50376
1978
192

N° d'ordre : 728

50376
1978
192

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I
pour obtenir le titre de Docteur de 3e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Christine MAZINGUE

INHIBITION DE LA DÉGRANULATION MASTOCYTAIRE PAR UN FACTEUR LIBÉRÉ PAR *SCHISTOSOMA MANSONI*

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Présentée le 14 Octobre 1978 devant la Commission d'examen

Membres du Jury : Président M. J. MONTREUIL
Rapporteur M. A. CAPRON
Examinateurs Melle G. SPIK
M. H. BAZIN

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de Lille (Institut Pasteur, INSERM U 167, CNRS ERA 422) sous la direction du Professeur André CAPRON.

Ce travail a contribué aux communications et publications suivantes :

- MAZINGUE, C., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A., 1977
^{3}H serotonin release ; an improved method to measure mast cell degranulation.
GRIGNON, Immunity in parasitic diseases

- MAZINGUE, C., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A., 1978
Modulation de la dégranulation mastocytaire dans la schistosomiase expérimentale du rat.
CLERMONT-FERRAND, Réunion annuelle de la Société Française d'Immunologie

- MAZINGUE, C., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A., 1978
^{3}H serotonin release : an improved method to measure mast cell degranulation.
J. Immunol. Meth., 21, 65.

- CAPRON, M., ROUSSEAUX, J., MAZINGUE, C., BAZIN, H. & CAPRON, A., 1978
Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody-dependent eosinophil cytotoxicity to Schistosoma mansoni schistosomula.
J. Immunol., in press.

- MAZINGUE, C., DESSAINT, J.P., CAMUS, D., CAPRON, A., 1978
Inhibition of mast cell degranulation by factor(s) produced by S. mansoni
Int. Arch. Allergy app. Immun., submitted.

RESUME

Notre travail avait pour but la mise en évidence d'une modulation de la dégranulation mastocytaire par un extrait parasitaire. Nous avons utilisé pour cela deux techniques, l'une *in vitro* et l'autre *in vivo*.

Les méthodes courantes de mesure de la dégranulation mastocytaire *in vitro* nous ont paru difficilement applicables à notre étude car peu précises et reproductibles. Nous avons donc tout d'abord mis au point une méthode de mesure de la dégranulation consistant à évaluer la libération de sérotonine tritiée par les mastocytes préalablement marqués. Le pourcentage de sérotonine tritiée libérée est en corrélation étroite avec le pourcentage de mastocytes dégranulés. Nous avons étudié les conditions optimales pour obtenir le maximum de libération après activation soit par des agents chimiques, soit par une réaction anaphylactique. Cette méthode s'est avérée très précise, rapide et facile à manier. Elle nous a permis d'étudier l'effet du produit d'incubation de vers adultes de *Schistosoma mansoni* sur la dégranulation mastocytaire.

La fraction dialysable de cet incubat présente une activité inhibitrice de la dégranulation qu'elle soit induite par des agents chimiques ou une réaction anaphylactique. Cette activité se retrouve dans la fraction thermostable. L'inhibition est irréversible par lavage des cellules. Avec de fortes concentrations, cette fraction est cytotoxique, mais aux doses utilisées pour mettre en évidence l'effet inhibiteur, aucune action ni cytotoxique, ni cytostatique vis-à-vis de cellules en culture n'est observée.

L'effet inhibiteur de cette fraction a été apprécié *in vivo* par la technique de PCA. Le même effet inhibiteur est observé. L'efficacité de ce facteur au cours de l'infection reste à démontrer, mais il pourrait être une des explications d'un certain dysfonctionnement de l'activité des mastocytes observé à certaines périodes de l'infection.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1: LE MASTOCYTE ET SON ACTIVATION	5
I - Historique	5
II - Hypersensibilité immédiate	6
III - Mécanisme de l'activation mastocytaire	6
A- Signal d'activation	
1. Dégranulation par des agents chimiques.	7
2. Dégranulation induite par des anticorps anaphylactiques.	7
a) IgE: - Fixation de l'IgE	8
- Induction de la dégranulation	12
b) Autres anticorps anaphylactiques	13
3. Dégranulation induite par les anaphylatoxines	14
4. Sensibilisation hétérologue	15
B- Mécanisme de la dégranulation	15
C- Médiateurs libérés	16
1. Médiateurs préformés	16
a) Histamine	16
b) Sérotonine	16
c) ECF-A	17
d) NCF	18
e) Héparine	18
2. Médiateurs néoformés	18
a) SRS-A	18
b) PAF	19
D- Techniques de mesure de la dégranulation	20

CHAPITRE 2: ROLE DU MASTOCYTE DANS LES RELATIONS HOTE-PARASITE

I- Modèle *Nippostrongylus brasiliensis* 22
II- Modèle *Trichostrongylus colubriformis* et *Trichinella spiralis* 23
III- Modèle *Schistosoma mansoni* 24

CHAPITRE 3: MATERIEL ET METHODES

I- Immunisation et production d'antisérums anti-ovalbumine 28
II- Infection expérimentale du rat 28
A- Entretien du cycle expérimental de *Schistosoma mansoni* 28
B- Infestation des rats 29
C- Prélèvements sanguins 29
III- Préparation des antigènes et des produits d'incubation 29
A- Antigène hydro-soluble de *S. mansoni* 29
B- Produits d'incubation du schistosome 30
IV- Techniques d'anaphylaxie cutanée passive 30
A- Principe 30
B- Titration des sérums 31
C- Inhibition de la réaction 32
1. Action de composés chimiques 32
2. Inhibition de la dégranulation induite par un système antigène- anticorps 32

V- Techniques de culture cellulaire 33
A- Culture de lymphocytes 33
1. Récupération des cellules 33
2. Mitogènes 33
3. Culture 33

B- Cultures de cellules en lignée continue 34

VI- Cytotoxicité mastocyte- éosinophile dépendante 35
A- Préparation des schistosomules 35

B- Milieu de culture 35

C- Préparation des cellules 35

D- Purification des cellules 35

E- Test de cytotoxicité 36

VII- Test de dégranulation 36
A- Obtention des cellules péritonéales de rat 36

B- Incorporation de ^{3}H sérotonine 37

C- Mesure de la libération de sérotonine 37

D- Mesure de la radioactivité 37

E- Produits utilisés 37

F- Contrôle morphologique de la dégranulation 38

G- Etude ultrastructurale 38

H- Purification des mastocytes 38

CHAPITRE 4: RESULTATS ET DISCUSSION

I- Mise au point du test de dégranulation 40

A- Incorporation de sérotonine par la suspension cellulaire 40

1. Localisation de la sérotonine marquée au niveau des mastocytes 40

2. Intégrité structurale après marquage 40

B- Action du composé 48/80 43

C- Action d'autres activateurs chimiques 46

D- Inhibition de la dégranulation par des agents chimiques 47

E- Dégranulation induite par une réaction antigène anticorps 50

1. Recherche du temps optimal de sensibilisation 50

2. Influence de la concentration en antigène 50

3. Sensibilité de la méthode 50

4. Caractéristiques de la dégranulation anaphylactique 50

5. Action du cromoglycate de sodium 54

6. Dégranulation de mastocytes d'animaux immuns 55

F- Discussion 57

II- Production par Schistosoma mansoni d'un facteur inhibiteur de la dégranulation mastocytaire 60

A- Inhibition de la dégranulation in vitro 60

1. Inhibition de la dégranulation induite par un système anaphylactique 60

2. Inhibition de la dégranulation induite par des agents chimiques 60

3. Caractéristiques de ce facteur inhibiteur 63

a) Thermostabilité 63
b) Caractère irréversible de l'inhibition par lavage 65
c) Non-cytotoxicité de cette substance 65

B- Inhibition de la dégranulation *in vivo* 70
1. PCA induite par des agents chimiques 70
2. PCA induite par une réaction anaphylactique 73
a) Sérum antiovalbumine et ovalbumine 73
b) Sérum de rat infecté et antigène hydrosoluble de *S. mansoni* 73

C- Inhibition du système de cytotoxicité mastocyte-éosinophile dépendant 73

D- Discussion 75

CONCLUSION 82

REFERENCES 85

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le parasite et l'hôte réalisent une association biologique dominée par la tolérance réciproque. Sur le plan immunologique, la longue survie des parasites chez leurs hôtes représente un paradoxe inexpliqué, car l'organisme tolère la présence d'une quantité d'antigène considérable. Pourtant l'hôte réagit à l'invasion parasitaire en développant une réponse immune composée de différents mécanismes effecteurs. Ces mécanismes mettent en cause des anticorps humoraux, des cellules sensibilisées et l'interaction d'anticorps avec différents types cellulaires comme les macrophages, les éosinophiles ou les mastocytes.

Malgré la diversité des phénomènes de défense mis en oeuvre, le parasite se maintient dans l'organisme même si chez certains hôtes il est partiellement rejeté. Depuis peu de temps, l'étude des modalités de survie du parasite a suscité un grand intérêt et il s'avère que le parasite dispose de plusieurs moyens lui permettant d'échapper à la réponse de l'hôte. L'acquisition d'antigènes d'hôte et la variation antigénique constituent pour le parasite deux mécanismes possibles. Mais le parasite est également capable d'interférer au niveau central de la réponse immune de l'hôte et de modifier le comportement de cellules immunocompétentes.

Dans cette vaste perspective de l'étude des relations hôte-parasite, nous nous sommes intéressés, dans le modèle d'infection par S. mansoni, aux phénomènes de régulation pouvant intervenir sur le mastocyte. En effet, le mastocyte constitue un élément important de la réponse immune de l'hôte. D'une part l'activation de cette cellule conduit à la libération de granules mastocytaires contenant des amines vasoactives et responsables de l'hypersensibilité immédiate. D'autre part le mastocyte intervient au niveau des mécanismes effecteurs de l'immunité puisque récemment il a été observé dans l'infection du rat par S. mansoni que le mastocyte

était indispensable à l'expression de la cytotoxicité par éosinophiles. L'activité cytotoxique des éosinophiles contre des schistosomules sensibilisés par des anticorps IgGa est considérablement amplifiée par la présence des mastocytes.

La transposition des phénomènes observés in vitro à la réalité biologique permet de penser que les activités mastocytaires sont modulées au cours de l'infection. En effet, le mécanisme de cytotoxicité impliquant les éosinophiles- mastocytes- IgGa n'apparaît efficace que pendant certaines périodes de l'infection alors que la production d'anticorps anaphylactiques capables d'activer le mastocyte se poursuit.

Par ailleurs, l'infection par S. mansoni s'accompagne d'une forte production d'IgE dont seul un faible pourcentage a une spécificité parasitaire. Cette situation devrait conduire à une dégranulation massive des mastocytes au cours de l'infection avec pour conséquence des symptômes d'hypersensibilité immédiate importants. Au contraire, la fréquence des manifestations allergiques est faible compte tenu de l'amplitude de la réponse réaginique. Il semble même que les sujets parasités soient moins susceptibles aux phénomènes allergiques.

L'ensemble de ces éléments suggère une modulation des phénomènes d'activation mastocytaire au cours de l'infection. Trois éléments peuvent expliquer cette limitation de la dégranulation: une quantité d'antigène trop faible pour induire une dégranulation, une compétition au niveau du récepteur mastocytaire par des anticorps IgE de spécificité différente ou des complexes immuns bloquants et une altération de la fonction mastocytaire. La première hypothèse est peu probable car plusieurs auteurs ont montré la libération d'allergènes en quantité suffisante au cours de l'infection. L'effet compétitif des IgE ou des complexes immuns bloquants est une hypothèse couramment admise mais pour plusieurs auteurs elle

ne constitue qu'une explication partielle. L'éventualité d'une altération de la fonction mastocytaire n'est plus hypothétique depuis la mise en évidence de la libération de facteurs régulateurs de l'activation cellulaire par les schistosomes et par d'autres parasites. Ces facteurs immunodépresseurs ou activateurs polyclonaux agissent directement sur les lymphocytes. Pour tenter de vérifier cette hypothèse, l'effet d'un extrait parasitaire de S. mansoni sur la dégranulation mastocytaire a été étudié in vitro et in vivo.

Le premier temps de notre travail a consisté à mettre au point une méthode de mesure de la dégranulation in vitro reproductible et standardisée. Puis nous avons recherché l'effet de substances d'origine parasitaire sur l'activation mastocytaire in vitro et in vivo. Avant de procéder à l'exposé de ces travaux, il est toutefois nécessaire de rappeler le mécanisme de l'activation mastocytaire et la place occupée par le mastocyte dans les relations hôte-parasite.

CHAPITRE 1

LE MASTOCYTE ET SON ACTIVATION

CHAPITRE 1 : LE MASTOCYTE ET SON ACTIVATION

I- Historique

En I877, EHRLICH décrit la présence dans le tissu conjonctif de cellules présentant des granulations importantes et une coloration métachromatique. EHRLICH étudie la morphologie du mastocyte, sa localisation, ses propriétés de coloration et la solubilité des granules dans l'eau. Les mastocytes se retrouvent dans pratiquement tout le règne animal, (RILEY, 1959), avec une quantité beaucoup plus importante chez les vertébrés supérieurs. On les retrouve principalement dans le tissu interstitiel, autour des vaisseaux sanguins, dans la cavité péritonéale et dans le thymus (HARRIS,1900),(STAMMLER, 1921; RILEY, I959; BENDITT et LAGUNOFF, I963). Ces cellules se présentent sous forme ovoïde ou allongée (BENDITT, I957; BLOOM, I960) avec un diamètre d'environ 12,6 µm. La cellule est remplie de granules (environ 500 granules par cellule chez le rat) (UVNAS, I964) limités par une membrane périgranulaire (GROSSBERG et GARCIA-AROCHA, I954).

JORPES et al. (I937) établissent que l'héparine se colore métachromatiquement avec le bleu de toluidine comme le mastocyte puis démontrent l'existence d'une corrélation entre le nombre de mastocytes et la quantité d'héparine d'un tissu. L'héparine est localisée au niveau des granules (OLIVER et al., I947). Les études biochimiques ont montré l'existence en quantités importantes d'héparine, d'histamine (RILEY, I953) et de 5-hydroxytryptamine, de même que la présence d'un grand nombre d'enzymes (BENDITT et al., I955). Histamine et héparine forment au niveau des granules des complexes dont la stabilité est assurée par le zinc.(KERP et STEINHAUSER, 1961).

Le mastocyte est capable de libérer ces complexes après activation par différents stimuli. La libération d'amines vasoactives est responsable des manifestations de l'hypersensibilité immédiate.

II- Hypersensibilité immédiate

L'interaction d'un allergène et d'anticorps cytotropes fixés à la surface de mastocytes ou de polynucléaires basophiles entraîne leur dégranulation et la libération d'amines vasoactives responsables des effets locaux et généraux de l'hypersensibilité immédiate. L'anaphylaxie qui est une de ces manifestations (PORTIER et RICHET, 1902) apparaît dans des conditions bien précises. Après une première injection dite sensibilisante d'antigène et une période de latence variant de 1 semaine à 1 mois, la seconde injection dite déclenchante est suivie immédiatement d'un état de choc. La symptomatologie du choc anaphylactique dépend de l'organe cible sur lesquels vont agir les médiateurs libérés par les mastocytes. Ces médiateurs entraînent principalement une augmentation de la perméabilité capillaire et une contraction des muscles lisses. Certains de ces organes, variables suivant les espèces mais constants pour une espèce donnée, vont réagir de façon plus intense et entraîner la mort de l'animal. Les symptomes sont atténués par l'administration d'antihistaminiques. L'anaphylaxie est transmissible par le sérum. C'est une réaction dépendante de certains anticorps. Ces anticorps sont appelés anticorps anaphylactiques. Le processus par lequel l'anticorps anaphylactique et l'allergène activent le mastocyte est extrêmement complexe.

III - Mécanisme de l'activation mastocytaire

A - Signal d'activation

C'est généralement l'interaction d'un anticorps anaphylactique et de l'antigène correspondant à la surface du mastocyte qui induit une dégranulation mais celle-ci peut également être déclenchée par certaines substances pharmacologiques.

1. Dégranulation par des agents chimiques

De nombreux composés basiques ont la propriété d'activer les mastocytes. Le composé 48/80 (produit de condensation de p-methoxyphenylethylmethylamine avec le formaldehyde) a été particulièrement étudié (MC INTOSH et PATON, 1949). Ce composé à très faible dose (1 µg) produit une libération d'histamine et des changements morphologiques comparables à ceux produits par une réaction anaphylactique. L'octylamine (MOTA, 1959), la decylamine (HOGBERG et UVNAS, 1960) et la polymyxine (LAGUNOFF, 1972) ont également une action de dégranulation des mastocytes.

La lysolecithine est capable d'induire une dégranulation seulement dans un milieu dépourvu d'albumine, afin d'éviter l'adsorption sur celle-ci et l'inactivation de la lecithine (KELLER, 1964a). Certains métabolites tels que l'ATP et l'ADP ont également une action directe de dégranulation sur les mastocytes (KELLER, 1964b). L'utilisation de Ca^{++} ionophore provoque une dégranulation, ce qui a permis de monter l'importance du Ca^{++} dans ce processus (FOREMAN et al., 1973).

La phospholipase A et l'α chymotrypsine activent le mastocyte (HOGBERG et UVNAS, 1957; KELLER, 1961). Le rôle de ces deux enzymes dans le mécanisme de la dégranulation anaphylactique a été avancé par ces auteurs mais n'a jamais pu être clairement démontré.

2- Dégranulation induite par des anticorps anaphylactiques

In vivo, l'activation du mastocyte résulte de l'interaction d'un anticorps anaphylactique avec l'antigène à la surface de la cellule. Suivant les espèces, différentes sous-classes d'immunoglobulines G ont cette propriété, mais ce sont surtout les anticorps de classe IgE retrouvés chez de nombreuses espèces qui ont été étudiés et qui apparaissent les plus efficaces.

a) IgE

La mise en évidence d'un transfert de la sensibilisation par le sérum a été rapportée par PRAUSNITZ et KUSTNER en 1921. PRAUSNITZ s'injecta dans la peau du bras le sérum de KUSTNER allergique au poisson et un extrait de poisson ce qui déclencha une réaction immédiate. Cette réaction est dépendante de la présence d'anticorps. Ces anticorps se fixent fortement au niveau du point d'injection et y persistent plusieurs semaines (COCA et GROVE, 1925).

Ces anticorps responsables des phénomènes d'allergie furent appelés anticorps réaginiques. Ils ont pour propriétés:

* thermolabilité: l'activité anaphylactique est détruite par chauffage à 56°C
* sensibilité au 2-mercaptoéthanol
* inaptitude à fixer le complément.

Ces anticorps sont dits "homocytotropes" car ils ne sensibilisent pas la peau d'autres espèces. Le faible taux sérique de ces réagines explique la difficulté de leur identification. C'est seulement en 1966 qu'ISHIZAKA et al. isolent et caractérisent ces réagines. Elees appartiennent à une classe d'immunoglobulines différentes de celles déjà identifiées et furent appelées IgE (du nom de l'allergène E vis-à-vis duquel les anticorps réaginiques étaient dirigés). L'étude de l'interaction de l'IgE avec le mastocyte a pu être réalisée grâce à la découverte de myelomes à IgE tout d'abord chez l'homme (ISHIZAKA et al., 1970a) puis chez une souche de rat (BAZIN et al., I974)

- Fixation de l'IgE:

* Structure de l'IgE nécessaire à la fixation:

La réaction de PRAUSNITZ-KUSTNER est inhibée par une IgE myelomateuse humaine et seul le fragment Fc présente cette activité (STANWORTH et al., 1968). L'activité homocytotropique est liée aux domaines constants Cε3 et/ou Cε4 (BENNICH et al., 1976).

