

# Stimulation in vitro des lymphocytes périphériques des bovins de l'Ouest africain par les lectines : intérêt dans la trypanosomose

par F. FUMOUX, R. QUEVAL, T. TRAORE-LEROUX

Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (C.R.T.A.)  
B.P. 454, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso

## Résumé

FUMOUX (F.), QUEVAL (R.), TRAORE-LEROUX (T.). Stimulation in vitro des lymphocytes périphériques des bovins de l'Ouest africain par les lectines : intérêt dans la trypanosomose. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 236-247

La stimulation des lymphocytes périphériques de bovins Baoulé et Zébus par diverses lectines a été étudiée dans des conditions expérimentales très variables. Les conditions optimales de stimulation ont été déterminées. L'étude en immunofluorescence des marqueurs de surface cellulaire a permis de préciser la population lymphocytaire stimulée par les lectines.

La réponse aux mitogènes a été contrôlée pendant 16 semaines sur des bovins transférés dans une zone de forte pression glossinienne. Aucune immuno-dépression notable n'a été mise en évidence.

Mots-clés : Lymphocytes périphériques - Mitogènes - Trypanosomose - Bovins.

## Summary

FUMOUX (F.), QUEVAL (R.), TRAORE-LEROUX (T.). In vitro stimulation of peripheral lymphocytes of West African cattle by lectins ; application to trypanosomiasis. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 236-247

The stimulation of peripheral lymphocytes in Baoule and Zebu cattle by various lectins was studied under very variable experimental conditions. The optimum conditions of stimulation were determined. The study of cell surface markers by immunofluorescence allowed to point out the lymphocyte population stimulated by lectins.

The response to mitogens was checked for 16 weeks on cattle transferred to a zone heavily infested by glossina. No marked immuno-depression was observed.

Key words : Peripheral lymphocytes - Mitogens - Trypanosomiasis - Cattle.

## INTRODUCTION

La stimulation in vitro des lymphocytes sanguins par diverses lectines est devenue d'usage courant en pathologie humaine. En médecine vétérinaire, l'intérêt de cette technique s'accroît sans cesse, cependant en l'absence de conditions expérimentales bien standardisées pour sa réalisation, les comparaisons d'un laboratoire à l'autre demeurent difficiles (3).

Nous nous proposons de préciser les conditions optimales de stimulation par les lectines pour les bovins de l'Ouest africain dont nous disposons : zébus de type soudanien (Bos indicus) et taurins de race Baoulé (Bos taurus) ; puis d'en étudier les modifications lors de la trypanosomose. L'existence d'une immunodépression - qui se traduirait par une diminution de la réponse aux mitogènes - lors de cette affection parasitaire reste un sujet de controverse (5, 12, 14).

## MATERIEL ET METHODES

### Bovins

Les bovins utilisés comprennent des zébus (29 p.100) dont 13 femelles, 12 mâles et 7 veaux femelles et des Baoulé (71 p.100) dont 42 femelles, 26 mâles et 10 veaux femelles. Ces 110 animaux sont maintenus dans des conditions identiques d'élevage à la ferme expérimentale de Banankélédaga près de Bobo-Dioulasso (Burkina). Au moment de notre étude, aucun de ces animaux ne présentait d'affections cliniques. Pour les jeunes animaux, plusieurs prélèvements ont été réalisés lors du sevrage.

Quarante Baoulé ont été transférés dans une zone de forte pression glossinienne afin de déterminer leur trypanorésistance (11), pour dix d'entre eux la réponse aux lectines a été étudiée chaque semaine pendant 4 mois. Lors de chaque prélèvement, l'hématocrite et la parasitémie ont été contrôlés.

### Isolement des lymphocytes sanguins

Environ 100 ml de sang sont recueillis stérilement par ponction à la jugulaire, les échantillons sont immédiatement défibrinés et conservés à + 4°C. Les cellules mononucléaires sont isolées par centrifugation (1 500 g, 20 mn) sur un gradient de Ficoll-Paque (Pharmacia : Fine chemical). Les cellules mononucléaires se rassemblent sous forme de disque en surface du Ficoll alors que les érythrocytes et les polynucléaires sédimentent. Après 3 lavages en milieu de HANKS, les cellules sont reprises dans le milieu de culture final (RPMI 1640) et dénombrées dans une cellule de Malassez.

