

Étude de la regranulation in vivo des mastocytes de la muqueuse des voies aériennes supérieures chez le cobaye

Son inhibition par une eau thermale

L.-G. CHEVANCE*, M.-C. PRÉVOST

RÉSUMÉ

Le mastocyte est une cellule dont la durée de vie est longue et qui ne disparaît pas lorsqu'on le fait dégranuler soit par contact avec un antigène, soit par action d'un histamino-libérateur. Nous avons démontré, sur un total de 5000 champs microscopiques provenant de cinquante animaux, que statistiquement le nombre normal de mastocytes par unité de surface de 0,06 mm² fluctuait en des limites assez étroites pour autoriser un traitement statistique ; que la cinétique de regranulation normale de ces cellules se situait entre 15 et 20 jours après dégranulation brutale ; qu'il était possible d'inhiber par un traitement local cette regranulation, ce traitement fait appel, suivant différentes modalités, à l'eau du Mont-Dore et permet d'allonger le temps de regranulation d'un facteur 2 à 3 et que l'étude ultrastructurale des cellules reflète cette inhibition. Ainsi est démontré l'un des modes d'action de l'eau du Mont-Dore dans le traitement des allergies respiratoires qui sont une des indications majeures de cette crénothérapie.

SUMMARY

Study of in vivo mast cells regranulation in the upper respiratory tract of the Guinea pig. Its inhibition by a thermal Spa water. — Mast cells have a long life span and don't disappear when they degranulate. Besides we have established that their number in the Guinea pig septum mucosa fluctuates per unit of surface (0.06 mm²) within limits that allow statistical treatment. 5000 microscopical fields were studied. After a quick degranulation either by allergic challenge or by the action of a well known histamino liberator (compound 48/80), the kinetics of normal regranulation has been demonstrated, the regranulation being achieved between 15 and 20 days. After treatment at the Spa of le Mont Dore or after treatment in the laboratory with this bottled Spa water, the duration of the regranulation was more than doubled. Besides ultrastructural changes in mast cells have been studied after this treatment. So for the first time, the therapeutic activity of this Spa water towards allergic respiratory disease has been demonstrated.

De très nombreuses études récentes ont été consacrées à la dégranulation du mastocyte, à son mécanisme et à son inhibition parmi lesquelles on peut citer les travaux de B. Diamant [2], A. R. Johnson et coll. [6], T. Ishisaka et coll. [4, 5], D. Lagunoff [7], J. Padawer [8], P. Rohlich et coll. [10].

Les travaux concernant la regranulation sont beaucoup moins nombreux. Citons ceux de Weill et Renoux [12] sur la culture à court terme des mastocytes péritonéaux et de Ginsburg et coll. [3] utilisant la culture de cellules blastiques sur film de fibroblastes. Mais à notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée sur la regranulation mastocytaire, sa cinétique et son inhibition au niveau des voies aériennes in vivo, c'est-à-dire là où la cellule appa-

raît, constitue son stock granulaire et par là même devient cellule effectrice des allergies respiratoires.

Une telle étude n'est possible que sous trois conditions :

- que le mastocyte ait une longue durée de vie ;
- que cette cellule ne disparaisse pas après avoir subi un processus de dégranulation, mais qu'elle demeure fonctionnelle et apte à rétablir son « stock » granulaire ;
- que le nombre de mastocytes, situés au niveau de la muqueuse des voies aériennes supérieures chez notre animal d'expérience, soit normalement situé dans une fourchette de valeur assez limitée, par unité de surface, pour rendre l'étude statistique possible.

* Station Centrale de Microscopie Électronique, Institut Pasteur, Paris.

Tirés à part : Dr L. G. Chevance, Station Centrale de Microscopie Electronique, Institut Pasteur, 28, rue du Dr-Roux, 75724 PARIS CEDEX 15.

Reçu le 30 mai 1983. Accepté le 31 janvier 1984.

CHEVANCE L.-G., PRÉVOST M.-C. — Étude de la regranulation in vivo des mastocytes de la muqueuse des voies aériennes supérieures chez le cobaye. Son inhibition par une eau thermale. *Rev. fr. Allergol.*, 1984, 24 (n° 1), 7-18.

La réponse à ces deux premières conditions, durée de vie et possibilité de regranulation est fournie par Padawer [8] qui a démontré la très grande longévité du mastocyte péritonéal chez le rat (plus d'un an, soit le tiers à peu près de la vie de cet animal).

Cet auteur a également montré que, dans les conditions physiologiques normales, cette cellule maintenait son homéostasie granulaire et que la dégranulation n'entraînait pas sa disparition.

La réponse à la troisième question est fournie par une de nos études statistiques de caractère préliminaire, portant sur 500 champs microscopiques, qui nous a montré que le nombre normal, par champ de microscopie optique (Wild 40 $\times$ 1,5 $\times$ 12) soit une surface de 0,06 mm², était situé chez le cobaye entre 7 et 10 mastocytes ce qui constitue une fourchette de valeurs autorisant une étude statistique.

Cette étude, de caractère préalable, fut suivie par l'établissement de la courbe définissant la cinétique normale de la regranulation. Nous avons ensuite démontré que l'eau thermale de la source César du Massif du Mont-Dore au griffon, comme au laboratoire, inhibait de façon statistiquement significative la regranulation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Au total, nous avons utilisé pour la présente étude 50 cobayes tricolores, des deux sexes, le poids des animaux variait de 350 à 400 grammes.

Technique de dégranulation des mastocytes in vivo

Les cobayes subirent une dégranulation soit par instillations nasales d'un histamino-libérateur, le composé 48/80, soit après sensibilisation, par instillation de l'antigène. Ce protocole de la dégranulation étant toujours identique pour les animaux traités et les témoins, quel que soit son type.

Dégranulation par le composé 48/80

Nous avons utilisé le composé 48/80 provenant des Laboratoires Sigma, ce produit résulte de la condensation du formaldéhyde avec la N-méthylphénylamine. Son action de libérateur d'histamine par dégranulation du mastocyte est connue depuis longtemps (Baltzly R. et coll. [1]).

Après différents essais par instillations nasales, la concentration de 2 % est apparue comme provoquant une dégranulation, sinon totale de la muqueuse, du moins importante et surtout de caractère constant. On effectue deux instillations par jour à raison de 3 gouttes, dans chaque narine, d'une solution de 48/80 à 2 % dans le PBS.

Sensibilisation et dégranulation par les allergènes

Nous avons utilisé le pollen de dactyle ou de bouleau préparé par le laboratoire des allergènes de l'Institut Pasteur.

Nous utilisons une macération fraîchement préparée de 25 mg de pollen desséché dans 1 ml de PBS,

la macération dure 6 heures à 4 °C, on centrifuge un court laps de temps pour n'utiliser que le surnageant.

La sensibilisation comporte cinq injections sous-cutanées de 1 ml. A la première injection est ajouté 0,5 ml de l'adjuvant complet de Freund homogénéisé dans la seringue.

Les quatre premières injections sont effectuées tous les quatre jours. A partir de la troisième injection, une sensibilisation de la muqueuse nasale est commencée en instillant deux fois par jour, pendant cinq jours, 3 gouttes dans chaque narine, de la même macération filtrée de pollen.

Les animaux sont ensuite laissés au repos pendant 15 jours.

Après cette période de latence, on effectue une cinquième injection et, pendant trois jours, deux instillations nasales par jour de l'extrait pollinique, afin de provoquer une dégranulation, aussi importante que possible, au niveau de la muqueuse nasale.

