

TD 97-33

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES  
E.I.S.M.V.

ANNEE 1997



N°33

APPLICATION D'UN MODELE PRIMATE *Cercopithecus (aethiops) sabaesus* POUR L'ETUDE DE STRATEGIES VACCINALES: MISE EN PLACE DU MODELE ET VACCINATIONS EXPERIMENTALES

\*\*\*\*\*

THESE

ECOLE INTER-ETATS  
DES SCIENCES ET MEDECINE  
VETERINAIRES DE DAKAR  
BIBLIOTHEQUE

Présentée et soutenue publiquement le 03 Décembre 1997 devant la faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar pour obtenir le grade de DOCTEUR VETERINAIRE (DIPLOME D'ETAT)  
par

Mahamodou YAYA  
né en 1965 à Tchon-Oro (Togo)

JURY

- |                                  |  |
|----------------------------------|--|
| Président                        | Monsieur Souleymane MBOUP<br>Professeur à la faculté de Médecine<br>et de Pharmacie de Dakar |
| Directeur et Rapporteur de Thèse | Monsieur Justin Ayayi AKAKPO<br>Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar                           |
| Membre                           | Monsieur Malang SEYDI<br>Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar                                  |
| Invité/Co-Directeur              | Monsieur Ronald PERRAUT<br>Chef de Laboratoire<br>Institut Pasteur de Dakar                  |

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES  
E.I.S.M.V.

ANNEE 1997



N°33  
ECOLE INTER-ETATS  
DES SCIENCES ET MEDECINE  
VETERINAIRES DE DAKAR  
BIBLIOTHEQUE

APPLICATION D'UN MODELE PRIMATE *Cercopithecus*  
*(aethiops) sabaesus* POUR L'ETUDE DE STRATEGIES  
VACCINALES: MISE EN PLACE DU MODELE ET  
VACCINATIONS EXPERIMENTALES

\*\*\*\*\*

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 03 Décembre 1997 devant la faculté de  
Médecine et de Pharmacie de Dakar pour obtenir le grade de DOCTEUR  
VETERINAIRE (DIPLOME D'ETAT)  
par

Mahamodou YAYA  
né en 1965 à Tchou-Oro (Togo)

JURY

Président	Monsieur Souleymane MBOUP Professeur à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar
Directeur et Rapporteur de Thèse	Monsieur Justin Ayayi AKAKPO Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar
Membre	Monsieur Malang SEYDI Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar
Invité/Co-Directeur	Monsieur Ronald PERRAUT Chef de Laboratoire Institut Pasteur de Dakar

# ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES DE DAKKAR

ANNEE UNIVERSITAIRE 1996-1997



## COMITE DE DIRECTION



### 1. LE DIRECTEUR

Professeur François Adébayo ABIOLA

### 2. LE DIRECTEUR ADMINISTRATIF ET FINANCIER

Monsieur Jean Paul LAPORTE

### 3. LES COORDONNATEURS

. Professeur Malang SEYDI  
Coordonnateur des Etudes

. Professeur Justin Ayayi AKAKPO  
Coordonnateur des Stages et Formation  
Post-Universitaires

. Professeur Germain SAWADOGO  
Coordonnateur Recherche-Développement

# LISTE DU PERSONNEL CORPS ENSEIGNANT

☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT EISMV**

☞ **PERSONNEL VACATAIRE (PRÉVU)**

☞ **PERSONNEL EN MISSION (PRÉVU)**

☞ **PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV (PRÉVU)**

# **LISTE DU CORPS ENSEIGNANT**

## **I - PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'EISMV**

### **A - DEPARTEMENT SCIENCES BIOLOGIQUES ET PRODUCTIONS ANIMALES**

Chef du département : *Professeur ASSANE MOUSSA*

#### **SERVICES :**

#### **1 - ANATOMIE-HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE**

Kondi Charles AGBA	Professeur
Mamadou CISSE	Moniteur

#### **2 - CHIRURGIE-REPRODUCTION**

Papa El Hassane DIOP	Professeur
Mohamadou YAYA	Moniteur
Fidèle BYUNGURA	Moniteur

#### **3 - ECONOMIE RURALE ET GESTION**

Cheikh LY	Maître-Assistant
Guy Anicet RERAMBYATH	Moniteur

#### **4 - PHYSIOLOGIE-THERAPEUTIQUE-PHARMACODYNAMIE**

ASSANE MOUSSA	Professeur
Mouhamadou CHAIBOU	Docteur Vétérinaire Vacataire

#### **5 - PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur
Aimable NTUKANYAGWE	Moniteur
Toukour MAHAMAN	Moniteur

#### **6 - ZOOTECHNIE-ALIMENTATION**

Gbeukoh Pafou GONGNET	Maître de Conférences agrégé
Ayao MISSOHOU	Maître-Assistant
Grégoire AMOUGOU-MESSI	Moniteur

## **B - DEPARTEMENT SANTE PUBLIQUE ET ENVIRONNEMENT**

Chef du département: *Professeur Louis Joseph PANGUI*

### **SERVICES :**

#### **1 - HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALES (HIDAOA)**

Malang SEYDI	Professeur
Mouhamadou Habib TOURE	Docteur Vétérinaire vacataire
Etchri AKOLLOR	Moniteur

#### **2 - MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-PATHOLOGIE INFECTIEUSE (MIP)**

Justin Ayayi AKAKPO	Professeur
Rianatou ALAMBEDJI (Mme)	Maître-Assistante
Kokouvi SOEDJI	Docteur Vétérinaire vacataire
Patrick MBA-BEKOUNG	Moniteur

#### **3 - PARASITOLOGIE-MALADIES PARASITAIRES-ZOOLOGIE APPLIQUEE**

Louis Joseph PANGUI	Professeur
Jean AMPARI	Moniteur
Rose NGUE MEYIFI KOMBE (Mlle)	Monitrice

#### **4 - PATHOLOGIE MEDICALE-ANATOMIE PATHOLOGIQUE-CLINIQUE AMBULANTE**

Yalacé Yamba KABORET	Maître de Conférences agrégé
Pierre DECONINCK	Maître-Assistant
Balabawi SEIBOU	Docteur Vétérinaire vacataire
Mohamed HAMA GARBA	Moniteur
Ibrahima NIANG	Moniteur

#### **5 - PHARMACIE-TOXICOLOGIE**

François Adébayo ABIOLA	Professeur
Patrick FAURE	Assistant
Abdou DIALLO	Moniteur

## **II - PERSONNEL VACATAIRE** (Prévu)

### **1 - BIOPHYSIQUE**

Sylvie GASSAMA SECK (Mme)

Maître de Conférences agrégé  
Faculté de Médecine  
et de Pharmacie - UCAD

### **2 - BOTANIQUE**

Antoine NONGONIERMA

Professeur  
IFAN - UCAD

### **3 - AGRO-PEDOLOGIE**

Alioune DIAGNE

Docteur Ingénieur  
Département "Sciences des Sols"  
Ecole Nationale Supérieure  
d'Agronomie (ENSA) - THIES

### **4 - BIOLOGIE MOLECULAIRE**

Mamady KONTE

Docteur Vétérinaire  
Chercheur ISRA

### **5 - PATHOLOGIE DU BETAIL**

Mallé FALL

Docteur Vétérinaire

### **III - PERSONNEL EN MISSION** (Prévu)

#### **1 - PARASITOLOGIE**

Ph. DORCHIES

Professeur

ENV - TOULOUSE (France)

M. KILANI

Professeur

ENMV- SIDI THABET (Tunisie)

#### **2 - ANATOMIE PATHOLOGIE GENERALE**

G. VANHAVERBEKE

Professeur

ENV - TOULOUSE (France)

#### **3 - PHARMACODYNAMIE-THERAPEUTIQUE**

M. GOGNY

Professeur

ENV - NANTES (France)

#### **4 - PATHOLOGIE DU BETAIL**

Th. ALOGNINOUBA

Professeur

ENV - LYON (France)

#### **5 - PATHOLOGIE DES EQUIDES ET CARNIVORES**

A. CHABCHOUB

Professeur

ENMV- SIDI THABET (Tunisie)

#### **6 - ZOOTECHNIE-ALIMENTATION**

A. BEN YOUNES

Professeur

ENMV- SIDI THABET (Tunisie)

#### **7 - DENREOLOGIE**

J. ROZIER

Professeur

ENV - ALFORT (France)

A. ETRIQUI

Professeur

ENMV- SIDI THABET (Tunisie)

#### **8 - PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

P. BENARD

Professeur

ENV - TOULOUSE (France)



**9 - PATHOLOGIE INFECTIEUSE**

J. CHANTAL

Professeur  
ENV - TOULOUSE (France)

**10 - PHARMACIE-TOXICOLOGIE**

J.D. PUYT

Professeur  
ENV - NANTES (France)

**11 - CHIRURGIE**

A. CAZIEUX

Professeur  
ENV - TOULOUSE (France)

**12 - OBSTETRIQUE**

N. BEN CHEHIDA

Professeur  
ENMV - SIDI THABET (Tunisie)

**13 - ALIMENTATION**

F. BALAM

Professeur  
Ministère de l'Elevage et  
de l'Hydraulique Pastorale  
NDJAMENA (Tchad)

**14 - ANATOMIE**

A. MATOUSSI

Professeur  
ENMV - SIDI THABET (Tunisie)

**15 - ANATOMIE PATHOLOGIQUE**

P. COSTIOU

Professeur  
ENV - NANTES (France)

## **IV - PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV**

### **1 - MATHEMATIQUES**

Sada Sory THIAM

Maître-Assistant  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

#### **Statistiques**

Ayao MISSOHOU

Maître-Assistant  
EISMV - DAKAR

### **2 - PHYSIQUE**

Djibril DIOP

Chargé d'enseignement  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

#### **Chimie Organique**

Abdoulaye SAMB

Professeur  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

#### **Chimie Physique**

Alphonse TINE

Maître de Conférences  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

#### **T.P. Chimie**

Abdoulaye DIOP

Maître de Conférences  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

### **3 - BIOLOGIE VEGETALE**

#### **Physiologie végétale**

Kandioura NOBA

Maître-Assistant  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

### **4 - BIOLOGIE CELLULAIRE**

#### **Anatomie comparée et extérieur des animaux domestiques**

K. AGBA

Professeur  
EISMV - DAKAR

## **5 - EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE**

Bhen Sikina TOGUEBAYE

Professeur  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

## **6 - PHYSIOLOGIE ET ANATOMIE COMPAREE DES VERTEBRES**

ASSANE MOUSSA

Professeur  
EISMV - DAKAR

Cheikh Tidiane BA

Maître de Conférences  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

## **7 - BIOLOGIE ANIMALE**

D. PANDARE

Maître-Assistant  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

Jacques N. DIOUF

Maître-Assistant  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

## **9 - GEOLOGIE**

A. FAYE

Chargé d'enseignement  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

R. SARR

Maître de Conférences  
Faculté des Sciences et Technique  
Université Ch. A. DIOP - DAKAR

## **10 - T.P.**

Abdourahamane DIENG

Moniteur

# DEDICACES

*Je rends grâce à Allah  
le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux*

*Et je dédie ce travail:*

*A Papa*

*Pour ton éducation et ton soucis de faire de tes enfants des hommes capables d'affronter les problèmes de la vie.*

*A Maman*

*Les mots me manquent pour exprimer mes sentiments envers toi. Que ce travail soit l'expression de ma sincère reconnaissance et ma profonde gratitude.*

*A Aïssatou "Alloh-Mollafi"*

*Chère compagne de tous les temps, pour ton affection, ta patience et ton implication active dans la grande partie de ce long parcours, ce travail est le tien. Mes hommages Madame.*

*A Amina, Souméïya et Djalilou, pour votre sagesse. Que Dieu vous bénisse.*

*A la mémoire de Mme FATIMA épouse LAO: nous aurions voulu faire ce témoignage de votre vivant; loin de toutes considérations vous avez été pour nous plus qu'une belle-mère. Que la grâce d'Allah soit sur vous et votre mari.*

*A mes frères et sœurs*

*A mes tantes et oncles paternels, cousins et cousines, neveux et nièces.*

*A la mémoire de ma grand-mère maternelle. Repose en paix.*

- A mon oncle ISSA et toute la famille Sibabi Guéfé*
- A M. MOUMOUNI Fousséni et sa famille*
- A la famille LAO de Bafilo*
- A mes camarades et amis de combat (Drs Boukaya, Aloeyi, Akollor,... Tchianiley, Tchédre...)*
- A tous mes amis (es)*
- A la promotion Dr Mamadou TOURE de l'EISMV: la 24ème*
- Au personnel enseignant et administratif de l'EISMV*
- A mes frères du GEVETO,*
- A toute la communauté togolaise de l'UCAD*
- A mon pays le TOGO*
- A mon pays hôte, le SENEGAL.*

## REMERCIEMENTS

Nous remercions:

Le Dr J.P. Moreau directeur de l'Institut Pasteur de Dakar pour avoir accepté nous accueillir dans son institut,

Monsieur Ousmane DIOP du laboratoire de Virologie médicale à l'IPD pour sa gracieuse contribution à ce travail,

Monsieur B. DIOUF pour sa collaboration,

Le Dr O. GARRAUD pour sa lecture et ses remarques constructives,

Les Docteurs C. Roussilhon, C.M. Nguer, A.T. Baldé,

Mmes G. Aribot et Mame C. Diouf, messieurs A. Diouf, M. Fall, A. Thiam, Diatta et tout le personnel du laboratoire d'Immunologie de l'IPD pour leur sympathie et entière collaboration,

Les camarades Idi, Samb, Tamsir, Victoire, Wilfrid,

Tout le personnel du laboratoire de Virologie médicale de l'IPD en particulier FAYE, TOURE, MBAYE pour leur parfaite disponibilité et leur aide qu'ils nous ont apportée au niveau de l'animalerie,

Les familles EGBAME et ADABI de Dakar,

Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

**A NOS MAITRES ET JUGES**



**Monsieur Souleymane MBOUP**

**Professeur à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Dakar,**

C'est un grand honneur pour nous que celui de vous savoir Président de notre jury de thèse. Vous l'avez accepté très aimablement. Vos qualités humaines et d'homme de science suscitent beaucoup d'admiration.

Sincères remerciements et profonde gratitude.

**Monsieur Justin Ayayi AKAPKO**

**Professeur à l'EISMV de Dakar,**

Vous nous avez proposés et conduit ce travail avec tout le précieux savoir-faire qu'on vous connaît. Vous nous avez permis de redécouvrir votre humanisme, votre rigueur et votre amour du travail bien fait. Plus qu'un éducateur, vous êtes pour nous un modèle.

Sincère reconnaissance.

**Monsieur Malang SEYDI**

**Professeur à l'EISMV de Dakar,**

Ce n'est pas un hasard si nous vous avons choisi pour juger ce travail. Votre rigueur scientifique, votre caractère humain et votre abord facile suscitent admiration et respect.

Recevez nos remerciements les plus sincères.

**Monsieur Renald PERRAUT**

**Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur de Dakar,**

C'est un honneur et un plaisir pour moi d'avoir pu travailler à vos côtés. Vous vous êtes impliqués personnellement et vous avez contribué grandement à la réalisation de ce travail que vous avez initié. Votre disponibilité, votre ouverture et votre sens de l'humanisme ne nous ont pas laissés indifférents.

Profonde gratitude.

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	=	Anticorps
ADCC	=	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCI	=	Inhibition cellulaire médiée par les anticorps
Ag	=	Antigènes
BSA	=	Bovine Serum Albumin
CD	=	Cluster of Differentiation
CMH	=	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CML	=	Culture mixte lymphocytaire
CTL	=	Lymphocyte T Cytotoxique
D.O.	=	Densité Optique
E.L.I.S.A.	=	Enzyme Linked Immunosorbent assay
hsp	=	protéine du choc thermique
HTLV	=	Human T-lymphotropic virus
Ig	=	Immunoglobuline
IL	=	interleukine
I.P.D.	=	Institut Pasteur de Dakar
kDa	=	Kilodalton
NK	=	Natural Killer
OMS	=	Organisation Mondiale de la Santé
PBMC	=	Cellules mononucléées circulantes
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
<i>P. falciparum</i>	=	<i>Plasmodium falciparum</i>
Th	=	lymphocyte T helper
TNF- $\alpha$	=	Facteur de Nécrose Tumorale alpha
$\mu$ g	=	microgramme
$\mu$ l	=	microlitre
ml	=	millimètre
nm	=	nanomètre
SIV	=	Simien Immunodeficiency Virus
STLV	=	Simien T-lymphotropic virus
SVF	=	Serum de veau fœtal
TT	=	Anatoxine tétanique

## LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1: Répartition géographique des singes verts .....	12
Figure 2: Courbes des poids en fonction des jours .....	36
Figure 3: Réponses en Ac anti-TT en fonction des adjuvants .....	46
a/ Réponses en Ac anti-TT en alumine	
b/ Réponses en Ac anti-TT en PAO	
Figure 4: Réponses en Ac anti-TT en fonction du statut immunitaire.....	47
a/ Réponses en Ac anti-TT des singes SIV-	
b/ Réponses en Ac anti-TT des singes SIV+	
Figure 5: Titres des réponses en Ac à J35 et à J94 .....	49
a/ Singes SIV-	
b/ Singes SIV+	
Figure 6: Réponses en Ac anti- <i>P. falciparum</i> .....	54
Figure 7: Réponses en Ac anti-TT en fonction de l'adjuvant .....	59
Figure 8: Titres en Ac anti-TT .....	59
Figure 9: Réponses Ac anti-TT à J56 en présence de divers adjuvants.....	59
Figure 10: Réponses anti-HSVgD à J56 et J105 en présence de divers adjuvants.....	59
Photo: <i>C. sabaesus</i> .....	13

## LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I: Systématique des principales espèces primates .....	7
Tableau II: Caractéristiques du matériel animal utilisé .....	27
Tableau III: a/ Protocole expérimental deTT .....	34
b/ Protocole expérimental du paludisme .....	34
Tableau IV: Suivi du poids des animaux .....	36
Tableau V: Résultats des CML obtenues avec les PBMC de divers animaux .....	40
Tableau VI: Index de prolifération vis à vis des mitogènes polyclonaux et du TT.....	43
Tableau VII: Titres en Ac anti-TT .....	48
Tableau VIII: Titres en IFI des Ac anti- <i>P. falciparum</i> .....	52