Dans certaines expériences, les cellules phagocytaires (les monocytes) ont été éliminées, soit par adhérence en boîte de Petri, soit à l'aide de pentacarbonyl de fer réduit.  $20 \cdot 10^6$  cellules sous un volume de 0.5 ml sont mélangées à volume égal avec 20 mg de pentacarbonyl de fer (SIGMA C 3518). Après 45 mn d'incubation à 37°C en présence de 5 p.100 de CO<sub>2</sub> les cellules ayant phagocyté les particules de fer sont éliminées à l'aide d'un champ magnétique créé par des barreaux de fer doux aimanté revêtus de teflon.

#### Les lectines

Les lectines sont des protéines extraites de plantes ou de bactéries, capables de se lier spécifiquement à un groupement glucidique sans le modifier chimiquement. Certaines de ces lectines sont mitogènes, c'est-à-dire capables d'induire une transformation lymphoblastique, d'autres ne possèdent que des propriétés d'agglutination mais sont cependant très utiles pour séparer les sous-populations lymphocytaires.

1. Lectines mitogéniques : 4 lectines ont été utilisées et proviennent de l'Industrie Biologique Française (IBF) :

a) La Concanavaline A (ConA) IBF n° 241182 Lot R 459 extraite de Concanavalia ensiformis, pH 7.2 d'un poids moléculaire de 100 000 d. Les concentrations finales sont de 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 µg/ml.

b) La Phytohémagglutinine (PHA) IBF n° 244267 Lot 666 extraite de Phaseolus vulgaris a été utilisée aux dilutions finales suivantes : 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200.

c) Le mitogène du phytolaque (PWM) IBF n° 243372 Lot P 360 extrait de Phytolacca americana, utilisé aux concentrations finales suivantes : 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 µg/ml.

d) L'agglutinine de l'arachide (PNA) IBF n° 242301 Lot 4432 extraite de Arachis hypogaea est utilisée aux concentrations finales 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31 µg/mg.

2. Lectines utilisées pour caractériser certaines sous-populations lymphocytaires en fluorescence. Nous avons utilisé des lectines marquées à la fluorescéine : PNA - FITC (IBF n° 242311 Lot H 536) et SBA - FITC (IBF n° 45121 Lot H 480).

#### Stimulation des lymphocytes

La culture lymphocitaire est réalisée en milieu RPMI 1640 (Flow Laboratories GB), additionné de L-glutamine à la concentration finale de 2mM (GIBCO-Europe),

HEPES [4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine-éthanesulfonic acid] (Serva-Feinbiochemica, Heidelberg) à la concentration finale de 10 mM, 2 mercapto-éthanol  $5 \times 10^{-5}$  M (Merck Darmstadt), gentamycine 50 µg/ml (Serva - Heidelberg) et de sérum de veau foetal à la concentration finale de 5 p.100 (IBF Villeneuve-la -Garenne Lot 252022). Le pH est ajusté à 7,2 - 7,4.

Plusieurs lots de sérum de veau foetal ont été préalablement testés, le sérum pouvant avoir par lui-même des propriétés stimulantes ou inhibitrices ; celui assurant la meilleure prolifération a été sélectionné et utilisé durant toute la durée de l'expérience (14 mois). La présence de 2 mercapto-éthanol se révèle indispensable pour la prolifération en présence de phytohémagglutinine.

La culture est réalisée en plaque de microtitrage à 96 trous (Linbro, Flow n° 7600305). Les suspensions cellulaires ( $10^6$  cellules/ml) sont réparties sous un volume de 200 µl, l'adjonction de lectines à la concentration désirée s'effectuant sous un volume de 50 µl. Tous les tests sont réalisés en triple ou quadruple exemplaires. L'incubation est effectuée à 37°C, 5 p.100 de CO<sub>2</sub> dans une étuve Heraeus, type B 5060 EK/CO<sub>2</sub> Hanau.

La transformation lymphoblastique induite par les mitogènes est mesurée par l'incorporation d'un précurseur radio-actif dans l'ADN.

Après le temps de culture choisi (72 h en général), l'on ajoute au milieu de culture 10 µl d'une solution de 5-[<sup>125</sup>I] iodo-2'-déoxyuridine (IUDR Amersham) à 100 µ Ci/ml. A la suite d'une dernière incubation de 4 heures, les cellules sont récoltées à l'aide d'un collecteur de cellules (Multiple cell culture Harvester - Flow Laboratories) et déposées sur un filtre de fibre de verre.