* Etude du récepteur IgE:

Cette spécificité étroite de la fixation de l' IgE sur le mastocyte fait appel à la présence au niveau de la membrane cellulaire d'une structure complémentaire ou récepteur (ISHIZAKA et al., I970a)(SULLIVAN et al., 1971).

Les premières études ont été réalisées sur des polynucléaires basophiles humains avec de l'IgE myelomateuse humaine (ISHIZAKA et al., 1970a). L'isolement d'une IgE myelomateuse par BAZIN et al.(1974a) a permis de poursuivre les études chez cet animal. Ce système présente l'avantage de permettre d'obtenir et d'isoler plus facilement des mastocytes (BACH et al., 1971a). D'autre part, l'existence d'une lignée de cellules de leucémie basophile de rat a permis la mise en culture de cette lignée et l'utilisation de ces cellules in vitro pour l'étude du récepteur mastocytaire (ECCLESTON et al., 1973).

.Nombre: Les premières études menées parallèlement sur les basophiles humains et les cellules normales ou leucémiques de rat ont permis d'apprécier le nombre de récepteurs présents à la surface des cellules.

Pour les basophiles humains, il varie de 40 à 100. 10^3 (ISHIZAKA et al., I973), pour les basophiles de rat leucémique de 600 à 1000.10^3 (KULCZYCKI et METZGER, 1974), et pour les mastocytes péritonéaux de rat 300.10^3 (CONRAD et al., 1975). Les basophiles humains ayant un diamètre 2 à 3 fois plus petit que les mastocytes péritonéaux, la densité des récepteurs par unité de surface cellulaire est comparable.

. Caractéristiques de fixation: La liaison IgE-récepteur est réversible. Des basophiles normaux incubés préalablement avec de l'IgE marquée puis avec de l'IgE froide,libèrent lentement de l'IgE marquée dans le milieu.(ISHIZAKA et al., 1973). La liaison entre l'IgE et le récepteur mastocytaire est dissociée à pH acide (ISHIZAKA et ISHIZAKA, 1974).

L'association de l'IgE avec son récepteur varie de façon linéaire avec la température. La fixation de l'IgE est indépendante de la présence d'ions Ca^{++} mais exige du Mg^{++} (KULCZYCKI et METZGER, 1974). Elle est également inhibée par des complexes immuns comportant de l'IgGa mais ne l'est pas par de l'IgGa monomère dans le cas de cellules leucémiques de rat (HALPER et METZGER, 1976). Ce dernier point est contesté par BACH et al.(1971b) qui obtient avec des cellules normales de rat une inhibition de la fixation de l'IgE par des anticorps IgGa.

La constante d'équilibre de la réaction a été estimée à $0,5 - 1,3.10^9$ $l.mole^{-1}$ dans le cas de basophiles humains (ISHIZAKA et al., 1973), 9.10^9 $l.mole^{-1}$ dans le cas de cellules leucémiques (KULCZYCKI et METZGER, 1974), $1 - 1,5$ 10^9 $l.mole^{-1}$ pour les cellules péritonéales de rat (CONRAD et al., 1975). Dans les trois modèles étudiés, les valeurs élevées de la constante d'équilibre reflètent la forte affinité de l'IgE pour le récepteur mastocytaire et expliquent les faibles quantités d'IgE nécessaires à la sensibilisation de la cellule-cible de même que la persistance de cette immunoglobuline au niveau des tissus.

. Distribution des récepteurs: La distribution des récepteurs pour l'IgE à la surface du mastocyte peut être appréciée en incubant la cellule avec de l'IgE radiomarquée ou rendue fluorescente. L'incubation de mastocytes avec de l'IgE montre une distribution régulière des récepteurs sur la surface cellulaire (ISHIZAKA, 1976)(MENDOZA et METZGER, 1976) (SCHLESSINGER et al., 1976). L'addition d'anti IgE divalent induit une redistribution des récepteurs: les molécules se regroupent en amas puis avec de plus fortes concentrations d'anti IgE se retrouvent à un pôle de la cellule (phénomène de "capping")(BECKER et al., 1973).La libération d'histamine peut être obtenue avec de l'anti IgE mais seulement avec des doses très faibles qui n'induisent pas de "capping" (ISHIZAKA, 1976).

Lors du "capping", dans le cas de basophiles humains, les récepteurs libres migrent avec les récepteurs occupés par l'IgE, ce qui laisse supposer soit de fortes liaisons entre les différents récepteurs, soit leur multivalence (ISHIZAKA, 1976). Avec des cellules normales et tumorales de rat et de souris, MENDOZA et METZGER (1976) montrent que le récepteur pour l'IgE est monovalent et indépendant mais ils n'excluent pas des interactions avec d'autres structures membranaires. SCHLESSINGER et al. (1976) dans le même modèle ont étudié par des techniques de fluorescence quantitative la mobilité des complexes IgE- récepteurs. Seulement 50 à 80% de ces complexes sont mobiles;ces auteurs concluent également que le récepteur IgE est monovalent. La mobilité est abolie quand un antisérum anti IgE induit le "capping". Par contre elle n'est pas modifiée dans les conditions de dégranulation, ce qui suggère une redistribution limitée et beaucoup moins étendue que pour le "capping".

. Nature du récepteur: Le traitement des mastocytes par la neuraminidase inhibe la dégranulation médiée par l'IgE alors que la phospholipase C est inactive (BACH et BRASHLER, 1973) ce qui suggère que ce récepteur est de nature glycoprotéique.

L'isolement et la purification du récepteur ont permis de préciser les propriétés physico-chimiques de ce récepteur. La lyse du mastocyte par de l'eau distillée ne détruit pas la capacité de fixation des IgE sur les fragments cellulaires (BACH et BRASHLER, 1973). L'action d'un détergeant, le Nonidet P40, permet d'obtenir des structures capables de fixer l'IgE.

A partir de ces préparations, un complexe IgE-récepteur a pu être isolé. Le récepteur pour l'IgE est une glycoprotéine de 50000 comprenant des hexosamines et de l'acide sialique, détruite complètement par la pronase et la pepsine, partiellement par la trypsine (CONRAD et al., 1976) (KULCZYCKI et al., 1976).

L'immunisation d'animaux par ces complexes récepteurs IgE a permis d'obtenir des anticorps possédant une capacité de liaison avec le récepteur mastocytaire et induisant la dégranulation (ISHIZAKA et al., 1977)(CONRAD et al., 1978).

-Induction de la dégranulation:

Le problème posé est de savoir comment l'interaction de l'IgE avec le mastocyte et l'antigène déclenche l'activation du mastocyte et la libération de médiateurs. Une condition nécessaire pour obtenir ce signal est l'interaction de deux molécules d'IgE par un antigène qui doit donc être au moins divalent. En effet les haptènes monovalents n'induisent pas d'activation (LEVINE et REDMOND, 1968) (WECK et SCHNEIDER, 1972). L'anti IgE doit être nécessairement bivalent pour obtenir une réaction d'hypersensibilité (ISHIZAKA et ISHIZAKA, 1969). La même réaction peut avoir lieu avec des $F(ab')_2$ antiε mais jamais avec des F(ab') monomères. Cette théorie a encore été renforcée par les travaux de SIRAGANIAN et al. (1975) sur le rôle d'haptènes monovalents ou bivalents. Des lapins sont immunisés avec un conjugué benzyl pénicilline- ovalbumine (BPO-OA). Si les leucocytes de ces animaux sont mis en présence de BPO-NH-$(CH_2)_6$-NH-BPO, on observe une libération d'histamine. Si la chaîne carbonée est plus courte ou si l'haptène est monovalent, la libération d'histamine est supprimée. Seuls les haptènes au moins bivalents induisent une libération d'histamine. La distance entre les deux groupements hapténiques est un facteur très important. Si l'haptène est bivalent mais de double spécificité antigénique, la réaction ne peut avoir lieu que si le répondeur a été immunisé avec les deux types d'haptènes; ceci montre que l'activation se produit par interaction de deux IgE avec un antigène bivalent. L'étude des complexes immuns préformés a permis de montrer que seuls les complexes formés en léger excès d'antigène possèdent une activité anaphylactique; les complexes de formule Ag2AC n'ont pas cette activité, alors que les complexes possédant deux anti-

corps ou plus ont une activité; le signal serait donc le rapprochement de deux molécules d'anticorps par l'antigène (ISHIZAKA et ISHIZAKA, 1968). L'utilisation d'IgE aggrégées de façon chimique par la benzidine diazotée a renforcé cette hypothèse. L'IgE aggrégée est capable d'induire une réaction anaphylactique, de même que des fragments Fc aggrégés (ISHIZAKA et al., 1970b). La quantité minimale d'anticorps IgE nécessaire pour induire une dégranulation est insuffisante pour que ces anticorps soient adjacents à la surface du mastocyte. Cependant l'hypothèse de l'interaction de deux IgE par l'antigène reste plausible. La membrane se trouve dans un état de "mosaïque fluide" (SINGER et NICHOLSON, 1972). On peut donc imaginer que la liaison d'une molécule d'IgE avec l'antigène soit suivie d'une migration du récepteur; l'ensemble peut alors se combiner à un autre complexe IgE-récepteur et induire le signal d'activation.

Les travaux très récents d'ISHIZAKA et al.(1977) ont fait évoluer cette théorie. L'isolement des récepteurs mastocytaires a permis d'obtenir des anticorps anti-récepteurs. Ces anticorps ont la propriété d'induire une libération d'histamine et par conséquent de reproduire le signal d'activation antigénique. Ce fait suggère que le rapprochement des deux récepteurs plutôt que l'interaction de deux IgE induise l'activation du mastocyte.

b) Autres anticorps anaphylactiques

Bien que la majorité des réactions anaphylactiques soit induite par des anticorps de classe IgE, il existe d'autres classes d'anticorps anaphylactiques. Ce sont des anticorps de classe IgG, IgGa chez le rat (MORSE et al., 1969), IgG1 chez la souris (NUSSENWEIG et al., 1964) et le cobaye (BENACERAFF et al., 1963), IgG_4 chez l'homme (STANWORTH et SMITH, 1973).

La dégranulation induite par le système IgGa chez le rat a été étudiée par BACH et al. (1971a,b). Ces anti-

corps présentent une affinité plus faible pour le mastocyte que l'IgE. Ils persistent beaucoup moins longtemps que l'IgE au niveau des tissus. Il semble que le récepteur mastocytaire soit le même pour les deux types d'anticorps puisqu'il existe une compétition entre des complexes à IgGa et l'IgE (HALPER et METZGER, 1976) ou l'IgGa monomère et l'IgE (BACH et al., 1971), mais aucune fixation directe de l'IgGa sur ce récepteur n'a pu être mise en évidence.

Chez la souris, les anticorps IgG_1 présentent également une plus faible affinité que l'IgE pour le mastocyte car leur durée de vie tissulaire est faible. Il semble que les récepteurs mastocytaires pour ces deux immunoglobulines soient distincts (SOUZA et al., 1974) (LEHRER, 1977).

On peut actuellement difficilement apprécier l'importance de ces anticorps dans l'anaphylaxie, et le rôle compétitif qu'ils jouent vis-à-vis de l'IgE.

3. Dégranulation induite par des anaphylatoxines

Le complément n'intervient pas dans l'activation des mastocytes par l'IgE mais il peut y participer indirectement. Les anaphylatoxines C_3a et C_5a sont des constituants capables de provoquer une libération d'histamine à partir des mastocytes (MULLER-EBERHARD, 1975). Ces anaphylatoxines sont générées après activation du complément par la voie classique ou alterne. In vitro, l'induction de la dégranulation par les anaphylatoxines est dépendante de la présence d'ions Ca^{++} et de la température (PETERSSON et al., 1975). L'importance de ce processus in vivo n'est pas établie, d'autant plus qu'il existe dans le sérum un inactivateur des anaphylatoxines extrêmement puissant (BOKISH et MULLER-EBERHARD, 1970).

Les neutrophiles après activation par des complexes immuns et complément sont également capables de libérer des protéines cationiques à activité anaphylactique (SEEGERS et JANOFF, 1966).

4. Sensibilisation hétérologue

Il est possible de sensibiliser passivement un animal avec des Ac provenant d'une espèce différente. Les manifestations anaphylactiques sont les mêmes mais la nature des Ac est différente. Ce sont, en général, des Ac inactifs chez l'espèce du donneur, par exemple IgG_2 de souris actifs chez d'autres espèces. Cette propriété a d'ailleurs été exploitée pour la détection d'Ac anaphylactiques dans des sérums humains en utilisant des cellules de rat (PERELMUTTER et LIAKOPOULOU, 1971)

B - Mécanisme de la dégranulation

Les mécanismes de transmission du signal à l'intérieur de la cellule et la séquence d'évènements qui conduit à la libération des médiateurs sont encore mal connus. C'est un processus dépendant de la présence de Ca^{++} et d'énergie (KELLER, 1964). Pour certains, le flux de Ca^{++} à l'intérieur de la cellule serait le premier évènement d'activation du processus (FOREMAN et al., 1973) D'autres pensent que des évènements plus précoces interviennent. HOGBERG et UVNÄS (1957) observent une inhibition de la dégranulation par inactivation des phospholipases qui pourraient ainsi être le premier maillon de la chaîne. Pour BECKER ET AUSTEN (1964) ce serait plutôt l'activation d'une sérine estérase. L'activation de la proestérase en estérase se fait sous la dépendance du Ca^{++}. On a également montré la dépendance du phénomène vis-à-vis des nucléotides cycliques. L'augmentation d'AMPc provoque une inhibition de la dégranulation alors que celle du GMPc favorise le phénomène (SULLIVAN et al., 1975). Cette modulation a pour conséquence une aggrégation des microtubules. (KALINER, 1977).

KALINER et AUSTEN (1973) décrivent 5 étapes successives : l'activation de la proestérase en estérase due au rapprochement des récepteurs mastocytaires, une étape dépendante d'énergie, l'utilisation du Ca^{++} intracellulaire qui conduit à une modification du taux des nucléotides intracellulaires ce qui permet l'aggrégation des microtubules, et l'extrusion des granules cytoplasmiques.

C - Médiateurs libérés

Deux types de médiateurs sont libérés lors de l'activation. Les uns préexistent et sont stockés dans les granules, les autres sont synthétisés lors de l'activation (médiateurs néoformés).

1. Médiateurs préformés

a) Histamine

C'est le médiateur le plus important chez les mammifères, mais des différences très marquées en quantité d'histamine existent entre les espèces (FELDBERG, 1956 ; PATON, 1958). Elle est stockée dans les granules (WEST, 1955). Chez le rat, on retrouve environ 20 pg d'histamine par cellule (KELLER, 1962). L'histamine est synthétisée à partir de l'histidine par action d'une décarboxylase (SCHAYER, 1956) cytoplasmique et forme ensuite des complexes avec l'héparine.

L'histamine a des actions vasodilatatrices, provoque la contraction des muscles lisses. Elle a également des propriétés chemotactiques pour les éosinophiles, mais ceci n'a pour l'instant été observé que *in vitro* (TURNBULL *et al.*, 1977).

b) Sérotonine

Elle a été identifiée chez le rat par BENDITT *et al.* en 1955. La concentration en sérotonine chez les mastocytes péritonéaux de rat représente environ le 1/10e au 1/20e de celle de

l'histamine (BENDITT et al., 1956). Elle est localisée dans les granules (BARNETT et al., 1958) et libérée avec l'histamine (BHATTACHARYA et LEWIS, I956). On la retrouve également chez la souris (FURTH et al., 1957). Elle est synthétisée dans le cytoplasme à partir de 5-hydroxytryptophane-décarboxylase (HAGEN et LEE, 1958). Les mastocytes des animaux d'autres espèces ne semblent pas contenir ce médiateur (SJOERDSMA et al., 1957).

c) ECF-A (Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis)

Ce facteur chemotactique pour les éosinophiles a été décrit par KAY et AUSTEN (1971) chez le cobaye et l'homme. L'ECF-A est totalement préformé et stocké dans les granules (WASSERMAN et al., 1974) des basophiles et mastocytes humains, et également dans les mastocytes péritonéaux de rat.

Il s'agit de deux tétrapeptides { Val-Gly-Ser-Glu / Ala-Gly-Ser-Glu } (GOETLZ et AUSTEN,1975

un troisième peptide analogue de synthèse a également cette propriété chemotactique : Val-Gly-Asp-Glu.
L'ECF-A et l'histamine présentent des activités chemotactiques in vitro quand incubés seuls mais présentent une action antagoniste annulant la réaction lorsqu'ils sont incubés simultanément (TURNBULL et al., 1977). D'autre part, des éosinophiles mis en contact avec de l'ECF-A ne peuvent plus répondre à une deuxième stimulation par l'ECF-A, le même phénomène de "déactivation" se produisant avec l'histamine. Par contre, la réaction croisée ne provoque pas de désensibilisation (WASSERMAN et al., 1975). Ces faits suggèrent une interaction complexe entre ces deux médiateurs. TURNBULL propose le mécanisme suivant : les éosinophiles activés par l'ECF-A migrent au site de la réaction, l'histamine permettant alors la stabilisation de ces cellules.

L'ECF-A joue un rôle dans l'activation des structures de liaison du C_3 sur la membrane des éosinophiles mais n'intervient pas sur les récepteurs IgG (ANWAR et KAY, 1977). C'est la première démonstration d'un rôle direct de facteur chemotactique au niveau de la membrane cellulaire.

Le recrutement des éosinophiles par ce facteur chemotactique se traduit par une activation de ces cellules avec une augmentation de la phagocytose. Les éosinophiles sont en particulier capables d'ingérer des granules mastocytaires (WELSH et GEER, 1959). Les éosinophiles activés libèrent des enzymes capables de dégrader certains médiateurs mastocytaires et exercent ainsi une action de régulation de la dégranulation.

d) Neutrophil chemotactic factor ou NCF

Cette protéine de poids moléculaire supérieur à 160.000 possède une activité chemotactique vis-à-vis des neutrophiles (LEWIS et al., 1975). Ce facteur est libéré par les cellules de poumon de cobaye ou d'homme, (WASSERMAN et al., 1974) et par les mastocytes péritonéaux de rat. Ce recrutement de neutrophiles par un médiateur mastocytaire souligne le rôle du mastocyte dans les réactions inflammatoires.

e) Héparine

Elle se trouve associée aux amines avec qui elle forme des complexes stabilisés par le zinc (KERP et STEINHAUSER, 1961). On connaît le rôle de l'héparine commerciale dans l'activation du complément et la coagulation sanguine, mais le rôle de l'héparine libérée par les mastocytes reste encore inconnu.

2. Médiateurs néoformés

a) SRS-A

Ce nom de "slow reacting substance of anaphylaxis" est lié à la contraction prolongée du muscle lisse qu'elle provoque par opposition à celle de l'histamine qui est de courte durée.

Cette substance est mise en évidence dans les tissus (BROCKLEHURST, 1960) (ORANGE et al., 1974) et dans les cellules (LEWIS et al., 1974) seulement après activation immunologique immédiatement avant sa libération. Chez le rat, la libération de SRS-A induite par les anticorps IgGa et l'antigène n'est pas liée aux mastocytes mais aux polynucléaires (MORSE et al., 1968). Il y a production de SRS-A par l'IgGa, et l'IgE chez le rat, IgG et IgE chez le cobaye, IgE chez l'homme. La SRS-A produite par activation avec l'IgE semble liée aux mastocytes (ORANGE et al., 1970).