**"Par délibération, la Faculté et l'Ecole ont arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui leur seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elles n'entendent leur donner aucune approbation ni improbation."**

# **SOMMAIRE**

	Pages
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
<b>1. GENERALITES SUR LES PRIMATES</b> .....	5
1.1. Systématique.....	6
1.2. Place des primates dans la recherche scientifique.....	8
<b>2. LE MODELE SINGE VERT</b> .....	10
2.1. Description phénotypique.....	10
2.2. Répartition géographique.....	10
2.3. Ecologie et éthologie.....	11
2.3.1. Ecologie.....	11
2.3.1.1. Habitat.....	11
2.3.1.2. Alimentation.....	14
2.3.2. Ethologie.....	14
2.4. Données biologiques et pathologiques sur le singe vert.....	15
<b>3. LE SINGE VERT DANS LA RECHERCHE EXPERIMENTALE</b> .....	16
3.1. Etude comportementale.....	16
3.2. Etude pathologique.....	16
3.3. Les études vaccinales.....	17
<b>4. ADJUVANTS DE L'IMMUNITE</b> .....	18
4.1. Définition.....	18
4.2. Mode d'action d'un adjuvant.....	19
4.3. Les principaux adjuvants.....	20
4.3.1. Les adjuvants particuliers.....	20
4.3.1.1. Les gels minéraux.....	20
4.3.1.2. Les émulsions eau /huile (E/H).....	20
4.3.1.3. Les émulsions huile /eau (H/E).....	21
4.3.1.4. La saponine.....	21
4.3.1.5. Les vésicules biodégradables.....	21
4.3.2. Les adjuvants non particuliers.....	23
4.3.3. Les combinaisons d'adjuvants.....	23
4.3.4. Les stratégies récentes .....	24

<b>DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....	25
<b>1. MATERIEL ET METHODES</b> .....	26
1.1. Matériel.....	26
1.1.1. Les animaux.....	26
1.1.1.1. Nombre et origine.....	26
1.1.1.2. Maintenance et alimentation.....	26
1.1.2. Les composants vaccinaux.....	28
1.1.2.1. Les antigènes .....	28
1.1.2.1.1 L'anatoxine tétanique.....	28
1.1.2.1.2. Les antigènes dérivés de <i>Plasmodium falciparum</i> ( <i>P. falciparum</i> ).....	29
1.1.2.2. Les adjuvants utilisés.....	30
1.1.2.2.1. Composition.....	30
1.1.2.2.2. Mode d'action.....	31
1.1.2.3. Matériel utilisé pour l'analyse de la réponse immunitaire.....	31
1.2. Méthodologie.....	31
1.2.1. Doses d'immunogène.....	31
1.2.2. Immunisation des animaux et prélèvements.....	32
1.2.2.1. Présélection des animaux.....	32
1.2.2.2. Immunisation et prélèvements de sang.....	32
1.2.2.3. Suivi des animaux en expérimentation (Numération-formule sanguine / poids).....	35
1.2.3. Etude de la réponse immunitaire.....	35
1.2.3.1. Réponse humorale.....	35
1.2.3.1.1. Test ELISA.....	37
1.2.3.1.2. Immunofluorescence indirecte.....	37
1.2.3.1.3. Tests statistiques.....	38
1.2.3.2. Réponse cellulaire : test de transformation lymphoblastique (TTL).....	38
<b>2. RESULTATS</b> .....	39
2.1 Exploration du polymorphisme du CMH classe II.....	39
2.2. Etude des réponses prolifératives.....	41
2.3. Réponse Ac anti-TT.....	44
2.3.1. Cinétique de production des anticorps.....	44



2.3.2. Titres des réponses en anticorps .....	45
2.3.3. Comparaison statistique des réponses en anticorps.....	45
2.3.3.1. Cinétique de production d'anticorps.....	50
2.3.3.2. Comparaison des réponses Ac entre les animaux: efficacité des adjuvants.....	50
2.4. Réponse en Ac anti- <i>P. falciparum</i> .....	51
2.4.1. Cinétique d'apparition des Ac contre les Ag recombinants.....	51
2.4.2. Cinétique d'apparition des Ac contre <i>P. falciparum</i> .....	52
<b>3. DISCUSSION</b> .....	55
3.1. Matériel animal.....	55
3.2. Matériel de laboratoire et méthodes.....	55
3.3. Etude de l'immunité liée à l'anatoxine tétanique.....	56
3.4. Etude de l'immunité due aux candidats vaccins anti- <i>P.</i> <i>falciparum</i> .....	57
3.5. Utilisation des adjuvants.....	58
3.6. La séropositivité des singes au SIV et leur état immunitaire.....	60
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	62
Références bibliographiques.....	65
Annexes.....	74

# **INTRODUCTION**

A partir des premières découvertes en microbiologie, la vaccination contre diverses maladies fut mise au point tout au long des 2 derniers siècles écoulés: c'est un terme qui remonte à 1801 et défini comme "une *préparation* d'origine microbienne destinée à l'immunisation contre les maladies infectieuses" (**Leclerc et al., 1991**). Les succès les plus spectaculaires furent les vaccinations anti-microbiennes: d'abord à partir des bactéries tuées (typhoïde, diphtérie, choléra) ou atténuées (B.C.G.), puis de leurs toxines (anatoxines diphtérique, tétanique, coqueluche) qui représentent les premières sous-unités vaccinales.

L'effet bénéfique des vaccinations n'est plus à démontrer; l'éradication de certaines maladies mondiales en est la preuve. L'utilisation alors de ces vaccins reste une nécessité. Il y a cependant encore une longue liste des maladies bactériennes (streptocoque A et B, méningocoque B, lèpre,...), virale (herpès, rotavirus, HIV, HTLV, arbovirose,...) et parasitaires (paludisme, bilharziose, trypanosomose, leishmaniose,...) pour lesquelles des approches vaccinales ont été engagées et dont l'aboutissement pourrait apporter une solution de santé publique. Depuis ces dernières années les recherches ont été centrées sur le clonage et l'expression des gènes codant pour des déterminants antigéniques clés des divers agents pathogènes. Face à cette nouvelle génération de vaccins (Ag faiblement immunogène), il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies vaccinales plus efficaces (**Allison et Gregoriadis, 1990; Bomford, 1989; Capron et al., 1994**).

Les essais vaccinaux reposent sur des modèles animaux essentiellement rongeurs: lapins, cobayes et particulièrement murins (souris). Une étape fondamentale dans la mise au point d'un vaccin passe également par l'utilisation de modèles phylogénétiquement plus proches de l'homme, ce qui est le cas des primates non humains.

Dès 1978, les groupes de travail de l'OMS faisant le point sur l'immunologie du paludisme préconisèrent la mise au point d'autres stratégies vaccinales pour des essais expérimentaux chez les modèles primates non humains (**WHO/OMS, 1978; 1988**). Ces modèles primates gardent alors un rôle vital pour la sélection des antigènes (**Pattaroyo et al., 1988**), des "carriers" (protéines porteuses), des adjuvants de l'immunité (**Collins, 1992**).

C'est sur cette thématique que le laboratoire d'Immunobiologie et Vaccinologie de l'Institut Pasteur de Dakar a initié un programme d'utilisation du singe vert comme modèle vaccinal. Notre objectif est de

participer à cette mise en place à travers une meilleure connaissance du singe vert (*Cercopithecus (aethiops) sabaeus*) concernant sa réponse immune face à un antigène de référence qui est l'anatoxine tétanique. Nous avons procédé également à un premier essai avec des Ag des formes sanguines de *P. falciparum*.

Avant de présenter nos résultats, un aperçu général sur les primates, dont fait partie le singe vert, et sur quelques adjuvants fera l'objet de la première partie.

Une deuxième partie sera consacrée à l'étude expérimentale de deux modèles antigéniques utilisés: l'anatoxine tétanique dont l'immunogénocité sera analysée par rapport aux épitopes T (effecteurs cellulaires), et aux épitopes B (effecteurs humoraux). Seules les réponses Ac seront analysées pour les antigènes parasitaires de *P. falciparum*".

**PREMIERE PARTIE:**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Les primates du fait de leur proximité phylogénique avec l'homme ont été longtemps utilisés au laboratoire, devenant ainsi un modèle expérimental de premier choix.

A travers une brève présentation systématique, nous situerons les primates dans la recherche expérimentale. Ensuite, nous exposerons les données écologiques et pathologiques du singe vert. Enfin, nous allons dégager l'intérêt du singe vert comme modèle expérimental en vaccinologie tout particulièrement.

## **1. GENERALITES SUR LES PRIMATES**

L'ordre des primates occupe une place particulièrement importante dans la mesure où il inclut l'Homme et comporte plus de deux cents espèces. En Français le terme "Primate" est quasi-exclusif des primates animaux, les anglophones utilisent plutôt "non human primate" (primate non humain) appellation souvent employée en français.

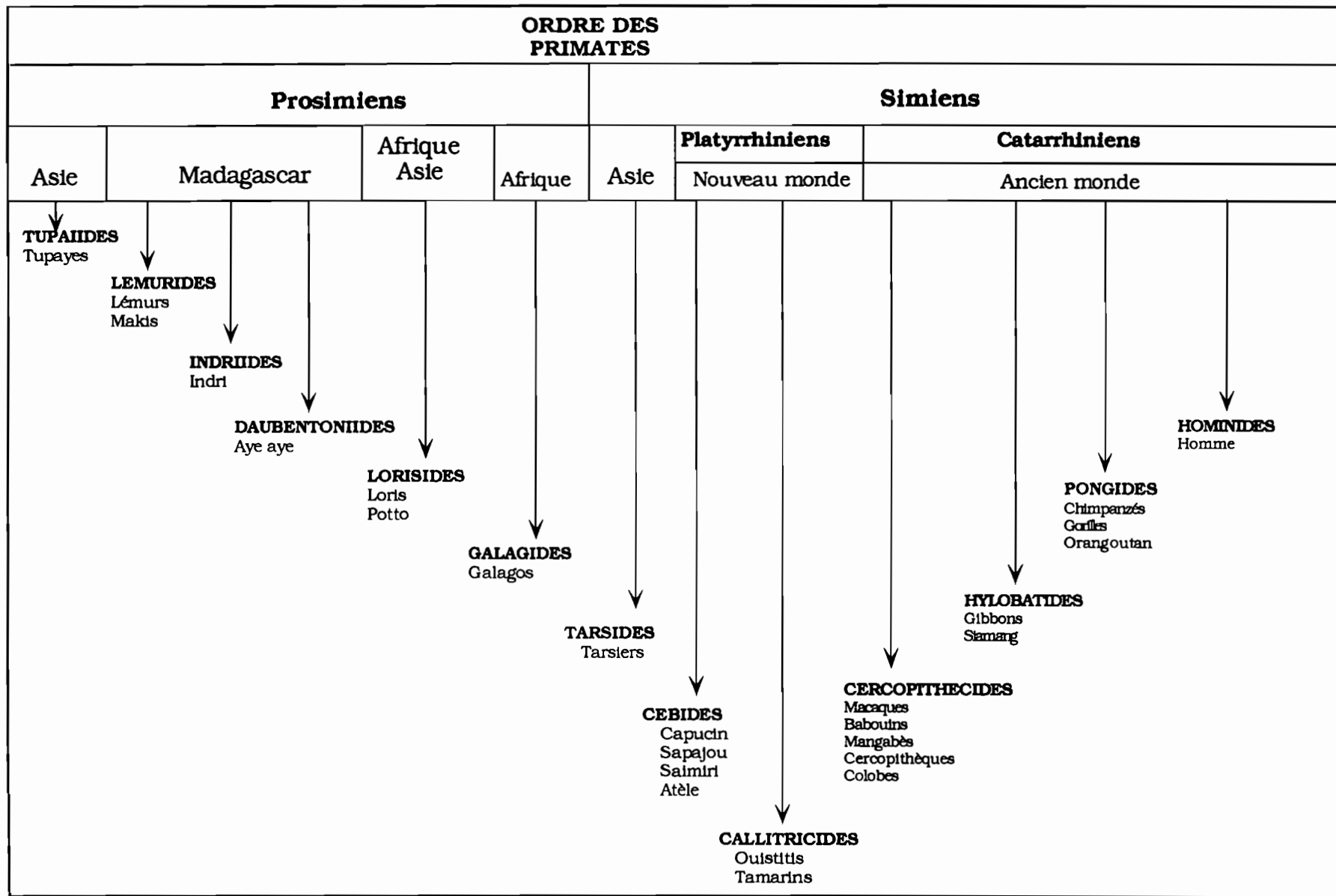
D'habitats et de comportements alimentaires assez variés, les primates sont susceptibles de transmettre à l'homme plusieurs maladies. Inversement, certaines maladies humaines peuvent être reproduites expérimentalement chez les singes. Ainsi, sont-ils fréquemment utilisés comme animaux de laboratoire.

### 1.1. Systématique

Avec plus de 179 espèces (**Depute, 1990**) l'ordre des primates est divisé en deux sous-ordres: celui des *Prosimii* ou primates primitifs et celui des *Athropoïdae* regroupant les infra-ordres des *Platyrrhini* ou singes du nouveau monde (Amérique du nord et centrale) et des *Catarrhini* ou singes de l'ancien monde (Afrique et Asie ).

Les *Platyrrhini* se distinguent des *Catarrhini* par la base de la forme de leurs narines dirigées latéralement et séparées par une large cloison nasale alors qu'elles sont rapprochées et dirigées vers le bas chez les autres. Une présentation de l'ordre des primates est montrée dans le tableau I (p.7)

**Tableau I: Systématique des principales espèces primates (Demontoy-Bonsel, 1986)**





## 1.2. Place des primates dans la recherche scientifique.

L'intérêt porté par l'homme aux primates remonte à l'antiquité. Les singes, êtres sacrés, créatures abominables, ravisseurs de femmes, ou créatures divertissantes selon les cas, ont été exploités à des fins alimentaires, médicales, thérapeutiques etc. (**Zigane, 1983**). Mais l'utilisation expérimentale de ces animaux demeure de loin la forme d'exploitation la plus fréquente.

En raison d'abord de l'intérêt pour l'anatomie et les sciences naturelles, ces créatures animales ont très vite fait l'objet d'une utilisation expérimentale généralisée dans le monde médical. De nos jours, les singes sont utilisés en anthropologie, en pharmacologie, en cancérologie, en neurologie, en chirurgie, en dentisterie, en immunologie fondamentale etc. Leur utilisation marque souvent l'étape finale de l'extrapolation à l'homme des études préliminaires sur des espèces non-simiennes, mais, dans beaucoup de cas il n'existe pas d'alternatives à l'usage des modèles singes.

Les primates les plus utilisés comme animaux de laboratoire sont: les cébidés (*Saimiri*), les callithricidés (*Callithrix*, *Sanguinus*), les cercopithécidés (*Maccaca*, *Papio*, *Cercocebus*, *Cercopithecus*), les pongidés (**Demontoy-Bonsel, 1986**).

Le choix des espèces fait l'objet de plusieurs considérations, car tous les animaux d'expériences ne réagissent pas de façon identique vis-à-vis du même agent étudié. Il se dégage la notion d'espèce hôte plus adaptée (**Vicaria Fabregas, 1965**). D'après

**Box et Cott (1992)** le choix des primates dans la recherche biomédicale est largement déterminé par des considérations pratiques et économiques et rarement par des propensions prescrites et quantifiées.

Par ailleurs, pour obtenir des résultats homogènes et précis, tous les auteurs s'accordent à dire qu'il faut un animal qui ne soit atteint au départ d'aucune infection; c'est pourquoi il est nécessaire de contrôler l'origine et le statut sanitaire des primates utilisés en laboratoire. Pour ces mêmes raisons, **Vicaria Fabregas (1965)** renchérit qu'il convient d'établir des lignées pures d'animaux immunologiquement neufs et en excellente santé.

Sujette à plusieurs controverses, l'expérimentation animale, en particulier l'utilisation des primates dans la recherche biomédicale, fait l'objet de défenses et de protections de la part de nombreux organismes. C'est ainsi que **Ruesch (1991)** cité par **Gogovor (1993)** a démontré dans son œuvre titrée "expérimentation animale: honte et échecs de la médecine" l'inutilité de l'expérimentation animale.

On peut cependant noter des prises de position beaucoup plus souples et certains auteurs affichent plus d'intérêt à l'éthique et aux aspects réglementaires de l'expérimentation animale.

Durant ces dernières années, l'utilisation des primates en recherche biomédicale s'est fortement intensifié. Aussi suivant les considérations économiques et la facilité d'obtention de ces animaux, la tendance actuelle semble aller vers la valorisation

des primates du milieu immédiat. C'est dans cet ordre d'idées que le singe vert du Sénégal fait l'objet, depuis quelques années, d'études expérimentales.

## **2. LE MODELE SINGE VERT**

### **2.1. Description phénotypique**

Animal dont le poids moyen à l'âge adulte est de 4,5 kg environ pour la femelle et de 6 kg pour le mâle au Sénégal, (**Galat-Luong, com. pers.**) le singe vert au sens propre est un quadripède. Avec une taille d'une cinquantaine de centimètres environ, il se distingue par un pelage chiné variant du jaune au brun olivâtre, une absence de bande frontale blanche, des favoris jaunâtres bien appliqués sur les joues, une face noire, un dessous blanchâtre, les membres gris et une extrémité de la queue jaune généralement plus flamboyante chez le mâle (**Pourrut, 1993**). Le singe vert est un animal relativement peu volumineux et facile à manipuler au laboratoire.

### **2.2. Répartition géographique**

Les singes verts se rencontrent dans des milieux très divers, allant de la savane arbustive à la forêt humide. Cette large occupation spatiale de ces cercopithèques africains découle, sans doute, de leurs caractéristiques morphologiques et de leur grande capacité d'adaptation liée à un certain polymorphisme (**Galat, 1975; 1983**) leur permettant d'exploiter toutes les ressources de ces habitats.