Sacrifice des animaux

Afin de suivre la cinétique de regranulation, on a sacrifié les animaux en trois groupes, qu'il s'agisse des animaux sensibilisés ou de ceux ayant reçu le composé 48/80 :

- premier groupe, de 6 h à 24 h après la dernière instillation ;
- deuxième groupe, de 15 à 20 jours après la dernière instillation ;
- troisième groupe, de 30 à 35 jours après la dernière instillation.

En outre, quelques animaux ont été sacrifiés 45 jours après cette dernière instillation.

On dissèque le septum dans sa totalité et l'on prélève le tiers moyen. Le prélèvement est rapidement lavé au PBS, puis la muqueuse est décollée du cartilage et fixée suivant les modalités habituelles de la double fixation glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium utilisée en microscopie électronique.

Traitement par les eaux thermales

Nous avons utilisé ces eaux, soit au griffon de la Source César au Mont-Dore, dans des conditions aussi proches que possible de celles qui président à la cure thermale chez les malades, soit à titre comparatif, en utilisant au laboratoire la même eau conservée suivant les modalités précisées plus loin.

Modalités de la cure thermale au griffon de la Source César (Mont-Dore)

Les mastocytes de la muqueuse des animaux sont dégranulés la veille du début de la cure, par la dernière instillation soit de l'allergène, soit du composé 48/80.

Dès lors, pendant 21 jours, ils reçoivent chaque matin 1 ml d'eau de la Source César dans chaque narine, puis, durant 10 minutes, respirent un brouillard constitué de gouttelettes dont le diamètre varie de 3 à 10 microns (brouillard humide à la température de 38 °C). Ils sont ensuite placés dans une atmo-

sphère de gaz thermal pendant une minute, augmentée progressivement jusqu'à 5 minutes, durée qui est maintenue pendant les 15 derniers jours de cure.

Chaque après-midi les animaux respirent durant 5 minutes en augmentant de une minute par jour, jusqu'à dix minutes, un aérosol sec d'eau thermal, le diamètre des micelles étant de un micron.

A l'issue de ces 21 jours de « cure », les animaux sont renvoyés au laboratoire où on les sacrifie 30 à 45 jours après la date de la dernière instillation dégranulante.

Traitement avec l'eau thermale conservée

L'eau prélevée au griffon en flacons pleins et hermétiquement clos est utilisée dans un délai variant de 10 à 35 jours après son prélèvement.

Les animaux reçoivent 24 heures après dégranulation 0,5 ml d'eau isotonisée par ClNa deux fois par jour dans chaque narine pendant 15 jours. Ils sont sacrifiés 30 jours après la dernière instillation dégranulante.

Traitement par le PBS

Ces animaux constituent les témoins essentiels.

La solution utilisée répondait à la formule NaCl 8 g/1000, KCl 0,2 g/1000, Mg Cl-6 H₂O : 0,1 g/1000, Na 2H PO₄-2 H₂O : 1,15 g/1000, KH₂ PO₄ 0,2 g/1000.

Cette solution constitue un bon témoin car notre expérience antérieure nous a montré qu'elle était bien tolérée et permettait, en particulier, de longues survies des battements ciliaires.

Le protocole du traitement local est le suivant : la muqueuse des animaux est localement dégranulée par l'ionophore 48/80 (comme indiqué précédemment). Après 24 h de délai, les animaux reçoivent deux fois par jour, 3 gouttes dans chaque narine, pendant 15 jours de PBS.

Techniques cytologiques

Nous n'insisterons, ni sur la fixation du matériel cytologique, ni sur son inclusion en résine époxy qui sont classiques.

Grâce à l'observation en microscopie optique de coupes semi-fines, nous avons établi une corrélation entre l'étude en microscopie photonique et électronique.

Étude en microscopie photonique

Chaque bloc fournit cinq lames de 12 coupes semi-fines (environ 2 μ). Ces coupes, obtenues à l'aide d'un ultramicrotome LKB III équipé de couteaux de verre, sont recueillies à sec à l'aide d'une pince fine et déposées sur des gouttes d'eau régulièrement réparties sur une lame. Après séchage à l'étuve à 37 °C, les lames sont colorées 12 heures dans une solution de bleu de Toluidine (0,1 % dans un tampon acétate pH 2,7), rincées à l'eau distillée, séchées et montées entre lame et lamelle à l'aide d'huile à immersion.

En raison du pH très acide du colorant utilisé, les mastocytes sont les seules cellules colorées. L'examen de la préparation est fait en contraste de phase qui transforme, par déplacement des longueurs d'onde, la coloration normale pourpre des granules en lumière blanche en une coloration verte très brillante plus nettement observable. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope Wild M20 en utilisant un objectif ($\times 40$) oculaire 12,5, une lentille intermédiaire $\times 2,5$, ce qui fournit une surface totale d'observation de 0,06 mm².

Étude en microscopie électronique de transmission

Pour l'observation des mastocytes en microscopie électronique de transmission, nous nous basons sur les résultats obtenus en microscopie optique. La comparaison de la dernière coupe semi-fine avec la surface du bloc observé par transparence au microscope à faible grossissement (oculaire 10), permet le repérage de la zone qu'on désire étudier.

Il suffit alors de tailler la pyramide autour du groupe des mastocytes repérés et de réaliser des coupes ultra-fines qui, recueillies sur des grilles mesh 200 seront colorées par la technique de Reynolds [9] et examinées à l'aide d'un Elmiskop 101 Siemens.

Dénombrement cellulaire

Les dénombrements sont effectués sur les coupes semi-fines colorées ainsi que précédemment indiqué.

Pour chaque animal d'expérience, deux expérimentateurs ont compté le nombre de mastocytes trouvés dans 50 champs optiques, 100 au total, en ne comptant qu'une coupe sur trois afin d'éviter de prendre en compte plusieurs fois la même cellule.

Analyse statistique

Comme c'est presque toujours le cas lorsqu'on étudie un matériel biologique, la « population » que nous avons étudiée, si elle offre une distribution normale (loi de Laplace et Gauss) n'est, en revanche, pas suffisamment homogène de telle sorte que la simple comparaison des moyennes entre les différents groupes d'animaux n'est pas suffisante au plan statistique.

Ces deux constatations nous ont conduit à utiliser le calcul de l'écart-type de la différence des moyennes (Schwartz D. et Lazar R. [11]) lequel, à condition que le nombre d'échantillons étudié soit suffisamment grand (supérieur à 30), ce qui est toujours le cas dans la présente étude, permet d'utiliser la formule destinée au calcul de l'écart réduit. Pour chaque couple d'animaux étudiés (traités et témoins), cette valeur est calculée suivant la formule :

$$\varepsilon = \frac{mA - mB}{\sqrt{\frac{SA^2}{nA} + \frac{SB^2}{nB}}}$$

mA : nombre moyen de cellules présentant des granules calculé sur 100 champs de microscope pour un animal ; mB : nombre moyen de cellules présentant des granules calculé sur 100 champs de microscope pour un animal traité ; SA : variance des animaux témoins ; SB : variance des animaux traités ; nA et nB : 100 champs microscopiques examinés.

Dans ce cas, la différence entre les valeurs mA et mB est significative si le calcul fournit une *valeur supérieure à 1,96* ceci à un risque donné par la table de l'écart réduit de Fischer et Yates.