La mise en évidence de la production de SRS-A par le macrophage vient encore renforcer l'origine multiple de cette substance aussi bien en ce qui concerne la cellule productrice que l'immunoglobuline activatrice. La SRS-A soluble dans l'éthanol et stable en milieu basique possède un poids moléculaire d'environ 400 (ORANGE et al., 1973). Elle est caractérisée par la présence d'un groupement sulfate ester sensible à l'hydrolyse par les arylsulfatases d'éosinophiles (ORANGE et al., 1974).

b) PAF

Il est libéré par des leucocytes sensibilisés avec un antigène spécifique ; le basophile sensibilisé par l'IgE produit ce médiateur (SIRAGANIAN et OSLER, 1971) (BENVENISTE et al., 1972). Il n'a pu être identifié dans les cellules non stimulées (LEWIS et al., 1975), ce qui suggère sa synthèse après activation immunologique. Ce composé de poids moléculaire 300-400 est de structure lipidique. Il est sensible à l'action de la phospholipase libérée par les éosinophiles. Il a la propriété de provoquer l'aggrégation des plaquettes et la libération de leurs amines (BENVENISTE et al., 1975). Récemment, MENCIA-HUERTA et al. (1978) ont montré que le PAF serait également produit par les macrophages. Il semblerait donc que les deux médiateurs néoformés SRS-A et PAF puissent avoir plusieurs origines dont vraisemblablement les mastocytes.

D- Techniques de mesure de la dégranulation

Deux groupes de méthodes peuvent être utilisées: l'observation morphologique des cellules altérées ou le dosage des médiateurs libérés.

L'observation microscopique des mastocytes après coloration métachromatique permet de mesurer le pourcentage de cellules altérées (MOTA et DIAS DA SILVA, 1960)(UVNAS, 1961) (KELLER, 1966)(BENVENISTE et al., 1976). Cette technique fastidieuse ne fournit qu'une information semiquantitative et n'est valable que si la cellule est fortement altérée.

La quantité de médiateurs libérés peut être déterminée soit par mesure de la contraction de l'iléon de cobaye en comparaison avec une solution standard (UVNAS et THON, 1959) soit par dosage fluorimétrique de la sérotonine (SNYDER et al., 1965) ou de l'histamine (SHORE et al., 1959). Un dosage radioimmunologique de la sérotonine a également été mis au point (PESKAR et SPECTOR, 1973). Ces méthodes donnent des résultats quantitatifs mais exigent du temps et de l'expérience. De plus des interférences avec d'autres substances biologiques sont toujours possibles.

L'utilisation de traceurs radioactifs constitue la dernière possibilité. L'incorporation de sérotonine exogène au niveau des mastocytes a été décrite par ERANKO et JANSSON (1967). L'utilisation de sérotonine marquée au tritium a permis à MORRISON et al., (1974) de décrire une méthode de mesure de la dégranulation. De même YURT et al. (1977) utilisent l'héparine ^{35}S mais l'héparine n'est pas à proprement parler un médiateur de l'anaphylaxie. L'héparine est associée à l'histamine dans lse granules mais la corrélation entre la quantité d'héparine libérée et l'importance de la dégranulation n'a pas encore été établie. En conclusion, la mesure de la quantité de sérotonine libérée par les mastocytes semble être une méthode intéressante. C'est celle que nous avons choisie de développer.

CHAPITRE 2

ROLE DU MASTOCYTE DANS LES RELATIONS HOTE-PARASITE

CHAPITRE 2: ROLE DU MASTOCYTE DANS LES RELATIONS HOTE-PARASITE

Les infections à helminthes sont caractérisées par une production d'IgE massive (JARRETT et BAZIN, 1974). Ce phénomène résulte de la potentialisation des différentes réponses réaginiques déclenchée par la présence du parasite (CARSON et al. 1975)(JARRETT et STEWART, 1972). Comme nous l'avons vu précedemment, ces anticorps ont la propriété d'activer les mastocytes avec pour conséquences les manifestations de l'hypersensibilité immédiate. Ces réactions d'hypersensibilité sont le plus souvent néfastes pour l'individu. Cependant il est étrange que la production d'IgE qui est sous la dépendance étroite de mécanismes différenciés dont le contrôle génétique soit un phénomène totalement inutile ou nocif. C'est pourquoi plusieurs auteurs ont cherché à connaître le rôle joué par les IgE et leurs interactions avec les mastocytes dans l'immunité antiparasite. Trois modèles parasitaires ont été plus particulièrement étudiés dans cette perspective.

I- Modèle Nippostrongylus brasiliensis

Cette infection, comme beaucoup d'infections à helminthes, est caractérisée par une forte augmentation de la production de réagines (OGILVIE, 1967) et une infiltration de mastocytes ou de basophiles au site de l'infection (WELLS, 1962) (WHUR, 1966, 1967). Des amines sont libérées par interaction des IgE et des allergènes parasitaires, ou par induction d'une dégranulation par un facteur parasitaire (UVNAS et WOLD, 1967). En liaison avec ces faits expérimentaux, BARTH et al.(1966) URQUHART et al. (1965) démontrent que les amines libérées par les mastocytes jouent un rôle facilitant dans l'accessibilité des anticorps antiparasite à leur cible. Ce mécanisme pourrait expliquer le rejet des vers. MURRAY et al.(1971) montrent qu'il existe une corrélation étroite entre le déclenchement de l'expulsion des vers, l'infiltration des mastocytes dans l'intestin et l'apparition d'anticorps réaginiques. Au cours du processus d'expulsion des vers, l'étude en microscopie

électronique montre une libération de granules mastocytaires (MILLER et al., 1968). Certaines substances inhibitrices de la libération des amines ou de leur action ultérieure sont également inhibitrices de l'expulsion des vers. Ces travaux sont en faveur d'un rôle direct des amines libérées par les mastocytes dans l'expulsion des vers.

Cependant, des travaux plus récents ont montré que dans certaines situations (rats nouveaux-nés par exemple) le rejet des vers peut intervenir sans qu'il y ait infiltration de mastocytes (KELLY et OGILVIE, 1973). La situation inverse, infiltration de mastocytes sans rejet de vers, a également été observée (KELLER, 1971). Ces deux phénomènes apparaissent donc dissociables. KELLER et OGILVIE (1972) puis KELLY et DINEEN (1972) ont montré la difficulté d'interprétation des expériences utilisant des drogues modifiant la libération des amines. En effet, ces drogues agissent en général à plusieurs niveaux et très souvent modifient ou suppriment l'activité lymphocytaire. De plus, KELLER et OGILVIE ont montré qu'un accroissement de la concentration en histamine dans la lumière intestinale avait un effet d'inhibition sur l'expulsion des vers. Cet ensemble de résultats est en contradiction avec les travaux de MURRAY et exclut la possibilité d'un rôle direct des amines mastocytaires dans l'expulsion des vers, mais il est possible que ces amines jouent un rôle coopératif avec les lymphocytes sensibilisés.

II- Modèle Trichonstrongylus colubriformis et Trichinella spiralis

Le rôle des amines dans l'immunité vis-à-vis de Trichinella spiralis et Trichonstrongylus colubriformis a également été étudié. L'action d'inhibiteurs d'amines prolonge considérablement ces deux infections (CAMPBELL et al., 1963)(ROTHWELL et al., 1971). L'injection d'amines ou de leurs précurseurs accélère au contraire l'expulsion des vers (ROTHWELL et al.,1971). ROTHWELL et al. (1974) ont montré que la sérotonine modifie le métabolisme des glucides du parasite,

Ce qui pourrait ainsi expliquer l'élimination des vers après dégranulation mastocytaire. L'utilisation d'un modèle biologique impliquant un rejet très rapide des vers après leur transplantation permet d'écarter l'hypothèse d'une coopération avec des lymphocytes sensibilisés. Le mécanisme de rejet n'est pas clairement explicité, mais c'est dans l'infection par Trichostrongylus colubriformis que le rôle direct des amines est le plus clairement démontré.

III - Modèle Schistosoma mansoni

Deux études suggèrent une intervention des mastocytes dans l'immunité antiparasite. HSU et HSU (1976) ont réalisé des biopsie de peau de singes immunisés avec des cercaires irradiés. Ils trouvent des vésicules contenant des mastocytes et des éosinophiles entourant les schistosomules provenant d'une infection de rappel. DEAN et al. (1976) suggèrent dans leurs résultats préliminaires un rôle des mastocytes dans l'immunité à la réinfection des souris infectées par S. mansoni. Le traitement des souris par injection de composé 48/80 réduit de 95 % cette immunité. Ce sont, à notre connaissance, les seuls travaux réalisés in vivo sur le rôle des mastocytes. SHER (1976) a montré in vitro la capacité des mastocytes à adhérer aux schistosomules par l'intermédiaire de complément.

Les anticorps anaphylactiques pourraient aussi jouer un rôle protecteur et bénéfique. Chez le rat infecté, il existe un parallèlisme entre le taux d'IgE sériques et l'immunité à la réinfection (CAPRON et al.,1977). Ces AC sont également impliqués dans des mécanismes de cytotoxicité in vitro faisant intervenir des macrophages (CAPRON et al.,1975, 1977)et conduisant à la mort des schistosomules.

D'autres mécanismes de cytotoxicité faisant intervenir les éosinophiles ont été décrits dans plusieurs modèles expérimentaux. BUTTERWORTH et al. (1975, 1977) utilisant des éosinophiles humains et du sérum de malades infectés par S. mansoni ont montré

l'existence d'une cytotoxicité anticorps dépendante contre des schistosomules. Le même mécanisme est effectif chez le babouin (BUTTERWORTH et al., 1976) et chez le rat (MACKENZIE et al., 1977). Chez le rat, ce mécanisme de cytotoxicité a été étudié en détail par CAPRON et al. (1978). L'anticorps impliqué est l'IgGa seconde classe d'Ac anaphylactique chez le rat. L'éosinophile est la cellule effectrice de ce mécanisme mais le mastocyte est indispensable et sert de cellule amplificatrice, sa dégranulation étant responsable de l'activation de l'éosinophile (CAPRON et al., 1978). Ce mécanisme est efficace avec des cellules d'animaux infectés mais son importance in vivo n'a pas encore été établie, de même que la relation avec le système macrophage-IgE.

Des relations entre mastocytes et immunité antiparasite existent donc, mais la nature et l'importance de ces relations n'ont pas été clairement démontrées et sont variables suivant le modèle parasitaire étudié. On peut s'étonner pourtant que la présence d'Ac anaphylactiques en quantités importantes chez les sujets parasités ne soit pas responsable de phénomènes plus marquants que ce soit au niveau de l'immunité antiparasite mais aussi au niveau de l'hypersensibilité immédiate. En effet, la potentialisation de l'ensemble de la réponse réaginique (ORR et BLAIR, 1969 JARRETT et STEWART, 1972) devrait aboutir à une sensibilité particulière aux allergies dans les zones endémiques. Une corrélation entre la fréquence de sujets asthmatiques et la présence de certains parasites intestinaux a été décrite par TULLIS (1970) et CHACKO (1970). Elle n'a jamais pu être confirmée par d'autres auteurs (VAN DELLEN et THOMPSON, 1971) (ALCASID et al., 1973) (CHEAH et KHAN, 1972) (TURNER et al., 1975). Au contraire, ANDERSON (1974) et GODFREY (1975) ont montré la rareté des manifestations asthmatiques ou allergiques dans les zones tropicales où le parasitisme est endémique. Dans les modèles expérimentaux chez des rats infectés plus d'une fois par Nippostrongylus brasiliensis, le taux d'anticorps IgE est très élevé et cependant les symptômes d'anaphylaxie sont fortement atténués (OGILVIE, 1967). Il semble donc

qu'il y ait une relation inverse entre la présence de parasites et l'allergie. Ces constatations amènent à penser à une régulation de la dégranulation mastocytaire. Nous avons vu précédemment quelles pouvaient être les explications possibles de cette régulation et l'hypothèse que nous avons tentée de vérifier.

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES.

I - Immunisation et production d'antisérums antiovalbumine

Le protocole d'immunisation utilisé est celui de JARRETT et STEWART (1974). Il permet la formation préférentielle d'IgE. Des rats Hooded-Lister mâles (180-200 g) (Animal suppliers, London) sont immunisés par injection intrapéritonéale d'une dose de 10 µg d'ovalbumine (Miles Laboratories) et une ampoule de vaccin anti-coquelucheux (5.10^9 germes Bordetella pertussis, 0,1% hydrate d'alumine (Perthydral, Institut Pasteur, Paris). Les animaux sont saignés au quatorzième jour. Il est possible d'induire une réponse secondaire par injection de rappel au trentième jour. Une dose de 1 µg d'ovalbumine en solution dans l'eau physiologique est injectée par voie intrapéritonéale. Quatre jours après la seconde injection, les animaux sont saignés par ponction cardiaque. Le titre des Ac réaginiques est estimé par réaction d'anaphylaxie cutanée passive.

II - Infection expérimentale du rat

A - Entretien du cycle expérimental de Schistosoma mansoni

La souche de *S. mansoni* utilisée au laboratoire est d'origine sud-américaine et a été isolée en Guyanne Hollandaise. L'hôte intermédiaire est un mollusque *Biomphalaria glabrata*, variété albinos. L'hôte définitif est le hamster doré (*Mesocricetus auratus*).

Chaque mollusque est infecté par 10 miracidiums obtenus après éclosion des oeufs prélevés chez les hamsters infectés. Après 21 jours, les mollusques exposés à la lumière et à une température de 30°C libèrent les furcocercaires, forme infectante pour l'hôte vertébré. Les hamsters sont infectés par baignade dans de l'eau désionisée contenant environ 900 furcocercaires. Les furcocercaires après pénétration transcutanée, se transforment en schistosomules qui atteignent le stade adulte en 35 à 40 jours. La ponte débute alors et les oeufs se logent dans le foie et les intestins du hamster infecté. Les vers adultes sont collectés par perfusion du foie et des veines mésentériques après 45 jours d'infection.

B - Infestation des rats

Les rats sont maintenus en décubitus dorsal. Sur l'abdomen rasé et mouillé à l'eau, on applique un cylindre métallique de 2 cm de diamètre maintenu par une bande adhésive. Dans ce cylindre, on place une suspension aqueuse contenant environ 800 furcocercaires. Le passage transcutané s'effectue pendant environ trente minutes.

C - Prélèvements sanguins

Ils sont effectués soit au niveau du sinus rétro-orbital, soit par ponction cardiaque, si les animaux sont en fin d'expérience.

III - Préparation des Ag et des produits d'incubation

A - Ag hydrosolubles de S. mansoni (CAPRON et al., 1968)

Les vers adultes, récoltés par perfusion de hamsters infectés depuis 45 jours sont lavés plusieurs fois en eau physiologique. Ils sont broyés dans une solution de chlorure de sodium 1 ‰ pendant 15 minutes puis congelés à -30°C. L'extraction de

l'antigène se fait par décongélation et broyage mécanique au mortier du matériel congelé. Cette opération est répétée cinq fois. La préparation est ensuite centrifugée à 40.000 g une heure à 4°C. Le surnageant est dialysé 24 heures contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

B - Produits d'incubation du schistosome (DESSAINT et al., 1977)

Dix mille vers adultes obtenus par perfusion de hamsters infectés depuis 40 jours sont incubés dans 10 ml d'eau bidistillée à 30°C pendant 3 heures. Après décantation, le surnageant obtenu constitute l'incubat. Celui-ci est centrifugé 10 min. à 1000 g pour éliminer les débris particulaires, filtré sur filtre Millipore 0,45 µm et mis en dialyse 24 heures à 4°C. Le liquide de dialyse ainsi que la fraction non dialysable sont lyophilisés et concentrés 10 x lors de leur utilisation.

IV - Techniques d'anaphylaxie cutanée passive (PCA)

A - Principe

Cette technique consiste à sensibiliser passivement l'animal par injection intradermique du sérum. L'injection simultanée d'Ag et de colorant (après un délai variable tenant compte de la demi-vie tissulaire des IgG et IgE) permet d'apprécier au niveau du point d'injection intradermique l'importance de la réaction anaphylactique par l'apparition d'une tache colorée, de surface proportionnelle à la dose d'Ac injectée (OVARY, 1958). Le titre PCA d'un sérum correspond à la plus grande dilution donnant une tache bleue d'au moins 5 mm. Nous avons utilisé cette technique d'une part pour évaluer le titre en réagines des sérums antiovalbumine, d'autre part pour étudier l'effet inhibiteur des produits d'incubation du schistosome sur cette réaction.

B - Titration des sérums

Ces réactions ont été effectuées chez des rats Wistar mâles (180-200 g) (Janvier, Le Genest). On injecte par voie intra-dermique dans le dos rasé du rat receveur, 0,1 ml des différentes dilutions du sérum à doser. Après une période de latence de 48 à 72 heures, on injecte dans la veine caudale 5 mg d'ovalbumine additionnée de 4 mg de Bleu d'Evans en solution dans 0,5 ml d'eau physiologique. Trente minutes plus tard, les rats sont sacrifiés et les réactions sont examinées du côté interne de la peau.

C - Inhibition de la réaction d'anaphylaxie cutanée passive

La fraction dialysable des produits d'incubation du schistosome (100 µl) est injectée par voie intradermique 15 minutes avant l'injection intraveineuse de Bleu d'Evans. Les témoins sont constitués par une injection d'eau physiologique.

1. Action de composés chimiques

Les substances ayant une action de dégranulation sur les mastocytes *in vitro* peuvent également induire une réaction positive *in vivo* . Deux substances ont été utilisées : le composé 48/80 à une concentration de 1 et 0,1 µg/ml et la polymyxine B sulfate à une concentration de 10 µg/ml. Ces substances (100 µl) ayant une action immédiate doivent être injectées par voie intradermique en même temps que l'injection intraveineuse de 4 mg de Bleu d'Evans en solution dans 0,5 ml d'eau physiologique.

2. Inhibition de la dégranulation induite par un système anticorps-antigène

100 µl de sérum réaginique (antiovalbumine ou sérum de rat infecté par *S. mansoni*) sont injectés par voie intra-dermique et les points d'injection sont soigneusement repérés. 48 h plus tard, 100 µl de dialysat ou d'eau physiologique sont injectés aux mêmes points de sensibilisation. Puis 15 minutes plus tard, on

injecte le Bleu d'Evans (4 mg) et l'ovalbumine (5 mg) ou l'Ag hydrosoluble S. mansoni 1 ‰ (2 mg) en solution dans 500 µl d'eau physiologique.

V - Techniques de culture cellulaire

A - Culture de lymphocytes

1. Récupération des cellules

L'action inhibitrice du dialysat a été testée vis-à-vis de lymphocytes spléniques de souris CBA femelles (CNRS, Orléans). Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. La rate est prélevée stérilement et dilacérée au moyen de pinces courbes dans du milieu RPMI additionné extemporanément de glutamine (2 nM) et de tripeptide Gly-His-Lys acétate (Eurobio) (20 µg/ml) (PICKART et al., 1973). Afin d'obtenir une meilleure stimulation, on élimine les cellules adhérentes. Les cellules sont placées dans des boîtes de Pétri à 37°C pendant 2 heures de façon à séparer les cellules adhérentes. Le surnageant est prélevé et centrifugé. Les cellules sont numérées dans un hémocytomètre de Thoma par un test d'exclusion du Bleu Trypan en solution à 0,02 % en tampon véronal pH 8,7. La suspension est ajustée à une concentration de 10^7 lymphocytes/ml.

2. Mitogènes

Les mitogènes utilisés pour induire une stimulation lymphocytaire sont la concanavaline A extraite de Concanavalia ensiformis (Industrie biologique française) aux doses de 0,5 et 1 µg/100 µl et la phytohemaglutinine extraite de Phaseolus vulgaris (Wellcome) diluée au 1:100e

3. Culture

La culture est réalisée en plaques de microtitration (Nunclon, Danemark). Les cellules sont réparties dans chaque puits

à raison de $0,5.10^6$ cellules/puits. La fraction dialysable de l'incubat de vers adultes est ajoutée sous un volume de 10 µl. On ajoute également les mitogènes, le volume final étant dans chaque puits de 200 µl.