Après séchage à la lampe à infra-rouge, le comptage de la radio-activité incorporée dans chaque puits de culture est effectué dans un spectrophotomètre à scintillation "Packard 5360 Autogamma". Les résultats sont présentés, soit en nombre de coups par minute (CPM) correspondant à la quantité de précurseur de l'ADN incorporé, soit en index de stimulation (IS) qui traduit le nombre de divisions cellulaires.

$$IS = \frac{\text{moyenne de CPM des cultures en présence de lectine}}{\text{moyenne CPM des cultures non stimulées}}$$

#### Etude des marqueurs de surface

La culture en présence de mitogène est réalisée en plaque à 24 trous (Linbro Lot 76051101) :  $10^6$  cellules/ml, ConA 2,5 µg/ml, PHA 1/400, PWM 5 µg/ml. Les cellules sont reprises en milieu RPMI complet additionné d'azide de sodium 10 mM, puis incubées en présence de lectines fluorescentes (SBA ou PNA FITC) pendant 30

mn à 4°C ou d'un anticorps monoclonal anti IgM bovine (9) ultérieurement révélé à l'aide d'un anti-sérum anti-immunoglobuline de souris marqué à la fluorescéine.

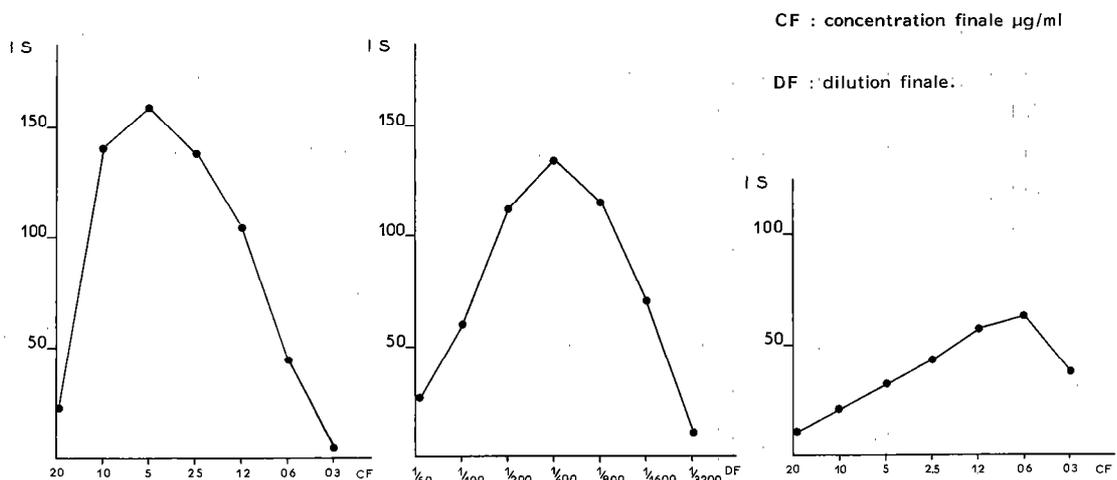
Le pourcentage de cellules fluorescentes est déterminé à l'aide d'un microscope Leitz Orthoplan à lampe à vapeur de mercure HBO 100.

## RESULTATS

Les conditions optimales de stimulation pour chaque lectine ont été déterminées chez les bovins Zébus et Baoulé. Des essais préliminaires - non rapportés - ont montré que la synthèse de l'ADN est maximale en présence d'une densité faible de cellules ( $10^6$  cellules/ml) et que la durée de culture optimale est de trois jours. L'utilisation du 2-mercapto-éthanol qui pourrait faciliter l'utilisation de la cystine contenue dans le milieu de culture à une concentration sub-optimale (2) ne se révèle indispensable que pour la stimulation par la PHA (étude comparative sur 4 animaux, non rapportée).

La prolifération lymphocytaire en fonction de la quantité de lectines pour la ConA, la PHA et le PWM est représentée sur la Fig. n° 1 (a, b, c) ; aucune prolifération - douze doses ont été essayées chez 8 animaux - n'a été obtenue en présence de PNA. Les réponses sont identiques chez les bovins Baoulé et Zébus. Les doses optimales sont de 5 µg/ml pour la Concanavoline A, 0,6 µg/ml pour le Pokeweed mitogène et 1/400 pour la Phytohémagglutinine.

