

## DÉVELOPPEMENT D'UNE HYPERSENSIBILITÉ RETARDÉE chez des lapins infestés par les femelles d'*Ixodes ricinus* L.<sup>1</sup>

P. GIRARDIN et M. BROSSARD\*

**RÉSUMÉ.** Au cours de 4 infestations successives par *I. ricinus* L., la peau de lapin se sensibilise progressivement aux antigènes salivaires des ectoparasites. Le phénomène est décelé par la mesure au micromètre d'un repli dermique au point d'injection de l'extrait salin antigénique.

Un léger épaissement de la peau des lapins infestés est noté durant l'heure suivant d'administration d'antigène. Il est sans doute dû à une faible hypersensibilité cutanée de type immédiat. L'épaississement est maximal après 24 à 48 h et s'amplifie au cours des infestations. Cette réaction tardive est certainement l'expression d'une hypersensibilité de type retardé (type IV = tuberculinique classique).

### Development of delayed-type hypersensitivity by rabbits infested with *Ixodes ricinus* L. females

**SUMMARY.** During the course of 4 successive infestations with *I. ricinus* L., the skin of rabbits became progressively more sensitive to the salivary antigens from the ectoparasites. The phenomenon was evaluated by measuring a skin fold at the point of injection of the antigenic saline extract.

A slight thickening of the skin of infested rabbits was observed during the hour following application of antigen. It is without doubt due to a weak cutaneous immediate type hypersensitivity. The skin thickness was at a maximum after 24 to 48 hrs and increased with each infestation. This late reaction is certainly the expression of a delayed-type hypersensitivity (type IV = classical tuberculin reaction).

## I — Introduction

Des lapins acquièrent progressivement une résistance contre la piqûre des femelles d'*Ixodes ricinus* L. au cours de 4 infestations successives (Bowessidjaou et coll., 1977 ; Brossard et coll., 1982). Ce phénomène affecte la biologie des ectoparasites. La durée moyenne du repas sanguin est prolongée, la prise de sang et le rendement des pontes sont diminués. La résistance perturbe également l'embryogenèse. Cette immu-

1. Travail ayant bénéficié de l'appui du Fonds national suisse de la recherche scientifique, requête n° 3'070.81. Il constitue une partie d'une thèse de P. Girardin.

\* Institut de Zoologie, Université, rue de Chantemerle 22, CH-2000 Neuchâtel.

Accepté le 4 juin 1984.

nité peut être partiellement transférée au moyen d'immunsérum d'animaux pluri-infestés (Brossard, 1977 ; Brossard et Girardin, 1979).

Le site de fixation des tiques dans la peau des lapins est fortement infiltré par des cellules mononucléées et polynucléées (Brossard et Fivaz, 1982). Ainsi, des basophiles affluent et dégranulent en plus grand nombre au cours d'une réinfestation que lors d'une primo-infestation des animaux. Cette réaction est similaire à une anaphylaxie cutanée à basophiles. Ces leucocytes sont en effet sensibilisés contre les antigènes salivaires de tiques, phénomène démontré par un test de dégranulation *in vitro* (Brossard et coll., 1982). Les éosinophiles sont mobilisés plus précocement et aussi de manière plus intense, tandis que neutrophiles et lymphocytes envahissent le tissu massivement quelle que soit l'infestation. Les mastocytes dégranulent également en plus forte proportion au cours d'une réinfestation. Cette dernière observation caractérise sans doute le développement d'une hypersensibilité de type immédiat.

Les effets de l'immunité des lapins sur la biologie des tiques sont diminués par l'injection quotidienne de mépyramine, un anti-histaminique-H1 (Brossard, 1982). Cette expérience démontre l'importance de l'histamine dans l'expression de la résistance.

L'étude présente montre que des lapins infestés par *I. ricinus* développent de surcroît une hypersensibilité de type retardé. Au cours de 4 infestations successives des animaux, le phénomène évolue progressivement.