Le calcul de ϵ est nécessaire à l'établissement des tables de T qui permettent en comparant par paires les animaux, d'établir qu'il existe parfois un certain pourcentage de cas où la différence n'est pas significative, c'est-à-dire que la valeur de ϵ est inférieure à 1,96.

Il convient alors — afin de fixer la barre *pour laquelle la différence est significative* — de se référer à la table de l'intervalle de confiance d'un pourcentage au risque de 5 p. cent (tables de Mainland Herrera et Sutcliffe). On trouvera donc au-dessous de chaque tableau la valeur de l'intervalle de confiance théorique comparé au pourcentage obtenu calculé pour chaque table.

RÉSULTATS

Résultats statistiques

Rappelons qu'à l'intérieur des groupes étudiés, chaque témoin particulier à ce groupe est comparé à chacun des animaux traités en utilisant la formule qui permet de se référer à la table des écarts réduits puisque le nombre de champs microscopiques comptés est, dans chaque cas, de 100 pour chaque animal.

Cinétique de la regranulation des animaux sensibilisés après contact de l'antigène ou après action du 48/80 avec la muqueuse nasale

La muqueuse des animaux, avant tout choc allergique, renferme en moyenne $7,3 \pm 1,6$ par champ de $0,06 \text{ mm}^2$.

Après choc allergique local ou utilisation du composé 48/80, au maximum de la dégranulation (6 à 12 heures après celle-ci), le nombre de mastocytes par champ s'abaisse à $2,6 \pm 1,5$ en cas d'allergie et $2,2 \pm 1$ après emploi du 48/80. Ces chiffres sont statistiquement semblables.

Le phénomène de regranulation est étudié 15 jours après la dégranulation. A ce stade, $5,5 \pm 1,4$ cellules par champ en moyenne présentent à nouveau des granules en cas d'allergie, et $8 \pm 1,6$ après emploi de l'ionophore.

Entre le 20^e et le 25^e jour, la regranulation apparaît complète. On observe, après choc allergique, $10,2 \pm 1,4$ et après action du 48/80 $9,3 \pm 1,3$ cellules par champ. Ce sont là des chiffres plus élevés que ceux de la moyenne des témoins (fig. 1). Tout se passe comme s'il existait in vivo après dégranulation brutale un phénomène de « rebond ».

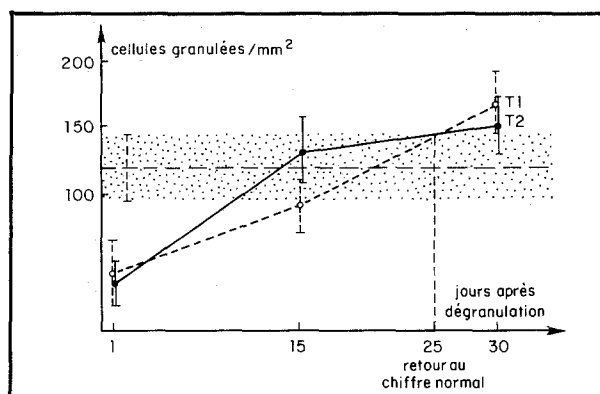


Fig. 1. — Cinétique de la regranulation chez les animaux sensibilisés au pollen (T1) ou traités par l'ionophore 48/80 (T2). Est considéré comme jour 1 (J1) le jour d'arrêt du traitement sensibilisateur où la dégranulation est maximale. Les valeurs exprimées représentent la moyenne $\pm$ l'écart-type calculée à partir des mesures effectuées sur 7 animaux différents. La zone grisée correspond au nombre moyen ($\pm$ l'écart-type) de cellules contenant des granules chez des animaux témoins. On peut admettre qu'au 25^e jour la proportion des mastocytes granuleux est redevenue normale.

TABLEAU I. — Influence du traitement thermal sur la régulation des mastocytes

Traités	Témoins						
	N86	N82	N83	NF10	K37	K38	K39
859	21,17	21,33	26,25	22,07	7,74	8,39	12,51
858	14,38	14,14	19,97	14,60	4,37	5,53	7,61
MD1C3	21,91	22,07	26,91	22,81	8,1	8,72	12,7
MD1C2	21,51	21,68	26,49	22,33	7,89	8,54	12,36
F81	27,87	28,52	32,21	22,78	10,6	10,7	16,98
F83	5,41	4,94	10,06	5,06	0,51	1,19	1,29
F84	8,83	8,31	13,87	8,60	1,55	2,47	2,75
882	15,39	15,16	20,85	15,63	4,83	5,92	8,06

Témoins : animaux sacrifiés 30 jours après dégranulation par le composé 48/80.

Traités : animaux sacrifiés après traitement thermal au Mont-Dore (30 jours après dégranulation).

Intervalle de confiance théorique au risque de 5 % : 1 à 14 %.

Intervalle de confiance calculé : 5,35 %.

Influence inhibitrice de la regranulation mastocytaire par le traitement thermal effectué au griffon de la Source César (Mont-Dore)

Le tableau I permet 56 comparaisons entre animaux témoins dont les muqueuses ont regranulé sans aucun traitement et celles qui furent soumises à l'action de l'eau thermale.

A partir de ces valeurs, trois seulement soit 5,35 p. cent ne sont pas significatives. Or l'intervalle de confiance théorique calculé pour une comparaison portant sur soixante valeurs est de 1 à 14 p. cent. L'ensemble des résultats est donc largement significatif, et l'on peut affirmer que le traitement thermal inhibe la regranulation.

TABLEAU II. — Poursuite de l'influence du traitement thermal, 45 jours après dégranulation

Traités	Témoins						
	N86	N82	N83	NF10	K37	K38	K39
F89	4,9	5,17	6,06	5,58	3,94	5,13	7,70
F90	4,76	5,02	5,93	5,45	3,73	5,06	7,81
F91	4,83	5,07	5,99	5,45	3,82	5,11	7,60
F92	3,71	3,80	5,13	4,08	2,35	3,84	5,55

Témoins : animaux sacrifiés 30 jours après dégranulation par le 48/80 sans autre traitement.

Traités : animaux sacrifiés 45 jours après dégranulation.

Intervalle de confiance théorique au risque de 5 % : 0 à 20 %.

Intervalle de confiance calculé : 0 %.

En effet, compte tenu des calculs statistiques précédents qui légitiment la simple étude des moyennes, il convient de noter que chez les animaux ayant subi un traitement thermal au griffon et sacrifiés 30 jours après dégranulation, on trouve en moyenne $3 \pm 1,8$ mastocytes par champ, c'est-à-dire un chiffre voisin de celui trouvé chez les animaux témoins 24 heures seulement après l'action dégranulante du composé 48/80.

En outre, le tableau II étudie 28 différences entre animaux témoins et animaux qui, ayant subi la cure, ont été sacrifiés 45 jours après dégranulation. Toutes les valeurs sont significativement différentes, ce qui signifie qu'aucun des animaux traités n'a effectué une regranulation normale. D'ailleurs à cette date où la regranulation chez les animaux témoins est complète depuis 20 jours au moins, ces animaux traités n'offrent à l'examen que 4,8 mastocytes par champ microscopique, soit à peu près la moitié du nombre normal.

Bien qu'il soit sans doute hasardeux d'extrapoler une cinétique cellulaire, on peut considérer que la cure thermique fait *plus* que doubler le laps de temps nécessaire à la regranulation mastocytaire.