Ces singes verts ont une répartition géographique située dans les régions tropicales. Quatre espèces du groupe

*Cercopithecus aethiops* sont distinguées (selon leur distribution géographique):

- Le Grivet: *Cercopithecus aethiops* en Ethiopie et au Soudan,
- Le Tantale: *Cercopithecus tantalus* vivant en Afrique centrale,
- Le Vervet: *Cercopithecus pygerythrus* occupant l'Afrique du Sud jusqu'à la région méridionale de l'Ethiopie,
- Le Callitriche, ou singe vert au sens strict, *Cercopithecus sabaesus* qui est très répandu dans les savanes boisées d'Afrique occidentale du Sénégal au Ghana (Figure 1 p.12).

### **2.3. Ecologie et éthologie**

Nous voulons aborder dans ce sous-chapitre, d'une façon brève quelques caractéristiques écologiques et éthologiques du singe au Sénégal *Cercopithecus (aethiops) sabaesus*, que nous utilisons pour nos expériences.

#### **2.3.1. Ecologie**

L' étude écologique sera axée sur l'habitat du singe vert et son alimentation dans la nature.

##### **2.3.1.1. Habitat**

Le singe vert est un primate arboricole quadripède vivant dans les milieux boisés. Au Sénégal, *Cercopithecus sabaesus* habite les formations sahéliennes de la vallée du fleuve



**Figure 1:** Répartition géographique des singes verts  
(Osman-Hill, 1966)



*Cercopithecus sabaëus jeune*

Sénégal, en limite nord de son aire de répartition, soudano-sahélienne de la région du Sénégal oriental ainsi que dans les forêts soudano-guinéennes de la Casamance. Sa niche écologique s'est élargie avec son adaptation à la mangrove (**Galat, 1983**). Cette association végétale halophile qui caractérise les régions littorales de la zone tropicale lui fournit des ressources alimentaires particulières. La grande diversité de l'habitat de ce singe dépend aussi de son régime alimentaire.

### **2.3.1.2. Alimentation**

Omnivore opportuniste, le singe vert consomme fruits, graines, fleurs, feuilles, graminées, pousses, épines, écorces, gomme d'accacia, œufs d'oiseau, oisillons, moineaux, tourterelles, lézards, rats, passereaux, crabes, mais aussi des invertébrés (**Galat, 1976; 1977; 1978**). L'exploitation du domaine vital variant considérablement d'un jour à l'autre et l'extrême fluctuation alimentaire conduisent à une organisation en groupes de taille différente.

### **2.3.2. Ethologie**

L'organisation sociale montre en général, au Sénégal, les bandes multimâles, multifemelles. L'effectif des groupes sociaux varie entre quatre et plus de cent cinquante individus selon les auteurs et les régions (**Galat, 1983**). Ceci s'explique par le fait que, lorsque le milieu est riche, les animaux se mettent en petits groupes sous la direction d'un mâle dominant; et lorsque le milieu est pauvre, de très grandes bandes se partagent les ressources sans compétition.

Le répertoire comportemental du singe vert se matérialise par les vocalisations d'alarme pour signaler la présence des prédateurs, les règlements des conflits par le mâle dominant et des relations privilégiées maintenues par des fréquents épouillages mutuels.

Par ailleurs sur les plans physiologique, biologique et pathologique le singe vert reste un animal peu connu.

#### **2.4. Données biologiques et pathologiques sur le singe vert**

Avant la description du SIV agm SAB par **Allan et al.** en **1990** chez le *Cercopithecus sabaeus*, on savait déjà que les singes verts hébergeaient SIV mais de façon asymptomatique. D'une manière concomitante ou non on retrouve chez ce singe vert le virus STLV avec une prévalence mesurée de 40%. au Sénégal (**Diop, 1992**).

Hormis ces infections dues à des rétrovirus, aucune enquête épidémiologique n'a été réalisée sur ces animaux (**Gogovor, 1993**).

Par ailleurs, depuis 1992, **Diop (1992,1993)** a initié, entre autres investigations, l'établissement des constantes sanguines et sériques de ces animaux. Cette étude se poursuit mais n'a pas encore fait l'objet d'une publication.

Au total, le singe vert du Sénégal offre un terrain vierge sur les plans biologiques et pathologiques.



### 3. LE SINGE VERT DANS LA RECHERCHE EXPERIMENTALE

Depuis quelques années les singes verts sont utilisés dans la recherche expérimentale. Cependant, la grande partie de ces études ne sont faites que sur le vervet (*Cercopithecus aethiops*); le calitriche (*Cercopithecus sabaeus*) étant beaucoup plus particulièrement étudié sur le plan comportemental.

#### 3.1. Etude comportementale

Le singe vert *Cercopithecus (aethiops) sabaeus* est plus connu dans le cadre de ses aspects comportementaux. En effet les domaines abordés sont: la vie socio-écologique, le régime alimentaire et l'habitat, largement développés par **Galat (1975; 1983)**, **Galat et Galat-Luong (1976; 1977; 1978)**. Ces aspects étudiés dans le milieu naturel des animaux ont été comparés à ceux observés sur ces animaux en captivité par **Gogovor (1993)**, surtout en ce qui concerne les activités sociales, le temps d'alimentation et le temps de repos.

Dans la littérature c'est un animal qui est très peu documenté sur le plan de la pathologie.

#### 3.2. Etude pathologique

Le SIVagm a été isolé chez le vervet, le grivet et le *sabaeus* qui apparaissent comme des porteurs naturels de ce virus. Ces singes, malgré une prévalence de plus de 50% d'animaux infectés dans leur milieu naturel (**Muller et al. 1993**) demeurent apparemment asymptomatiques sur le plan des manifestations cliniques d'après plusieurs auteurs cités par **Muller (1995)**. Ce caractère non pathogène a été surtout décrit pour les singes

verts d'espèce vervet. En ce qui concerne le callitriche (*C. sabaesus*) les études de **Gogovor (1993)** remettaient en question ce caractère non pathogène du SIVagm chez ce singe vert. Mais les investigations faites par **Diop** (com. pers.) dans ce sens ont montré que les mortalités observées chez ces animaux en captivité à l'IPD étaient dues à une avitaminose B. Selon **Gogovor** la très grande prévalence de l'infection dans la population adulte de *Cercopithecus sabaesus* du Saloum (21% chez les immatures à 80% et plus chez les adultes) (**Diop, 1992**) s'expliquerait par deux voies possibles de transmission: la voie hétérosexuelle et la morsure. Par ailleurs, l'infection par SIV se traduirait également par une modification de certains paramètres biologiques (augmentation de la concentration de protéines sanguines) (**Galat et al., 1996**).

Outre ces études effectuées sur le singe vert du Sénégal dans le cadre de son infection par le virus SIV, la littérature ne semble pas faire état d'autres investigations inhérentes à sa pathogénicité propre.

### **3.3. Etudes vaccinales**

Nous évoquerons dans ce sous chapitre l'utilisation faite du singe vert dans le domaine vaccinal. En effet, la littérature n'évoque aucun usage du singe vert *C. sabaesus* comme modèle vaccinal. Seules des inoculations du virus SIV ont été essayées dans le cadre de l'étude du statut immunitaire du singe vert SIV+ (**Gogovor, 1993**). Par ailleurs une inoculation per os d'une souche virale HTLV1 à un Cercopithèque a été envisagée pour rechercher un modèle simien pour la mise au point d'un vaccin HTLV1 (**Rapport IPD 1992**). Quelques essais de vaccins ont été

effectués sur le *Certhopithecus aethiops* comme l'utilisation de vaccin recombinant gp120 DNA du virus HIV1 pour montrer son effet sur l'induction de la prolifération des lymphocytes T helper et les T cytotoxiques (**Sliver et al., 1995**).

D'une manière générale, pour conférer une immunité active à un organisme, outre l'utilisation des anatoxines, les vaccins à germes atténués, les vaccins à germes tués et plus récemment les vaccins recombinants, sont largement utilisés. Cependant, en dehors des vaccins vivants atténués, les autres préparations ont le plus souvent besoin d'un adjuvant pour accroître leur efficacité immunogène.

Compte tenu de la diversité des effets et de la composition des adjuvants, de nombreuses possibilités d'amplification de la réponse immune n'appartiennent pas à un type physico-chimique particulier. C'est pourquoi nous adopterons la classification de **Woodard (1990)**, pour énumérer les principaux adjuvants d'immunité. Selon leurs propriétés chimiques, nous allons en décrire quelques caractéristiques.

#### **4. ADJUVANTS DE L'IMMUNITE**

##### **4.1. Définition**

Un adjuvant est une substance augmentant la réponse immune spécifique à un Ag. On peut différencier l'adjuvant lui même (la substance active directement sur la réponse immune) du "véhicule" ou liquide contenant la substance adjuvante (**Allisson et Byars, 1986**). La définition générale est suffisante, elle implique cependant plusieurs catégories d'effets.

## 4.2. Mode d'action d'un adjuvant

Les mécanismes généraux suivants se retrouvent dans les divers types d'adjuvants:

- La rétention de l'antigène au site d'injection:

L'antigène inclus dans un adjuvant (du type gel minéral ou émulsion) resterait localement de manière prolongée induisant une immunisation secondaire.

- Recrutement cellulaire:

De nombreux adjuvants ont une action pro-inflammatoire, parfois granulomateuse, attirant les cellules lymphocytaires et monocytaires avec pour conséquence un afflux de cellules capables de "présenter" l'antigène (APC).

- La présentation de l'antigène:

Les antigènes inclus dans un adjuvant de type gel minéral, adjuvant huileux ou dans des liposomes sont plus efficacement présentés au niveau des APC.

- L'activation du complément

La voie complémentaire est activée par certains adjuvants (alumine, polymères synthétiques) avec attraction et activation des monocytes pour leurs capacités phagocytaires.

- Activation des cellules de l'immunité:

La plupart des adjuvants induisent la sécrétion d'IL-1 (une cytokine pro-inflammatoire) par des macrophages de culture.

Certains composés peuvent interagir directement avec les cellules de l'immunité comme la saponine à faible concentration qui a une action sur les membranes cellulaires (**Bomford, 1980**).

### **4.3. Les principaux adjuvants**

#### **4.3.1. Les adjuvants particuliers**

##### **4.3.1.1. Les gels minéraux**

Le composé essentiellement utilisé est l'hydroxyde d'alumine  $\text{Al(OH)}_3$ , obtenu soit par précipitation extemporanée avec l'antigène soit par mélange de l'Ag avec des solutions commerciales prêtes à l'emploi. Ces dernières ont l'avantage de présenter une taille des particules précipitées homogènes et reproductibles dans un même lot [les autres gels utilisés sont  $\text{KAl(SO}_4)_2 \cdot \text{AlPO}_4$  ou  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ]. C'est sur ces composés que l'on a le plus de recul depuis leur découverte (**Glenny et al., 1926**). Seul l'alumine est l'adjuvant autorisé à large échelle chez l'homme.

##### **4.3.1.2. Les émulsions eau/huile**

Il en existe divers constituants: huiles végétales ou synthétiques (SQUALANE, PAO) stabilisées par des émulsifiants (Tween 80). Ces émulsions sont généralement utilisées dans les vaccins vétérinaires, le plus connu étant l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) (**Freund et Bonato, 1944**), composé d'une huile minérale et de mannide mono-oléate comme émulsifiant (Arlacel A). Ces émulsions retiennent l'Ag au site d'injection et permettent sa diffusion dans l'organisme sous forme concentrée et "protégée" à l'intérieur de la phase hydrophile ou à l'interface des deux

phases liquides. Elles ont aussi un effet sur la migration cellulaire.

#### **4.3.1.3. Les émulsions huile/eau**

Ce sont les huiles minérales, végétales ou de la paraffine stabilisées par des émulsifiants comme Arlacel A ou le Tween 80. Ces adjuvants sont constitués de microgouttes lipidiques dispersées dans une phase aqueuse contenant l'Ag et stabilisées par un émulsifiant biocompatible (Tween 80). L'antigène est concentré à l'interface des microgouttelettes et présenté aux APC par sa partie hydrophile. Leur mode d'action est analogue aux précédents adjuvants; leur intérêt réside dans l'association possible avec d'autres constituants non particuliers.

#### **4.3.1.4. La saponine**

La saponine correspond à un groupe de glycosides tensioactifs naturels végétaux composés d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Sa propriété adjuvante a été montrée par **Ramon** en **1926**; c'est un composé hétérogène dont les divers constituants peuvent montrer une activité variable d'adjuvantité (**Kensil et al., 1991**). La saponine classiquement employée provient de *Quillaja saponaria molina* (arbre d'Amérique du Sud) et son mécanisme d'action n'est pas connu. Un dérivé purifié, nommé QS21 avec une activité adjuvante particulièrement efficace (induction de CTL) et une toxicité réduite, a fait l'objet d'une commercialisation (Stimulon®).

#### **4.3.1.5. Les vésicules biodégradables**

Il s'agit des liposomes et les sphères biodégradables:

- Les liposomes ou vésicules lipidiques multilamellaires artificielles sont fabriqués par hydratation d'un film phospholipidique (**Kirby et Gregoriadis, 1984**). Les phospholipides en solution aqueuse forment des vésicules closes et stables, dont les parois peuvent être formées de plusieurs couches de manière analogue aux membranes cellulaires. Un antigène (avec éventuellement d'autres cofacteurs) dissous dans la solution aqueuse peut s'y inclure lors de la formation des vésicules (**Siddiqui et al., 1978**).

- La micro encapsulation correspond à la fabrication de particules solides (de 10 nm à 100  $\mu\text{m}$ ) avec divers composants (polylactide/polyglycolide, composants entrant dans la fabrication des sutures chirurgicales biodégradables), et contenant un antigène. Cette technique est un progrès car il est possible de catalyser le relargage progressif de l'Ag en fonction de la composition des polymères (le DL-Lactide accélère la dégradation du Glycolide) et de la taille des particules, ce qui permet une seule injection immunisante (**Lussow et al., 1990**; **Morris et al., 1994**). L'immunisation par ce procédé a été proposée pour la voie orale (**Eldridge et al., 1991**).

Le mode d'action principal des liposomes et des microsphères est lié à leur phagocytose efficace par les macrophages ou "Immuno targeting" et la dégradation progressive du support relarguant ainsi l'Ag.

#### **4.3.2. Les adjuvants non particuliers**

Ils sont très nombreux et agissent généralement par modulation de la réponse immune. Ce sont des substances peptidiques, lipidiques ou polysaccharidiques.

- Le muramyl dipeptide et analogue (MDP): principe actif des mycobactéries détoxifiées.

- Le Tripalmitoyl-S-glycerylcysteinyl seryl serine (P3CSS): le lipopeptide P3CSS est un dérivé synthétique représentant la séquence N-terminale immunologiquement active de la lipoprotéine de *Escherichia coli*. Il est conjugué directement à l'immunogène.

- Les dérivés lipopolysaccharidiques (LPS) endotoxines des bactéries Gram négatives, le dérivé détoxifié le plus utilisé est le monophosphoryl lipide A (MPL).

- Les Cytokines en particulier l'IL-1 pour son effet pro-inflammatoire, co-activateur des cellules T, il favorise la prolifération des lymphocytes T et B. L'IL-2 fait proliférer les lymphocytes T, elle a un rôle activateur des CTL et NK. L'IFN $\gamma$  est produit après activation des cellules Th1. Ce dernier augmente la synthèse d'IL1 par les monocytes et accroît l'expression des molécules du CMH classe II pour une présentation plus efficace de l'Ag aux cellules immunocompétentes.

#### **4.3.3. Les combinaisons d'adjuvants**

L'association adjuvante la plus ancienne et la plus connue est l'adjuvant complet de Freund (ACF) combinant une émulsion



eau dans l'huile (AIF) et des mycobactéries entières tuées (**Freund et Mc Dermott, 1942**). C'est un standard d'efficacité pour stimuler l'immunité, mais aussi un standard de toxicité locosytémique (pyrogénicité, inflammation locale ulcéro-nécrotique, inflammation générale), qui en proscrit toute application chez l'homme.

Un progrès significatif, basé sur le modèle ACF a été l'association des dérivés bactériens détoxifiés MPL/MDP à des émulsions de dérivés atoxiques et de tensio-actifs synthétiques métabolisables. Ainsi il existe trois dérivés importants dont certains sont commerciaux: le MF59, le Syntex<sup>®</sup> et le Ribi Adjuvant: ce sont généralement des émulsions de squalane stabilisées par du Tween 80 incorporant un activateur (MPL, MDP).

#### **4.3.4. Les stratégies récentes**

La production d'Ag par un vecteur vivant atténué chez l'individu vacciné a été proposée: ces vecteurs sont des poxvirus, dont le virus de la vaccine et des poxvirus aviaires non réplicatifs, en particulier pour l'expression des protéines de HIV-1 (**Graham et al., 1993; Radaelli et Morghen, 1994**), des adénovirus et des poliovirus. Parmi les vecteurs bactériens, le B.C.G. et les salmonelles (*S. typhimurium*) ont été envisagés.

Les vaccins à ADN sous forme de plasmide le plus souvent (codant pour la protéine vaccinale à partir des composants cellulaires de l'hôte) (**Robinson et al., 1993; Davis et al., 1993; Whalen, 1996**), se fait par voie intramusculaire.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**ETUDE EXPERIMENTALE**

## **1. MATERIEL ET METHODES**

### **1.1. Matériel**

#### **1.1.1. Les animaux**

##### **1.1.1.1. Nombre et origine**

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé les animaux de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD). Onze singes sont entrés dans le protocole. Trois ont servi à l'expérimentation des candidats vaccins anti-*P. falciparum*, ils sont tous positifs au syndrome d'immunodéficience simien (SIV<sup>+</sup>). Les huit autres (4 SIV<sup>-</sup> et 4 SIV<sup>+</sup>) ont été vaccinés avec l'anatoxine tétanique (TT). Ces singes, juvéniles, jeunes, subadultes et adultes pesant en moyenne de 1 à 4,5 kg (Tableau II p.27), sont issus de captures dans la nature. Ils proviennent de la région de Sine Saloum (Ouest du Sénégal), caractérisée par un climat soudano-sahélien.

Parmi ces animaux, neuf vivaient en captivité depuis 1 à 7 ans et quatre, récemment arrivés, ont été mis en quarantaine un mois au moins avant le début des essais vaccinaux.