48 heures plus tard, 1 µCi de ^3H Thymidine tritiée est ajoutée dans chaque puits. On mesure l'incorporation de la thymidine après une nuit de contact. Les cellules sont lavées, puis lysées par de la soude 1N pendant 10 minutes à 56°C. Le matériel acidoprécipitable est obtenu après addition de 2 ml d'acide trichloracétique froid. Après incubation de 15 minutes à 4°C et centrifugation, le précipité est dissous dans la soude 1N et les échantillons sont placés dans des fioles de comptage. Le liquide scintillant utilisé est du Picofluor[15] (HEWLETT-PACKARD). Les échantillons sont comptés dans un spectromètre à scintillation Nuclear Chicago (Isocap 300).

B - Cultures de cellules en lignée continue

Les lignées utilisées pour les tests de cytotoxicité sont : une lignée monocytaire humaine J111 (American culture type collection) (CCL 24) et une lignée Hela. Les cellules sont cultivées en boîtes de Pétri dans du MEM (Minimum essential medium) additionné de 15 % de sérum de veau foetal inactivé par chauffage. Après 24 heures de culture en présence de dialysat, les cellules sont remises en suspension par action de versene-trypsine et centrifugées. Le culot est repris dans du MEM et numéré. On mesure aussi la viabilité cellulaire par test d'exclusion du bleu Trypan (0,02 %).

L'incorporation de thymidine est mesurée de la même façon que pour les cultures de lymphocytes.

VI - Cytotoxicité mastocyte-eosinophile dépendante (CAPRON M. et al., 1978)

A - Préparation des schistosomules

Les schistosomules sont récoltés in vitro après passage des cercaires à travers la peau abdominale isolée de souris Swiss (CLEGG and SMITHERS, 1972).

B - Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est le MEM : Eagle's minimum essential medium (Institut Pasteur Production, Paris) auquel on rajoute 1 % de sérum de veau inactivé par chauffage et 20 ng/ml de tripeptide Glycyl-histidyl-lysine (Calbiochem., San Diego, Ca.) (PICKART et al., 1973).

C - Preparation des cellules

10 ml d'eau physiologique sont injectés par voie intrapéritonéale à des rats Fischer mâles (Iffa Credo, l'Arbresle, France). 48 à 72 heures plus tard, les cellules sont prélevées par lavage de la cavité péritonéale avec 20 ml de milieu de culture contenant 25 IU/ml d'héparinate de calcium. Les cellules péritonéales sont centrifugées à 1800 rpm et lavées deux fois dans le milieu de culture. On enrichit cette population en éosinophiles en laissant adhérer les cellules dans des boîtes de Petri (7.10^6 cellules/ml dans des boîtes de 3 cm de diamètre). Après 2 heures, les cellules non adhérentes sont prélevées et numérées. La population obtenue contient environ 45 % d'éosinophiles et 10 % de mastocytes.

D - Purification des cellules

Pour éliminer la contamination due aux mastocytes, la population cellulaire obtenue est déposée sur une solution de Ficoll 35 % (Pharmacia, Uppsala, Suède) (Wasserman et al., 1974).

Après centrifugation à 1000 x g pendant 15 minutes, les cellules de l'interface sont prélevées et lavées dans le milieu. Cette population contient environ 50 % d'éosinophiles et moins de 1 % de mastocytes.

La technique de purification des mastocytes sera décrite ultérieurement.

E - Test de cytotoxicité

50 schistosomules en suspension dans 100 µl de milieu de culture sont déposés dans les alvéoles d'une plaque de microtitration (Nunclon) et sont incubés une nuit avec 100 µl de sérum de rat infecté par *Schistosoma mansoni*, inactivé par chauffage, à une dilution finale de 1 : 16. Les schistosomules sont ensuite lavés avec le milieu de culture et remis en suspension dans 100 µl de milieu. On ajoute 100 µl de la suspension cellulaire effectrice de façon à obtenir un rapport de 4000-6000 cellules effectrices pour un schistosomule. Le pourcentage de cytotoxicité est déterminé par observation microscopique (CLEGG et SMITHERS, 1972) après une incubation de 48 heures.

VII - Test de dégranulation

A - Obtention des cellules péritonéales de rat

Les cellules utilisées pour le test sont obtenues par lavage de la cavité péritonéale de rats Wistar mâles (180-200 g) (Janvier, Le Genest, 200 g) avec 20 ml de milieu de Eagle (M.E.M.) (Institut Pasteur Production, Paris). A ce milieu ont été ajoutés préalablement de la glutamine (2 mM), de l'héparinate de calcium 50 U/ml (Choay, Paris) et le tripeptide Gly-His-Lys acétate (Eurobio) 20 µg/ml (PICKART *et al.*, 1973). L'exsudat péritonéal contient en moyenne 10^6 mastocytes, ce qui représente 2 à 5 % des cellules totales. Les cellules sont centrifugées 5 min. à 1000 x g. Les mastocytes sont colorés au bleu de toluidine et numérés dans un hémocytomètre de Fuchs Rosenthal.

B - Incorporation de ^3H sérotonine

Une solution de 5-Hydroxy G ^3H tryptamine créatinine sulfate (10 Ci/mmol) (Amersham) a été utilisée pour le marquage des cellules. L'exsudat péritonéal est incubé 30 min. à 37°C avec 2 µCi de ^3H sérotonine pour 10^6 mastocytes. La suspension cellulaire est ensuite lavée 4 fois dans 5 ml de milieu pour éliminer l'excès de sérotonine marquée.

C - Mesure de la libération de sérotonine

La réaction est réalisée en plaques de microtitration à fonds plats (Linbro, Flow Lab.). Les différentes substances testées activatrices ou inhibitrices sont mises en contact avec 50 µl de la suspension cellulaire à 10^6 mastocytes/ml. Après un temps d'incubation variable suivant le cas étudié, la plaque est centrifugée 5 min. à 1000 x g. 50 µl de surnageant sont transférés dans une fiole de comptage. Le traitement des cellules par 50 µl de digestine (Merck) permet de mesurer la quantité totale de radioactivité incorporée dans les cellules.

D - Mesure de la radioactivité

10 ml de liquide scintillant (Toluène triton 1 : 1 (v/v) butyl PBD 7g/l) sont ajoutés dans chaque fiole de comptage. La radioactivité est mesurée dans un spectromètre à scintillation (Isocap 300, Nuclear Chicago, Illinois) avec une efficacité de 50,1 % pour le ^3H. L'extinction de fluorescence (quenching) est corrigée par la méthode des rapports de canaux, à partir de courbes étalons obtenues avec des échantillons d'activité constante.

E - Produits utilisés

Le composé 48/80, la polymyxine B sulfate, l'ATP, l'α chymotrypsine, la L α lysophosphatidylcholine, le dicoumarol et

la papavérine proviennent de Sigma Chemicals Company (St Louis, Missouri), l'ovalbumine de Miles Lab. Le cromoglycate de sodium nous a été offert par Fisons Ltd pharmaceutical division.

F - Contrôle morphologique de la dégranulation

50 µl de bleu de Toluidine 0,1 % (I.C.N. Laboratories, Cleveland) sont ajoutés aux cellules activées. Le pourcentage de mastocytes dégranulés est déterminé par observation microscopique avec un grossissement de 40 x 10 (modèle Reichert, Autriche). Pour chaque détermination, trois cent cellules au moins ont été observées.

G - Etude ultrastructurale

Les cellules sont fixées par une solution de glutaraldéhyde 2,5 % en tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,2 à 4°C puis lavées en tampon cacodylate. On postfixe les cellules par le tétroxyde d'osmium à 1 % dans l'eau distillée pendant 1 heure. Une déshydratation à l'acétone suivie d'une inclusion en Araldite est ensuite réalisée. L'observation est faite avec un microscope électronique Hitachi HU 12.

H - Purification des mastocytes

La technique utilisée a été décrite par SULLIVAN et al. (1975). Les cellules sont déposées sur une solution de sérumalbumine bovine (SAB) 38 % (poids/volume). Après 30 min. à température ambiante, les cellules sont centrifugées à 450 g 20 min. Les mastocytes se trouvent alors dans la couche de SAB. Le surnageant et l'interface sont éliminés et la couche inférieure est lavée plusieurs fois avec le milieu de culture. La préparation de mastocytes obtenue est pure à 99 % avec un rendement d'environ 75 %. L'observation microscopique confirme l'intégrité structurale des mastocytes purifiés.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

I - Mise au point du test de dégranulation

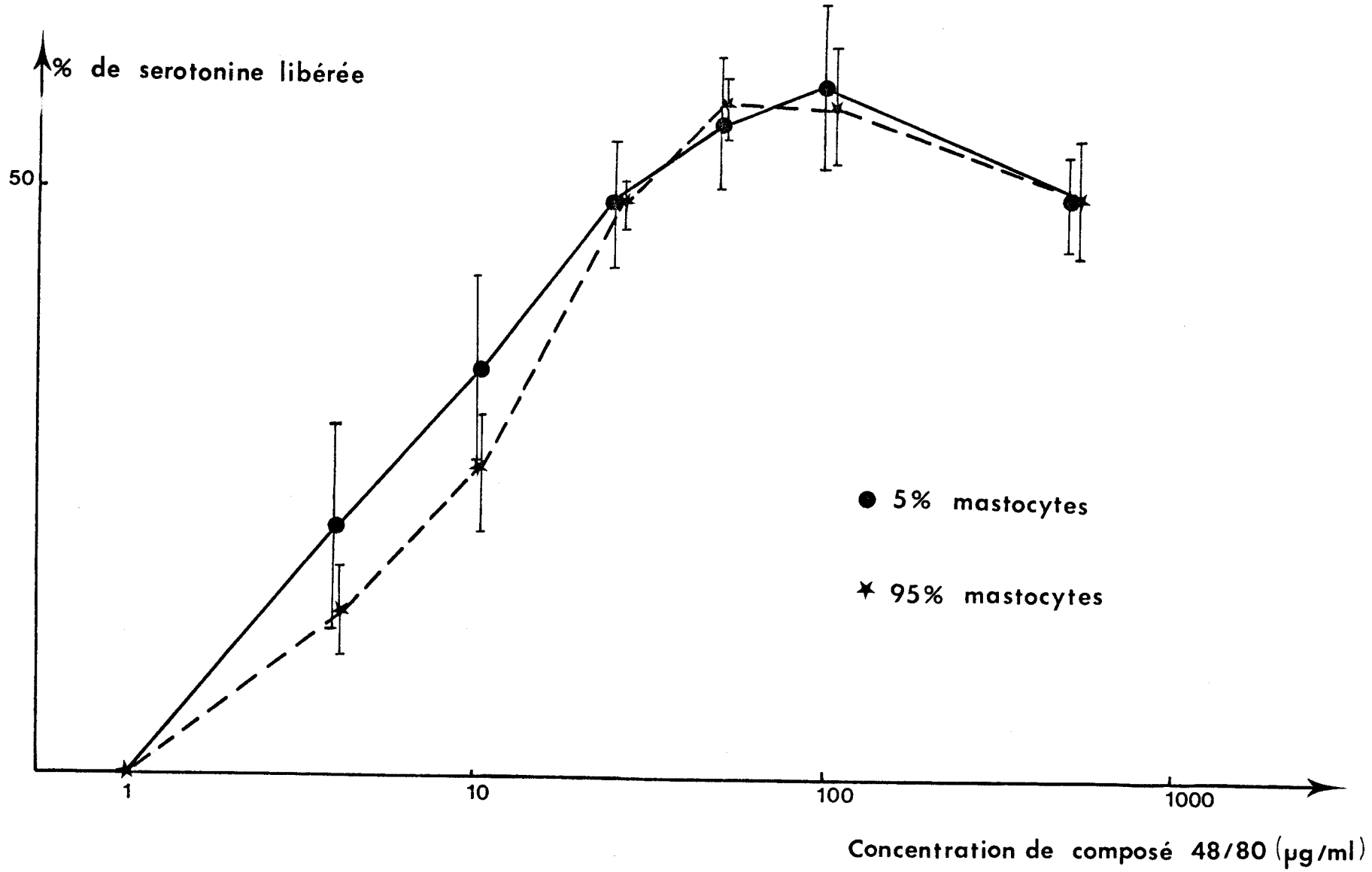
A - Incorporation de sérotonine par la suspension cellulaire

1. Localisation de la sérotonine marquée au niveau des mastocytes

Seuls les mastocytes et les plaquettes ont la propriété d'incorporer la sérotonine exogène (JANSSON, 1970). Les plaquettes en faible proportion dans l'exsudat péritonéal sont éliminées par le premier lavage des cellules, ceci étant confirmé lors de l'observation microscopique. Cependant, pour démontrer la localisation de la sérotonine marquée au niveau des mastocytes, une préparation de mastocytes purifiés a été comparée à la population péritonéale totale. L'exsudat péritonéal est marqué par la sérotonine tritiée, puis un aliquot est prélevé en vue de la purification. A concentrations égales en mastocytes, la quantité totale de radioactivité incorporée est la même dans la préparation contenant 5 % de mastocytes et dans celle contenant 95 % de mastocytes. La courbe de libération de sérotonine sous l'action du composé 48/80 est rigoureusement identique pour les deux préparations (figure 1). Ces faits expérimentaux démontrent l'incorporation sélective de la sérotonine au niveau des mastocytes. Ceci renforce l'intérêt de la méthode en permettant l'utilisation de populations non purifiées.

2. Intégrité structurale après marquage

L'observation microscopique ainsi que l'étude en microscopie électronique montrent que le marquage par la sérotonine tritiée n'affecte pas l'intégrité structurale des membranes et des granules mastocytaires (figure 2).



BUS LILLE

Figure 1 : COURBE DOSE-REPONSE DE LA LIBERATION DE SEROTONINE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN COMPOSE 48/80 AVEC UNE POPULATION PURIFIEE ET TOTALE.
Cinquante µl de la suspension cellulaire sont incubés 15 min. à 37°C avec 50 µl de composé 48/80 et 50 µl de milieu

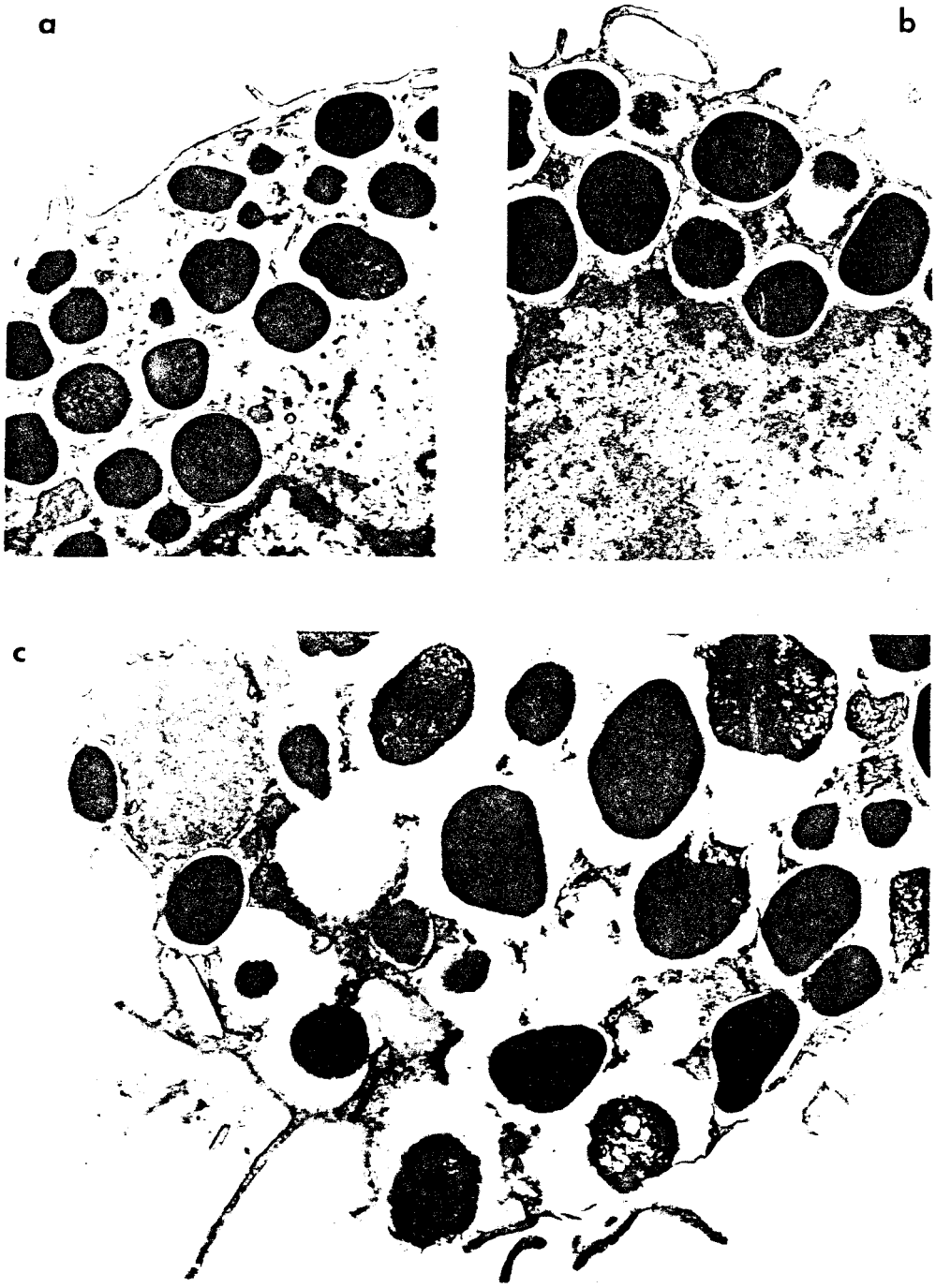


FIGURE 2: CONTROLE ULTRASTRUCTURAL DE MASTOCYTES APRES MARQUAGE.

a- mastocyte avant marquage (x 19000)

b- mastocyte marqué après incubation avec la sérotonine 45 min. à 37°C (x 19000)

c- mastocyte marqué après dégranulation par la polymyxine (10 µg/ml) 15 min. à 37°C (19000).

BUS LILLE

B - Action du composé 48/80

Ce composé a été choisi pour son aptitude à faire dégranuler les mastocytes avec une amplitude importante, ce qui facilite l'observation morphologique et la détermination optique du pourcentage de mastocytes dégranulés.

Les cellules sont incubées 15 minutes à 37°C avec des concentrations de composé 48/80 allant de 1 mg à 0,1 µg/ml. On mesure d'une part la libération de sérotonine tritiée, d'autre part le pourcentage de mastocytes dégranulés obtenu par observation microscopique.

La libération spontanée de sérotonine tritiée représente 1 à 5 % de la radioactivité totale incorporée dans les mastocytes. Chaque concentration est testée en triple exemplaire et le pourcentage de libération de sérotonine est calculé d'après la formule suivante :

$$\% = \frac{X - S}{T - S} \times 100$$

X : radioactivité totale de l'échantillon
S : radioactivité libérée spontanément
T : radioactivité totale incorporée (libérée après action de la digestine).

Le composé 48/80 présente une activité à partir d'une concentration de 1 µg/ml. La courbe dose réponse présente une allure sigmoïde. L'activité maximale correspondant à 75-86 % de sérotonine libérée est obtenue pour une concentration de 100 µg/ml de composé 48/80 (figure 3).

Un parallélisme étroit s'établit entre les résultats obtenus par la méthode isotopique et l'observation microscopique. L'étude de corrélation donne un coefficient $r = 0,9935$ ($p < 0,001$) (figure 4).