Influence sur la regranulation mastocytaire d'un traitement par l'eau conservée de la Source César (Mont-Dore)

Du point de vue statistique, la regranulation apparaît inhibée par l'utilisation locale de cette eau conservée.

Le tableau III fait état de 35 comparaisons. L'inhibition est nette dans 34 cas. Le calcul de l'intervalle de confiance à 5 p. cent montre que le pourcentage est de 2,9 p. cent. Or l'intervalle de confiance théorique est situé entre 1 et 17 p. cent. L'inhibition est donc ici encore statistiquement prouvée. Mais si l'on se reporte aux valeurs moyennes dénombrées par champ, on note que l'eau utilisée au griffon entraîne une diminution moyenne beaucoup plus forte du nombre de cellules mastocytaires $3 \pm 1,8$ contre 6 ± 2 . Cette différence résulte évidemment de la différence des traitements locaux administrés aux animaux.

TABLEAU III. — Influence du traitement effectué au laboratoire avec des eaux conservées du Mont-Dore

Traités	Témoins						
	NE86	NE82	NE83	NF10	K37	K38	K39
D1	15,07	14,86	20,68	15,4	11,04	15	17,77
D2	15,12	14,88	20,55	15,38	11,28	15,05	17,4
D3	3,51	9,92	9,89	3,05	0,56	3,04	3,59
D4	17,26	17,12	22,46	17,6	13,68	17,3	19,8
D5	15,46	15,25	20,08	15,7	11,73	15,37	17,64

Témoins : animaux sacrifiés 30 jours après dégranulation par le composé 48/80.

Traités : animaux sacrifiés après traitement par les eaux conservées du Mont-Dore, 30 jours après la dégranulation.

Intervalle de confiance théorique au risque de 5 % : 1 à 17 %.

Intervalle de confiance calculé : 2,9 %.

TABLEAU IV. — Comparaison entre le traitement local par le PBS et la cure thermique au griffon

Traités	Témoins							
	N859	N858	MD1C3	MD1C2	NF81	NF83	NF84	N882
P38	20,3	14,4	21,12	20,76	25,96	6,12	9,40	15,31
P39	11,53	8,9	20,4	19,7	34,58	0,06	3,05	10,33
P42	37,7	30	38,17	37,7	45,7	16,09	21,04	30,88
P43	20,46	10,4	21,3	20,65	33,62	1,00	4,26	11,75
M50	15,15	10,39	16,78	16,45	21,06	3,41	6,29	11,3
M51	14,86	9,73	15,67	15,36	19,45	3,28	6,01	10,6
M52	15,07	10,42	15,82	15,55	19,12	4,26	6,92	11,21
M53	15,62	11,78	16,27	16,05	18,84	6,28	8,75	12,45

Témoins : animaux sacrifiés en fin de traitement thermal au Mont-Dore, 30 jours après dégranulation.

Traités : animaux sacrifiés en fin de traitement local par le PBS (tampon phosphate), 30 jours après dégranulation.

Intervalle de confiance théorique au risque de 5 % : 1 à 14 %.

Intervalle de confiance calculé : 3,1 %.

Influence du traitement local par une solution saline sur la regranulation mastocytaire

Les instillations d'une solution de PBS telles que définies plus haut, c'est-à-dire dans les mêmes conditions expérimentales que l'eau du Mont-Dore conservée, constitue un témoin des différents traitements locaux précédemment analysés et dont on a vu qu'ils inhibaient, à des degrés divers, cette regranulation. Si l'on compare (tableau IV) les résultats pour huit animaux traités par le PBS et huit ayant effectué la cure au griffon, on constate que sur les 64 comparaisons, deux seulement ne sont pas significatives, soit 3,10 p. cent alors que l'intervalle de confiance est dans ce cas de 1 à 14 p. cent. On peut donc affirmer que les instillations de PBS n'inhibent pas la regranulation. D'ailleurs, on peut noter que les animaux ayant reçu du PBS offrent en moyenne neuf cellules mastocytaires par champ microscopique 30 jours après dégranulation, ce qui constitue une moyenne semblable à celle obtenue

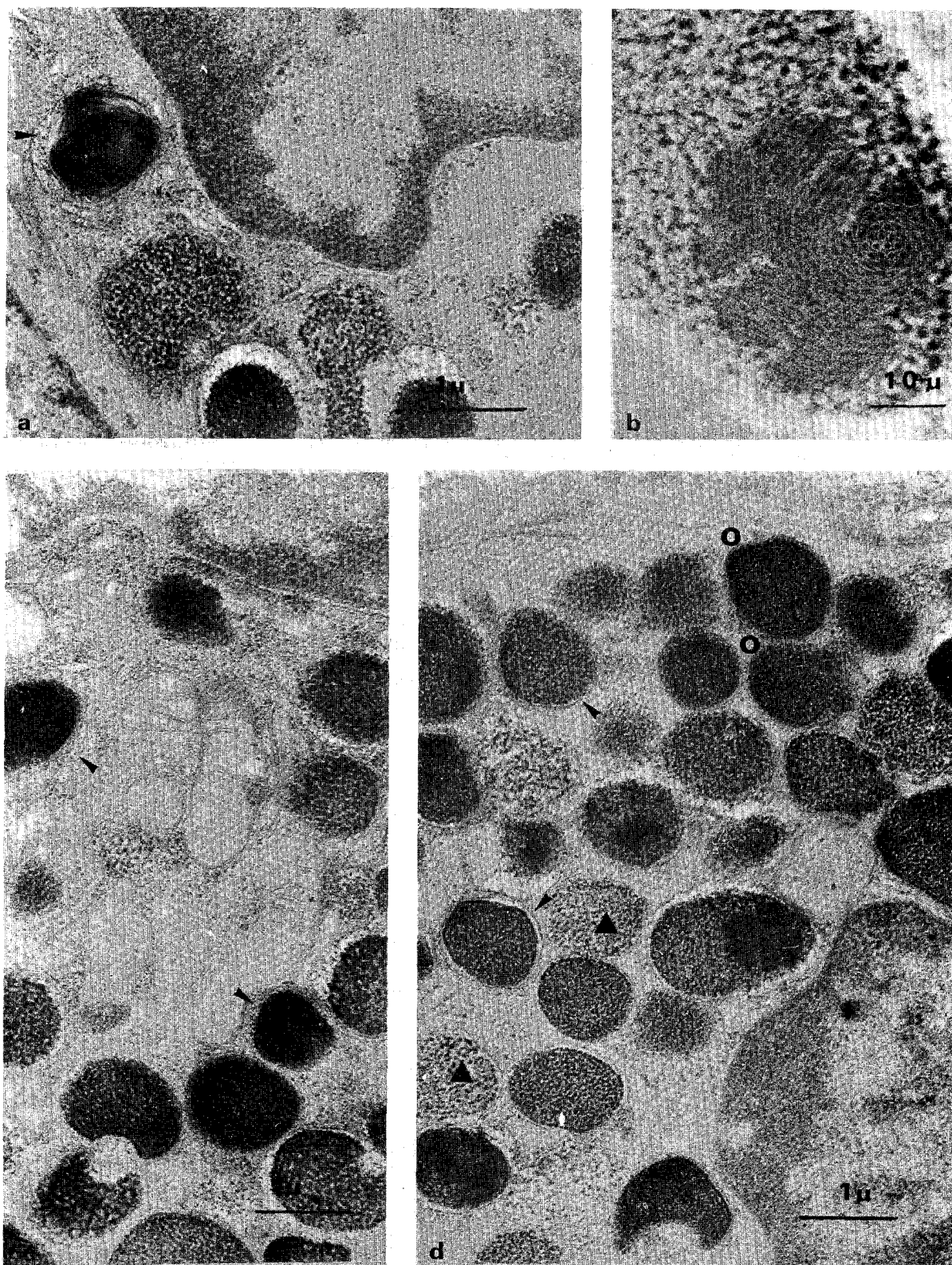


Fig. 2. — Détail des granulations d'un mastocyte non dégranulé. a : granules lamellaires peu fréquemment observées. b : forme cristalline à l'intérieur des granulations. c : granules denses aux électrons. d : granules à structure finement granulaire de densité électronique moyenne (▲), granules à structure grossièrement granulaire de densité électronique élevée (○).