##### **1.1.1.2. Maintenance et alimentation.**

Les cages individuelles de l'animalerie sont installées dans un enclos fermé au sein même de l'IPD et servent de lieu réservé pour la maintenance des animaux. Chaque cage présente des barreaux métalliques sur les deux faces et contient une caisse en bois à moitié close (niche) servant d'endroit de repos et de sommeil. Il faut signaler l'absence de suivi médico-vétérinaire systématique. Toutefois, l'animalerie est nettoyée

**Tableau II:** Caractéristiques du matériel animal utilisé .

N°singe	Sexe	Age	Sérologie SIV	Poids(Kg)
89032	F	A	+	3,57
92010	F	A	+	3,56
93035	F	A	+	*
96002	M	A	+	3,09
96014	F	SA	-	2
97005	M	E/J	-	1,70
97007	M	A	-	2,51
97009	M	E	-	1,52
92014	F	A	+	3,40
96002	M	A	+	3
96003	F	A	+	4,5

A: adulte, SA: subadulte, E/J: enfant/juvénile, E: enfant, F: femelle, M: mâle

quotidiennement, ce qui permet de dégager les fèces et les restes de nourriture. Une désinfection est faite après chaque nettoyage. L'accès à l'animalerie étant interdit et un enclos grillagé situé à un mètre des cages sur le périmètre de l'animalerie isole les singes du public et évite l'incursion des rats et autres animaux.

Les animaux sont nourris d'une ration composée de riz, de manioc, de patates douces, de carottes, de légumes et de protéines animales sous forme de viandes et d'œufs; le mélange est cuit avant la distribution qui se fait généralement en fin de matinée. Des arachides et des fruits sont donnés en complément.

Les jours de manipulation les animaux reçoivent leur ration après les prélèvements et l'injection des produits vaccinaux.

## **1.1.2. Les composants vaccinaux**

### **1.1.2.1. Les antigènes**

Deux types ont été utilisés: l'anatoxine tétanique (TT) et les antigènes du *Plasmodium falciparum*.

#### **1.1.2.1.1. L' anatoxine tétanique**

La toxine tétanique (tétanospasmine) est une protéine de 150 kDa, produite par *Clostridium tetani*, ayant une activité neurotoxique dont le mécanisme d'action exact n'est pas totalement connu. Cette toxine, après sa libération par la lyse cellulaire, est clivée par une endoprotéase en deux fragments C (50 kDa) et B (100 kDa). La fabrication de l'anatoxine tétanique, destinée à la composition des vaccins à usage humain (souche de *C. tetani* de référence, méthodes de culture, inactivation de la

toxine, purification et contrôle pharmacologique), obéit à des règles strictes. L'activité antitoxine est mesurée en Lf correspondant à une réaction de floculation en présence d'un sérum standard antitoxine (OMS) de 1 UI. Cet antigène a été choisi comme modèle pour les études vaccinales car il est bien connu et très utilisé comme antigène de référence dans la mise au point de nouvelles stratégies vaccinales (**Xuamano et al., 1993**).

#### **1.2.1.2. Les antigènes dérivés de *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*)**

Un mélange de trois antigènes recombinants a été utilisé PfEB200, Pfi72 et R23 ainsi que des mérozoïtes.

La molécule recombinante PfEB200 contient une séquence de 135 acides aminés de l'antigène Pf332. C'est une protéine qui se trouve dans le cytoplasme des globules rouges parasités dans la phase tardive de développement du parasite, cette protéine est transportée vers la membrane de l'érythrocyte dans des structures vésiculaires (**Mattéi et Scherf, 1992**).

L'antigène Pfi72 correspond à un polypeptide de 153 acides aminés appartenant à la partie C-terminale de la hsp Pf72 de *P. falciparum* présentant le moins d'homologies avec son équivalent humain. La protéine 72 est cytoplasmique (concentrée autour du noyau), synthétisée aux stades hépatiques et sanguins. C'est la protéine recombinante tandem Pfi72-EB200, construite par PCR à partir des clones originels et d'amorces spécifiques, qui a servi aux immunisations comme chez le Saimiri (**Perraut et al., 1995**).

L'antigène recombinant R23 est formé de 11 répétitions d'un motif de 6 acides aminés, elle correspond à une partie d'un Ag nommé R45 (80 répétitions). La localisation exacte du produit du gène R45 n'est pas encore déterminée, il correspondrait à une protéine de 160kDa détectable au stade de jeune trophozoïte (**Bonnefoy et al., 1992**).

Ces protéines ont été exprimées dans un vecteur d'expression couplées à la glutathion-S-transférase (GST) permettant de les purifier par chromatographie d'affinité (**Smith & Johnson, 1988**)

Ces candidats vaccins ont été sélectionnés initialement suite à des analyses immunochimiques de fractions parasitaires démontrées comme ayant des capacités protectrices chez le singe *Saimiri* (**Dubois et al., 1984**), leur sélection a été ensuite faite sur la base de leur pouvoir inhibiteur de la phagocytose immune *in vitro* (**Gysin et al., 1993**) et ils ont montré leur pouvoir protecteur dans l'infection expérimentale chez le *Saimiri* (**Perraut, 1995; Perraut et al., 1997**).

### **1.1.2.2. Les adjuvants utilisés**

#### **1.1.2.2.1. Composition**

L'alumine: Alu-Gel-S (ref. 12261, lot 00490), adjuvant de référence a été obtenue chez Serva (Heidelberg) et conservée à 4°C.

La PAO (polyalphaoléfine) fait partie des adjuvants expérimentaux non commercialisés, fabriqués par Behringwerke AG (Marburg); ils ont été décrits et préalablement utilisés chez

diverses espèces animales dont des primates du nouveau monde (**Enders et al., 1990**). Des utilisations ultérieures ont également été rapportées lors d'essais vaccinaux faits chez des primates (**Niedrig et al., 1993; Knapp et al., 1992**).

Les émulsions ou suspensions obtenues après passage sur vortex sont stables et homogènes (contrairement à l'alumine).

#### **1.1.2.2.2. Mode d'action**

Le mode d'action de l'alumine avec son effet pro-inflammatoire a été décrit précédemment. La PAO, donnant des émulsions stables type huile dans l'eau, concentre l'antigène à l'interface entre la phase hydrophile et la phase hydrophobe permettant ainsi sa présentation aux cellules effectrices.

#### **1.1.2.3. Matériel utilisé pour l'analyse de la réponse immunitaire**

C'est le matériel habituellement utilisé pour le test ELISA et ceux employés dans les tests de transformation lymphoblastique et l'immunofluorescence indirecte (voir annexes).

### **1.2. Méthodologie**

#### **1.2.1. Doses d'immunogènes**

Anatoxine Tétanique: toutes les immunisations ont été faites avec un lot d'anatoxine tétanique (fournie par Behringwerke AG, Marburg) ayant déjà servi pour les immunisations du modèle *Saimiri*, la dose immunisante à chaque injection a été de 15 Lf (la dose humaine va de 5 à 30 Lf). Une anatoxine tétanique d'une



autre source (Pasteur Mérieux, Paris) a été utilisée pour les titrations des réponses Ac spécifiques.

Antigènes de *P. falciparum*: les extraits de mérozoïtes ont été injectés à la dose de 200 $\mu$ g de protéines parasitaires; les Ag recombinants ont été injectés à la dose de 100 $\mu$ g pour l'Ag Pfi72-EB200 mélangé avec 100 $\mu$ g de l'Ag R23. Tous ces Ag ont été dilués dans de l'eau physiologique pour préparation injectable avant mélange avec l'adjuvant.

### **1.2.2. Immunisation des animaux et prélèvements**

#### **1.2.2.1. Présélection des animaux**

Les singes ont été présélectionnés au départ en fonction d'un bruit de fond Ac spécifique par rapport à l'antigène envisagé comme modèle. D'une manière générale, un tel criblage révélait une très faible positivité en Ac préexistants aussi bien pour le TT que pour l'antigène *P. falciparum* tant somatiques que recombinants. Seul un singe SIV<sup>+</sup> (93035) présentait un léger bruit de fond TT à J0 (premier jour) (D.O.# 0,2). Un autre singe (92010) avait déjà été immunisé activement par l'Ag TT; son bruit de fond à J0 était cependant nul. Ils ont été néanmoins utilisés compte tenu du choix restreint d'animaux en captivité.

#### **1.2.2.2. Immunisation des animaux et prélèvements de sang**

La modélisation vaccinale utilisant l'Ag TT a été faite de manière strictement analogue à celle pratiquée sur le singe *Salmiri* (Perraut 1993; 1994) à savoir trois immunisations à J0, J21 (21ème jour) et J84 (84ème jour). Pour les Ag de *P. falciparum*,

3 immunisations ont été faites à J0, J21 et J60. Les immunisations ont été faites par la voie sous-cutanée en dix points sur le dos de l'animal. Les prélèvements ont été effectués selon le protocole décrit dans le Tableau III (p.34).

Lors des prises de sang les singes sont anesthésiés par une injection intramusculaire de kétamine (Imalgène® 1000 ND). Une dose de 0,3 à 0,5 ml par animal (selon le poids de l'animal) induit un effet anesthésique d'une vingtaine de minutes en moyenne.

Une quantité de sang (de 5 ml à 10 ml) a été généralement prélevée à la seringue au niveau de la veine fémorale puis transférée dans un tube-EDTA. Un millilitre de ce sang est envoyé pour la numération-formule sanguine, le reste est centrifugé et le plasma récolté; le culot sert à la séparation des PBMC sur gradient de densité. Pour les tests de CML les prélèvements peuvent être faits sur tube hépariné .

Tableau III

## a/ PROTOCOLE ANATOXINE TETANIQUE

GROUPE 1	TT+ 50% AI 96014--97005	GROUPE 3	TT+ 50% AI SIV+ 89032--92010
GROUPE 2	TT+ 10% PAO 97007---97009	GROUPE 4	TT+ 10% PAO 93035--96002

Ag= 15 Lf TT

Adjuvants= ALU-GEL et PAO

Immunsisation	JOURS	DATE	PRELEVEMENT
<b>Ag</b>	0	4/3/97	sérum/plasma/prolif
	14	18/3/97	sérum
<b>Ag</b>	21	25/3/97	sérum
	35	8/4/97	plasma/TTL
<b>Ag</b>	56	29/4/97	sérum
	70	13/5/97	plasma/TTL
	84	27/5/97	sérum
<b>Ag</b>	94		sérum
	105	17/6/97	sérum

## b/ PROTOCOLE Paludisme

SINGE 1	R23+i72-EB200+ 50% AI	92014
SINGE 2	R23+i72-EB200+ 10% PAO	96002
SINGE 3	mérozoïte/PAO 10%	96003

Ag= R23+Pf72-EB200 et mérozoïte/PAO

Adjuvants= ALU-GEL et PAO

Immunsisation	JOURS	DATE	PRELEVEMENT
<b>Ag</b>	0	2/12/96	plasma/cell tube hépariné
<b>Ag</b>	21	23/12/96	sérum
	35	6/1/97	sérum
<b>Ag</b>	60	31/1/97	sérum
	67	7/2/97	sérum
	75	15/2/97	sérum

### **1.2.2.3. Suivi des animaux en expérimentation (Numération-formule sanguine/poids)**

Au cours des essais vaccinaux les animaux sont soumis à une surveillance clinique et biologique. Sur le plan clinique nous relevons à chaque séance de prélèvement les poids des animaux (Tableau IV p.36) et nous recherchons par palpation aux points d'injection la présence de nodules indurés, signe d'inflammation locale.

Par ailleurs, la numération-formule sanguine permet un suivi biologique. Les constantes obtenues ont été comparées aux normes humaines.

Globalement la santé apparente des animaux a été très satisfaisante, les poids ont peu varié (fig. 2 p.36) durant toute l'expérimentation. Mais nous pouvons remarquer que les singes 97005, 97007 et surtout le 97009 sont des animaux en croissance et auraient dû normalement présenter une augmentation de poids au fil du temps. La perte de poids du singe 92010 serait due probablement à une infection passagère.

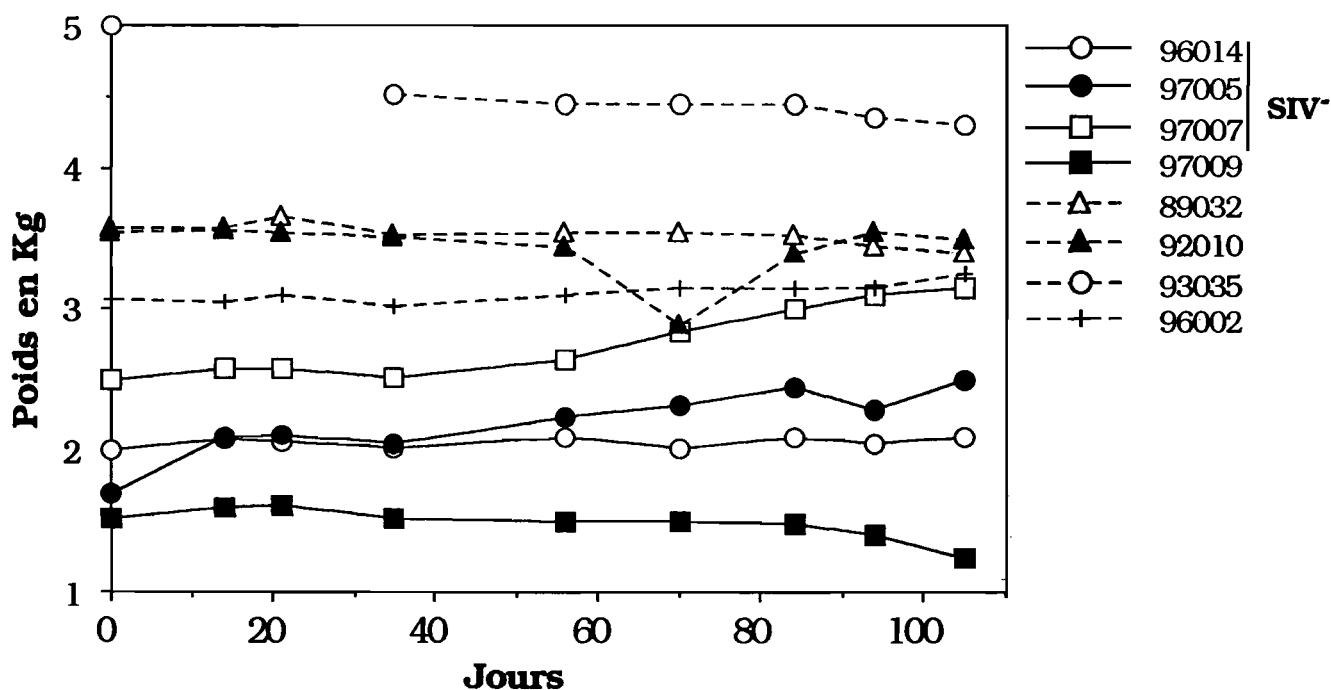
### **1.2.3. Étude de la réponse immunitaire**

#### **1.2.3.1. Réponse humorale**

Dans cette étude nous avons utilisé deux techniques, le test ELISA et l'immunofluorescence indirecte (IFI).

**Tableau IV : Suivi du poids des animaux en kg**

	96014	97005	97007	97009	89032	92010	93035	96002
<b>J0</b>	2	1,7	2,51	1,52	3,57	3,55		3,08
<b>J14</b>	2,09	2,1	2,59	1,6	3,57	3,56		3,06
<b>J21</b>	2,07	2,12	2,58	1,61	3,65	3,55		3,1
<b>J35</b>	2,02	2,05	2,52	1,52	3,52	3,51	4,51	3,02
<b>J56</b>	2,1	2,25	2,65	1,5	3,55	3,45	4,45	3,1
<b>J70</b>	2,02	2,33	2,85	1,5	3,55	2,9	4,45	3,15
<b>J84</b>	2,1	2,45	3	1,48	3,52	3,4	4,45	3,15
<b>J94</b>	2,05	2,3	3,1	1,4	3,45	3,55	4,35	3,15
<b>J105</b>	2,1	2,5	3,15	1,25	3,4	3,5	4,3	3,25

**Figure 2: Courbes des poids en fonction des jours**

### **1.2.3.1.1. Test ELISA**

Principe: Lorsqu' un Ag est absorbé sur les parois d'un support solide (plaques d'hémagglutination en polystyrène), l'addition du sérum entraîne une fixation d'anticorps spécifiques éventuellement présents sur les Ag correspondants. L'addition d'immunoglobulines (Ig) hétérologues, conjuguées à une enzyme, permet la transformation d'un substrat chromogène en produit coloré dont l'intensité mesurée en densité optique est proportionnelle à la quantité d'anticorps. Dans notre étude nous avons recherché particulièrement les immunoglobulines de type IgG. L'anatoxine tétanique a été coatée à 10 $\mu$ g/ml dans du PBS à pH 7,4. La méthodologie est celle utilisée habituellement.

### **1.2.3.1.2. Immunofluorescence indirecte**

Les lames recouvertes de dépôts parasitaires (issus de parasites de culture) et stockées à -20°C sont laissées à la température ambiante pendant 15 minutes puis fixées dans l'acétone froid pendant 10 minutes. Après un séchage, 25  $\mu$ l de sérum dilué est déposé sur chaque spot et les lames sont incubées pendant 30 mn en chambre humide à 37°C. L'incubation est suivie par des lavages et un séchage puis un dépôt de 25 $\mu$ l d'anticorps anti-IgG humaines marqués à la fluorescéine, contre-coloré avec du bleu Evans. Une seconde incubation de 30 mn est effectuée, à laquelle fait suite un dernier lavage et un séchage. Enfin les lames sont observées au microscope à fluorescence à l'objectif x40 en immersion.

### **1.2.3.1.3. Tests statistiques**

Le test de Wilcoxon (non paramétrique) a été utilisé pour comparer entre elles les séries de D.O. correspondant à chaque titration d'un sérum. Un programme informatique permettant d'utiliser ce test pour une analyse simultanée de nombreuses séries de variables, écrit en langage Basic Microsoft<sup>®</sup> (Perraut, 1995) a été utilisé. Dans notre analyse, les D.O. des J35, J84 et J94 ont été comparées entre elles.