Fig. n° 1 : Courbe dose-réponse en présence de lectines



1a : ConA, chaque point correspond à une moyenne de 16 animaux (8 zébus et 8 taurins)

1b : PHA, moyenne de 16 animaux (8 zébus et 8 taurins)

1c : PWM, moyenne de 8 taurins

Le tableau n°1 donne les résultats de la prolifération aux mitogènes sur 110 animaux, en présence de la dose optimale pour chaque lectine. L'on constate une grande disparité entre les animaux sains, mais pour un même animal les résultats sont remarquablement constants. L'analyse statistique, test de Student, ne montre pas de différence entre les Zébus et les Baoulé ni entre les mâles et les femelles de même race. Pour les jeunes animaux, l'index de stimulation est plus faible ( $p < 0.001$ ) que chez les adultes mais là aussi aucune différence liée à la race n'est constatée. Cette réponse aux lectines n'est pas modifiée lors du sevrage.

TABL. N°1-Réponse des lymphocytes périphériques de bovins aux diverses lectines.

Tableau 1a : ConA CF : 5 µg/ml				
		Nombre (n = 110)	C P M (bdf)	Index de stimulation
Zébus	Mâles adultes	12	78530 ± 18970 (527)	149 ( 78-220)
	Femelles adultes	13	91060 ± 21830 (397)	229 (127-333)
	Veaux (<11 mois)	7	91970 ± 13250 (1164)	79 ( 46-112)
Taurins	Mâles adultes	26	81470 ± 18130 (509)	160 ( 79-239)
	Femelles adultes	42	74000 ± 30510 (333)	222 ( 53-391)
	Veaux (<11 mois)	10	67860 ± 22030 (1077)	63 ( 42- 84)
Tableau 1b : PHA DF : 1/400				
		(n = 110)		
Zébus	Mâles adultes	12	62920 ± 14960 (478)	131 ( 78-184)
	Femelles adultes	13	82450 ± 15670 (398)	207 (103-311)
	Veaux (<11 mois)	7	68070 ± 10750 (1135)	60 ( 40- 82)
Taurins	Mâles adultes	26	58360 ± 18700 (503)	116 ( 53-179)
	Femelles adultes	42	39220 ± 18850 (356)	110 ( 45-220)
	Veaux (<11 mois)	10	46880 ± 7530 (956)	49 ( 28- 70)
Tableau 1c : PWM CF : 0.61 µg/ml				
		(n = 15)		
Taurins	Mâles et femelles adultes	15	38200 ± 12080 (626)	61 ( 28-104)

Seules les valeurs correspondant à la dose optimale ont été reportées.

C P M : coups par minutes, moyenne et écart-type ; b d f : bruit de fond ; incorporation dans les cultures contrôles sans lectines. Index de stimulation : moyenne et valeurs extrêmes. Les doses de lectines sont exprimées en concentration finale (CF) ou dilution finale (DF).

Le traitement des cellules par le pentacarboxyl de fer - qui ne produit qu'une déplétion partielle en cellules phagocytaires - s'accompagne d'une baisse d'environ 60 p.100 de l'incorporation de IUDR (fig. n° 2a) ; cependant, si les résultats sont exprimés en index de stimulation, cette différence est non significative (fig. n° 2b).