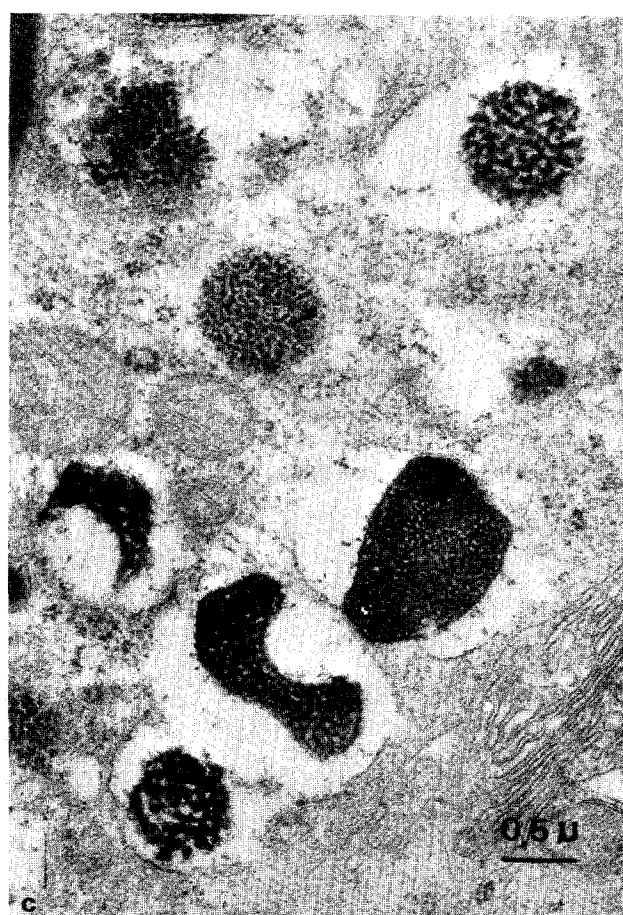
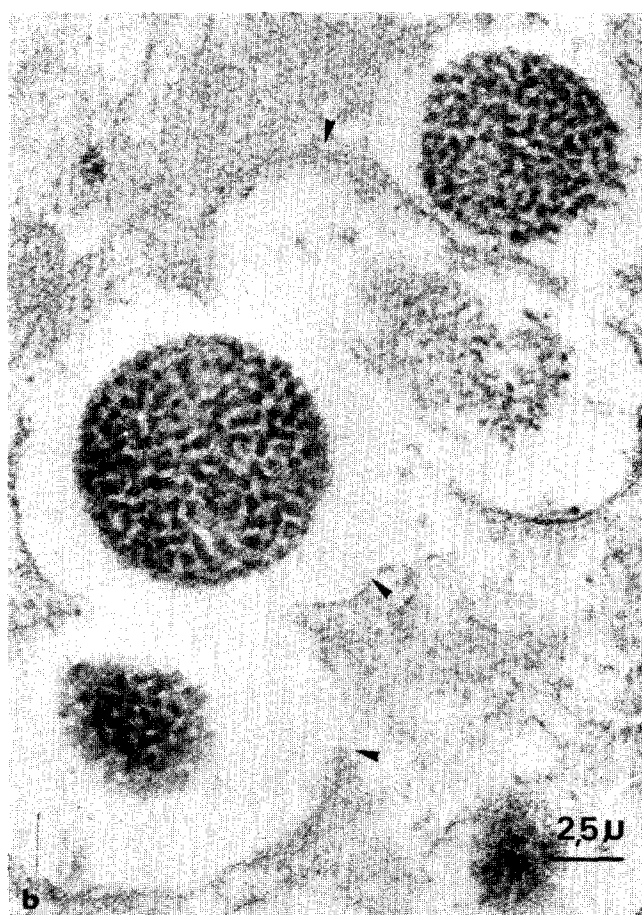
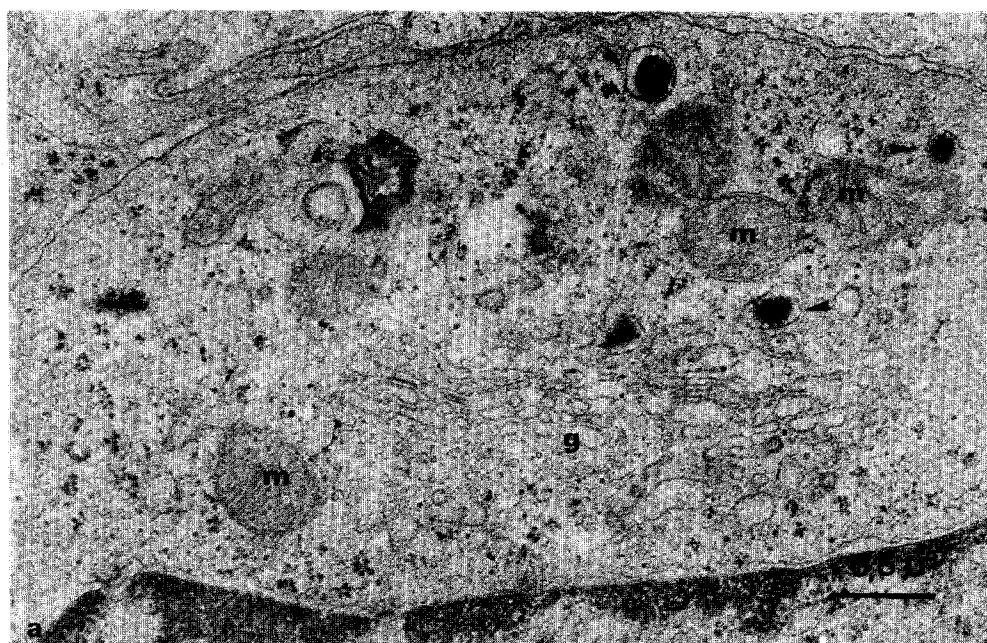


Fig. 3. — a : appareil de Golgi (g) de mastocytes après dégranulation allergique. b et c : aspects des granulations mastocytaires en voie de dégranulation allergique, mitochondrie (m).

chez les animaux témoins n'ayant subi aucun traitement après dégranulation.

Ce résultat constitue un témoin capital pour l'ensemble de l'étude statistique de l'inhibition de la dégranulation.