### **1.2.3.2. Réponse cellulaire : test de transformation lymphoblastique (TTL)**

Quand les lymphocytes périphériques d'un sujet sensibilisé sont cultivés en présence de l'antigène spécifique ils peuvent être amenés à proliférer: c'est la transformation lymphoblastique. Ce phénomène peut être reproduit avec des mitogènes polyclonaux (contrôle positif) entre autres la phytohémataglutinine (PHA), des lipopolysaccharides (LPS), la Concanavaline A (ConA), le pokeweed mitogen (PwM).

L' anatoxine tétanique (Ag) a été utilisée aux concentrations différentes (0,2 $\mu$ g, 2 $\mu$ g et 10 $\mu$ g/ml: quantité finale) et les incubations durent 7 jours. Ces tests ont été réalisés le premier jour, le 70<sup>ème</sup> et le 84<sup>ème</sup> jour. Le protocole est brièvement ainsi décrit. Après concentration des PBMC sur gradient de Ficoll<sup>®</sup>, les cellules sont reprises dans du RPMI-SVF 2% et distribuées en triplicats de 200 $\mu$ l dans des cupules (plaques Costar<sup>®</sup> à 96 puits) à raison de 10<sup>6</sup> cellules/ml. Les plaques sont incubées à 37°C en atmosphère humide en présence de CO<sub>2</sub> (5%); le 6<sup>ème</sup> jour, le surnageant est récupéré puis la thymine tritiée est ajoutée. Le

7<sup>ème</sup> jour, les plaques sont congelées en vue d'une lecture ultérieure, ou bien elles sont traitées le jour même. Les cellules sont lysées et récoltées sur des filtres en laine de verre et placées dans un compteur- $\beta$  qui mesure la radioactivité incorporée en coups par minute (cpm).

## **2. RESULTATS**

### **2.1. Exploration du polymorphisme du CMH classe II**

Nous avons effectué une exploration préliminaire pour détecter un polymorphisme des Ag du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) classe II par la méthode de culture mixte lymphocytaire (CML) de manière analogue au travail précédemment publié dans le cadre du modèle *Salmiri* (**Garraud & al., 1990; Garraud, 1993**).

Nous avons mis en œuvre deux techniques:

a) d'une part une CML en traitant la cellule cible allogénique par de l'Actinomycine D. On constate dans ces expériences une incorporation de thymidine tritiée inférieure à celle des témoins cellules seuls, y compris dans le cas d'une coculture avec des PBMC humains. On peut interpréter ce résultat par le fait que l'antimitotique a diffusé dans le milieu de culture inhibant toute prolifération. Cette constatation a été faite lors de deux expériences distinctes.



b) d'autre part une technique de CML sans addition d'antimitotiques, nous y avons incorporé 2 témoins PBMC humains différents. Les résultats sont présentés sur le tableau V.

**Tableau V:** Résultats des CML obtenues avec les PBMC de divers animaux.

No	cellules	89032	93035	96002	92010	96014	97005	97007	97009	H2
89032	244				1438	974	1277	1176	1306	
<i>Index-P</i>					<b>5,9</b>	<b>4,0</b>	<b>5,2</b>	<b>4,8</b>	<b>5,4</b>	
96014	400				2072		2364	1932	1774	
<i>Index-P</i>					<b>5,2</b>		<b>5,9</b>	<b>4,8</b>	<b>4,4</b>	
97005	262							327	561	
<i>Index-P</i>								<b>1,2</b>	<b>2,1</b>	
97007	220								267	
<i>Index-P</i>									<b>1,2</b>	
97009	277				1760					
<i>Index-P</i>					<b>6,4</b>					
Hommel	146	629	745	1898	2910	1332	645	822	909	957
<i>Index-P</i>		<b>4,3</b>	<b>5,1</b>	<b>13,0</b>	<b>19,9</b>	<b>9,1</b>	<b>4,4</b>	<b>5,6</b>	<b>6,2</b>	<b>6,6</b>

Le témoin positif a été les PBMC de 2 hommes différents. Les cpm obtenus sont notés pour chaque co-culture, les index de proliférations sont indiqués en dessous

Index-P = index de prolifération

Avec un témoin positif humain de 6,6 d'index de prolifération et un index de prolifération moyen de 8,5 pour les co-cultures entre les PBMC de Homme-1 et les PBMC du singe, on peut en déduire qu'il existe un polymorphisme du CMH classe II chez le singe vert qui semble pouvoir se traduire par des CML positives avec des index supérieurs à 4. Dans cette étude, nous ne notons pas de différences significatives entre les animaux SIV<sup>+</sup> (89032, 93035, 96002, 92010) et ceux SIV<sup>-</sup> quant à leur réponses prolifératives.

Ces résultats ont été obtenus avec un nombre restreint d'expériences, ils semblent être en accord avec une étude similaire faite par des méthodes biochimiques. Une hétérogénéité avait été mise en évidence, avec un degré moindre chez les animaux dans le cadre d'un élevage de singes verts par rapport aux animaux sauvages (**Lekutis, 1995**). Cependant d'autres explorations sont à pratiquer pour valider cette observation: utilisation d'autres antimitotiques, étude cinétique des proliférations en CML.....

## **2.2. Étude des réponses prolifératives**

Elles ont été pratiquées selon deux modalités: d'une part les techniques classiques après isolement des PBMC sur gradient de densité et d'autre part sur sang total.

La technique sur sang total est de mise en œuvre plus simple et mieux corrélée à certains états pathologiques (**Bocchieri et al., 1995**). Dans notre cas, nous n'avons pas obtenu de réponses prolifératives dans ces conditions, d'autres explorations sont à conduire pour adapter cette technique au singe vert.

Les résultats obtenus avec les techniques classiques figurent dans le Tableau VI (p.43). Compte tenu d'un certain nombre de difficultés techniques, nous n'avons pas les résultats des réponses prolifératives vis à vis du TT à JO de l'immunisation.

- Concernant les mitogènes polyclonaux: les index de proliférations sont variables en fonction des périodes de

prélèvements, les proliférations sont notables avec la ConA et le mélange LPS/PHA, elles sont particulièrement élevées à J84.

- Concernant le TT, la dose optimale de stimulation semble se situer à  $2\mu\text{g}/\text{ml}$  final. A J84 la dose de  $0,2\mu\text{g}$  est particulièrement efficace chez les singes immunisés en présence d'alumine. Ces résultats sont difficiles à interpréter exactement en l'absence des témoins J0; mais chez les singes SIV<sup>-</sup> les réponses prolifératives sont nettement plus faibles à J70 qu'à J84 (après le rappel). L'alumine dans ce cas semble plus efficace.

D'une manière générale les bruits de fond "cellules" sont faibles. On note de façon paradoxale l'existence de réponses prolifératives notables chez les animaux SIV<sup>+</sup>, y compris avec les mitogènes polyclonaux à J0 et de façon très nette après immunisation avec l'Ag TT. En conclusion, on constate en première approche un effet positif de la vaccination TT pour le recrutement d'effecteurs cellulaires détectables par les tests prolifératifs, même chez les animaux SIV<sup>+</sup>; d'autres investigations sont à mener pour valider cette constatation dont des techniques relatives aux dosages de cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ ) si elles peuvent être pratiquées.

**Tableau VI. Index de prolifération vis à vis des mitogènes polyclonaux et du TT**

Jour 0						Jour 70						Jour 84					
Adjuvant			IS			cpmo	IS					cpmo	IS				
statut-SIV	SINGE	cpmo	L+P	ConA	PwM		L+P	ConA	TT0,2	TT2	TT10		L+P	ConA	T	TT0,2	TT2
Alum	96014	392	10,9	7,9	25,6	157	0,9	0,8	0,6	0,6	0,6	70	28,2	7,5	18,4	31,1	23,7
Alum	97005	2972	1,3	3,1	1,8	117	1,7	2,1	3,3	1,8	1,4	91	18,8	6,4	16,7	13,9	9,0
Alum/SIV+	89032					79	1,2	13,3	49,0	62,6	45,0	81	17,0	19,1	13,9	18,0	18,3
Alum/SIV+	92010	392	2,1	3,5	3,1	333	15,2	22,4	6,3	16,7	18,0	69	82,2	61,0	21,1	36,1	39,1
PAO	97007	364	7,0	29,1	2,1	162	1,3	1,2	0,5	0,4	1,1	78	32,5	4,3	5,5	23,3	3,5
PAO	97009	710	8,7	10,6	2,5	56	2,5	1,6	3,6	5,9	1,2	43	30,8	4,1	5,2	7,0	3,5
PAO/SIV+	93035	1260	12,5	19,4	2,3	466	21,6	11,9	19,4	16,9	17,9	51	47,5	8,8	35,2	34,9	15,0
PAO/SIV+	96002					155	25,4	13,9	2,7	11,0	21,5	109	27,9	0,3	1,7	1,0	0,8

L+P = LPS + PHA

cpmo = moyenne des cpm des cellules témoins

T= moyenne des cpm cellules essais - cpmo = cellules stimulées

Index de prolifération = T/cpmo

## 2.3. Réponse Ac anti-TT

### 2.3.1. Cinétiques de production des Ac

Elles sont représentées sur les fig. 3 et 4, groupées par adjuvant (fig. 3a et 3b p.46) ou par statut SIV (fig. 4a et 4b p.47), à partir des DO des réponses Ac pour les sérums dilués au 1/200. Tous les singes ont répondu à l' Ag. Ces réponses sont matérialisées par des courbes qui présentent dans l'ensemble deux pics à J35 et à J94.

- Par rapport à l'adjuvant, on constate que les singes ayant reçu le TT avec la PAO (fig. 3b) voient leur niveau d'Ac baisser entre le premier et le deuxième rappels (J35 et J84), (sauf chez le singe 93035 qui montre une réponse Ac de type secondaire malgré son statut SIV<sup>+</sup>) contrairement aux singes ayant reçu l'alumine (Fig. 3a).

- Par rapport au statut SIV on constate une certaine hétérogénéité des réponses des singes SIV<sup>-</sup> avec des variations individuelles (fig. 4a). Dès la première injection de de l'immunogène, les singes montrent une ascension continue de leur taux d'Ac dans laquelle la seconde injection ne semble pas avoir d'effet directement visible. Ce sont les niveaux d'Ac qui diffèrent selon les individus, les singes 97007 et 97009 montrent une baisse de leur taux d'Ac avant la troisième injection. Ce constat peut être éventuellement lié à l'âge des animaux, les singes 97005 et 97009 étant respectivement enfant/juvénile et enfant.

Chez les singes SIV<sup>+</sup>, une relative homogénéité de réponse en Ac semble se dégager (fig. 4b); les courbes ont presque la même allure, les taux d'Ac augmentent après J21, deux injections sont nécessaires sauf pour le 93035.

### **2.3.2. Titres des réponses en Ac**

Les titres des réponse Ac anti-TT correspondent à la dernière dilution qui donne le double du bruit de fond. Quand les signaux étaient trop élevés à la dernière dilution testée (1/51200) les titres ont été calculés par extrapolation: nous avons pris la moitié du DO pour chaque dilution jusqu'à l'atteinte du double du bruit de fond.

Dans le tableau VII (p.48) nous constatons une grande élévation des titres en Ac d'une manière générale à J105. Les courbes des réponses en Ac ne recourent pas exactement les titres en particulier pour les singes 97005 et 93035. Il faut noter que les titres des sérums du singe 97005 sont relativement plus élevés; ceci serait lié à un problème de coloration, la DO plus faible à J0 ayant donné des titres plus élevés alors que les résultats en ELISA sont faibles. Pour le singe 93035, c'est le phénomène inverse; la DO positive à J0 fait chuter les titres calculés sur le bruit de fond bien que les signaux ELISA soient forts.

### **2.3.3. Comparaison statistique des réponses en Ac**

Les courbes des titres Ac à J35 et à J94 sont montrées sur la figure 5 (p.49). Les comparaisons statistiques ont été faites entre

Figure 3: Réponses en Ac anti-TT en fonction des adjuvants

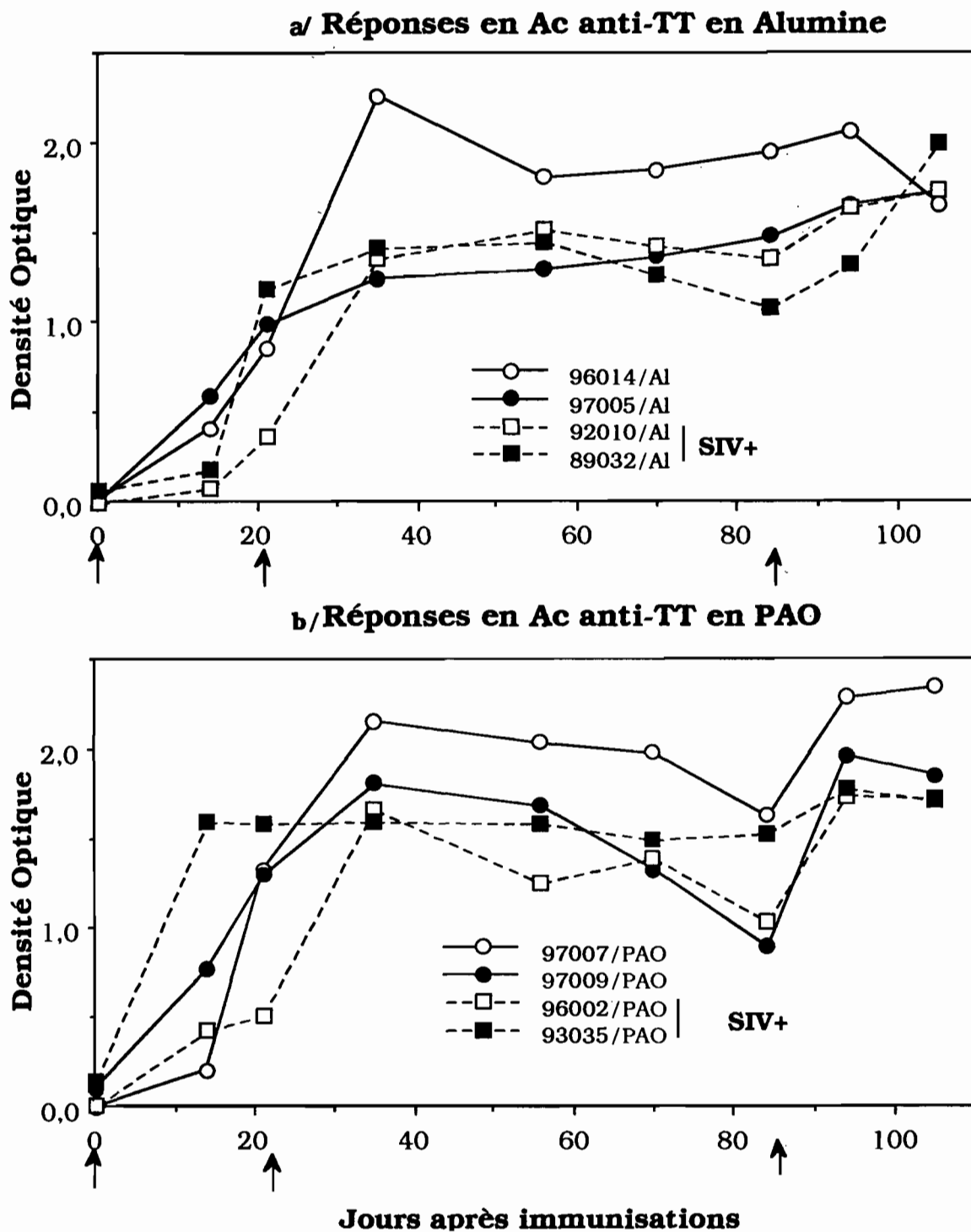
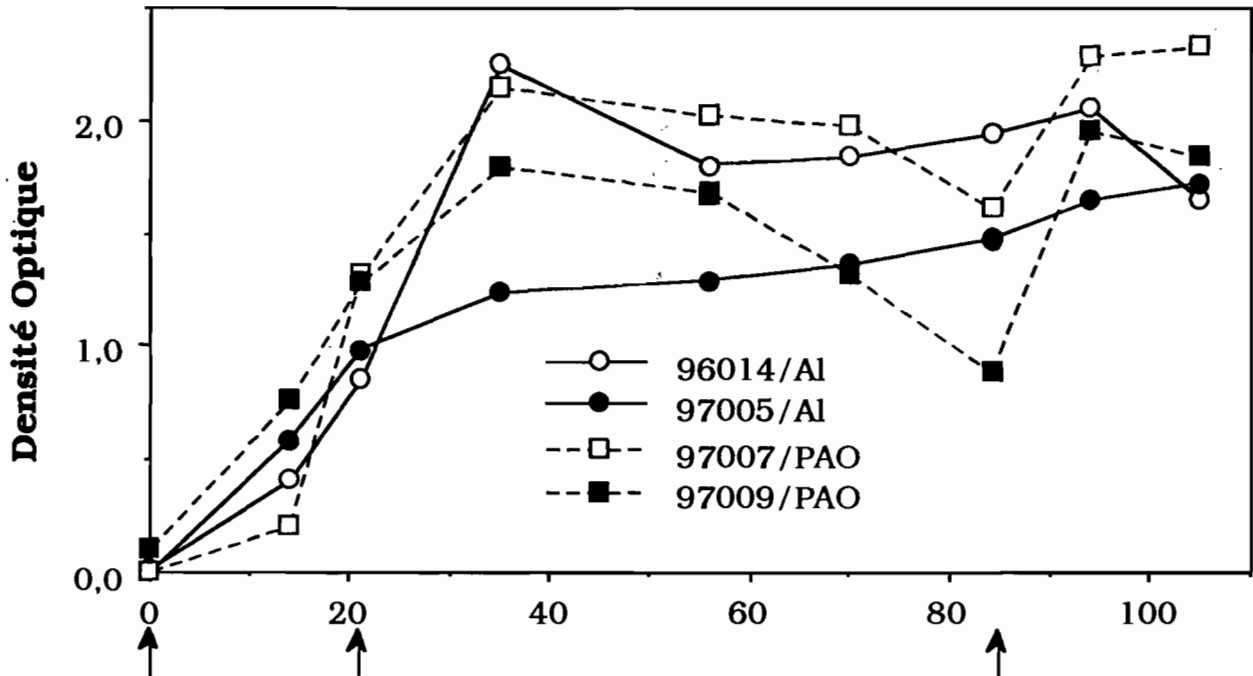
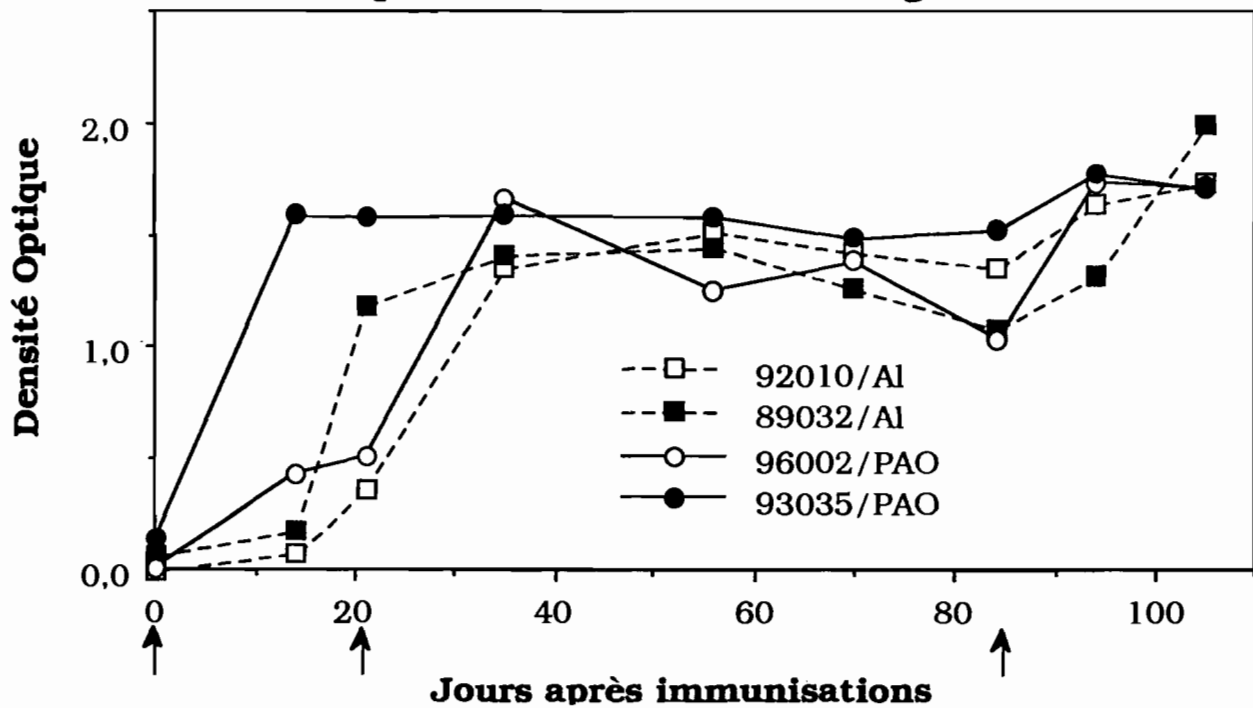