## II — Matériel et méthodes

### 2.1 Lapins

Cinquante-cinq lapins (10 par infestation et 15 contrôles) de souche Himalayenne et de génotype aac<sup>u</sup>c<sup>u</sup> ont été utilisés. Lors des expériences, ils étaient âgés de 3 mois (contrôles et première infestation) à 6 mois et demi (4<sup>e</sup> infestation) et pesaient 2,5 kg en moyenne. Ces animaux ont été infestés par 10 femelles et 10 mâles d'*I. ricinus*. Seules les femelles de cette espèce se gorgent, mais la copulation est nécessaire à une prise de sang normale (Graf, 1978a). L'essai cutané a été réalisé 15 jours après la fin de chaque infestation (*fig. 1*). Le même intervalle a été respecté avant de réinfester les animaux des autres lots.

### 2.2 Tiques

Les tiques *I. ricinus* utilisées pour les infestations et la préparation d'antigène sont élevées dans notre laboratoire selon la méthode de Graf (1978b). Lors de l'infestation des lapins, les tiques sont déposées dans un fourreau de drap fixé à la base de l'oreille de l'hôte et fermé à son extrémité distale au moyen de toile adhésive. Un large collier empêche les lapins de se défaire des parasites par grattage.

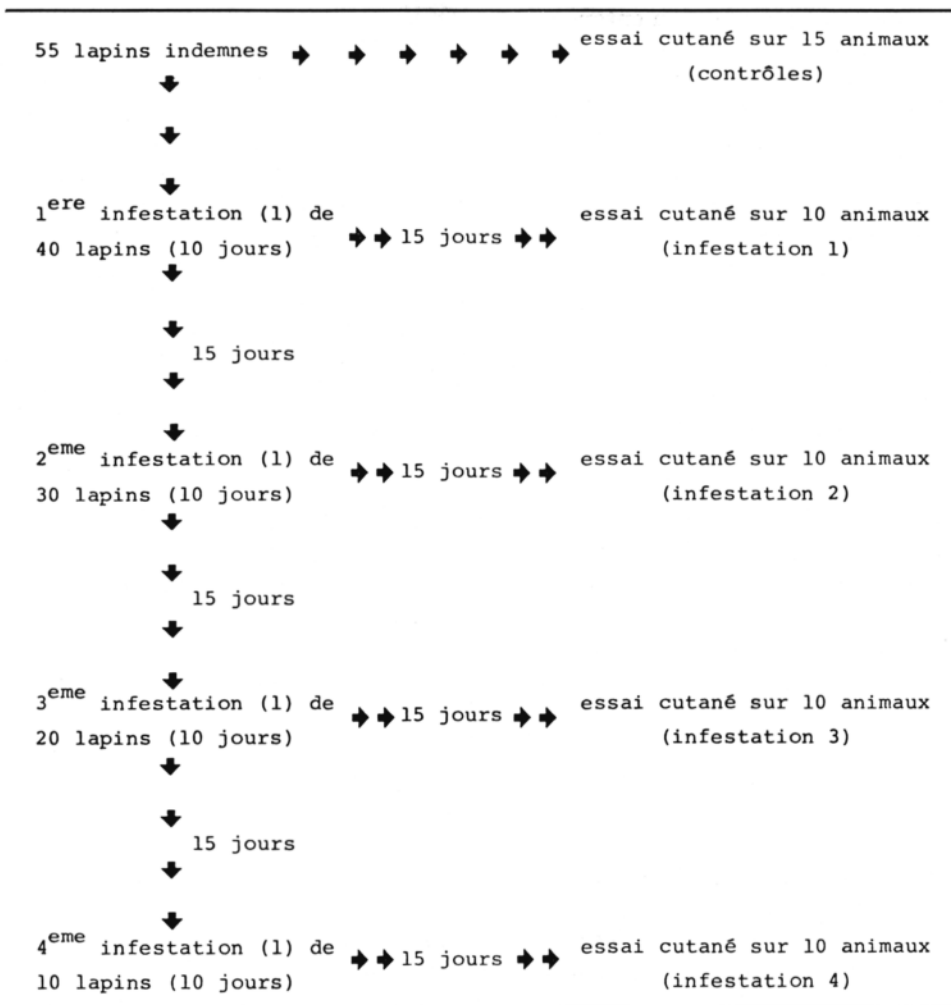


FIG. 1. — Schéma expérimental.

(1) : 10 ♀♀ et 10 ♂♂ d'*I. ricinus*.