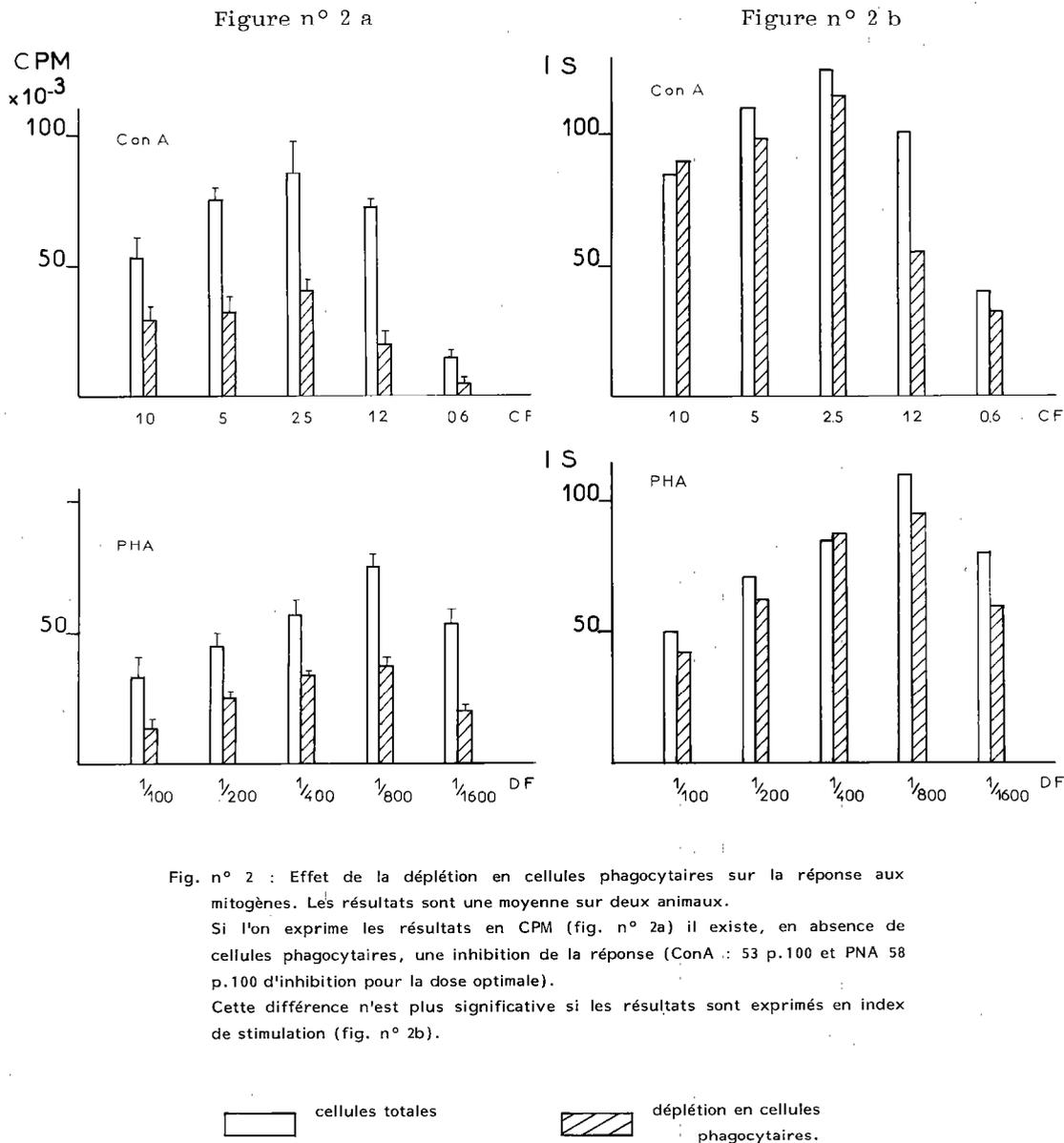


Fig. n° 2 : Effet de la déplétion en cellules phagocytaires sur la réponse aux mitogènes. Les résultats sont une moyenne sur deux animaux.

Si l'on exprime les résultats en CPM (fig. n° 2a) il existe, en absence de cellules phagocytaires, une inhibition de la réponse (ConA : 53 p.100 et PNA 58 p.100 d'inhibition pour la dose optimale).

Cette différence n'est plus significative si les résultats sont exprimés en index de stimulation (fig. n° 2b).

L'utilisation de marqueurs de surface fluorescents montre que 13 p.100 des lymphocytes non stimulés peuvent être considérés comme des "B", 74 p.100 comme des "T" et 13 comme des cellules nulles. Après culture en présence de lectines, l'on observe une majorité de cellules transformées ; ces blastes possèdent très rarement une immunoglobuline de surface ( $\leq 5$  p.100) mais près de 95 p.100 d'entre eux présentent un marqueur de lymphocytes "T" ; chez les bovins, la prolifération en

présence de ces lectines semble essentiellement le fait de cellules "T" (tableau n° II).