Étude cytologique en microscopie électronique des mastocytes de la muqueuse nasale du cobaye

Leur localisation est précise. Ils sont situés au-dessous de la muqueuse nasale à la partie superficielle de la sous-muqueuse. C'est là un fait anatomique d'importance lorsqu'on effectue les comptages cellulaires. Il importe, en effet, que les coupes passent perpendiculairement à cette zone. Cette localisation n'est d'ailleurs pas exclusive, on peut rencontrer des mastocytes, en petit nombre, au niveau de l'épithélium cilié et entre les Acini de la sous-muqueuse. C'est une cellule de grande taille (50 micromètres et plus), elle est de forme variable, le plus souvent très allongée avec des replis membranaires assez semblables mais moins nombreux que ceux des macrophages. La caractéristique de cette cellule est la présence au sein du cytoplasme de très nombreuses granulations qui sont entourées, à l'état normal, d'une membrane à double feuillet, l'aspect de ces granulations permet de les classer en quatre types morphologiques principaux (fig. 2) :

- des granules denses aux électrons et qui, pour cette raison, n'ont apparemment aucune structure organisée ;
- des granules de densité électronique moyenne et qui possèdent une structure finement corpusculaire ;
- des granules de densité électronique élevée à structure plus grossière ;
- des granules lamellaires, qui sont plus rares, et dont l'aspect rappelle les enroulements ou « scrolls » de certaines granulations plaquettaires (thrombocytes).

Enfin, des structures d'aspect cristallin sont parfois observées au sein de ces granules. Certains de ces aspects peuvent coexister dans le même granule.

Mastocyte en voie de dégranulation

Au niveau ultrastructural, les mastocytes dégranulés par contact avec un allergène et ceux qui ont subi l'action du 48/80 sont d'aspect très semblables.

Dans les deux cas, la dégranulation se traduit par une diminution de la densité des granules aux électrons et l'apparition, dans le même temps, de structures cristallines qui sont probablement préexistantes mais masquées par la densité des structures à l'état normal. On observe ensuite un élargissement de la logette des granules qui deviennent plus transparents aux électrons, il persiste durant quelques temps une inclusion granulaire centrale (fig. 3).

L'agrandissement des logettes n'est pas une apparence due à la fonte des granules, car on peut observer des aspects en chapelet par fusion partielle de deux ou trois de ces logettes. Au stade terminal, les

granules disparaissent totalement en ne laissant parfois subsister que quelques résidus lamellaires. En résumé, tout se passe comme si le phénomène de lyse était intracytoplasmique.

En ce qui concerne les autres organelles cellulaires ; les mitochondries apparaissent à peu près normales. L'appareil de Golgi, lorsqu'on le met en évidence, est bien développé.

Le réticulum endoplasmique n'apparaît pas très dense.

Après dégranulation par le 48/80, seules quelques nuances morphologiques sont à noter. Ainsi, les logettes granulaires paraissent moins dilatées, le réticulum endoplasmique est plus développé et présente de nombreux polyribosomes. Les aspects cristallins sont plus nombreux (fig. 4).

En résumé, un fait fondamental apparaît après étude ultrastructurale des cellules dégranulées, c'est qu'elles ne *sont pas en voie de lyse* et que morphologiquement, au plan ultrastructural, rien ne s'oppose à leur survie.

Aspect ultrastructural des mastocytes en fin de regratulation normale

Les cellules mastocytaires offrent à ce stade quatre aspects qui sont à souligner :

- l'espace périnucléaire apparaît normal ;
- le cytoplasme renferme une quantité normale de ribosomes et peu de polyribosomes ;
- l'appareil de Golgi est formé de vésicules plus dilatées que normalement avec, fréquemment, des progranules dans leur voisinage immédiat ;
- dernier aspect, enfin, et le plus caractéristique, la presque totalité des granules apparaît d'une densité électronique nettement plus grande que normalement (fig. 5).

Aspect ultrastructural des mastocytes dont la regratulation est inhibée par l'action d'un traitement thermal au griffon de la Source César (Mont-Dore)

On constate, pour reprendre la comparaison sur les mêmes points que précédemment que :

- l'espace périnucléaire s'élargit et devient irrégulier ;
- le cytoplasme est plus clair que normalement, et les polyribosomes en petit nombre sont situés près de l'espace périnucléaire ;
- l'appareil de Golgi est peu visible et on ne voit pas de progranules ;
- les granules sont de texture bigarrée, peu dense aux électrons, des zones presque transparentes alternant avec des zones plus denses, ceci aussi bien à l'intérieur d'un même granule que d'un granule à l'autre (fig. 6).

En conclusion de cette étude ultrastructurale, il apparaît que les différences morphologiques entre mastocytes regratulés normalement et ceux chez lesquels ce mécanisme fut inhibé sont nettes et, en conséquence, cette inhibition a un support ultrastructural évident.

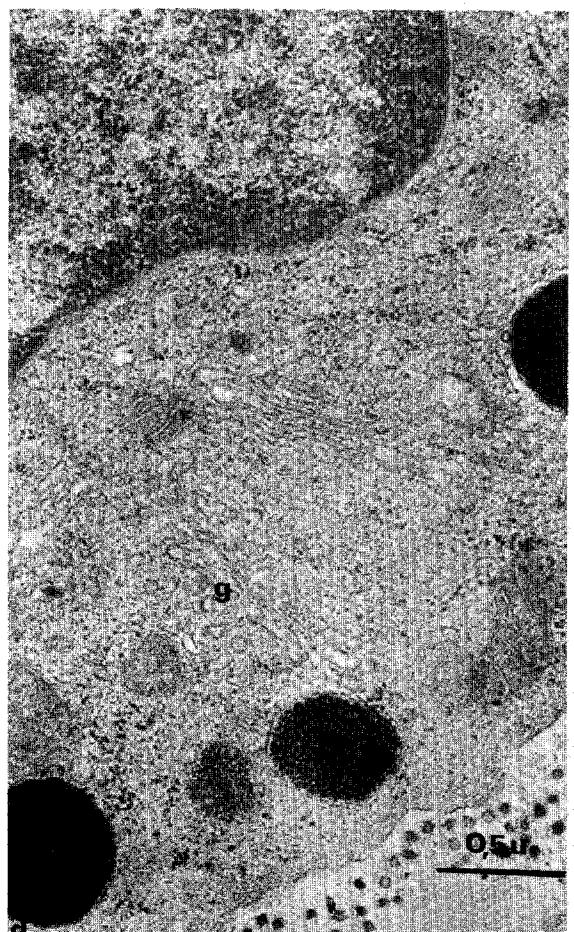
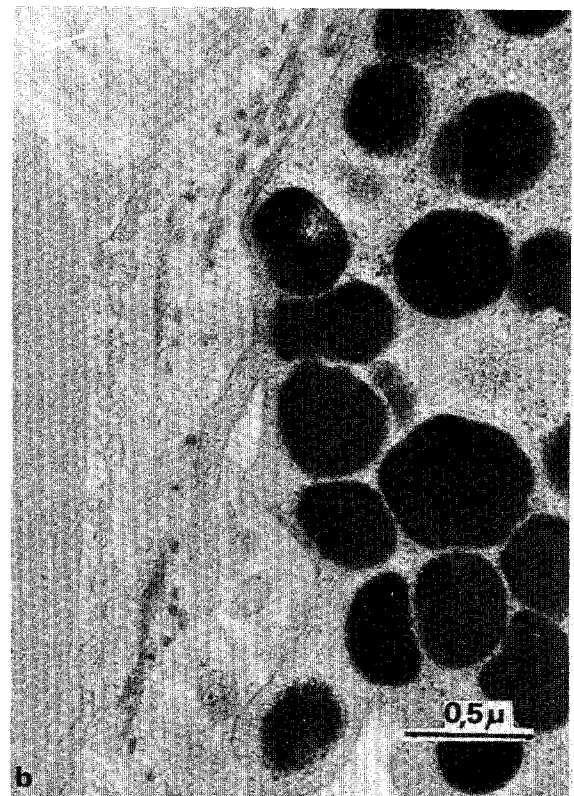
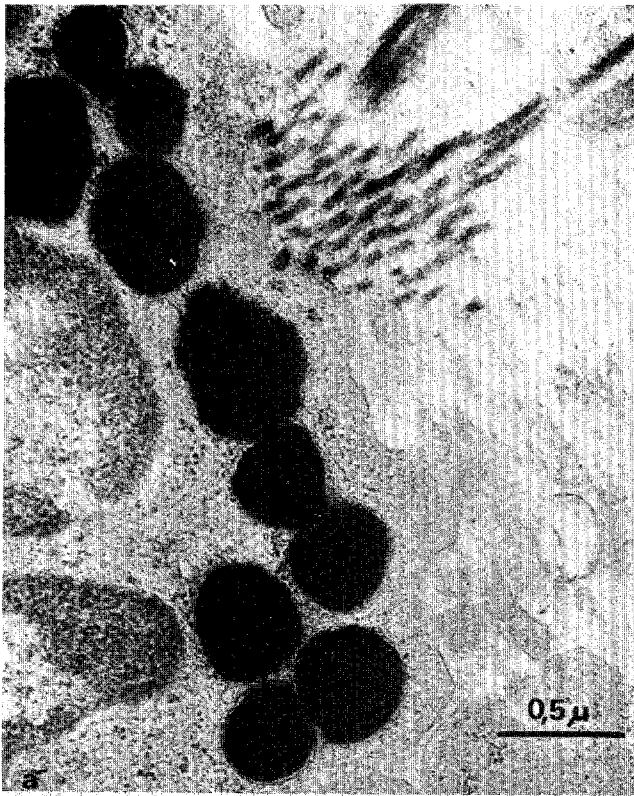