Figure 4: Réponses en Ac anti-TT en fonction du statut immunitaire

a/ Réponses en Ac anti-TT des singes SIV-



b/ Réponses en Ac anti-TT des singes SIV+



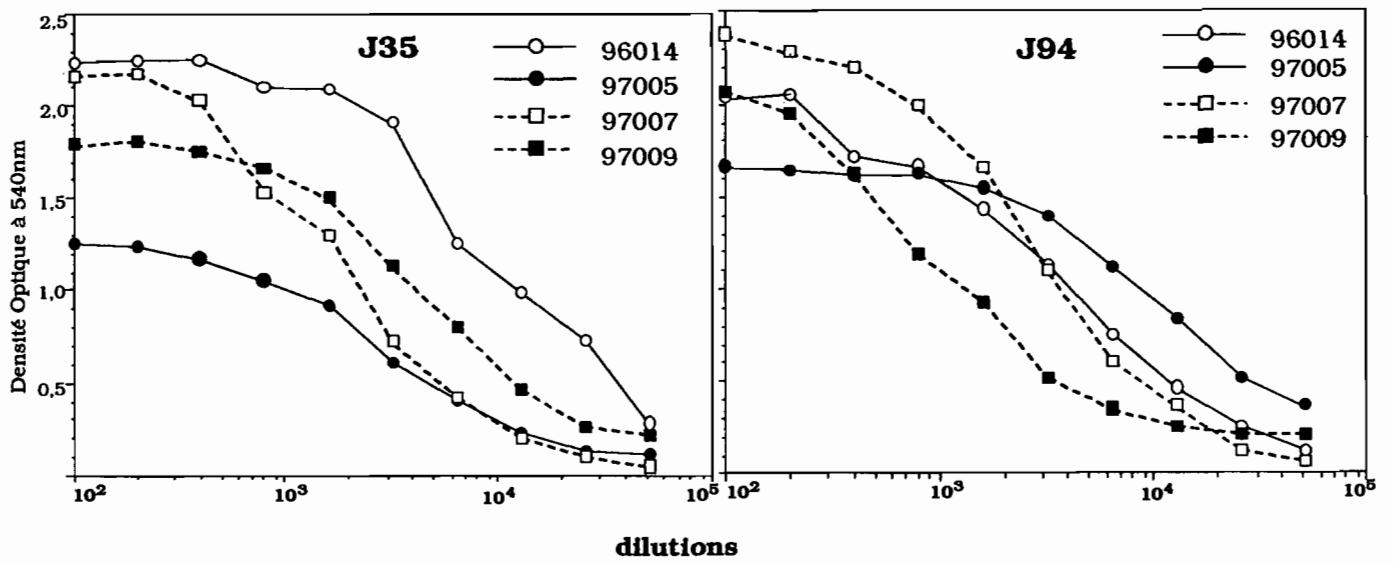


**Tableau VII: Titres en Ac anti- TT**

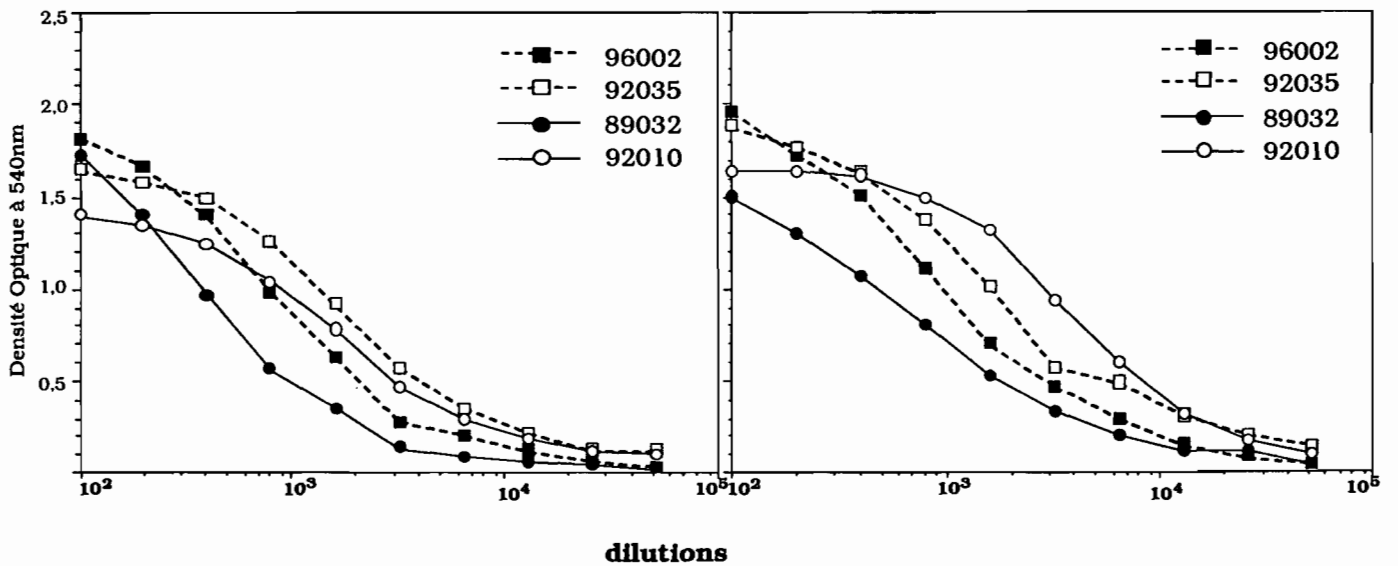
Jour	SINGES SIV+				SINGES SIV-			
	Alumine		PAO		Alumine		PAO	
	89032	92010	93035	96002	96014	97005	97007	97009
0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	800	800	25600	3200	3200	12800	1600	800
21	12800	6400	12800	3200	25600	51200	25600	3200
35	12800	>51200	12800	25600	>51200	>51200	51200	25600
<i>extrapol</i>		102400			204800	204800		
56	25600	>51200	12800	12800	>51200	>51200	51200	6400
<i>extrapol</i>		204800			204800	204800		
70	12800	51200	6400	12800	>51200	>51200	51200	6400
<i>extrapol</i>					204800	204800		
84	6400	51200	6400	12800	>51200	>51200	25600	6400
<i>extrapol</i>					204800	102400		
94	25600	>51200	12800	51200	>51200	>51200	>51200	51200
<i>extrapol</i>		204800			204800	409600	204800	
105	>51200	>51200	12800	51200	>51200	>51200	>51200	>51200
<i>extrapol</i>	204800	204800			204800	409600	204800	102400

**Figure 5: Titres des réponses en Ac à J35 et à J94**

**a/ Singes SIV-**



**b/ Singes SIV+**



les titres d'Ac chez un même animal à J35 et à J94, ou entre les titres en Ac des mêmes jours chez les différents animaux.

### **2.3.3.1. Cinétique de production d'anticorps**

- Chez les animaux SIV<sup>-</sup>

- Le 96014 présente une réponse significativement plus élevée à J35 qu'à J94 les taux d'Ac ensuite redescendent mais se maintiennent (présence d'un pic initial de réponse Ac).

- Le 97005: les taux d'Ac sont faibles à J35 faisant un palier de réponse Ac après deux injections qui croît significativement après la troisième.

- Le 97007 et le 97009 atteignent un maximum de réponse en Ac anti-TT à J35 non significativement différent de J94, il y a une baisse des taux d'Ac entre la deuxième et la troisième injection.

- Chez les animaux SIV<sup>+</sup>

Les titres sont analogues à J35, J84 et à J94 dans leur cinétique d'apparition chez trois singes, sauf le 92010 qui voit son titre augmenter significativement après la troisième injection.

### **2.3.3.2. Comparaison des réponses Ac entre les animaux: efficacité des adjuvants**

Au premier pic de réponse à J35 (Fig. 5a et b p.49), il ressort que l'alumine est significativement plus efficace que la PAO pour induire une réponse après deux injections. Les titres sont significativement plus élevés chez les singes SIV<sup>-</sup> immunisés par l'alumine que chez les animaux SIV<sup>+</sup> immunisés avec les deux

adjuvants (y compris le singe 92010 faisant une réponse Ac de type secondaire).

Tous les animaux SIV<sup>+</sup> ont des titres Ac significativement analogues quelque soit l'adjuvant (Fig. 5b p.49)). Ils sont comparables à ceux des singes SIV<sup>-</sup> immunisés par la PAO.

Au deuxième pic de réponse à J94, toutes les réponses Ac anti-TT sont significativement analogues, sauf pour le 89032 qui est en cours d'augmentation de son titre de réponse Ac atteignant le niveau général à J105. En d'autre terme, les adjuvants ont la même efficacité pour la production d'Ac anti-TT après trois immunisations quelque soit le statut immun de l'animal (fig. 4 p.47).

## **2.4. Réponse Ac anti-*P. falciparum***

### **2.4.1. Cinétique d'apparition des Ac contre les Ag recombinants**

Les signaux correspondants à la dilution au 1/100 des sérums sont montrés sur la Figure 6 (p.54) individualisant les réponses contre chaque Ag et contre la GST. L'utilisation des molécules couplées à la GST pose le problème de l'élimination du signal dû à la réponse dirigée contre la GST. Nous pouvons constater que la réponse Ac contre la GST est relativement majoritaire quand on compare les réponses anti-R23 mesurées sur la GST-R23 et sur la  $\beta$ -galactosidase-R23 (fig. 6{1}; 2,0 de DO contre 0,5).

A partir de là on peut remarquer que la réponse spécifique est significative contre chaque composant du mélange vaccinal.

Tout en sachant que la réponse réelle ne représente que 25% environ du signal détecté sur PfiEB200 et Pfi72 (fig. 6{3} et {2}), on peut constater que les deux adjuvants induisent une cinétique différente d'apparition des Ac: l'alumine fait monter rapidement les taux d'Ac spécifiques après deux injections alors qu'avec la PAO la troisième injection est nécessaire pour parvenir à un titre d'Ac à peu près comparable.

On retrouve chez le singe 93003 le même profil de réponse Ac anti-*P. falciparum* détectée sur Ag somatique (fig. 6{4} p.54).

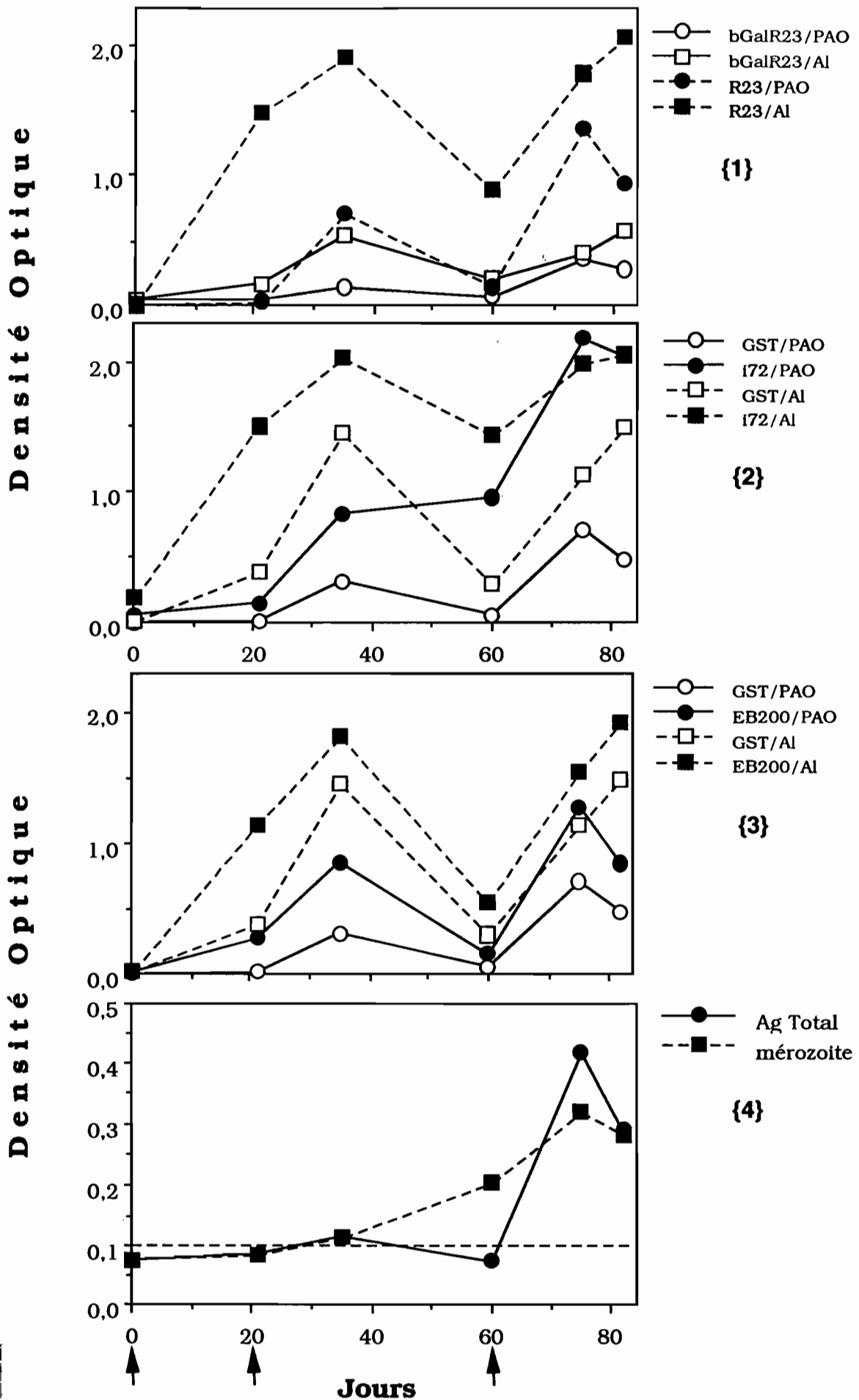
#### 2.4.2. Cinétique d'apparition des Ac contre *P. falciparum*

**Tableau VIII:** Titres en IFI de réponse en Ac anti-*P. falciparum* des animaux. SIV<sup>+</sup>

	No singes		
	92014	96002	96003
Ag vaccinant	Pfi72-EB200+R23		mérozoïtes
Adjuvant	Alum (50%)	PAO (10%)	PAO (10%)
jour 0	10	0	0
jour 21	10	0	0
jour 35	40	20	80
jour 60	20	10	80
jour 75	10	0	40
jour 84	10	20	40
<hr/>			
Témoin positif 10000			

Les titres IFI de réponse en Ac anti-*P. falciparum* sont faibles et sont en relation avec l'intensité des réponses Ac spécifiques.

Le singe 96003 immunisé avec les mérozoïtes a des titres significatifs en IFI qui ne corrèlent pas exactement avec la cinétique d'apparition des Ac détectés en ELISA. Il ressort qu'une bonne réponse en ELISA sur Ag total n'est pas le reflet de la réponse anti-*P. falciparum* mesurée en IFI. Les singes 92014 et 96002 ont des DO nulles sur ces Ag alors qu'ils reconnaissent significativement le parasite en IFI après immunisation par le mélange vaccinal d'Ag recombinants.