TABL. N°II-Pourcentage de cellules positives en immunofluorescence

	Lymphocytes périphériques (n = 8)	ConA blastes (n = 4)	PHA blastes (n = 4)	PWM blastes (n = 4)
PNA - FITC	73.6 ± 8.0	67.8 ± 18.6	64.3 ± 8.6	80.0 ± 2.8
SBA - FITC	68.3 ± 7.8	94.5 ± 1.9	92.7 ± 5.0	95.0 ± 4.2
Anti-IgM	13.0 ± 6.0	2.5 ± 2.0	5.0 ± 4.0	1.5 ± 0.7

Les cellules blastiques sont récoltées après 3 jours de culture en plaque à 24 trous ( $10^6$  cellules/ml, ConA 2.5 µg/ml, PHA : 1/400, PWM : 5 µg/ml. Le pourcentage de blastes est de : 62 pour la ConA ; 74 pour la PNA ; 20 pour le PWM.

Pour trente-deux Baoulé femelles, la réponse aux lectines a été effectuée avant leur transfert dans une zone de forte pression glossinienne. Leur suivi clinique, biologique et parasitologique permet de contrôler leur trypanorésistance (11). La réponse aux lectines est identique ; que les animaux se révèlent trypanosensibles (parasitémie élevée, chute de l'hématocrite) ou trypanorésistants (maintien de l'hématocrite, absence de parasitémie ou parasitémies fugaces après 16 semaines) (tableau n° III).

TABL. N°III-Réponse aux lectines de 32 Baoulé avant leur transfert en zone infestée

Femelles Baoulé	Concanavoline A 5 µg/ml		Phytohémagglutinine 1/400	
	C P M (bdf)	Index de stimulation	C P M (bdf)	Index de stimulation
Trypano- sensibles (n = 8)	76560 ± 14640 (274)	279 (182 - 376)	36500 ± 18800 (244)	149 (78 - 220)
Trypano- résistants (n = 24)	82208 ± 33270 (387)	212 (98 - 342)	45762 ± 20700 (369)	124 (60 - 188)

Il n'existe pas de différence entre les animaux trypanosensibles et trypanorésistants.

Lors d'une infection naturelle à *T. congolense*, une diminution de la réponse aux lectines n'apparaît que tardivement et ne devient très importante que dans les jours précédant la mort de l'animal (fig. n°3). Chez certains animaux, des extraits mitogéniques provenant des trypanosomes pourraient potentialiser l'effet des lectines et cacher une éventuelle immunodépression (tableau n° IV), cet effet peut persister jusqu'à un mois après la disparition des parasites sanguins.

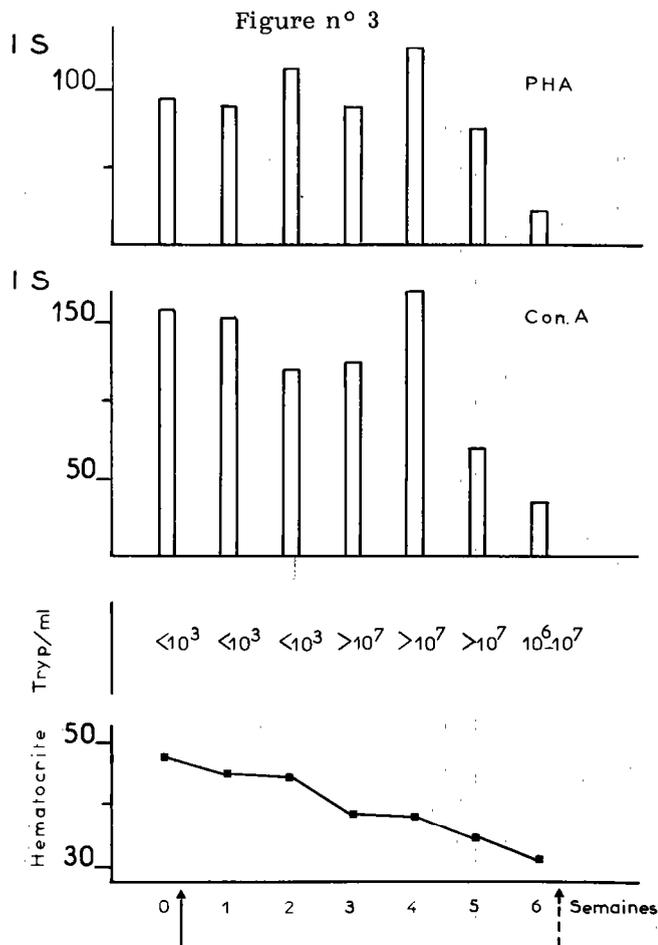


Fig. n° 3 : Réponse des lymphocytes périphériques aux lectines lors d'une infection naturelle à *T. vivax* et *T. congolense*. L'immunodépression n'est notable que dans les jours qui précèdent la mort de l'animal.