### 2.3 Antigène

Après 4 jours de nutrition sur lapin, des femelles d'*I. ricinus* sont disséquées. Les glandes salivaires sont prélevées, lavées, puis broyées dans du tampon phosphate 0,01 M à pH = 7,2 maintenu à 4° C. Le broyat est centrifugé pendant 30' à 10 000 G et 4° C. Le surnageant est dialysé pendant 24 h (membrane sélective pour des PM > 7-8 000) à 4° C contre le même tampon. Les protéines du dialysat sont dosées selon la méthode de Lowry et coll. (1951). L'antigène est conservé lyophilisé.

## 2.4 Mesure de la réaction cutanée

Toutes les 10 minutes pendant l'heure suivant les injections d'antigène, ainsi qu'après 6, 24, 48, 72 et 96 h, la réaction cutanée est évaluée par la mesure au micromètre de l'épaisseur d'un repli de la peau des lapins. Le ventre des animaux est rasé 24 h avant le début des expériences. Les mesures sont effectuées au centre de 3 disques d'un diamètre approximatif de 1 cm, dessinés avec un stylo feutre, et distants d'au moins 5 cm. Deux surfaces servent de contrôle : l'influence de l'injection de 50  $\mu$ l de tampon phosphate 0,01 M à pH = 7,2 et du pincement de la peau par le micromètre est estimée respectivement dans les disques 1 et 3. Le troisième endroit (disque 2) est réservé à l'administration de l'antigène. La dose antigénique optimale a été expérimentalement fixée à 50  $\mu$ g dans 50  $\mu$ l de tampon phosphate 0,01 M à pH = 7,2. Les essais préliminaires avaient été effectués sur des lapins immuns avec les doses respectives de 5, 10, 20, 50, 100 et 200  $\mu$ g.

## 2.5 Traitement des résultats

Une statistique globale des données a été réalisée pour chaque groupe de lapins (contrôles et infestations 1 à 4). Il a ensuite été procédé à des tests de Student pour détecter des différences d'épaississement significatives :

- entre les trois disques choisis,
- entre les intervalles de mesure (cinétique de la réaction),
- entre les différentes infestations, au point d'injection de l'antigène.

# III — Résultats

## 3.1 Remarques préliminaires

Le diamètre des indurations apparues au seul point d'injection de l'antigène chez les lapins infestés n'a pas été pris en considération. Cette mesure est trop imprécise et de grandes variations sont enregistrées entre animaux d'un même groupe. L'expression des épaisissements de la peau en pourcents ou en quotients par rapport aux épaisseurs initiales a été écartée : quels que soient les surfaces ou groupes de lapins choisis, l'accroissement dermique n'a jamais été, pour un intervalle de temps fixé, proportionnel à l'épaisseur initiale.

## 3.2 Statistique globale (tableau I)

Chez les lapins contrôles, on note un léger accroissement moyen de la peau, maximal et non spécifique après 30' dans le disque 1 (injection du solvant), 24 h dans le disque 2 (injection de l'antigène) et 50' à 6 h dans le disque 3 (aucune injection). Il reste borné à des valeurs très modestes (respectivement 0,28 mm, 0,45 mm et 0,16 mm).

TABLEAU I. — Statistique globale.