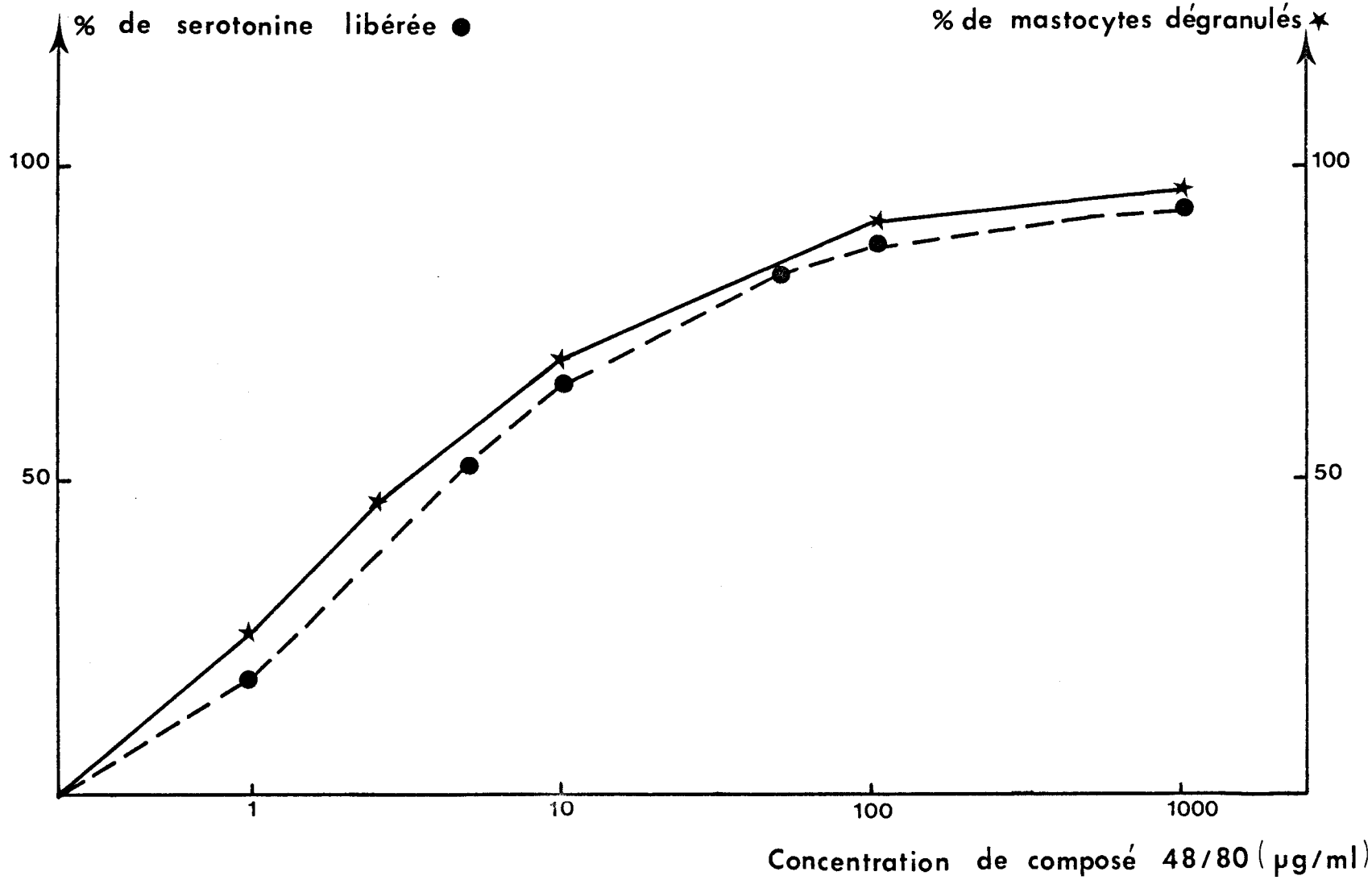


FIGURE 3: COURBES DOSES REPONSES DE LA LIBERATION DE SEROTONINE ET DU POURCENTAGE DE MASTOCYTES DEGRANULES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN COMPOSE 48/80.

BUS LILLE

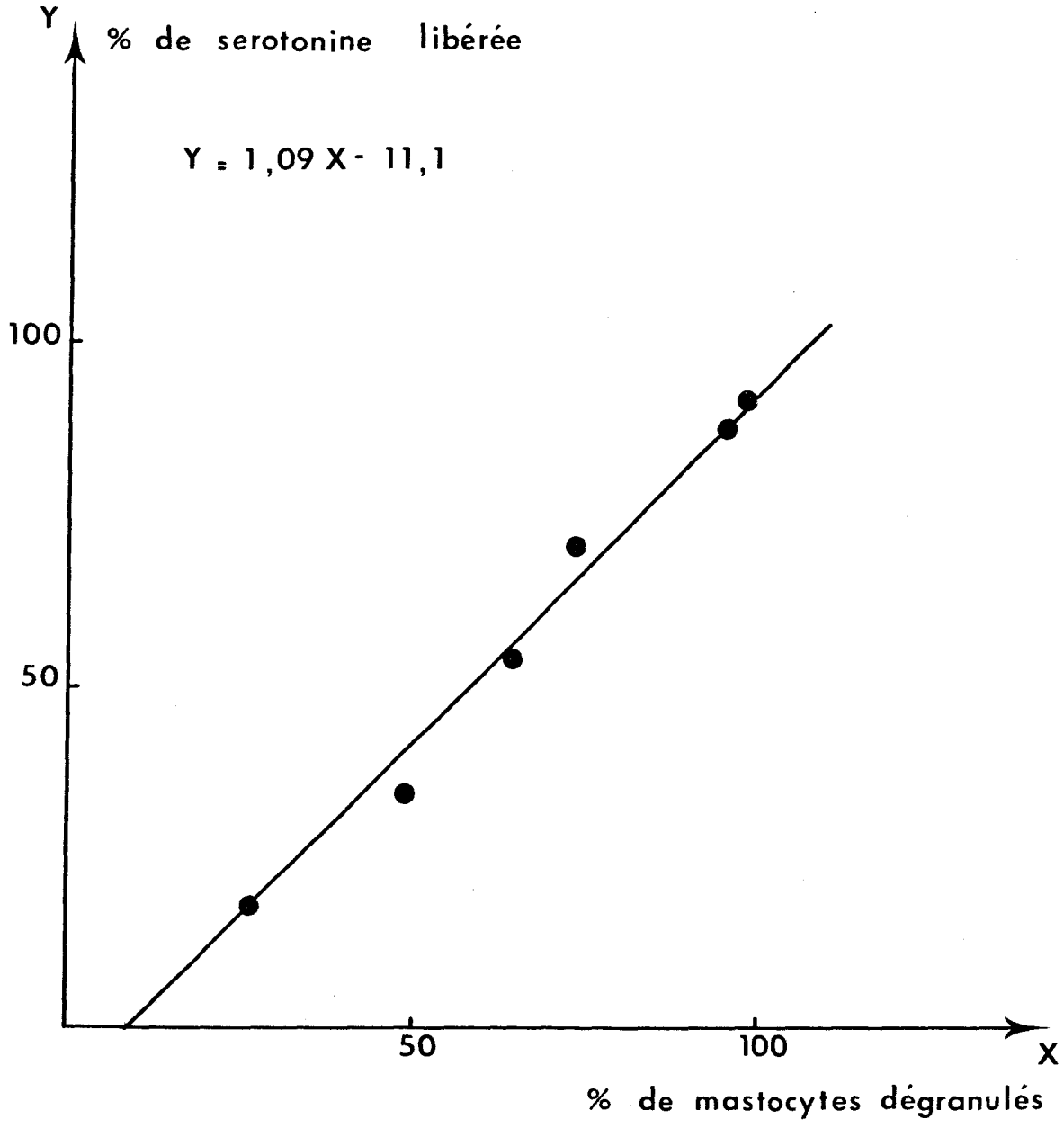


FIGURE 4: CORRELATION ENTRE LE POURCENTAGE DE MASTOCYTES DEGRANULES PAR OBSERVATION MICROSCOPIQUE ET LE POURCENTAGE DE SEROTONINE TRITIEE LIBEREE.

BUS LILLE

C - Action d'autres activateurs chimiques

Plusieurs composés ayant la propriété d'induire une dégranulation mastocytaire ont été testés dans les mêmes conditions que le composé 48/80. La polymyxine B sulfate, l'α chymotrypsine, la L α lysophosphatidylcholine et l'ATP induisent une libération de sérotonine (figure 5). Les courbes dose-réponse sont concordantes avec celles observées par les méthodes classiques. Les doses nécessaires pour induire une dégranulation sont plus importantes qu'avec le composé 48/80. La polymyxine B sulfate induit une libération de sérotonine à partir de 10 µg/ml, la chymotrypsine 100 µg/ml et l'ATP 500 µg/ml. Avec l'ATP le pourcentage de sérotonine libérée reste limité à 20 % dans la gamme de concentrations étudiées.

D - Inhibition de la dégranulation par des agents chimiques

Deux types d'inhibiteurs de la dégranulation ont été décrits (GARLAND et MONGAR, 1976). Le premier type d'inhibiteur inhibe l'étape d'activation membranaire. Ce sont des substances qui interviennent au niveau des nucléotides cycliques en provoquant une augmentation de l'AMPc intracellulaire par inhibition de la phosphodiesterase. C'est par ce mécanisme qu'agissent par exemple le dicoumarol ou le cromoglycate de sodium.

Le second type d'inhibiteur agit directement au niveau du métabolisme intracellulaire. C'est le cas par exemple de la papaverine.

Nous avons testé l'effet du dicoumarol et de la papaverine sur une dégranulation induite par la polymyxine B. Les cellules sont d'abord incubées 30 minutes à 37°C avec les inhibiteurs; la dégranulation est induite par action de polymyxine B sulfate (100 µg/ml) 15 minutes à 37°C (tableau 1). Avec une dose de

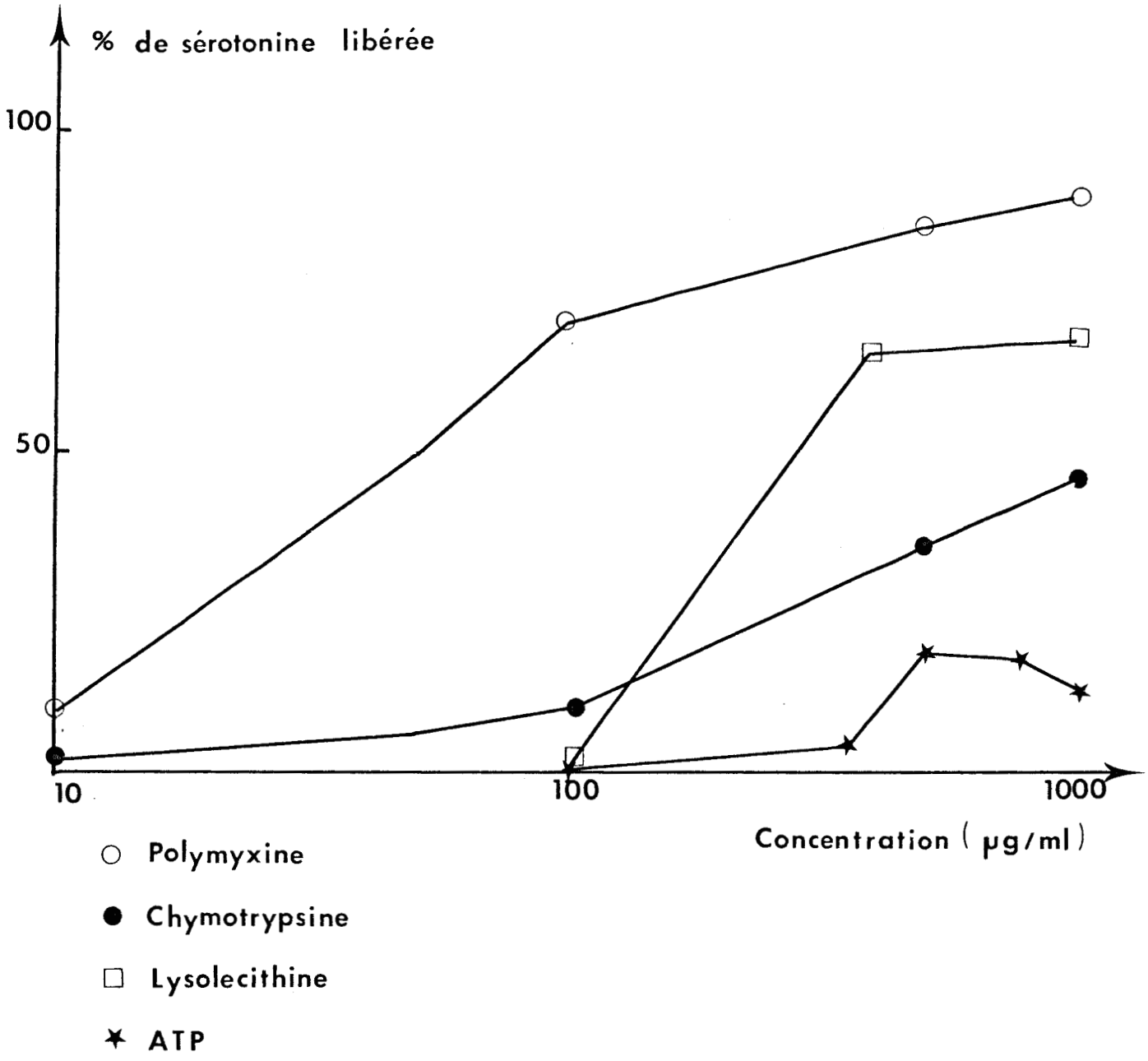


FIGURE 5: COURBES DOSE-REPONSES DE LA LIBERATION DE SEROTONINE PAR DIFFERENTS ACTIVATEURS CHIMIQUES.

Cinquante µl de chaque concentration indiquée sont ajoutés à 50µl de la suspension cellulaire (106 mastocytes/ml) et 50 µl de milieu et incubés 15 min. à 37°C.

BUS LILLE

Echantillons	% sérotonine libérée**	% inhibition
Polymyxine B (100 µg/ml)	56,1 ± 6,4	
Papaverine 10^{-4}M * + polymyxine B	14 ± 2,1	75 %
Dicoumarol 10^{-5}M * + polymyxine B	6,4 ± 3,2	89 %

* 50 µl de la suspension cellulaire sont incubés 30 minutes à 37°C avec 50 µl de la solution d'inhibiteur, puis on ajoute 50 µl de Polymyxine B (100 µg/ml)

** Moyenne de trois expériences.

Tableau 1 : Inhibition de la dégranulation mastocytaire par des agents chimiques.

BUS LILLE

100 µmole/l de papaverine, l'inhibition est de 75 % ; avec 10 µmole/l de dicoumarol, elle est de 89 %. Ces composés sont donc actifs sur la dégranulation mastocytaire et la libération de sérotonine tritiée.

E - Dégranulation induite par une réaction antigène-anticorps

L'interaction des mastocytes avec un allergène et l'Ac réaginique correspondant induit une dégranulation mais les altérations cellulaires sont beaucoup moins importantes que sous l'action de composés chimiques, ce qui renforce l'intérêt d'une méthode plus précise que l'observation microscopique. Nous avons donc recherché les conditions optimales de dégranulation induite par un sérum réaginique anti-ovalbumine et l'antigène correspondant.

1. Recherche du temps optimal de sensibilisation

La fixation des IgE à la surface du mastocyte nécessite un temps de contact avant que la dégranulation puisse être induite par addition de l'antigène. Nous avons donc recherché le temps optimal nécessaire pour obtenir la sensibilisation des mastocytes.

Les mastocytes marqués sont incubés avec l'antisérum anti-ovalbumine pendant des périodes variables de 15 minutes à 2 heures, puis mis en contact avec l'antigène pendant 15 minutes (figure 6). Ni l'antigène, ni l'antisérum n'induisent de libération de sérotonine supérieure au témoin. Quand l'antigène est ajouté simultanément à l'antisérum, aucune dégranulation n'est induite même si l'on prolonge les temps d'incubation, ce qui rend l'étape de sensibilisation absolument nécessaire. Elle peut être cependant de courte durée puisqu'on obtient le maximum de libération de sérotonine avec un temps de contact de 15 minutes.

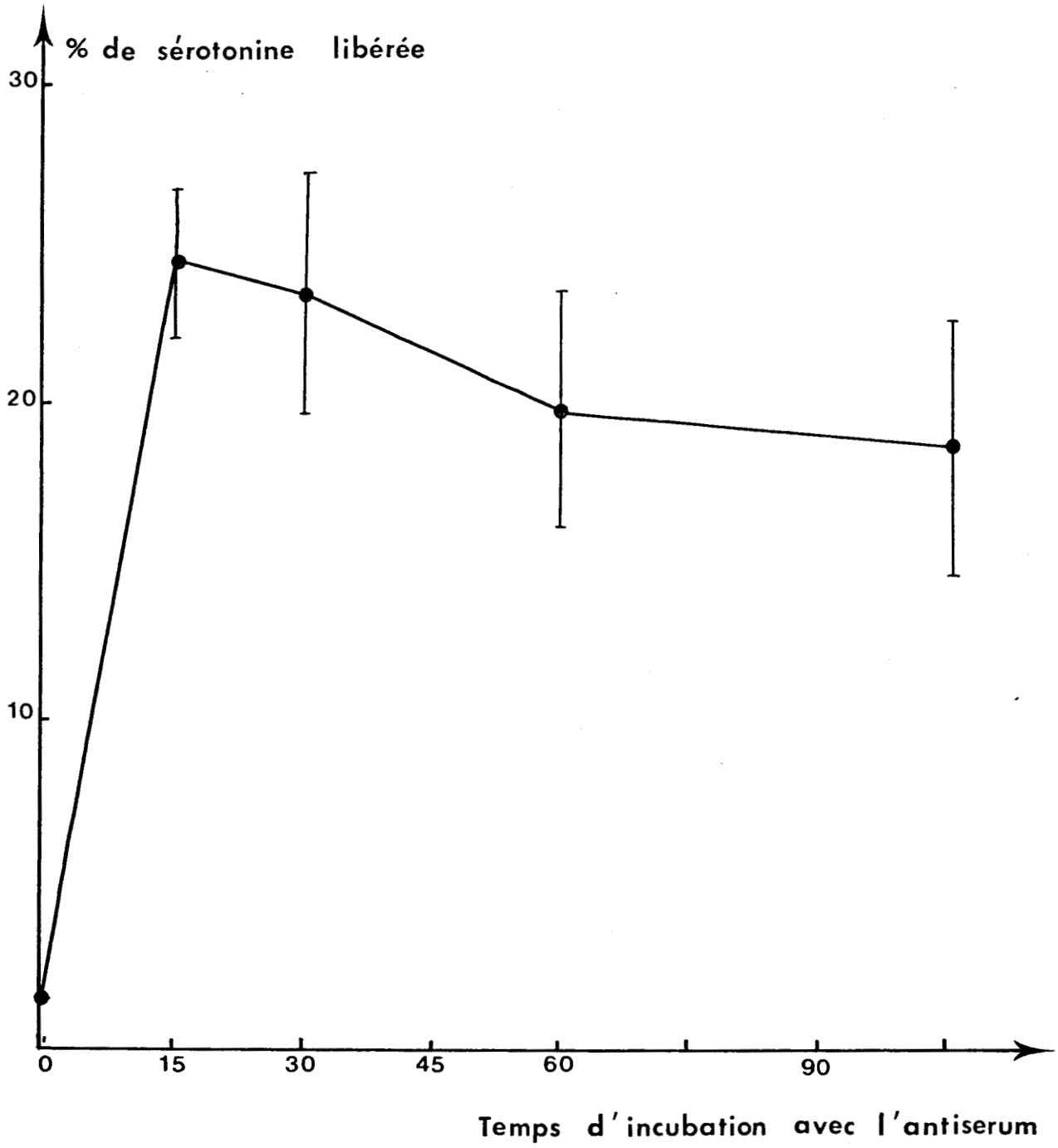


FIGURE 6: INFLUENCE DU TEMPS D'INCUBATION AVEC LE SERUM REAGINIQUE SUR LA LIBERATION DE SEROTONINE.