### **3. DISCUSSION:**

#### **3.1. Matériel animal**

Nous avons utilisé des animaux dont on ignore les antécédents biologiques puisque ce sont des sujets de capture, ils ont un passé variable de stabulation, cependant ils constituent la seule alternative pour l'expérimentation sur les primates du fait que leur élevage contrôlé est très onéreux. Les animaux que nous avons utilisé vivent dans les mêmes conditions. Néanmoins la différence d'âge et la différence dans la durée d'adaptation des animaux peuvent constituer une source de biais.

#### **3.2. Matériel de laboratoire et méthodes**

Les différentes manipulations que nous avons effectuées ont été possibles grâce à l'existence des réactions croisées entre plusieurs constituants biologiques du singe et de l'homme. L'extrême rareté et/ou l'absence de matériel d'expérimentation spécifique aux primates en général et à chacune des espèces simiennes en particulier nous a conduit à l'utilisation des réactifs prévus pour les tests humains. Ainsi le manque d'adaptation peut constituer une source d'erreur. C'est pourquoi les résultats de prolifération lymphocytaires, avec les mitogènes polyclonaux particulièrement, n'ont pas été constants. Il s'agit donc de résultats informatifs qui peuvent aider à la poursuite de la recherche dans ce domaine.



### 3.3. Etude de l'immunité liée à l'anatoxine tétanique

Dans cette étude nous avons analysé les réponses des effecteurs cellulaires et humoraux.

Les résultats que nous avons obtenus en culture lymphocytaire montrent que certains singes ne développent pas une lymphoprolifération *in vitro* (index de stimulation: IS va de 1 à 80). Les cellules des singes SIV+ prolifèrent beaucoup plus que celles des singes SIV- même avec les mitogènes polyclonaux.

En comparant les résultats obtenus avec les mitogènes, la PwM a un index de stimulation (IS: 1,8 à 3,1) faible; ce qui est en accord avec les résultats obtenus par **Gogovor (1993)**. Par ailleurs le mélange LPS/PHA a donné un index de stimulation plus élevé en le comparant à l'IS du PHA seul (**Gogovor, 1993**). Nous pouvons donc supposer que ce mélange serait plus efficace pour stimuler les lymphocytes des singes SIV+.

En ce qui concerne l'anatoxine tétanique, les résultats sont plus difficiles à exploiter du fait du manque de ceux du premier jour (J0). Néanmoins avec la plupart des index de stimulation qui sont à plus de 4, nous pouvons estimer avoir eu de bonnes réponses prolifératives par rapport à celles obtenues par **Perraut (1995)** chez les Saimiri (index de 2 à 4).

Sur le plan humoral tous les singes ont répondu à TT. Les réponses en Ac produits sont comparables dans leur cinétique à celles obtenues chez les Saimiri (**Perraut & al., 1993; Perraut, 1995**). Ceci prouve que l'anatoxine tétanique est un antigène très immunogène utilisable comme modèle commun. Cette forte

immunogénicité a été démontrée par **Perraut (1995)**, où une réponse Ac a pu être objectivée en l'absence d'adjuvant ce qui n'était pas le cas d'autres immunogènes. Pour le confirmer avec le singe vert, il faut un groupe contrôle Ag sans adjuvant, ce qui n'a pas été fait ici. Cette alternative est à envisager ultérieurement pour confirmer l'analogie du potentiel de réponse Ac chez ce modèle dans le contexte de son statut SIV.

Les cinétiques de production d'Ac ressemblent au profil obtenu chez le Saimiri. Mais on peut se poser la question de savoir si J21 n'est pas trop tôt chez les SIV<sup>-</sup> pour voir l'effet éventuel du premier rappel en fonction de l'adjuvant. Il nous semble dans ce cas que le rappel pourrait se faire après au moins un mois.

### **3.4. Étude de l'immunité due aux candidats vaccins anti *P. falciparum*.**

Les résultats que nous avons obtenus montrent que le singe vert, lorsqu'il reçoit l'antigène *P. falciparum* est capable de produire des Ac. Une réponse maximale a été obtenue pour chaque composante du mélange d'antigènes recombinants après deux immunisations. Un résultat équivalent a été trouvé chez les Saimiri pré-immuns (**Perraut, 1995**). Les Ac anti GST n'ayant pas été éliminés, nous ne pouvons pas comparer les réponses spécifiques. Cependant une réponse spécifique correcte est obtenue sur la  $\beta$ -galactosidase-R23 montrant exactement qu'il y a une réaction positive après le deuxième contact. Ceci prouve que le singe vert réagit plus vite que le Saimiri naïf qui ne répond qu'après trois immunisations (**Perraut, 1995**).

Le résultat obtenu avec les mérozoïtes montre que la réponse en Ac anti mérozoïtes est faible. Le test de phagocytose immune effectué montre que les phagocytes ne reconnaissent pas la surface des globules rouges parasités. D'où l'importance du contact avec le parasite vivant; c'est le cas du Saimiri avec une forte stimulation anti-*P. falciparum* et probablement une grande différence des singes pré-immuns dans ce cas (le parasite mort ne stimule pas les mêmes effecteurs ou nettement moins efficacement).

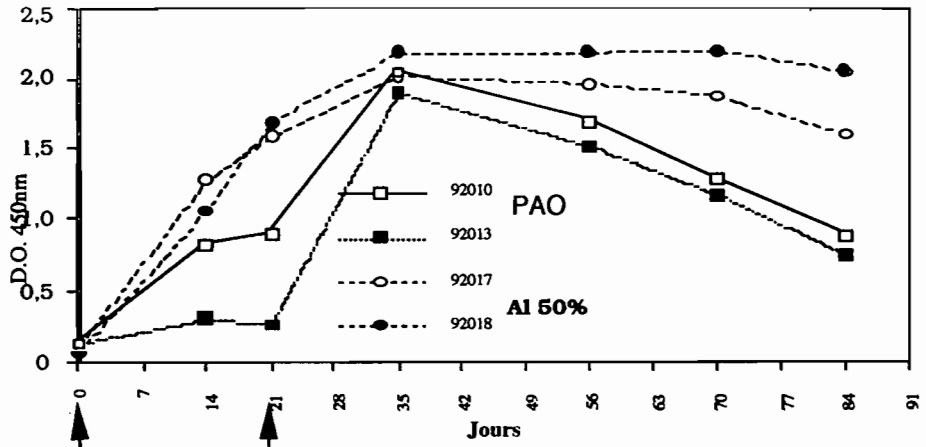
Cependant le singe vert peut être un bon modèle pour tester une réponse spécifique dont on peut éventuellement vérifier une propriété biologique: phagocytose, reconnaissance de surface etc...

### **3.5. Utilisation des adjuvants**

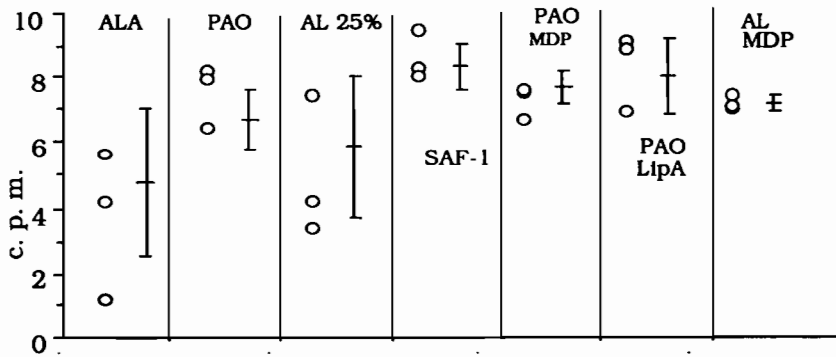
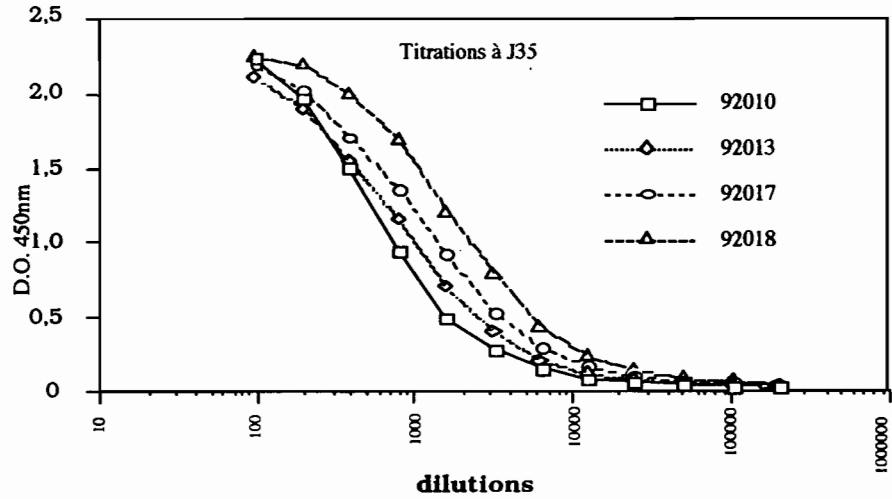
L'adjuvant peut amplifier la réponse immunitaire sur le plan quantitatif et/ou qualitativement. Dans notre étude nous avons essayé de l'apprécier d'une façon quantitative.

Les résultats obtenus dans le cas de la TT ou dans celui des candidats vaccins montrent que l'alumine semble être plus efficace que la PAO après deux immunisations. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Perraut (1995; 1996)** trouvés chez les Saimiri en présence des Ag différents (TT, Ag recombinant de la protéine de Herpes Simplex (HSVgD) et l'Ag gp160 de l'enveloppe du HIV-1), dont certains résultats sont rapportés ici (fig. 9 et 10 p.59). Au cours des études préliminaires effectuées à l'IPD ce même constat a été fait (fig. 7 p.59).

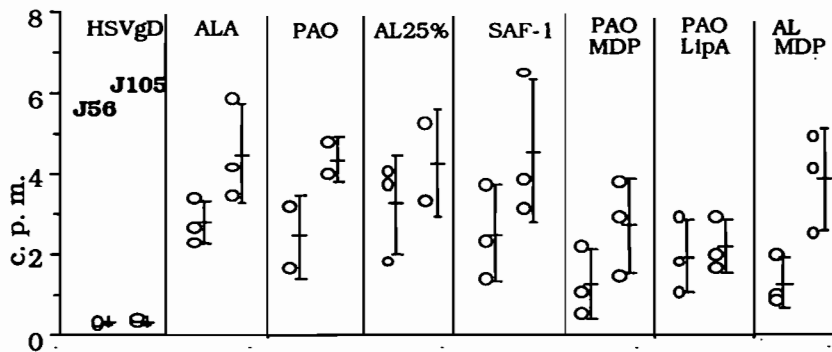
**Figure 7:**  
Réponses en Ac anti-TT en fonction de l'adjuvant (OLLOY A., com. pres.)



**Figure 8:**  
Titres en Ac anti-TT (OLLOY A., com. pers.)



**Figure 9:** Réponse Ac anti-TT à J56 en présence de divers adjuvants (Perraut, 1995)



**Figure 10:** Réponse Ac anti-HSVgD à J56 et J105 en présence des divers adjuvants (Perraut, 1996)

Dès lors le problème de la qualité des Ac produits subsiste puisque leurs propriétés biologiques n'ont pas été testées chez le singe vert avec l' Ag *P. falciparum*. Il faudrait aussi essayer d'autres adjuvants sur ce singe mais aussi l'appliquer à d'autres Ag car une modélisation qui utilise un seul Ag est restrictive.

### **3.6. La séropositivité des singes au SIV et leur état immunitaire**

Dans notre travail nous avons utilisé les singes négatifs au SIV et ceux qui sont positifs, afin de les comparer sur leur aptitude à réagir à un même Ag.

En effet face aux résultats obtenus, il est à remarquer que tous les animaux produisent des Ac; mais il y a une homogénéité dans la cinétique de la réponse en Ac chez les SIV+. Les mêmes observations ont été faites lors d'une étude préliminaire (fig. 8 p.59). Ceci pourrait donc être lié à leur état de porteurs inapparents. Ces résultats montrent aussi que le système immunitaire de ces singes n'a pas en fait été déprimé. L'état d'infection inapparente des singes verts (vervet) a été démontrée (**Muller, 1994; Nerrienet, 1993**). Gogovor a trouvé que chez le *C. sabaues* les perturbations immunologiques au moment de la séroconversion n'étaient que temporaires.

Dans le contexte des lymphoproliférations, nous avons constaté aussi que les cellules de ces singes SIV<sup>+</sup> dans leur majorité ont proliféré que ce soit avec les mitogènes ou avec la TT. Peut-on alors dire que le virus en vivant chez son hôte n'a pas d'effet sur son état immunitaire? **Nerrienet (1993)** dans ses travaux a démontré qu'il n'y avait pas de phénomène d'apoptose

au niveau circulant chez le singe vert infecté naturellement. De même **Diop (1993)** lors des études préliminaires sur l'apoptose chez ce singe a montré qu'il n'y avait pas de lien entre le phénomène et le statut immunitaire de l'animal. En tenant compte des travaux mentionnés ci-dessus, nous pouvons dire que le singe vert positif au SIV ne connaîtrait pas d'immunodépression. Ceci expliquerait probablement l'obtention d'une bonne réponse chez celui-ci.

**CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES**

De nos jours, la lutte contre les grandes endémies et en particulier celles dues aux rétrovirus (cas du SIDA) et aux hémoparasites (paludisme) lance un grand défi à la science. Les traitements qui demeurent aléatoires et onéreux d'un côté et de l'autre ceux-ci ayant perdu une partie de leur efficacité, rendent de plus en plus pressante la mise au point de vaccins.

Le singe étant l'animal le plus proche de l'homme sur le plan phylogénétique, il constitue généralement la dernière étape des essais vaccinaux avant le passage à l'homme. Le singe vert du Sénégal *Cercopithecus sabaeus*, porteur du SIVagm et abondant dans la sous-région reste peu exploité sur ce plan. C'est dans ce sens que ce travail a été envisagé.

L'utilisation du singe vert comme modèle en vaccinologie requiert une modélisation préliminaire en utilisant des Ag de référence. Nous avons abordé cet aspect en utilisant deux antigènes sur deux types de singes ayant des statuts différents par rapport à l'infection rétrovirale due au virus de l'immunodéficience simienne (SIV<sup>-</sup> et SIV<sup>+</sup>).

Ainsi nous avons mené un premier essai de modélisation vaccinale sur deux groupes de singes (1<sup>er</sup> groupe de 4 singes SIV<sup>-</sup> et un 2<sup>ème</sup> groupe de 4 singes SIV<sup>+</sup>) avec un antigène de référence bien connu, l'anatoxine tétanique, utilisé selon un protocole standardisé.

Comme autre modèle d'antigène nous avons utilisé des protéines représentant des fractions parasitaires (*P. falciparum*) chez trois singes SIV<sup>+</sup>.

L'analyse des résultats a été faite à l'aide des tests ELISA et d'IFI pour les Ag parasitaires permettant de mesurer les réponses des effecteurs humoraux par dosage des Ac. Des tests de transformation lymphoblastique ont contribué à l'analyse des réponses dues aux effecteurs cellulaires.

Enfin une analyse statistique des réponses Ac, utilisant le test de Wilcoxon (non paramétrique), nous a conduits aux résultats dont la teneur suit:



D'une part,

- les singes verts sont de très bons répondeurs vis à vis de l'anatoxine tétanique.
- la cinétique de cette réponse Ac est liée à la nature de l'adjuvant que nous avons utilisé, elle montre en particulier la haute efficacité de l'alumine vis à vis des deux Ag. Dans cet essai l'alumine a aussi été efficace dans l'induction des réponses prolifératives.
- l'état du singe par rapport au SIV semble jouer un rôle dans cette cinétique. Cependant, ces animaux SIV<sup>+</sup> au bout du compte répondent significativement aussi bien que les SIV<sup>-</sup>.
- Globalement, un protocole impliquant une immunisation conséquent avec au moins trois injections est à même d'induire une bonne réponse vaccinale.

D'autre part, l'utilisation d'antigènes recombinants nous a montré l'existence d'une bonne réponse spécifique avec les mêmes tendances de type de réponse Ac en fonction de l'adjuvant qu'avec l'anatoxine tétanique.

Ce travail ouvre une perspective nouvelle pour l'utilisation du singe vert comme modèle vaccinal, permettant d'envisager l'essai de nouveaux vaccins et de nouvelles stratégies vaccinales. C'est un modèle dans lequel l'infection par le SIV ne semble pas altérer de manière hautement notable les réponses Ac vis à vis des antigènes que nous avons testés. D'autres investigations doivent être menées afin de déterminer l'existence ou non d'une perturbation du système immunitaire qui serait capable d'influencer la qualité et la quantité des effecteurs humoraux.

Toutefois, le modèle singe vert ne pourra véritablement être reconnu valable pour des modélisations vaccinales que dans la mesure où une meilleure connaissance de sa biologie, de son anatomie et de ses différentes pathologies sera effective.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLAN, J. S., KANDA, P., KENNEDY, R. C., COBB, E. K., ANTONY, M. & EICHBERG, J. W. (1990). Isolation and characterisation of simian immunodeficiency viruses from two subspecies of African green monkeys. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6: 275-285.
- ALLISON, A. C. & BYARS, N. E. (1986). An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *J. Immunol. Methods* 95: 157-168.
- ALLISON, A. C. & GREGORIADIS, G. (1990). Vaccines: recent trends and progress. *Immunology* 11: 427.
- BOCCHIERI, M. H., TALLE, M. A., MALTESE, L. M., RAGUCCI, I. R., HWANG, C. C. & GOLSTEIN, G. (1995). Whole blood culture for measuring mitogen induced T cell proliferation provides superior correlations with disease state and T cell phenotype in asymptomatic HIV-infected subjects. *J. Immunol. Methods* 181: 233-243.
- BOMFORD, R. (1989). Adjuvants of ant-parasite vaccine. *Parasitol. Today* 5: 41.
- BONNEFOY, S., GUILLOTTE, M., LANGSLEY, G. & MERCEREAU-PUIJALON, O. (1992). *Plasmodium falciparum*: Characterization of gene R45 encoding a trophozoite antigen containing a central block of six amino acid repeats. *Exp. Parasitol.* 74: 441-451.
- BOUHAROUN-TAYOUN, H., ATTANATH, P., SABCHAREON, A., CHONGSUPHAJASIDDHI, T. & DRUILHE, P. (1990). Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion *in vitro*, but act in cooperation with monocytes. *J. Exp. Med.* 172: 1633-1641.
- BOX, H. O. & SCOTT, L. (1992). Provision of welfare of non-human primates used in biomedical research. *XIV Congress of the International Primatological Society, Strasbourg*. Abstract N°0042, p32.
- CAPRON, A., LOCHT, C., ET FRACCHIA, G. N. (1994). Safety and efficacy of a new generation vaccines. *Vaccine* 12: 667.

