary gland of sheep. *Immunology* 66, 388-393
- Lerondelle C, Fleury C, Vialard J (1989) La glande mammaire : organe cible de l'infection par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine. *Ann Rech Vét* 20, 57-64
- Mackay CR, Maddox JF, Gogolin-Ewens KJ, Brandon MR (1985) Characterization of two sheep lymphocyte differentiation antigens, SBU-T1 and SBU-T6. *Immunology* 55, 729-737
- Maddox JF, Mackay CR, Brandon MR (1985) Surface antigens, SBU-T4 and SBU-T8, of sheep T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies. *Immunology* 55, 739-748
- Miyazaka M, Beya MF, Dudler L, Parisot R, Ezaki T, Trnka Z (1985) Studies on lymphocyte differentiation and migration in sheep by the use of monoclonal antibodies. In: *Immunology of the sheep* (B Morris, M Miyazaka, eds) 68-83
- Narayan O, Sheffer D, Clements JE, Tennekoon G (1985) Restricted replication of Lentivirus. Visna viruses induce a unique interferon during interaction between lymphocytes and infected macrophages. *J Exp Med* 162, 1954-1969
- Ouzrout R, Lerondelle C (1990) Expression du virus Visna-Maedi dans les sécrétions mammaires d'une brebis séropositive lors d'une gestation puis d'une induction de lactation artificielle. *Ann Rech Vét* 21, 69-73
- Plata F, Autran B, Pedroza Martins L, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debre P (1987) AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* 328, 348-351
- Richie ER, Bass R, Meistrich ML, Dennison DK (1982) Distribution of T lymphocyte subsets in human colostrum. *J Immunol* 129, 1116-1119
- Van der Molen EJ, Houwers DJ (1987) Indurative lymphocytic mastitis in sheep after experimental infection with Maedi-Visna virus. *Vet Q* 9, 193-202