BUS LILLE

Cinquante µl de suspension cellulaire (10^6 mastocytes/ml) sont incubés avec 50 µl de sérum pur (titre PCA 1:128) puis mis en contact avec 50 µl d'ovalbumine (1 mg/ml) 15 min. à 37°C

2. Influence de la concentration en antigène

Nous avons étudié une gamme de concentrations de 1 à 1000 µg/ml soit en concentrations finales de 0,05 à 50 µg. Les cellules sont mises en contact 15 minutes à 37°C avec 50 µl de sérum pur, puis incubées 15 minutes avec les différentes concentrations d'antigène (tableau 2). Dans la gamme de concentrations testées, la libération de sérotonine s'accroît avec la concentration en antigène. Pour l'ensemble des expériences, nous avons donc utilisé la concentration la plus forte, soit 50 µg par puits.

3. Sensibilité de la méthode

Les sérums des rats Hooded-Lister immunisés contre l'ovalbumine présentent des titres en PCA variant de 64 à 512. Nous avons testé un sérum de titre 128 à différentes dilutions (figure 7). On peut induire une libération de sérotonine avec ce sérum jusqu'à une dilution de 1/4, mais dans ce cas seulement 5 % de la sérotonine incorporée se retrouve dans le surnageant. Le sérum pur induit la libération de 20 % de la sérotonine, ce qui reste faible et nécessite l'utilisation du sérum non dilué pour toutes les expériences. Les sérums utilisés pour la sensibilisation passive devront avoir un titre PCA supérieur à 128. Cette limite n'est pas imputable au test lui-même mais à la difficulté de sensibiliser passivement des mastocytes *in vitro*.

4. Caractéristiques de la dégranulation anaphylactique

Deux propriétés des IgE ont été utilisées pour vérifier que la libération de sérotonine fait suite à l'interaction des IgE avec les récepteurs mastocytaires : ce sont la thermolabilité des IgE et la forte affinité de l'IgE pour le récepteur mastocytaire.

- Thermolabilité : le sérum anti-ovalbumine de titre PCA 128 est chauffé 3 heures à 56°C. Ce sérum pur est incubé 15 minutes à 37°C avec des mastocytes marqués dans les conditions de sensibilisation passive (tableau 3). Après addition d'antigène, il n'y a aucune libération de sérotonine alors que le même sérum non chauffé induit une libération de 21,9 % de sérotonine tritiée.

Concentration en ovalbumine (µg/ml) *	% sérotonine libérée**
1000	45,8 ± 7,3
100	14,9 ± 3,8
10	5,6 ± 1,4
1	N.S.***

* 50 µl de la suspension cellulaire sont incubés 15 min. à 37°C avec 50 µl d'un sérum antiovalbumine (titre PCA 1 : 512) puis on ajoute 50 µl de chacune des solutions d'ovalbumine indiquées. On mesure la libération de sérotonine après 15 minutes d'incubation à 37°C.

** Moyenne de trois expériences.

*** Non significativement différent de la libération spontanée.

Tableau 2 : Influence de la concentration en antigène sur la libération de sérotonine.

BUS LILLE

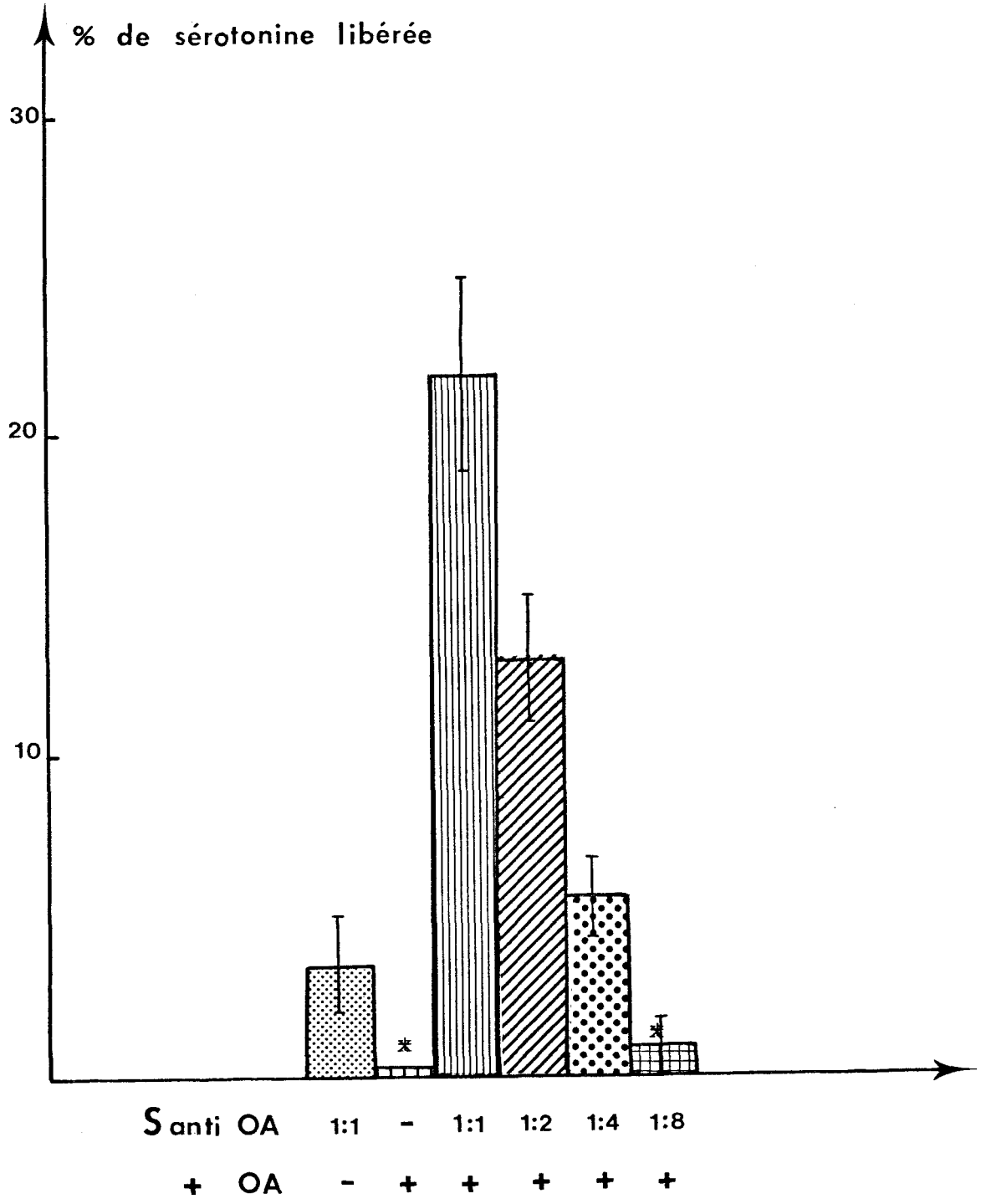


FIGURE 7: LIBERATION DE SEROTONINE PAR UNE REACTION DE TYPE ANAPHYLACTIQUE.

Cinquante µl de suspension cellulaire (10^6 mastocytes/ml) sont incubés 15 min. à 37°C avec 50 µl de sérum antiovalbumine (S anti OA) puis avec 50 µl d'ovalbumine (OA)(1 mg/ml) 15 min. à 37°C.

* Non significativement différent de la libération spontanée.

BUS LILLE

Echantillons *	% sérotonine libérée
Sérum non dilué (titre PCA 1 : 128) + OA	21,9 ± 3,1
Sérum chauffé (3 hr 56°C) + OA	3,1 ± 0,9 N.S***
Sérum non dilué (titre PCA 1 : 128) + OA	23,7 ± 4,7
Sérum non dilué → lavages → OA	20,2 ± 0,9
Sérum non dilué (titre PCA 1 : 512) + OA	46,1 ± 3,5
** Sérum non dilué + cromoglycate (1 mg/ml) + OA	31,2 ± 4,4 (33 % inhibition)

* 50 µl de la suspension cellulaire sont incubés 15 minutes à 37°C avec 50 µl de sérum réaginique puis mis en contact 15 minutes avec 50 µl d'ovalbumine (1 mg/ml)(OA)

** le cromoglycate de sodium est ajouté 30 minutes avant l'addition du sérum

*** N.S. : non significativement différent de la libération spontanée.

Tableau 3 : Caractéristiques de la dégranulation anaphylactique.

La destruction des IgE par chauffage inhibe totalement la dégranulation ultérieure, ce qui confirme que c'est un phénomène dépendant des IgE fixées à la surface du mastocyte.

- affinité de l'IgE : les IgE présentent pour le récepteur mastocytaire une forte affinité. La fixation de l'IgE est irréversible par lavage des cellules. On peut donc, après la sensibilisation passive, laver les cellules et induire une dégranulation avec l'antigène.

Les cellules marquées sont incubées avec un sérum anti-ovalbumine de titre PCA 128 15 minutes à 37°C puis sont lavées 3 fois dans le milieu de culture. 50 µg d'antigène sont ensuite ajoutés . On mesure la libération de sérotonine après 15 minutes d'incubation (tableau 3). Sans étape de lavages ce sérum induit une libération de 23,7 %. Après 3 lavages entre la sensibilisation par l'IgE et l'addition de l'antigène, 20,2 % de la sérotonine est libérée ; on préserve donc la sensibilisation des mastocytes par lavage, ce qui confirme l'interaction d'IgE avec le mastocyte.

5. Action du cromoglycate de sodium

Le cromoglycate de sodium est une drogue utilisée dans le traitement de certaines allergies. Son action se situe au niveau de la dégranulation ; ce composé est un inhibiteur de la phosphodiesterase qui dégrade l'AMPc en AMP ; par conséquent il inhibe le signal d'activation intracellulaire qui conduit à la dégranulation.

Les cellules marquées sont incubées 30 minutes à 37°C avec 50 µg de cromoglycate de sodium avant d'être soumises à l'action du sérum et de l'antigène. Avec le sérum utilisé, la libération de sérotonine est de 46,1 %. Lorsque ces cellules sont préincubées avec le cromoglycate, on obtient 31,2% soit une inhibition de 33% (tableau 3). La possibilité d'inhibition

par le cromoglycate de sodium confirme que la libération de sérotonine mesurée est la conséquence d'un processus actif.

6. Dégranulation de mastocytes d'animaux immuns

Il était intéressant de voir si les mastocytes des animaux immunisés contre l'ovalbumine présentaient à leur surface des IgE antiovalbumine et par conséquent s'il était possible d'induire une dégranulation par action de l'ovalbumine.

On étudie d'une part la dégranulation des mastocytes de ces rats immuns quand mis en contact direct avec l'antigène, d'autre part la dégranulation induite par les sérums de ces rats après sensibilisation passive de mastocytes de rats sains. Un groupe de rats est immunisé contre l'ovalbumine. Après l'injection de rappel, le sérum des animaux est prélevé et titré en PCA. D'autre part, les cellules péritonéales de ces rats sont recueillies dans le milieu de culture.

Ces mastocytes sont marquées par incubation avec de la sérotonine tritiée, lavés et mis en contact avec 50 µg d'ovalbumine pendant 1 heure à 37°C. On mesure alors le pourcentage de sérotonine libérée.

Les sérums des rats immunisés sont testés dans les conditions habituelles (tableau 4).

On observe une concordance entre la réactivité des cellules des animaux immunisés et le titre en réagines de leurs sérums, bien que la proportionnalité ne soit pas toujours rigoureusement respectée. La production d'anticorps IgE chez un animal est associée à la présence d'IgE spécifiques à la surface de ses mastocytes.

Animaux	Titre PCA sérum	% sérotonine libérée	
		sensibilisation passive avec sérums *	dégranulation active **
Rat témoin	-	N.S. ***	N.S.
n° 1	64	1,5 ± 1,3	5,6 ± 2,4
2	256	30,9 ± 2,0	35,2 ± 1,2
3	256	20,1 ± 6,5	23,3 ± 2,0
4	512	25,4 ± 2,2	49,3 ± 5,9

* Les sérums des animaux immunisés sont testés vis-à-vis de mastocytes de rats sains. Les cellules sont incubées 15 minutes à 37°C avec 50 µl de sérum puis 15 minutes avec 50 µl d'ovalbumine (1 mg/ml) 15 minutes à 37°C.

** Les mastocytes des animaux immunisés sont prélevés et marqués à la sérotonine. Ils sont incubés avec 50 µl d'ovalbumine (1 mg/ml) 30 minutes à 37°C.

*** N.S. : non significativement différent de la libération spontanée.

Tableau 4 : Dégranulation de mastocytes d'animaux immuns.

F - Discussion

La mise au point de cette méthode nous permet d'apprécier d'une manière quantitative l'importance de la dégranulation induite d'une part par des activateurs chimiques, d'autre part par un système anaphylactique.

La rapidité d'incorporation de la sérotonine marquée permet d'éviter des altérations de la structure cellulaire. L'étude en microscopie électronique nous a permis de confirmer l'intégrité structurale des cellules.

Après trois lavages, tout l'excès de sérotonine est éliminé. La libération spontanée de sérotonine par les mastocytes correspond environ à 1-5 % de la sérotonine incorporée. BACH et al. (1971a) obtiennent, par dosage d'histamine, une libération spontanée de 0 à 5 %. Le bruit de fond mesuré est donc tout à fait normal et confirme que les conditions expérimentales utilisées pour marquer les cellules respectent leur intégrité, et ne perturbent pas leur activation ultérieure.

L'incorporation sélective du marqueur au niveau des mastocytes permet d'éviter la purification des cellules, tout au moins dans le cas où les interactions avec les autres types cellulaires n'interfèrent pas dans la libération des médiateurs. Cette possibilité d'éviter l'étape de purification des cellules représente à la fois un gain de temps et une garantie de meilleur état des cellules. La mesure de la libération de sérotonine semble être une bonne technique de mesure de la dégranulation. En effet, l'activation des mastocytes par certaines substances chimiques induit une libération du marqueur avec une courbe dose-réponse comparable à celle obtenue par dosage d'histamine ou contrôle morphologique. La courbe obtenue par action du composé 48/80 est identique aux résultats de MORRISON et al. (1974). De même, les autres activateurs chimiques induisent une dégranulation avec des doses optimales du même ordre de grandeur que celles précédemment décrites.

L'utilisation d'inhibiteurs du métabolisme ou de l'activation membranaire nous a permis de montrer que la libération de sérotonine correspond à un processus métabolique actif.

L'induction d'une dégranulation de cellules sensibilisées passivement in vitro a posé beaucoup de problèmes méthodologiques. BACH et al. ont étudié en détail les conditions optimales d'obtention d'une libération d'histamine in vitro à partir de cellules sensibilisées passivement. Ces auteurs ont en particulier constaté la nécessité d'une sensibilisation préalable des cellules par les anticorps réaginiques avant la mise en contact avec l'antigène. Nous avons confirmé ce fait puisqu'il est impossible d'induire une dégranulation lorsque les anticorps et l'antigène sont ajoutés simultanément. Il est probable que dans ce cas les complexes immuns formés avant la fixation sur le mastocyte ne sont pas dans le rapport ou dans la configuration nécessaire pour induire une dégranulation.

ISHIZAKA et ISHIZAKA (1968) ont montré qu'il faut un excès d'antigène pour induire une dégranulation in vitro. L'utilisation de concentrations croissantes d'antigène nous a montré que le pourcentage de dégranulation augmente avec la dose d'antigène. La dose utilisée pour induire une dégranulation optimale correspond effectivement à un excès d'antigène.

La quantité d'Ac réaginiques nécessaire pour sensibiliser passivement des mastocytes est beaucoup plus grande in vitro qu'in vivo (BACH et al., 1971 a). Ces auteurs induisent une libération d'histamine avec des quantités d'Ac huit fois supérieures in vitro à celles nécessaires in vivo en technique de PCA. Nous avons également observé cette difficulté de sensibilisation passive des cellules Pour obtenir une dégranulation dans le système ovalbumine et dans nos conditions expérimentales, il faut un sérum de titre PCA supérieur à 128, ce qui est considérable.

La destruction des IgE par chauffage abolit complètement la libération de sérotonine. Par contre, elle est maintenue si les cellules sont lavées après la sensibilisation passive par le sérum réaginique. Ces deux faits expérimentaux confirment qu'il s'agit d'une dégranulation anaphylactique dont le signal est l'interaction de l'IgE avec son récepteur sur le mastocyte. L'inhibition de la dégranulation par le cromoglycate de sodium confirme que la mesure de la libération de sérotonine est dans nos conditions une bonne méthode d'évaluation de la dégranulation aussi bien en anaphylaxie active qu'après sensibilisation passive.

De nombreuses méthodes de dosage de la concentration sérique en IgE ont été décrites : la technique du RAST est précise mais son principal inconvénient réside dans la nécessité d'insolubiliser de grandes quantités d'Ag et l'absence d'information sur le pouvoir anaphylactique de ces IgE. La technique d'anaphylaxie cutanée passive permet au contraire d'analyser le pouvoir biologique de ces anticorps, mais elle exige de nombreux animaux et une période de sensibilisation de 48 heures. La technique in vitro de dégranulation mastocytaire est satisfaisante dans son principe, mais les méthodes couramment utilisées pour l'évaluation de la dégranulation sont peu adéquates. L'observation au microscope optique est peu reproductible surtout lorsque le pourcentage de cellules dégranulées est faible ou lorsque les altérations cellulaires sont minimes. C'est une information subjective et de toute façon semiquantitative. Les dosages physicochimiques de médiateurs (histamine ou sérotonine) permettent d'éviter ces inconvénients en fournissant une information quantitative mais ils exigent du temps et de l'expérience. La méthode de mesure de libération de sérotonine tritiée que nous avons développée semble éviter tous ces inconvénients, en évitant la caractérisation physicochimique d'un médiateur tout en donnant un résultat quantitatif. Cette méthode simple et rapide pourrait être appliquée dans tous les cas où la technique de dégranulation mastocytaire convient pour la détection des IgE et la caractérisation de réactions anaphylactiques.

II - Production par Schistosoma mansoni d'un facteur inhibiteur de la dégranulation mastocytaire

A - Inhibition de la dégranulation in vitro

1. Inhibition de la dégranulation induite par un système anaphylactique

Des mastocytes péritonéaux de rat marqués à la sérotonine sont incubés avec la fraction dialysable et non dialysable de l'incubat à différentes concentrations. Après 45 minutes de contact, on induit une dégranulation par action d'un sérum réaginique antiovalbumine et ovalbumine dans les conditions habituelles. Des doses de dialysat de 10-50 µl sont testées. On mesure d'une part la libération de sérotonine en présence de dialysat seul de façon à contrôler l'effet cytotoxique de cette substance, d'autre part la libération de sérotonine après activation par le système anaphylactique (figure 8). A de faibles concentrations (10-30 µl) la fraction dialysable de l'incubat inhibe de façon significative la dégranulation mastocytaire. Cette inhibition est fonction de la dose puisqu'on obtient 54 % avec 10 µl et 70 % avec 20 µl. Avec 30 µl l'inhibition est de 49 % mais une libération spontanée de sérotonine commence à apparaître à cette dose, ce qui peut expliquer la plus faible inhibition obtenue avec cette concentration. Aux plus fortes concentrations (40 et 50 µl), la libération spontanée de sérotonine augmente de façon considérable. Elle est presque totale avec 50 µl de dialysat (87 %), ce qui correspond non pas à un processus actif mais très certainement à une cytotoxicité du dialysat à ces concentrations. La fraction non dialysable ne présente pas d'action inhibitrice.