- COLLINS, W. E. (1992). South American monkeys in the development and testing of malarial vaccines - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87: 401-406.
- DAVIS, H. L., MICHEL, M.-L. & WHALEN, R.G. (1993). DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high level of circulating antibody. *Human Mol. Genetics* 11: 1847-1851.
- DEMONTOY-BONSEL, M. C. (1986). Contribution à la pathologie des primates. *Rec. Méd. Vét.* 162 (3): 411-425.
- DEPUTE, B. L. (1990). *Primates*, (948-1002) In *Encyclopedia Universalis*. Paris: Corpus, Vol.18, 1065p.
- DIOP, O. (1992). Rétrovirus simiens: dans *Rapport sur le Fonctionnement de l'Institut Pasteur de Dakar*, Dakar: p. 98.
- DIOP, O. (1993). Rétrovirus simiens: dans *Rapport sur le Fonctionnement de l'Institut Pasteur de Dakar*, Dakar: p. 97.
- DUBOIS, P., DEDET, J., FANDEUR, T., ROUSSILHON, C., JENDOUBI, M., PAUILLAC, S., MERCEREAU-PUIJALON, O. & PEREIRA DA SILVA, L. (1984). Protective immunization of the squirrel monkey against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by use of parasite protein fractions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 229-232.
- ELDRIDGE, J. H., STAAS, J. K., MEULBROEK, J. A., MC GHEE, J. R., TICE, T. R. & GILLEY, R. M. (1991). Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Molecular Immunology* 28: 287-294.
- ENDERS, B., HUNDT, E., BERNHARDT, D., SCHORIEMMER, H.U., WEINMANN, E. & KÜPPER, H. A. (1990). Comparative studies on the influence of different adjuvants on serum conversion after immunization with tetanus toxoid and recombinant malaria and viral antigens in mice and monkeys. In: *Vaccines 90. Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*, edited by Brown, F.,

Chanock, R. M., Ginsburg, H. S. and Lerner, R. A. New York: Cold Spring Harbour Press, p. 29.

FREUND, J. & BONANTO, M.V. (1944). The effect of parafin oil, lanolin substances, and killed tubercle bacilli on immunization with diphtheric toxoid and *Bact. typhosum*. *J. Immunol.* 48: 325-320.

FREUND, J. & MC DERMOTT, K. (1942). Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 548-540.

GALAT, G. (1975). Eco-éthologie de *Cercopithecus aethiops sabaeus* en limite d'aire de repartition au Sénégal. *centre ORSTOM*, multigr.

GALAT, G. (1983). Socio-écologie du singe vert *Cercopithecus aethiops sabaeus* en référence de quatre Cercopithécinés forestiers sympatriques (*Cercocebus atys*, *Cercopithecus campbelli*, *C. diana*, *C. petaurista*) d'Afrique de l'ouest. *Thèse Doctorat d'Etat. Université Pierre et Marie Curie, Paris* 500 p.

GALAT, G. & GALAT-LUONG, A. (1976). La colonisation de la mangrove par *Cercopithecus sabaeus* au Sénégal. *La Terre et la Vie Revue d'Ecologie.* 30 (1): 3-30.

GALAT, G. & GALAT-LUONG, A. (1977). Démographie et régime alimentaire d'une troupe de *Cercopithecus aethiops sabaeus* en habitat marginal au nord Sénégal. *La Terre et la Vie Revue d'Ecologie.* 31: 557-577.

GALAT, G. & GALAT-LUONG, A. (1978). Diet of green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) in Senegal. Recent Advances in Primate Behaviour. Proceedings of VIth Congress of the International Primate Society Cambridge: Academic Press. 257-258.

GALAT, G., POURRUT, X., GALAT-LUONG, A., MBOUB, S., DURAND, S. & BERNARD, P. (1996). Infection par le SIV et protéinémie chez les singes verts *in natura* au Sénégal. VIII colloque de la SFDP. CSRA Mulhouse France.

- GARRAUD, O. (1993). Contribution à la caractérisation d'effecteurs cellulaires du système immunitaire chez le singe écureuil (*Saimiri sciureus*): application à l'étude expérimentale des paludismes humains. *PhD Thesis/Univ Paris VI* . 403 p.
- GARRAUD, O., GROUX, H., POINGT, J.P. & GYSIN, J. (1990). Limited MHC-class II polymorphism within squirrel monkeys of the same karyotype. *Med. Sci. Res.* 18: 359-361.
- GARRAUD, O., PERRAUT, R., GYSIN, J., BEHR, C., DUBOIS, P., BONNEMAINS, B., JOUIN, H., MICHEL, J.C. & PEREIRA DA SILVA, L. (1994). Manipulating blood T-cells and B-cells from squirrel monkeys: some technical considerations. *J. Immunol. Methods* 173: 165-173.
- GLENNY, A. T., POPE, C. G., WADDINGTON, H. & WALLACE, U. (1926). Immunological notes. *J. Pathol. Bact.* 29: 31-30.
- GOGOVAR, K. A .E. (1993). Etudes éthologique et immunologique du singe vert *Cercopithecus aethiops sabaesus* infecté par le SIV. *Thèse de Doct. Vét.* Dakar n°16.
- GROUX, H., PERRAUT, R., GARRAUD, O., POINGT, J. P. & GYSIN, J. (1990). Functional characterisation of the antibody-mediated protection against blood stages of *Plasmodium falciparum* in the monkey *Saimiri sciureus*. *Eur. J. Immunol.* 20: 2317-2323.
- GYSIN, J., GAVOILLE, S., MATTEI, D., SCHERF, A., BONNEFOY, S., MERCEREAU-PUIJALON, O., FELDMAN, T., MÜLLER-HILL, B. & PEREIRA DA SILVA, L. (1993). *In vitro* phagocytosis inhibition assay for the screening of potential candidate antigens for sub-unit vaccines against the asexual blood stage of *Plasmodium falciparum*. *J. Immunol. Methods* 159: 209-219.
- GYSIN, J., MOISSON, P., DASILVA, L. P. & DRUILHE, P. (1996). Antibodies from immune african donors with a protective effect in *Plasmodium falciparum* human infection are also able to control asexual blood forms of the parasite in saimiri monkeys. *Res. Immunol.* 147: 397-401.

- GYSIN, J., PAUILLAC, S. & FANDEUR, T. (1987). Characterization by anti-Ig monoclonal antibodies of protective and non-protective antibodies against asexual forms of *Plasmodium falciparum* in the saimiri monkey. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 138: 829-844.
- KENSIL, C. R., PATEL, U., LENNICK, M. & MARCIANI, D. (1991). Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria molina* cortex. *J. Immunol.* 146: 431-437.
- KNAPP, B., HUNDT, E., ENDERS, B. & KUPPER, H. A. (1992). Protection of *Aotus* monkeys from malaria infection by immunization with recombinant hybrid proteins. *Infect. Immun.* 60: 2397-2401.
- LECLERC, S., HAZEBROUCQ, G. Et al. (1991). Vaccins Dorvault l'officine XXIIe édition. Ed Vigot Paris: 1797-1800.
- LUSSOW, A. R., AGUADO, M. T., DEL GIUDICE, G. & LAMBERT, P. H. (1990). Towards vaccine optimisation. *Immunology* 25: 255-264.
- MATTEI, D. & SCHERF, A. (1992). The Pf332 gene of *Plasmodium falciparum* codes for a giant protein that is translocated from the parasite to the membrane of infected erythrocytes. *Gene* 110: 71-79.
- MERCEREAU-PUIJALON, O. (1993). Les réponses immunes contre les stades sanguins asexués de *Plasmodium falciparum* et leurs cibles antigéniques. *Cahiers Santé* 3: 256-266.
- MILLER, L. H., GOOD, M. F. & KASLOW, D. (1997). The need for assays predictive of protection in development of malaria bloodstage vaccines. *Parasitol. Today* 13: 46-47.
- MORRIS, W., STEINHOFF, M. C. & RUSSELL, P. K. (1994). Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation. *Vaccine* 12:

- MULLER, M. C., (1995). Diversité génétique des retrovirus simiens d'Afrique chez leurs hôtes naturels et chez une espèce hétérologue. *Thèse de Doctorat de l'Université Paris 7* .
- NERRIENET E. (1993). Variabilité génétique des HIV/SIV et pathogénèse lentivirale: un modèle d'étude, l'infection non pathogène du singe vert. *Thèse de Doctorat de Université de Paris VI*.
- OSMAN-HILL, W. C. (1966) Primates: comparative anatomy and taxonomy. Part VI Catarrhini Cercopithecoidea Cercopithecinae, New-York: *Interscience*, p. 538-554.
- PATTAROYO, M. E., AMADOR, R., CLAVIJO, P. ET AL. (1988) A syntétique vaccineprotects humans against challenge of asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 332: 158-161.
- PERRAUT, R. (1995). Approche expérimentale au développement de stratégies vaccinales: utilisation du singe écureuil (*Saimiri sciureus*) pour l'évaluation d'adjuvants de l'immunité et de candidats vaccins contre le paludisme, *PhD Thesis*, Paris: Université de Paris V. 283 p.
- PERRAUT, R., CHOUTEAU, P., BOURREAU, E., BONNEMAINS, B. & GARRAUD, O. (1994). Assays for adjuvanticity of new formulations and of carrier proteins for inducing antibody responses to selected immunogens in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Immunol. Cell. Biol.* 72: 169-175.
- PERRAUT, R., MERCEREAU-PUIJALON, O., MATTEI, D., BOURREAU, E., GARRAUD, O., BONNEMAINS, B., PEREIRA DA SILVA, L. & MICHEL, J.C. (1995). Induction of opsonizing antibodies after injection of recombinant *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in preimmune *Saimiri sciureus* monkeys. *Inf. Immun.* 63: 554-562.
- PERRAUT, R., MERCEREAU-PUIJALON, O., MATTEI, D., BOURREAU, E., BONNEFOY, B., BONNEMAINS, B., GYSIN, J., MICHEL, J. C. & PEREIRA DA SILVA, L. (1997). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in



naive squirrel monkey *Saimiri sciureus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (In Press)

POURRUT, X. P. Y. (1993). Les associations plurispécifiques des simiens de la forêt de Fathala: implication sur la transmission du SIV. *Thèse de Doctorat Vétérinaire :Toulouse, N° TOU3-4029.*

RADAELLI, A. & MORGHEN, C. D. G. (1994). Expression of HIV-1 envelope gene by recombinant avipox viruses. *Vaccine* 12: 1101-1105.

ROBINSON, H. L., HUNT, L.A. & WEBSTER, R.G. (1993). Protection against lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11: 957-950.

SIDDIQUI, W. A., TAYLOR, D. W., KAN, S. C., KRAMER, K., RICHMOND-CRUM, S. M., KOTANI, S., SHIBA, T. & KUSUMOTO, S. (1978). Vaccination of experimental monkeys against *Plasmodium falciparum*: a possible safe adjuvant. *Science* 201: 1237-1238.

SMITH, D. & JOHNSON, K. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene* 29: 31-40.

STOUTE, J. A., SLAOU, M., HEPPNER, D. G. , MOMIN, P. & al. (1997). A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* 336: 86-91.

VICARIA FABREGAS, J. B. (1965) Les Primates animaux de laboratoire, Paris: Vigot et frères, 134p.

WHALEN, R. G. (1996). DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if? *Emerg. Infect. Dis.* 2: 168-175.

WHO/OMS (1988). Menerandum of a WHO meeting: Role of non-human primates in malaria vaccine development. *Bull. WHO/OMS.* 66: 719

- WOODARD, L. F. (1990). Surface chemistry and classification of vaccine adjuvants and vehicles. *Bacterial Vaccines* 281-306.
- XUAMANO, J. C., KIYONO, H., JACKSON, R. J., STAATS, H. F., FUJIHASHI, K., BURROWS, P. D., ELSON, C. O., PILLAI, S. & MCGHEE, J. R. (1993). Helper T Cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.* 178: 1309-1320.
- ZIGANE, J. B. (1983). Eléments d'éthologie et étiologie des troubles de capture et de l'acclimatisation du Cynocéphale et du Patas du Sénégal. *Thèse de Doctorat Vétérinaire* , Dakar N°8.

**ANNEXES**

## **Les solutions tampons**

### **\* Tampon de coating:**

- Tampon de carbonate 1M pH 9,6:
- Mélanger sous le pH mètre NaCO<sub>3</sub> jusqu'au pH 9,6 (environ 1 volume de chaque). A utiliser au 1/10 = 0,1M pH 9,6.

### **\* Tampon PBS:**

- 1000 ml d'eau distillée + 10 comprimés de PBS.

### **\* Tampon de saturation**

- Tampon PBS +BSA 5%.
- Tampon PBS + Lait écrémé 5%.

### **\* Tampon de dilution des sérums.**

- Tampon PBS + 0,05% TWEEN + 2,5% LAIT + 0,01% AZIDE
- Tampon PBS + 0,05% TWEEN + 1% BSA + 0,01% AZIDE
- Tampon PBS + 0,05% TWEEN + 0,5% + 0,01% AZIDE

### **\* Tampon de dilution des conjugué**

- Tampon PBS + 0,1% TWEEN
- Tampon PBS + 0,05% TWEEN + 1% BSA
- Tampon PBS + 0,05% TWEEN+ 0,5% GELATINE

## **Matériel de l'aboratoire**

### **• IFI**

- Anti-IgG marquée à la fluorescéine Biosys
- Bleu Evans
- Glicérol 70%
- Lames d'immunofluorescence à 12 spots (Dymatech)
- Microscope à fluorescence

- **ELISA**

- Plaques MaxiSorp® (Nunc, Danemark) à fond plat (96 puits)
- Tubes Eppendorf 1,5 ml (Polylabo®)
- Pipettes pasteur 5 ml, 10 ml (Falcon®)
- Micropipettes Pipetman 20, 200, 1000  $\mu$ l et cônes (Gilson®)
- Tubes de dilution
- Lecteur de plaques: Spectrophotomètre. TITERTEK MULTISKAN MCC/340
- Laveur de plaque: TITERTEK MICROPLATE Washer 120 (Flow - laboratories)

- **Test de transformation lymphoblastique**

**Matériel**

- Ficoll 1077 (LSM, Oganon Teknika N<sup>D</sup>)
- Bleu trypan
- RPMI tampon
- RPMI SVF à 10% soit RPMI tampon + serum AB
- Thymidine tritiée
- Plaques Immulon- 4® (Dynatech Microtiter, USA) à fond conique (96 puits)
- Skatron pour récolter les cellules
- Filtres
- Liquide de scintillation
- Compteur- $\beta$  (RACKBETA N<sup>D</sup>)

**Protocole**

- Après séparation des lymphocytes sur gradient de ficoll, faire le comptage au microscope à fluorescence par la cellule de MALASSEZ remplie d'une suspension cellulaire + du bleu trypan
- Diluer les cellules dans du RPMI SVF (sérum de veau foetal) à 10% pour avoir une concentration finale de  $10^6$  cellules par ml
- Préparer les dilutions des mitogènes et l'antigène dans du RPMI SVF.

- Distribuer les mitogènes et l'antigène en triplicat sauf dans les cupules témoins
- Ajouter 200 $\mu$ l de suspension cellulaire dans chaque cupule
- Incuber les plaques à l'étuve en CO<sub>2</sub> (5%) à 37°C pendant 6 jours
- Ajouter 10 $\mu$ l de thymidine tritiée au 1/10 dans chaque cupule 16 heures avant que les cellules ne soient récoltées
- Les cellules sont récoltées au skatron sur des disques de filtre
- Après séchage, déposer chaque disque dans une fiole contenant du liquide de scintillation et lire au compteur bêta qui donne les résultats en coups par minute (cpm).

# SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR



«Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, fondateur de l'enseignement vétérinaire dans le monde, je promets et je jure devant mes maîtres et mes aînés :

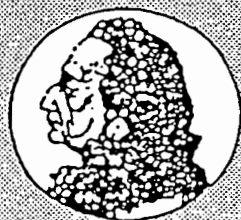
D'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire.

D'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le code de déontologie de mon pays.

De prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire.

De ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.

**QUE TOUTE CONFIANCE ME SOIT RETIREE S'IL  
ADVIENT QUE JE ME PARJURE.**



Claude BOURGELAT (1712 - 1779)



**Application d'un modèle primate *Cercopithecus (aethiops) sabaeus* pour l'étude de stratégies vaccinales: mise en place du modèle et vaccinations expérimentales**

ECOLE INTER-ETATS  
DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES  
VETERINAIRE DE L'UNIVERSITÉ  
BIBLIOTHÈQUE

**Résumé**

L'étude que nous présentons est une modélisation préliminaire qui utilise deux antigènes (l'anatoxine tétanique et l'antigène *P. falciparum*) sur des singes verts, *C. sabaeus* de statut différent (SIV- et SIV+). Cette étude montre que ces animaux sont des bons répondeurs vis à vis de l'anatoxine tétanique. Une réponse spécifique a été obtenue avec les antigènes recombinants.

La cinétique de la réponse anticorps est liée à la nature de l'adjuvant utilisé; elle montre en particulier la haute efficacité de l'alumine par rapport à PAO vis à vis des deux Ag et dans l'induction des réponses prolifératives.

Même si le statut SIV semble influencer la cinétique des réponses Ac, les SIV+ répondent significativement aussi bien que les SIV-. L'infection par le SIV ne semble pas altérer de manière notable les réponses Ac contre ces deux Ag.

**Mots clés:**

*Cercopithecus sabaeus*, modélisation, vaccination, l'anatoxine tétanique, l'Ag *P. falciparum*, adjuvants, réponses immunitaires.

**Adresse de l'auteur:** Mahamodou YAYA s/c TCHACROME Tchaby  
B.P. 326 Lomé TOGO