—————→ Transfert en zone infectée

-----→ Mort de l'animal.

TABL. N°IV-Index de stimulation d'un même animal en présence de doses variables de ConA avant et durant une infection naturelle à *T. congolense*

	ConA : µg/ml			
	5	1.25	0.6	0.3
Avant infection	125	134	30	9
En cours d'infection	112	131	113	45

Les cultures contrôles ne sont pas modifiées lors de l'infection.

## DISCUSSION

Dans ce travail, nous définissons les conditions de culture les plus favorables pour l'étude de la transformation lymphoblastique chez les bovins de l'Ouest africain. La stimulation des lymphocytes sanguins périphériques par les lectines chez les races bovines européennes a déjà été rapportée par d'autres auteurs (4, 7, 8). Nos résultats sont identiques en ce qui concerne le temps de culture, la concentration cellulaire mais différents pour la concentration optimale du mitogène employé.

PEARSON et collab., (8) montrent une stimulation des lymphocytes de bovins frisons et ayrshires par la PNA ; nous n'avons pas retrouvé cette activité chez nos animaux malgré l'utilisation de lectines de même origine (IBF) que celle utilisée par ces auteurs.

Peu de données existent sur l'intervention des cellules accessoires (monocytes - macrophages) dans la réponse proliférative aux mitogènes chez les bovins. La déplétion en cellules phagocytaires s'accompagne d'une inhibition supérieure à 50 p.100 de l'incorporation d'un précurseur radio-actif ; des résultats identiques sont rapportés par USINGER (15) et MASTRO (6), cependant ces auteurs ne présentent pas leurs contrôles réalisés sur la population cellulaire soumise à une déplétion. L'intervention de ces cellules dans la réponse proliférative mériterait des études plus approfondies.

Le pourcentage de lymphocytes périphériques porteurs de marqueurs de sous-populations "T" et "B" est comparable aux données relevées dans la littérature (8,3) ; la stimulation par les lectines ConA, PHA ou PWM est l'apanage des lymphocytes T ; seul un très faible pourcentage de cellules transformées (< 5 p.100) possèdent une immunoglobuline de membrane. Chez l'homme, le PWM et la PHA stimulent faiblement une sous-population de lymphocytes B (13).

La réponse aux mitogènes peut être modifiée chez les bovins lors de certains états pathologiques : leucose bovine enzootique, paratuberculose, sarcocystose (revue par KRISTENSEN). Sur nos animaux soumis à une infection naturelle à T. vivax et T. congolense et suivis pendant quatre mois, les variations demeurent très faibles ; une importante immunodépression n'est notée que dans les jours qui précèdent la mort. MASAKE (5) et SOLLID (14), lors d'infections expérimentales à la seringue par T. congolense, ne notent pas d'immunodépression. En fait, ces résultats sont difficiles à interpréter en raison d'une importante augmentation de l'incorporation d'IUDR dans les cultures contrôles (en absence de lectines) chez les animaux infectés. Chez nos animaux infestés, nous avons noté une potentialisation, par des extraits du parasite, de la réponse aux faibles doses de lectines et rapporté par ailleurs (1) la stimulation in vitro des lymphocytes périphériques de certains bovins par les trypanosomes. La trypanosomose dans

l'espèce bovine ne semble pas s'accompagner d'une baisse de la stimulation des lymphocytes du sang périphériques par les lectines à l'inverse du phénomène rencontré chez les rongeurs où une immunodépression très intense - révélée à l'aide de cellules spléniques - accompagne la trypanosomose expérimentale (10).

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec le support de l'Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux (I.E.M.V.T.), Maisons-Alfort, France, et de la Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (G.T.Z.) PN 77 2227 5, Eschborn, République Fédérale d'Allemagne.

Les auteurs remercient les Dr. G. E. ROELANTS et M. PINDER pour leurs encouragements durant ce travail.