2. Inhibition de la dégranulation induite par des agents chimiques

Il était intéressant de voir si cette substance a la propriété d'inhiber de façon très générale le processus de

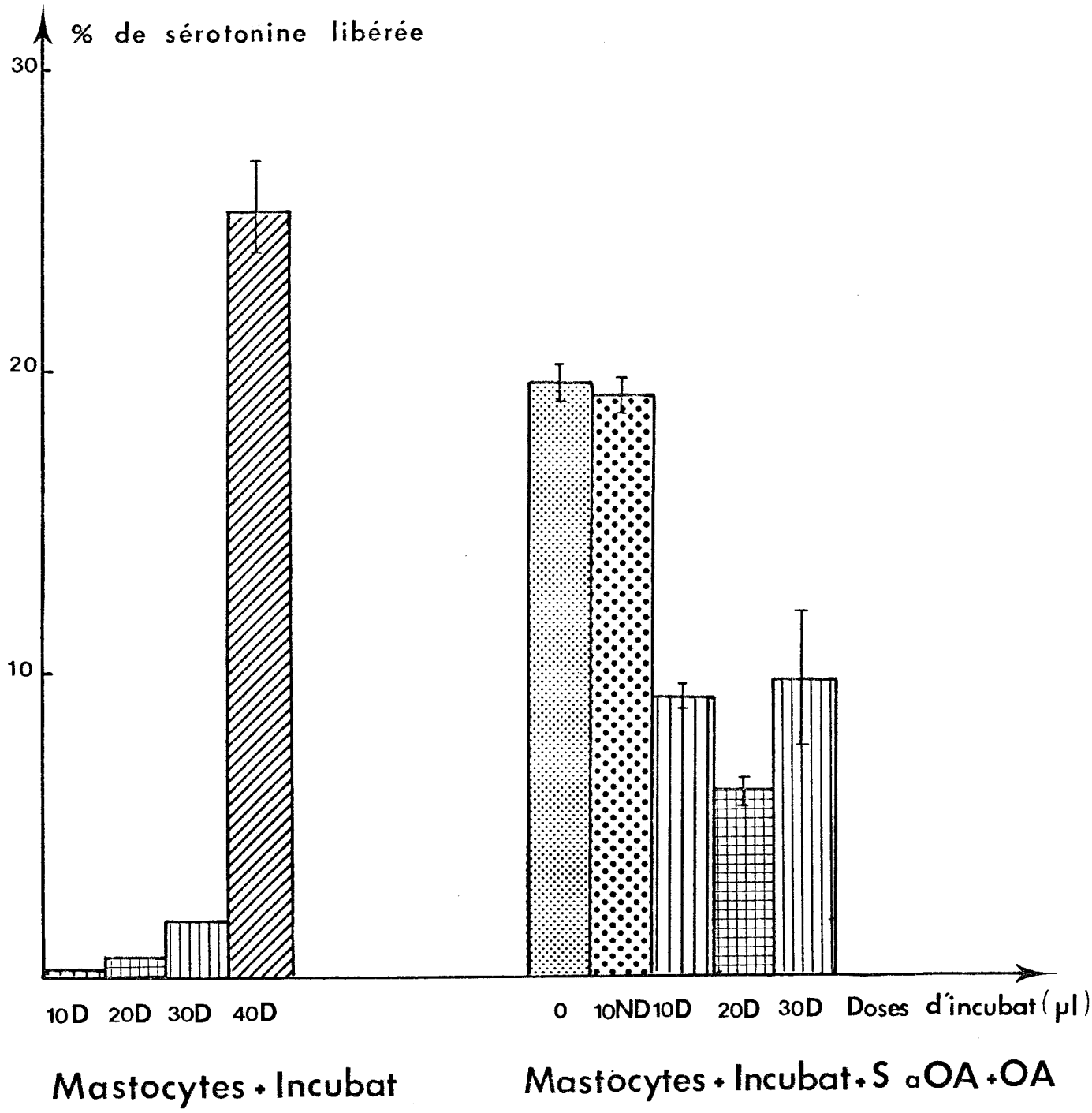


FIGURE 8: INHIBITION DE LA DEGRANULATION ANAPHYLACTIQUE PAR DES EXTRAITS PARASITAIRES.

SHS LILLE

5.10^4 mastocytes marqués sont incubés 45 min. à 37°C avec les fractions dialysable (D) et non dialysable (ND) de l'incubat de vers adultes. 50 µl de sérum antiovalbumine (S aOA) sont ajoutés et incubés 15 min. avant l'addition de 50 µl d'ovalbumine (OA) (1 mg/ml)

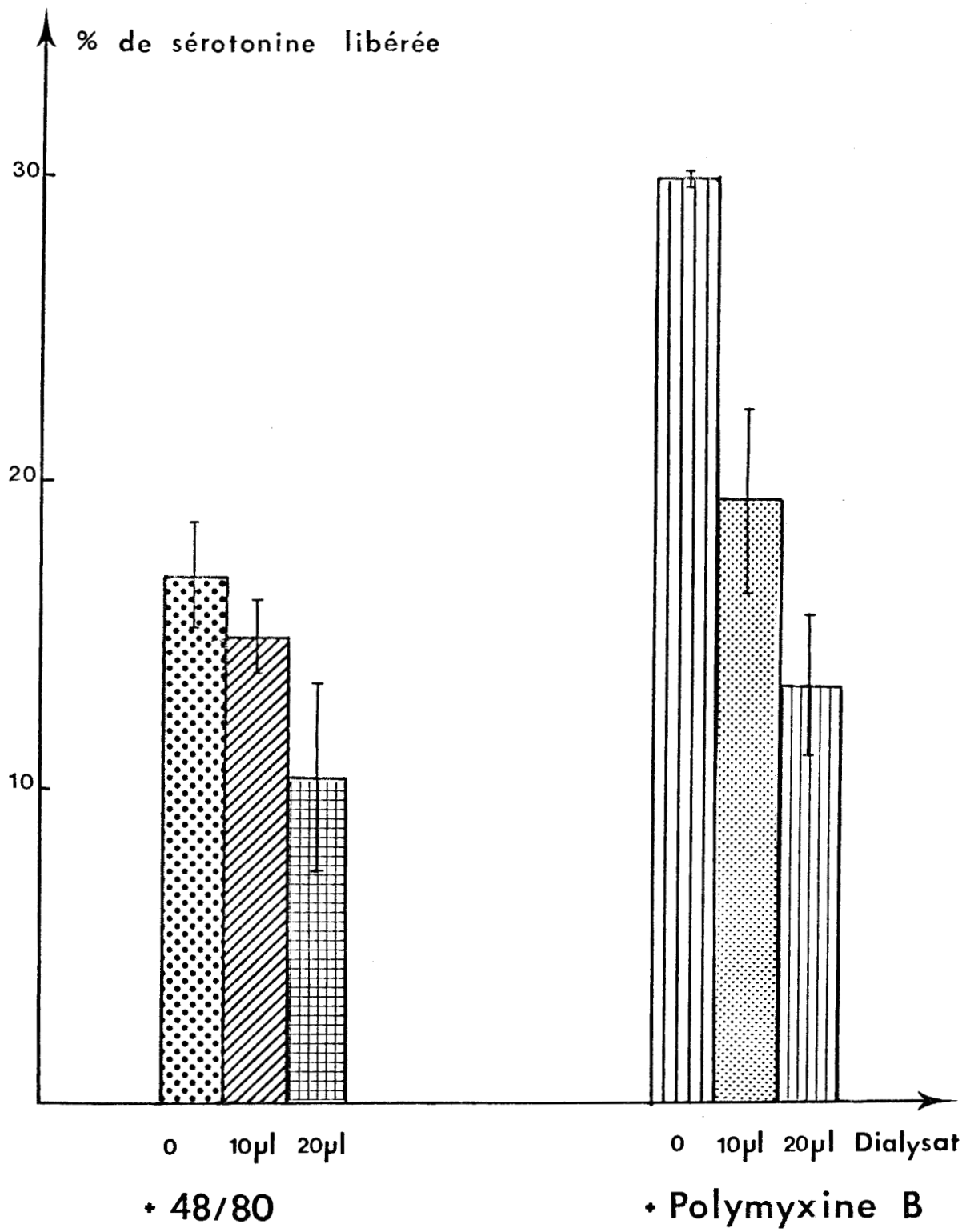


FIGURE 9: INHIBITION PAR UN EXTRAIT PARASITAIRE DE LA DEGRANULATION INDUITE PAR DES AGENTS CHIMIQUES.

BUS LILLE

5.10^4 mastocytes marqués sont incubés 1 h. à 37°C avec la fraction dialysable de l'incubat puis avec 50 µl de composé 48/30 (5 µg/ml) ou de Polymyxine (50 µg/ml)

dégranulation, ou si cette inhibition est spécifique d'une dégranulation induite par des réactions antigène-anticorps. Pour cela, nous avons mis en contact des mastocytes marqués avec l'incubat, puis nous avons induit une dégranulation par action de composé 48/80 ou de polymyxine B sulfate.

Les doses de ces composés utilisées pour faire dégranuler les mastocytes sont des doses infra-optimales de façon à limiter la lyse cellulaire qui résulte d'une dégranulation explosive (figure 9). Avec le composé 48/80 (5 µg/ml) le pourcentage de libération de sérotonine est de 17,1 %. La préincubation avec 10 µl de fraction dialysable réduit ce pourcentage à 15,1 % ; avec 20 µl on obtient 10,4 %. L'inhibition obtenue avec 20 µl est de 39%. Bien que statistiquement significative, ($p<0,05$), elle reste cependant limitée.

Avec la polymyxine B sulfate (50 µg/ml) on obtient 29,8 %. En préincubant avec 10 µl de dialysat, on a 19,5 % ; avec 20 µl 13,5 %, ce qui correspond respectivement à 35 et 55 % d'inhibition. On peut donc inhiber plus facilement une dégranulation induite par de la polymyxine B que par le composé 48/80.

3. Caractéristiques du facteur inhibiteur

a) Thermostabilité

La fraction dialysable de l'incubat de vers adultes est chauffé 1 heure à 100°C puis mise en contact avec les mastocytes marqués. On compare l'inhibition de la dégranulation anaphylactique obtenue avec les fractions chauffée et non chauffée. On obtient avec 10 µl de dialysat respectivement 54 et 56 % d'inhibition. Il s'agit donc d'un composé thermostable (figure 10a)

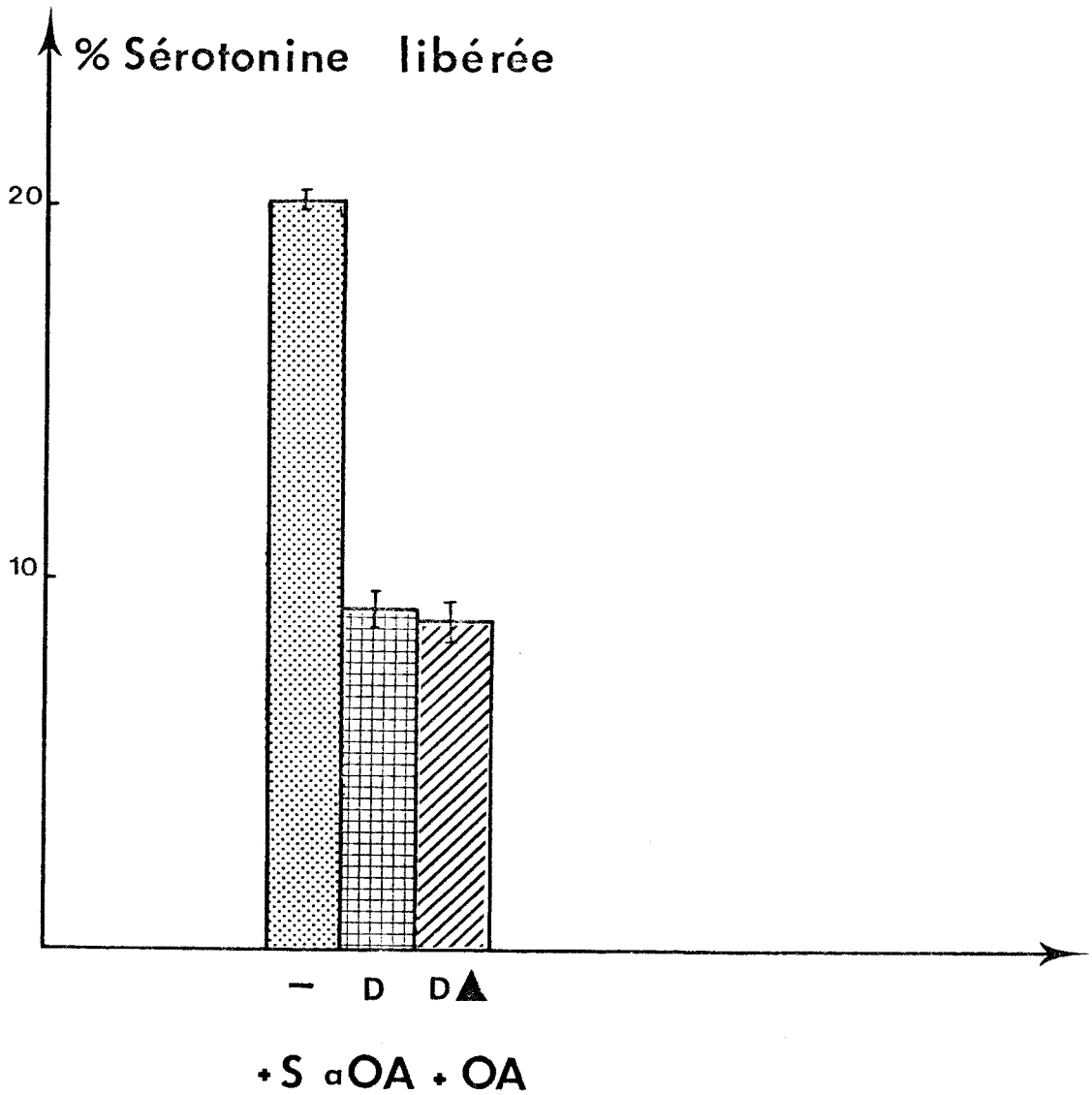


FIGURE 10a: CARACTERISTIQUES DE LA FRACTION INHIBITRICE.

5.10^4 mastocytes marqués sont incubés 1h. à 37°C avec 10 µl de la fraction dialysable de l'incubat chauffée (D▲) ou non chauffée (D) puis avec un sérum antiovalbumine (S aOA) 15 min. avant l'addition de 50 µl d'ovalbumine (OA)(1 mg/ml).

BUS LILLE

b) Caractère irréversible de l'inhibition par lavage

Nous avons recherché si l'inhibition de la dégranulation pouvait être levée par lavage des cellules après leur mise en contact avec la fraction inhibitrice.

Les cellules marquées sont incubées 45 minutes avec 10 µl de dialysat puis lavées trois fois dans le milieu de culture. On induit une dégranulation soit par action de Polymyxine B sulfate soit par action d'un sérum antiovalbumine et d'ovalbumine.

Avec le système anaphylactique, on obtient 30,3 % de libération de sérotonine. Avec 10 µl de dialysat, on obtient 13,3 % s'il n'y a pas d'étape de lavages et 19,5 % lorsque les cellules sont lavées entre l'incubation avec le dialysat et la sensibilisation passive avec le sérum réaginique. On ne peut donc pas restaurer la réponse normale par ces lavages (figure IOb)

Avec la polymyxine B sulfate (10 µg/ml), la dégranulation est de 23,9 %. En préincubant avec le dialysat, on obtient sans lavage 19,9 % ; avec l'étape des lavages on obtient 22,0 % pour le témoin et 12,7 % avec le dialysat, ce qui correspond à 34 et 42 % d'inhibition. On obtient le même résultat que précédemment avec la réaction anaphylactique. Il semble que le dialysat induise un signal inhibiteur irréversible même lorsqu'il est ensuite éliminé par lavages

c) Non-cytotoxicité de cette substance

L'action de la fraction dialysable de l'incubat de vers a déjà été étudiée vis-à-vis de lymphocytes stimulés par des mitogènes (DESSAINT et al., 1977). Cette fraction s'est montrée inhibitrice de la prolifération lymphocytaire. Bien que les tests de cytotoxicité réalisés sur les cultures de lymphocytes aient été négatifs, il était nécessaire de voir si cette fraction possède un caractère de toxine cellulaire, c'est-à-dire si elle induit une cytotoxicité ou cytostaticité des cellules quelle que soit la lignée choisie.

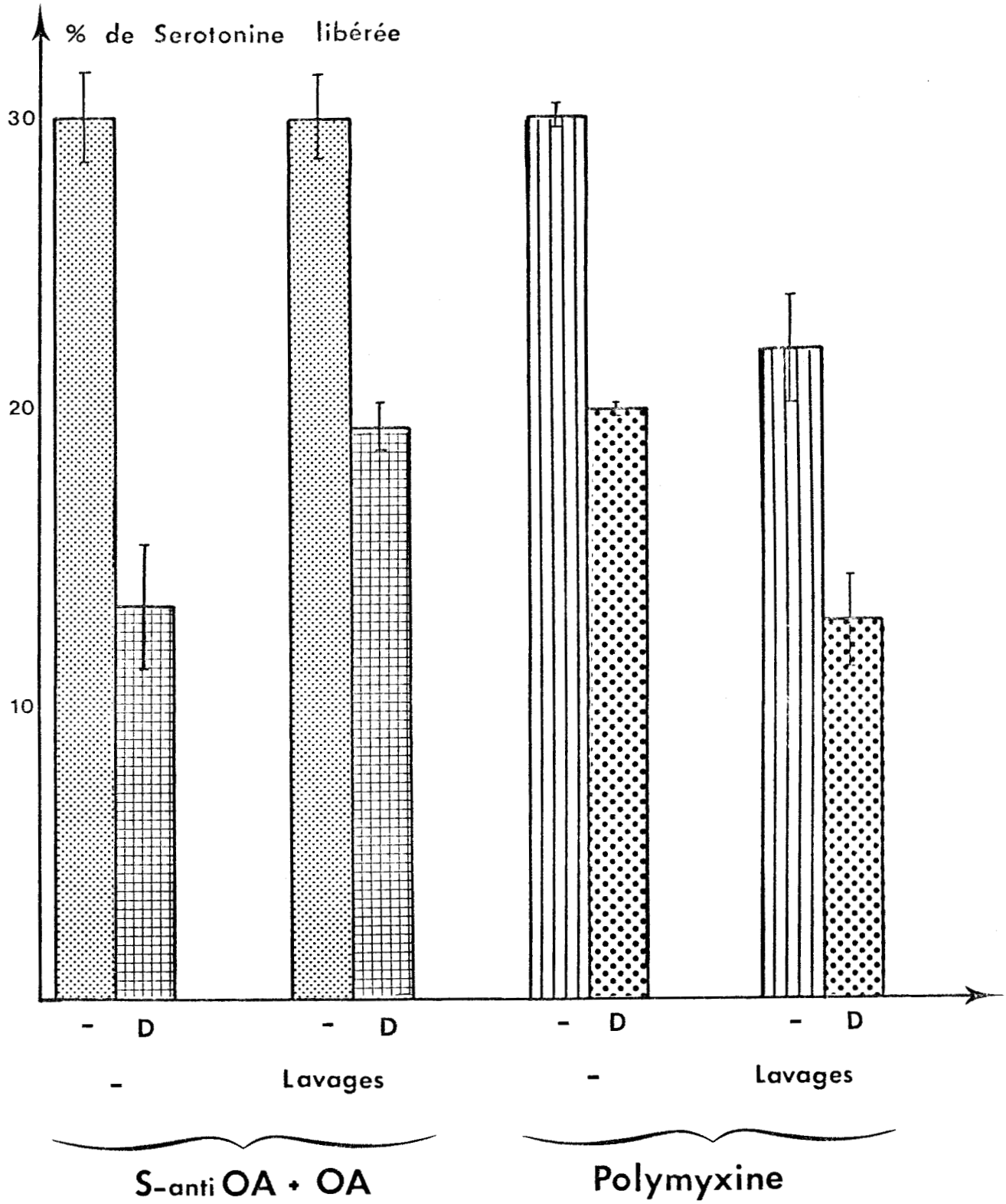


FIGURE 10b: CARACTERISTIQUES DE LA FRACTION INHIBITRICE

5.10^4 mastocytes marqués sont incubés avec 10 µl de fraction dialysable 1h. à 37°C. Puis les cellules sont lavées dans le milieu de culture et mises en contact avec le système anaphylactique antiovalbumine ou avec la polymyxine dans les conditions précédemment décrites (a)

BUS LILLE

Nous avons étudié deux lignées de cellules en culture continue. La première est la lignée Hela. Ce sont des cellules tumorales du col utérin n'ayant pas de compétence immunologique particulière. La seconde est la lignée monocytaire humaine J111. Nous avons étudié l'action du dialysat sur des lymphocytes stimulés par des mitogènes ainsi que sur ces deux lignées cellulaires. La cytotoxicité est mesurée par test d'exclusion au bleu trypan accompagnée d'une numération en hémocytomètre de Thoma. L'inhibition de croissance est évaluée par la mesure de l'incorporation de ^{3}H Thymidine (Thy).