SITE	TEMPS	Contrôles		Infest. 1		Infest. 2		Infest. 3		Infest. 4	
		MOY.	E.-T.	MOY.	E.-T.	MOY.	E.-T.	MOY.	E.-T.	MOY.	E.-T.
1	10'	18	8	24	14	18	15	29	24	17	11
1	20'	22	12	26	16	32	25	21	20	20	14
1	30'	28	15	27	23	30	20	26	23	19	15
1	40'	27	16	25	20	27	22	28	23	21	15
1	50'	23	15	21	23	32	25	25	23	19	11
1	60'	23	16	22	20	31	26	24	19	20	11
1	6 h	21	15	15	13	29	31	23	17	20	12
1	24 h	14	10	29	25	26	36	13	10	17	13
1	48 h	10	14	22	23	12	13	12	6	15	12
1	72 h	8	10	19	24	11	18	7	6	7	4
1	96 h	4	4	15	25	16	29	4	3	6	6
2	10'	24	19	27	17	10	8	29	21	26	18
2	20'	33	29	37	17	26	17	36	24	37	26
2	30'	43	39	39	21	38	21	45	33	40	26
2	40'	43	39	36	15	37	24	61	43	50	28
2	50'	39	30	31	16	37	19	48	35	47	25
2	60'	39	28	33	20	35	15	48	36	49	28
2	6 h	34	26	64	25	80	22	100	55	113	43
2	24 h	45	30	106	54	213	64	269	166	224	62
2	48 h	38	43	87	44	212	93	302	144	242	66
2	72 h	25	32	74	43	188	112	209	99	192	63
2	96 h	24	32	43	22	130	96	151	106	133	60
3	10'	9	9	13	12	3	3	9	10	6	4
3	20'	10	10	13	15	6	5	10	10	12	7
3	30'	12	11	18	20	8	7	15	12	10	10
3	40'	13	11	21	22	13	9	17	10	13	8
3	50'	16	13	21	25	13	9	17	9	17	11
3	60'	16	14	23	22	13	11	17	10	17	13
3	6 h	16	12	19	18	13	9	17	7	11	8
3	24 h	9	6	23	13	15	14	10	9	17	12
3	48 h	4	4	15	12	10	13	17	11	21	20
3	72 h	5	4	11	8	6	3	11	9	14	9
3	96 h	3	2	6	5	6	10	7	8	7	7

Contrôles : n = 15

Infestations 1-4 : n = 10

MOY. : moyennes (centièmes de mm)

E.-T. : écarts-types (centièmes de mm)

Chez les animaux infestés, aucun accroissement notable n'est également décelé aux deux sites témoins (1 et 3), les épaisissements maximaux relevés étant respectivement de 0,32 mm (infestation 2, site 1) et de 0,23 mm (infestation 1, site 3).

Au site d'injection de l'antigène (disque 2), l'épaisissement maximal moyen apparaît au bout de 24 h chez les lapins infestés 1 fois (1,06 mm) et 2 fois (2,13 mm).

C'est chez les lapins ayant subi 3 infestations que l'accroissement moyen d'un repli dermique est le plus élevé (3,02 mm après 48 h).

Enfin, après 4 infestations des lapins, la mesure maximale est obtenue après 48 h (2,42 mm). Elle avoisine celle relevée chez les lapins infestés à deux reprises.



TABLEAU II (suite).

		INFESTATION 1										
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
T1												
T2												
T3												
T4												
T5												
T6												
T7		***	**	*	**	**	**					
T8		***	***	***	***	***	***	*				
T9		***	**	**	***	**	**					
T10		**	*	*	*	**	*					
T11									**	*		

		INFESTATION 2										
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
T1												
T2		*										
T3		***										
T4		**										
T5		***										
T6		***										
T7		***	***	***	***	***	***					
T8		***	***	***	***	***	***	***				
T9		***	***	***	***	***	***	***	***			
T10		***	***	***	***	***	***	**				
T11		***	**	**	**	**	**		*			

		INFESTATION 3										
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
T1												
T2												
T3												
T4		*										
T5												
T6												
T7		***	**	*		*	*					
T8		***	***	***	**	***	***	**				
T9		***	***	***	**	***	***	***				
T10		***	***	***	**	***	***	**				
T11		**	**	**	*	**	**			*		

		INFESTATION 4										
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
T1												
T2												
T3												
T4		*										
T5		*										
T6		*										
T7		***	***	***	***	***	***					
T8		***	***	***	***	***	***	***				
T9		***	***	***	***	***	***	***				
T10		***	***	***	***	***	***	**				
T11		***	**	**	**	**	**		**	***	*	

\* prob < 0.05      T1 = 10'      T7 = 6 h  
 \*\* prob < 0.01     T2 = 20'      T8 = 24 h  
 \*\*\* prob < 0.001   T3 = 30'      T9 = 48 h  
                           T4 = 40'      T10 = 72 h  
                           T5 = 50'      T11 = 96 h  
                           T6 = 60'

a) *Contrôles*. Le repli dermique n'est significativement épaissi ( $p < 0,05$ ) qu'après 24 h, et seulement par rapport à la valeur obtenue après 10'.

b) *Infestation 1*. Durant la période comprise entre 6 et 72 h après l'injection d'antigène, les épaissements de la peau sont significativement différents de ceux observés antérieurement ( $p < 0,05$ ). On constate, après 24 h, une forte augmentation de l'épaisseur du derme, puis un retour progressif à l'état antérieur.