## Resumen

FUMOUX (F.), QUEVAL (R.), TRAORE - LEROUX (T.). Estimulación in vitro de los linfocitos periféricos de los bovinos de África del Oeste por las lectinas : interés en la tripanosomosis. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 1984, 37 (N° spécial) : 236-247

Se estudió la estimulación de los linfocitos periféricos de bovinos de raza Baule y de cebues por diferentes lectinas en condiciones experimentales muy variables. Se determinaron las condiciones óptimas de estimulación. El estudio en inmunofluorescencia de los marcadores de superficie celular permitió precisar la población linfocitaria estimulada por las lectinas.

Se comprobó durante 16 semanas la respuesta a los mitógenos en bovinos transferidos en una zona muy infestada por glosinas. No se evidenció ninguna inmuno-depresión importante.

Palabras claves : Linfocitos periféricos - Mitógenos - Tripanosomosis - Bovinos.

## Bibliographie

1. FUMOUX (F.), TRAORE-LEROUX (T.), QUEVAL (R.), PINDER (M.), ROELANTS (G.E.). High and low responsiveness of bovin lymphocytes to Trypanosoma brucei in vitro. Correlation with resistance to trypanosomiasis. (Soumis pour publication).
2. HUME (D.A.), WEIDEMANN (M.J.). Mitogenic lymphocyte transformation. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, 1980.
3. KRISTENSEN (F.), KRISTENSEN (B.), LAZARY (S.). The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. Vet. Immunol. Immunopathol., 1982, 3 : 203-277.

4. LAZARY (S.), RIVERA (E.), DE WECK (A.L.), GERBER (H.), NICOLET (J.). In vitro stimulation of bovine leucocytes by phytohemagglutinin and other mitogens. Res. vet. Sci., 1974, 17 : 344-350.
5. MASAKE (R.A.), PEARSON (T.W.), WELLS (P.), ROELANTS (G.E.). The in vitro response to mitogens of leucocytes from cattle infected with Trypanosoma congolense. Clin. exp. Immunol., 1981, 43 : 583-589.
6. MASTRO (A.M.), SNIEZEK (M.J.). The effect of removal of adherent cells in lectin and allogenic cell stimulation of bovine lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopathol., 1984, 5 : 161-176.
7. MUSCOPLAT (C.C.), CHEN (A.W.), JOHNSON (D.W.), ALNAJI (I.). In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes : standardization and kinetics of the response. Am. J. vet. Res., 1974, 35 : 1557-1561.
8. PEARSON (T.W.), ROELANTS (G.E.), LUNDIN (B.), MAYOR-WITHEY (K.S.). The bovine lymphoid system : binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins. J. Immunol. Methods, 1979, 26 : 271-281.
9. PINDER (M.), MUSOKE (A.J.), MORRISON (W.I.), ROELANTS (G.E.). The bovine lymphoid system : 3. A monoclonal antibody specific for bovine cell surface and serum IgM. Immunology, 1980, 40 : 359-365.
10. ROELANTS (G.E.), PEARSON (T.W.), MORRISON (W.I.), MAYOR-WITHEY (K.S.), LUNDIN (L.B.). Immune depression in trypanosome infected mice. IV. Kinetics of suppression and alleviation by the trypanocidal drug Berenil. Clin. exp. Immunol., 1979, 37 : 457-469.
11. ROELANTS (G.E.), TAMBOURA (I.), SIDIKI (B.D.), BASSINGA (A.), PINDER (M.). Trypanotolerance. An individual not a breed character. Acta trop., 1983, 40 : 99-104.
12. ROELANTS (G.E.), WILLIAMS (R.O.). African trypanosomiasis. A review Critical Rev. Trop. Med., 1982, 1 : 31-75.
13. SHARON (N.), Lectin receptors as lymphocyte surface markers. Adv. immunology, 1983, 34 : 213-298.
14. SOLLOD (A.E.), FRANCK (G.H.). Bovine trypanosomiasis : effect on the immune responses of infected host. Am. J. vet. Med., 1979, 40 : 658-664.
15. USINGER (W.R.), SMITH (W.G.), SPLITTER (G.A.). Bovine T cells do not require auxiliary cells for response to selected mitogens. Vet. Immunol. Immunopathol., 1981, 2 : 381-391.