Fig. 4. — a : appareil de Golgi (g) de mastocyte après dégranulation par le composé 48/80 ; b, c et d : aspects des granulations mastocytaires en voie de dégranulation chimique par le composé 48/80 ; e : aspect des formes cristallines souvent rencontrées dans les granules de mastocytes en voie de dégranulation chimique.

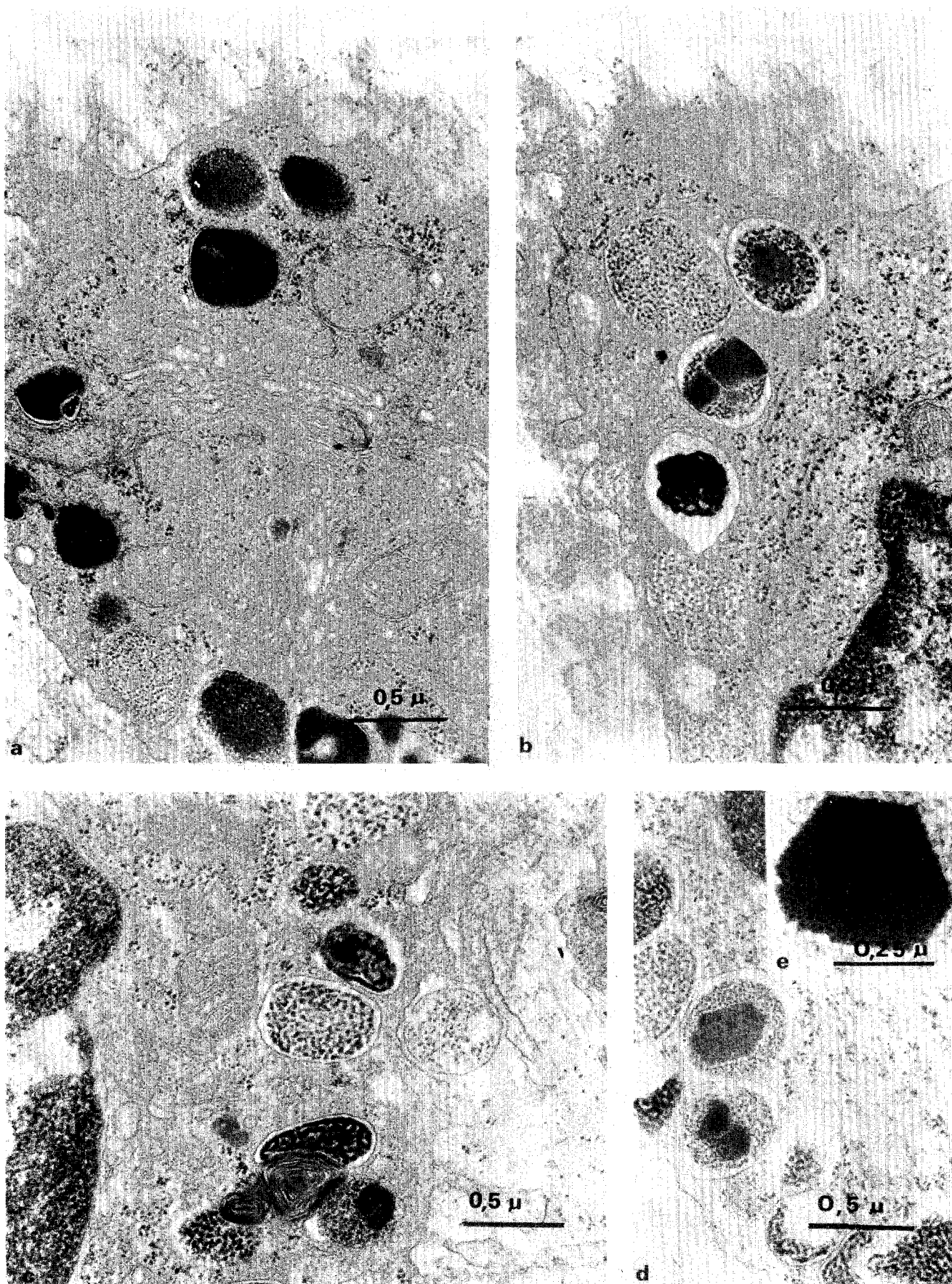


Fig. 5. — a et b : aspect des granules mastocytaires en fin de regranulation normale ; c et d : appareil de Golgi (g) dans les mastocytes regranulés.