c) *Infestation 2*. Toutes les épaisseurs mesurées lors de cette infestation diffèrent de celle relevée 10' après l'administration d'antigène ( $p < 0,05$ ). Les valeurs de la première heure sont en outre inférieures à celles mesurées ultérieurement ( $p < 0,01$ ). Les épaissements notés après 6, 48 et 72 h ne sont pas dissemblables de celui obtenu après 96 h.

d) *Infestation 3*. Durant la première heure d'observation, un seul épaissement dermique est supérieur à la première mesure (40',  $p < 0,05$ ). Les épaissements diffèrent, durant cette période, de ceux mesurés ultérieurement ( $p < 0,05$ ). On constate cependant une exception : les valeurs relevées après 40' et 6 h ne sont pas significativement différentes entre elles. De même, aucune différence n'est relevée entre la dernière valeur et les mesures effectuées 6, 24 et 72 h après les injections.

e) *Infestation 4*. De la 40<sup>e</sup> à la 60<sup>e</sup> minute, l'épaissement de la peau des lapins est supérieur à celui mesuré après 10' ( $p < 0,05$ ). Dès lors, il s'accroît sensiblement ( $p < 0,01$ ). Enfin, lors de la dernière mesure, l'épaisseur du repli dermique est proche de celle relevée après 6 h.

### 3.5 Comparaisons, au site 2, entre les infestations (fig. 2)

a) *Remarques générales*. Pendant la première heure d'observation, on ne décèle aucune différence significative entre les divers groupes de lapins, sauf lors de la première mesure. En effet, les animaux infestés 2 fois présentent à ce moment une réaction significativement inférieure à celle des contrôles et des animaux primo-infestés ( $p < 0,05$ ). Cette différence est sans doute essentiellement imputable à la dispersion des mesures.

b) *Comparaisons entre contrôles et sujets infestés*. A l'exception de la 1<sup>re</sup> infestation, les mesures effectuées sur les lapins infestés diffèrent ( $p < 0,01$ ) de celles relevées chez les lapins indemnes entre 6 et 96 h après l'administration d'antigène. En effet, les lapins primo-infestés ne montrent une différence qu'après 6, 24 et 72 h, par rapport aux lapins non infestés ( $p < 0,01$ ).

c) *Comparaisons entre les réactions cutanées des lapins primo-infestés et pluri-infestés*. De la 24<sup>e</sup> à la 72<sup>e</sup> heure d'observation, les réactions des lapins primo-infestés diffèrent de celles des animaux infestés 2 fois ( $p < 0,01$ ). Dès 24 h, elles sont également inférieures à celles des individus infestés 3 fois ( $p < 0,01$ ). Enfin, toutes les réactions cutanées observées dès la 6<sup>e</sup> heure sont dissemblables chez des lapins infestés 1 ou 4 fois ( $p < 0,005$ ).