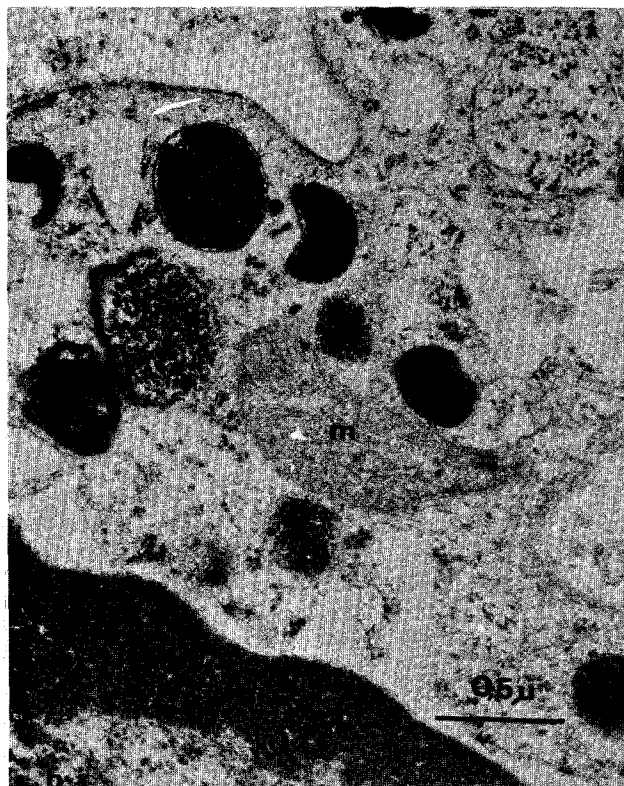
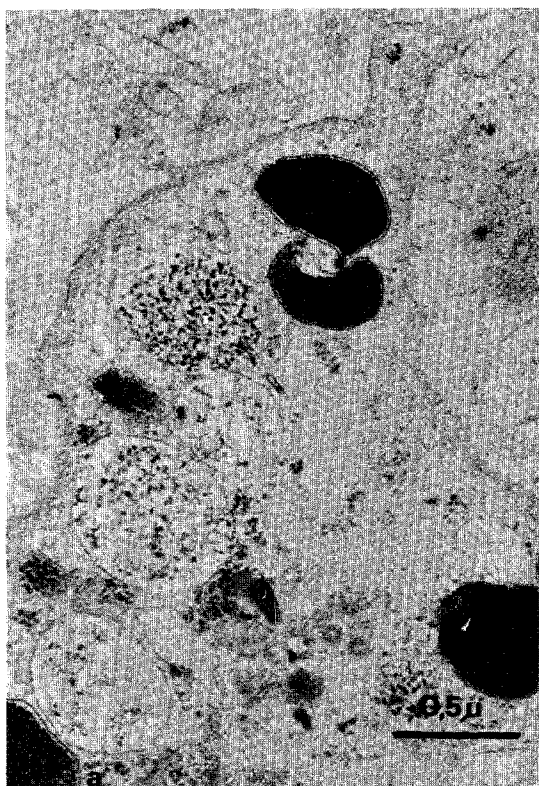


Fig. 6. — Aspect des granulations mastocytaires après traitement thermal au griffon, 30 jours après dégranulation. Granule de densité élevée présentant, dans un même granule, différents aspects (►) (b et d). Granule présentant trois zones de densité électronique différente (◄) (d). Espace périnucléaire élargi (►) (c et d). Mitochondrie (m).

Par contraste, rien ne distingue au plan de la morphologie électronique les mastocytes d'animaux en voie de regranulation normale et ceux qui, durant ce laps de temps, ont reçu quinze jours des instillations de PBS suivant la technique indiquée plus haut.

DISCUSSION

Nos résultats sont en accord avec ceux des auteurs qui ont étudié en culture à la fois la survie des mastocytes après dégranulation (Weill et Renoux [12] et Ginsburg et coll. [3]) et les possibilités de regranulation en culture. Une différence notable néanmoins est constituée par la rapidité de la regranulation en culture qui n'exige, lorsqu'on la juge par les dosages d'histamine, que 24 à 48 heures. Alors qu'in vivo, le nombre de mastocytes granuleux ne revient à la normale qu'en une quinzaine de jours. Il est très probable que cette différence tient aux conditions de l'environnement, les cultures sont effectuées dans un milieu enrichi en histidine (Weill et Renoux), ou bien il s'agit de cultures de cellules blastiques sur film monocouche de fibroblastes embryonnaires (Ginsburg et coll.).

Mais quels que soient ces délais, variables avec les conditions expérimentales, tous les auteurs sont d'accord pour affirmer qu'un mastocyte dont la

dégranulation a été provoquée ne disparaît pas et demeure capable de reconstituer son stock granulaire. Il est évident, en ce cas, qu'en retardant de façon notable cette *restitutio ad integrum* on retarde également la possibilité d'apparition des manifestations allergiques dont cette cellule est « effectrice ».

En d'autres termes, l'inhibition de cette regranulation apparaît comme une modalité thérapeutique qui n'a jamais été étudiée jusqu'ici. Nos résultats indiquent qu'il s'agit là de l'un des modes d'action de la cure thermale au Mont-Dore — Station traditionnellement utilisée pour le traitement des allergies respiratoires.

Quant à la question qui ne peut manquer d'être posée, à savoir quel est l'élément responsable de cette inhibition, ce travail est actuellement en cours dans notre laboratoire mais il faut souligner le fait que la complexité de cette eau est telle qu'il peut paraître vain de tenter d'isoler un seul élément chimique d'un ensemble qui constitue un « miraculeux équilibre ».

Remerciements : Ce travail a pu être effectué grâce à une aide financière de l'Association pour le Soutien et le Développement de la Recherche Thermale (Clermont-Ferrand), dont le Secrétaire Général est le P^r Duchêne-Marullaz, que nous tenons à remercier. Ce travail fut également possible grâce aux facilités d'hébergement et à l'assistance technique fournie par la Société Fermière de l'Établissement Thermal du Mont-Dore. Nous tenons enfin à remercier M. Bourguoin qui nous a guidé dans le traitement statistique de nos résultats.

RÉFÉRENCES

1. Baltzly R., Buck S. S., de Beer E. J., Webb F. J. — A family of long acting depressors. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71, 1031-1035.
2. Diamant B. — Local ungranulation of rat peritoneal mast cell induced by 48/80. *Acta Physiol. scand.*, 1970, 79, 1-5.
3. Ginsburg H., Nir I., Hammel I., Rina Eren B. A., Weissman, Yehudith Naot. — Differentiation and activity of mast cells following immunization in cultures of lymph-node cells. *J. Immunol.*, 1978, 35, 485-502.
4. Ishikawa T., Shimada T., Kossoku N., Kiyoi M. — Inhibition of rat mast cell degranulation and histamine release by histamine-rat gamma-globulin conjugate. *Int. Arch. Allergy appl. Immun.*, 1979, 59, 403-407.
5. Ishisaka T., Ishisaka K., Tomioka H. — Release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by IgE anti-IgE reactions on monkey mast cells. *J. Immunol.*, 1972, 108, 513-520.
6. Johnson A. R., Moran N. C. — Release of histamine from rat mast cell : a comparison of the effects of 48/80 and two antigen-antibody systems. *Fed. Proc.*, 1969, 28, 1716-1720.
7. Lagunoff D. — The mechanism of histamine release from mast cells. *Biochem. Pharma.*, 1972, 21, 1889-1896.
8. Padawer J. — Mast cell structure : implications for normal physiology and degranulation. In : Pepys J., Edwards A. M., *The mast cell ; its role in health and disease*, pp. 1-9. Pitman, Tunbridge Wells, 1979.
9. Reynolds E. S. — The use of lead citrate at high pH as opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 1963, 17, 208-212.
10. Rohlich P., Anderson P., Uvnas B. — Electron microscope observations on compound 48/80 induced degranulation in rat mast cells. *J. Cell. Biol.*, 1971, 51, 465-483.
11. Schwartz D., Lazar P. — *Éléments de statistique médicale et biologique*. Paris, Flammarion, 1978.
12. Weill B. J., Renoux M. L. — Study of granule reappearance and histamine synthesis in rat mast cells maintained in short-term cultures. *J. Cell. Immunol.*, 1982, 68, 220-233.