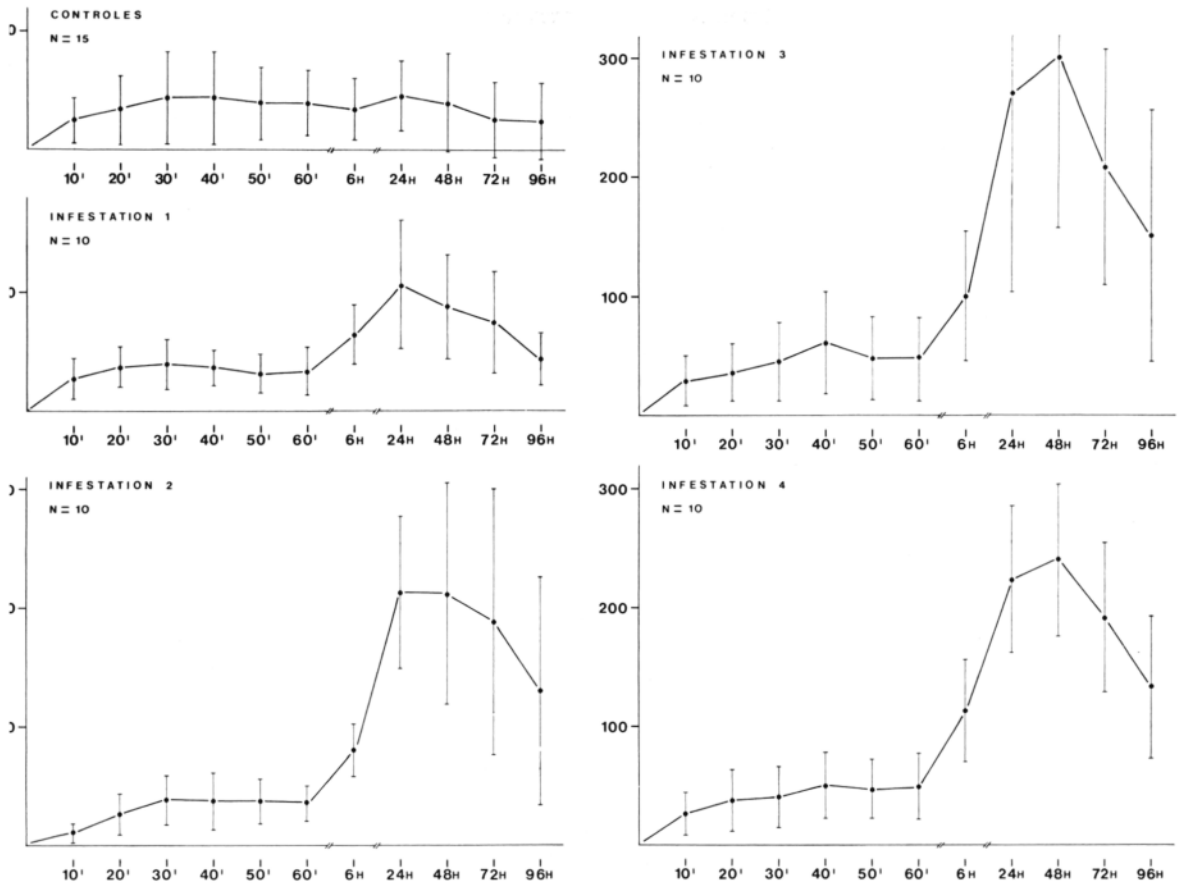


FIG. 2. — Évolution de l'épaississement de la peau des lapins au site d'injection de l'antigène (moyenne  $\pm$  écart-type).

d) *Conclusion.* Les réactions des contrôles diffèrent de celles de tous les autres groupes de lapins. En outre, les animaux primo-infestés développent une réponse inférieure à celle des sujets pluri-infestés. Enfin, les résultats obtenus chez des lapins ayant nourri des tiques 2, 3 ou 4 fois ne diffèrent pas statistiquement.

#### IV — Discussion

Dans notre expérience, la peau des lapins s'épaissit légèrement pendant l'heure suivant l'injection intradermique d'antigène (extrait salivaire de tique). Seuls les animaux infestés 3 fois par *I. ricinus* montrent alors un épaississement significativement supérieur à la première mesure ( $p < 0,05$ ), ceci après 40'. Ce phénomène est sans doute la manifestation d'une hypersensibilité de type immédiat. Brossard et

Fivaz (1982) ont observé des mastocytes dégranulés au point de fixation des ectoparasites, en plus grand nombre sur des lapins réinfestés. En outre, des éosinophiles envahissent plus précocement et plus massivement le tissu. Par un test de Präusnitz-Küstner, Brossard et Girardin (1979) ont décelé des anticorps homocytotropes dans le sérum d'animaux infestés. La peau de receveurs a été sensibilisée (type immédiat) par l'injection intraveineuse de ces immunosérums. Des bovins infestés par *Boophilus microplus* développent aussi une hypersensibilité cutanée de type immédiat (Willadsen et coll., 1978). Wikel et coll. (1978) détectent également une légère réaction cutanée immédiate chez des cobayes résistants soumis à une injection intradermique d'antigène salivaire de *Dermacentor andersoni*. Ils imputent plutôt ce phénomène à l'effet d'agents salivaires vasoactifs.

Dès 6 h après la stimulation antigénique, l'épaississement de la peau de lapins infestés est plus marqué. On observe alors l'apparition d'un érythème. La réaction atteint son apogée après 24 à 48 h et est accompagnée d'une induration.

Dans le lot des contrôles, nous notons, après 24 h, un épaississement dermique supérieur ( $p < 0,05$ ) à celui obtenu après 10'. Cependant, cette réaction n'est pas comparable à celle des animaux infestés ( $p < 0,01$ ). Elle est sans doute non spécifique, car nous n'avons pas observé d'érythème ou d'induration.

Les lapins primo-infestés réagissent différemment des contrôles et des animaux pluri-infestés. En revanche, aucune distinction significative ne peut être décelée entre les réactions des sujets infestés 2, 3 ou 4 fois. Les effets de la résistance sur la biologie des femelles d'*I. ricinus* sont également plus marqués au fil des infestations et plafonnent dès la 3<sup>e</sup> (Bowessidjaou et coll., 1977 ; Brossard et coll., 1982). Les basophiles se sensibilisent aussi plus fortement aux antigènes salivaires après une 2<sup>e</sup> infestation (Brossard et coll., 1982). Ils dégranulent dans une proportion sensiblement égale lors d'infestations ultérieures. La production d'anticorps anti-tique de la classe IgG augmente chez les lapins réinfestés et leur titre est maximal après 3 (Bowessidjaou et coll., 1977) ou 4 infestations (Brossard et coll., 1982).

Ces différents phénomènes peuvent intervenir dans l'établissement d'une immunité. Nous avons démontré que des facteurs humoraux (sans doute des anticorps IgG et IgE) ne conféraient qu'une immunité partielle à des receveurs d'immunosérum (Brossard, 1977 ; Brossard et Girardin, 1979).

Ainsi, dans le présent travail, nous avons montré que les lapins soumis à des infestations successives d'*I. ricinus* développent une hypersensibilité de type immédiat et une hypersensibilité de type retardé. D'après Gell et Coombs (1968), cette dernière est une réaction tuberculique de type classique (type IV). Révélée par un essai cutané, elle est en effet encore présente un mois après le début des infestations. Elle est maximale 24 à 48 h après la stimulation antigénique et déjà fortement atténuée au bout de 96 h.

## BIBLIOGRAPHIE

- BOWESSIDJAOU J., BROSSARD M., AESCHLIMANN A. : Effect and duration of resistance acquired by rabbits on feeding and egg laying in *Ixodes ricinus* L. *Experientia*, 1977, 33, 528-530.
- BROSSARD M. : Rabbits infested with the adults of *Ixodes ricinus* L. : passive transfer of resistance with immune serum. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1977, 70, 289-294.
- BROSSARD M., GIRARDIN P. : Passive transfer of resistance in rabbits infested with adults *Ixodes ricinus* L. : humoral factors influence feeding and egg laying. *Experientia*, 1979, 35, 1395-1396.
- BROSSARD M. : Rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L. : Effects of mepyramine on acquired resistance. *Experientia*, 1982, 38, 702-703.
- BROSSARD M., FIVAZ V. : *Ixodes ricinus* L. : Mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. *Parasitology*, 1982, 85, 583-592.
- BROSSARD M., MONNERON J.-P., PAPAΘEODOROU V. : Progressive sensitization of circulating basophils against *Ixodes ricinus* L. antigens during repeated infestations of rabbits. *Parasite Immunol.*, 1982, 4, 355-361.
- GRAF J.-F. : Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea : Ixodidae)-3<sup>e</sup> partie. *Bull. Soc. Entomol. Suisse*, 1978a, 51, 343-360.
- GRAF J.-F. : Copulation, nutrition et ponte chez *Ixodes ricinus* L. (Ixodoidea : Ixodidae) - 1<sup>re</sup> partie. *Bull. Soc. Entomol. Suisse*, 1978b, 51, 89-97.
- GELL P. G. H., COOMBS R. R. A. : Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. In : Gell P. G. H. et Coombs R. R. A. Eds, *Clinical aspects of immunology*, 2<sup>e</sup> édition, Blackwell, Oxford, 1968, p. 575.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. : Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- WIKEL S. K., GRAHAM J. H., ALLEN J. R. : Acquired resistance to ticks : IV. Skin reactivity and *in vitro* lymphocyte responsiveness to salivary gland antigen. *Immunology*, 1978, 34, 257-263.
- WILLADSEN P., WILLIAMS P. E., ROBERTS J. E., KERR J. D. : Response of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.*, 1978, 8, 89-95.