Les lymphocytes spléniques de souris CBA sont mis en culture conformément à la technique décrite précédemment en présence de 10 µl de dialysat et de mitogènes PHA (dilution 1/100) et Con A (1 µg). On mesure l'incorporation de ^{3}H Thy au bout de 72 heures de culture. La dose de 10 µl de dialysat s'avère extrêmement efficace vis-à-vis de lymphocytes stimulés par des mitogènes. L'inhibition est de 96 % c'est-à-dire que la stimulation mitogénique est totalement abolie. L'incorporation de base de la thymidine en présence ou en absence de dialysat est la même, ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'une action cytotoxique (tableau 5)

Les cellules Hela et les monocytes sont mis en culture conformément à la technique décrite précédemment. Le test au bleu Trypan permet d'évaluer le pourcentage de cellules mortes lorsque celles-ci ne sont pas lysées. Un effet toxique pourrait entraîner une lyse cellulaire, c'est pourquoi il est nécessaire de faire également une numération de façon à connaître le nombre de cellules viables. Avec les cellules Hela aucune différence de comportement n'est observée entre les cellules témoin et les cellules cultivées en présence de dialysat. Après 72 heures de culture les cellules se sont multipliées et forment un tapis confluent ; l'inhibition de contact limite la prolifération cellulaire ce qui explique la plus faible incorporation de thymidine en fin de culture (tableau 6)

Stimulation	Incorporation de ^{3}H Thy par les lymphocytes de souris	
	Témoin cpm ± et *	Dialysat 10 µl cpm *± et
—	15848 ± 4463	15850 ± 2421
Con A 1 µg	237643 ± 8632 (I.T.** = 15)	24896 ± 9235 (I.T. = 1,6)
PHA 1/100	206224 ± 58231 (I.T. = 13)	22469 ± 3656 (I.T. = 1,4)

* Nombre de coups par minute (cpm) ± écart-type (et)

** I.T. : index de transformation

Tableau 5 : Incorporation de thymidine par des lymphocytes stimulés en présence de dialysat.

BUS LILLE

Temps		Témoin	Dialysat 10 µl
3 H	(1) Numération	$4,6.\ 10^5 \pm 0.5.\ 10^5$	$4,9.\ 10^5 \pm 0,9.\ 10^5$
	(2) ^{3}H Thy (cpm ± et)	23114 ± 9477	30040 ± 11177
8 H	Numération	$4,1.\ 10^5 \pm 1,0.\ 10^5$	$3,0.10^5 \pm 0,4.10^5$
	^{3}H Thy (cpm ± et)	17847 ± 1675	19629 ± 977
24 H	Numération	$7,7.10^5 \pm 0,4.10^5$	$5,6.10^5 \pm 0,5.10^5$
	^{3}H Thy (cpm ± et)	22719 ± 651	21873 ± 1550
72 H	Numération	$21,6.10^5 \pm 3,8.10^5$	$22,0.10^5 \pm 3,0.10^5$
	^{3}H Thy (cpm ± et)	5726 ± 386	6015 ± 1764

(1) Numération en hémocytomètre de Thoma après test d'exclusion du bleu Trypan

(2) Incorporation de ^{3}H Thy exprimée en coups par minutes (cpm) ± écart-type (et).

Tableau 6 : Action du dialysat sur la viabilité et la croissance de cellules Hela.

BHS LILLE

Le même résultat a été obtenu avec la lignée monocytaire J111. La multiplication cellulaire est plus lente mais en 48 heures, on observe cependant une augmentation du nombre de cellules, cette augmentation étant identique avec et sans dialysat (tableau 7).

L'hypothèse d'une toxine cellulaire semble donc écartée. Aux doses couramment utilisées pour mettre en évidence des effets inhibiteurs, la fraction dialysable de l'incubat ne présente pas d'action toxique sur les cellules quelle que soit leur origine.

B - Inhibition de la dégranulation in vivo

1. PCA induite par des agents chimiques

Le composé 48/80 et la polymyxine sont capables d'induire *in vivo* une réaction positive lorsqu'ils sont injectés par voie intradermique. La réaction est instantanée, c'est pourquoi l'injection intraveineuse de Bleu d'Evans doit être faite simultanément. La dilution limite donnant une réaction positive est déterminée pour chacun de ces composés sur une série de rats témoins. Pour le composé 48/80, il s'agit de 0,1 µg/ml, pour la polymyxine de 10 µg/ml.

Le dialysat est injecté 10 minutes avant l'induction de la dégranulation à raison de 100 µl par injection, par voie intradermique. Simultanément, on injecte le Bleu d'Evans par voie intraveineuse et le 48/80 ou la polymyxine par voie intradermique. Les témoins positifs sont constitués par une première injection d'eau physiologique puis une seconde de 48/80 ou de polymyxine. On observe après injection du dialysat une nette diminution de l'intensité de la réaction que ce soit avec le composé 48/80 ou avec la polymyxine. (Figure 11 et 12)

		Témoin	Dialysat 10 µl
24 H	(1) Numération	$2,6.10^5 \pm 0,2.10^5$	$2,3.10^5 \pm 0,2.10^5$
	(2) ^{3}H Thy (cpm ± et)	5262 ± 835	3693 ± 255
48 H	Numération	$3,5.10^5 \pm 0,2.10^5$	$3,8.10^5 \pm 0,3.10^5$
	^{3}H Thy (cpm ± et)	17483 ± 1431	14736 ± 2211

(1) Nombre de cellules évalué par numération dans un hémocytomètre de Thoma après test d'exclusion au bleu Trypan

(2) Incorporation de ^{3}H Thymidine exprimée en coups par minute (cpm) ± écart-type (et).

Tableau 7 : Action du dialysat sur la viabilité et la croissance de monocytes humains (J111) en culture continue.

BUS LILLE

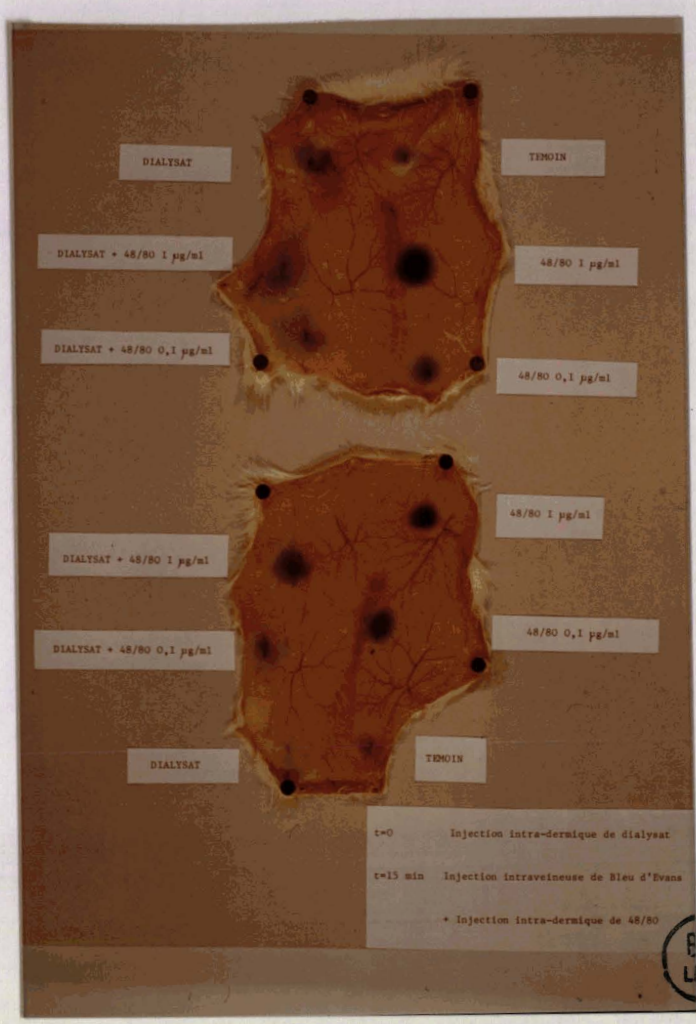


FIGURE 11 : INHIBITION DE PCA INDUITE PAR LE COMPOSE 48/80.

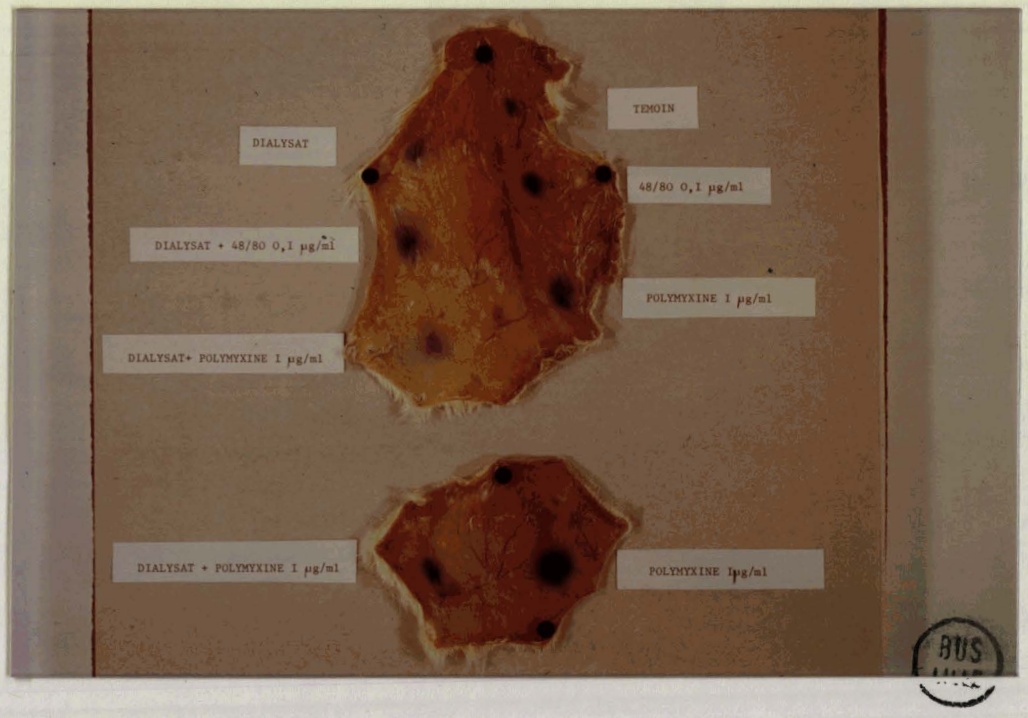


FIGURE 12 : INHIBITION DE PCA INDUITE PAR LE COMPOSE 48/80 OU LA POLYMYXINE B.

2. PCA induite par une réaction anaphylactique

a) Sérum antiovalbumine et ovalbumine

Nous avons induit une réaction d'anaphylaxie cutanée passive en utilisant un sérum antiovalbumine de titre PCA 1 : 128. Les animaux sont sensibilisés par le sérum réaginique dilué au 1 : 64. Après 48 heures de sensibilisation, le dialysat est injecté au même point, une injection d'eau physiologique constituant le témoin positif. L'ovalbumine est injectée par voie intraveineuse avec le bleu d'Evans. Une forte réaction positive est obtenue avec le sérum réaginique. Cette réaction est pratiquement totalement abolie si le dialysat a été injecté au préalable. (Figure 13)

b) Sérum de rat infecté et antigène hydrosoluble de S. mansoni

Un deuxième système anaphylactique a été choisi : contrairement aux expériences in vitro, il est possible d'obtenir une réaction positive avec un sérum de rat infecté par S. mansoni lorsqu'on utilise la technique de PCA. Le sérum de rat infecté est pris au 45ème jour de l'infection c'est-à-dire à la période la plus favorable pour l'obtention d'IgE spécifiques anti-S. mansoni. Le sérum (titre PCA 1 : 8) est injecté pur par voie intradermique 48 heures avant l'injection de dialysat. L'injection intraveineuse d'Ag hydrosoluble S. mansoni et de bleu d'Evans amène une forte réaction positive pour le témoin. Celle-ci est totalement abolie avec le dialysat. On confirme les résultats obtenus avec les composés chimiques, l'inhibition étant même plus marquée dans le cas de la réaction anaphylactique. (Figure 14)

C- Inhibition du système de cytotoxicité mastocyte-éosinophile dépendant

Le mécanisme de cette réaction de cytotoxicité a été décrit par Capron et al. (1978). Les éosinophiles mis en contact

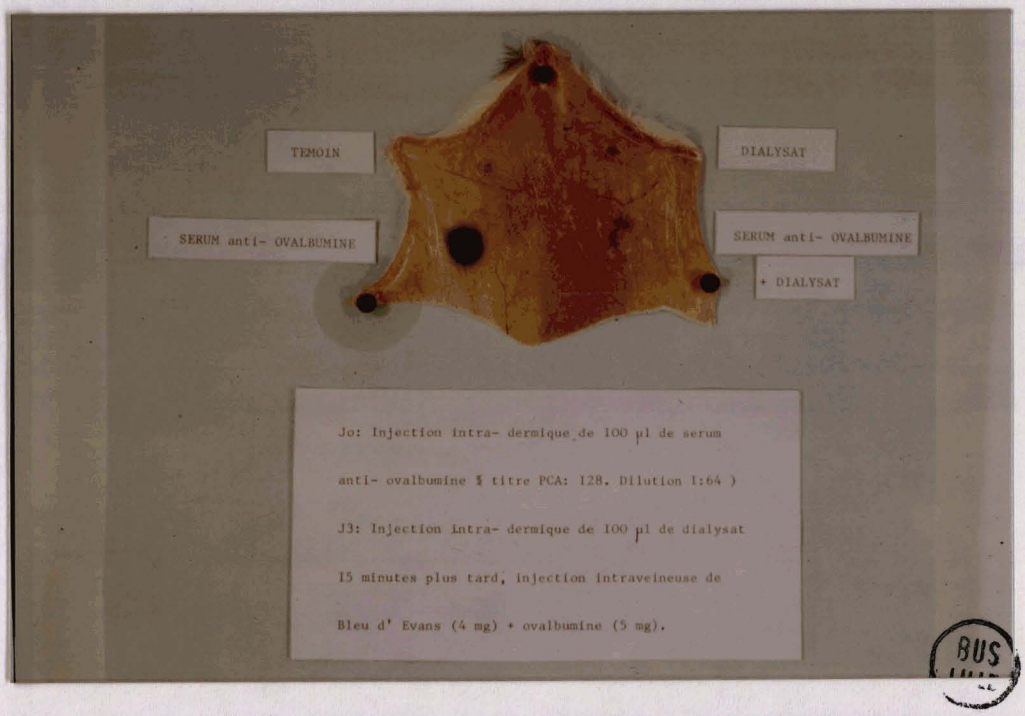


FIGURE 14 : INHIBITION DE PCA INDUITE PAR UN SERUM ANTIOVALBUMINE ET OVALBUMINE.

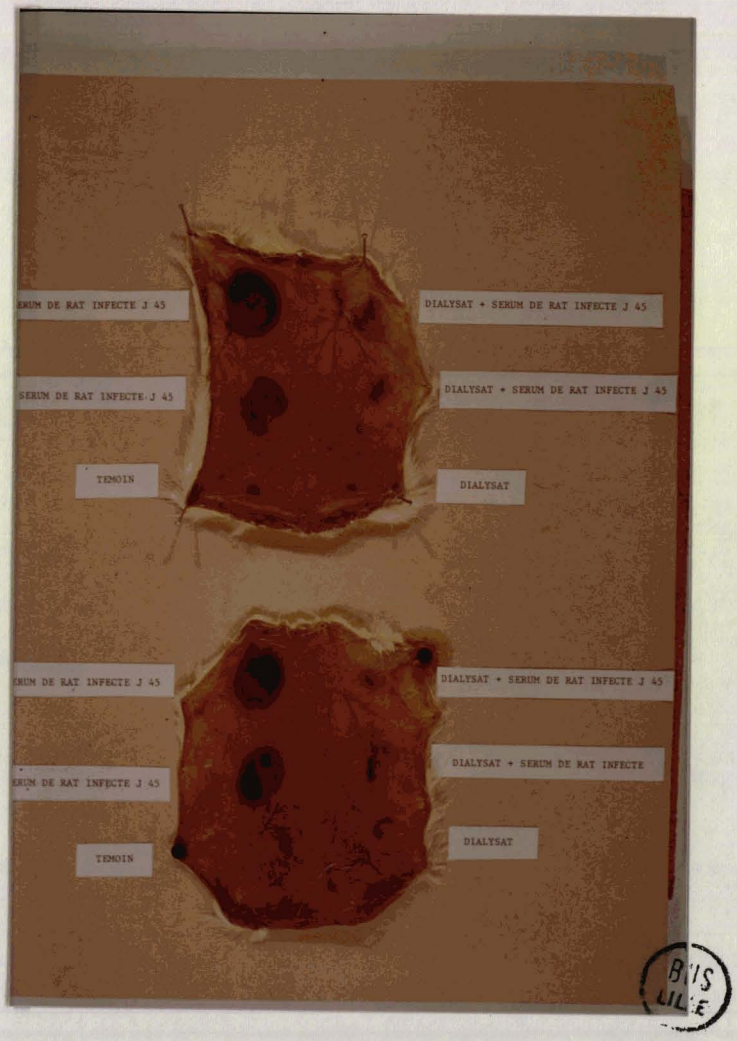


FIGURE 15 : INHIBITION DE PCA INDUITE PAR UN SERUM DE RAT INFECTE (J45) ET L'AG HYDROSOLUBLE DE S. MANSONI.

avec des schistosomules sensibilisés par des Ac IgGa sont capables d'enrober et de tuer ceux-ci. La présence de mastocytes ou de surnageants de mastocytes dégranulés s'avère indispensable pour qu'il y ait cytotoxicité. Il est probable que les mastocytes activés par des complexes à IgE ou IgGa libèrent des produits d'activation des éosinophiles. Ceux-ci sont alors capables de détruire les schistosomules. Il était donc intéressant de voir si la fraction dialysable de l'incubat de vers adultes était capable en bloquant les mastocytes d'inhiber cette réaction de cytotoxicité.

10 µl de fraction dialysable sont déposés au contact des schistosomules sensibilisés en même temps que les cellules obtenues après adhérence de deux heures. Le pourcentage de schistosomules morts après 48 heures de culture est déterminé. La présence de la fraction dialysable de l'incubat fait tomber le pourcentage de cytotoxicité de 63 % à 17 %, soit une inhibition de 74 %. La fraction dialysable agit très probablement au niveau des mastocytes mais il est également possible qu'elle agisse sur les éosinophiles. C'est pourquoi une deuxième expérience a consisté à incuber préalablement des mastocytes purifiés avec la fraction dialysable puis à ajouter ces mastocytes à des éosinophiles purifiés et des schistosomules sensibilisés. Le pourcentage de cytotoxicité qui était de 14 % tombe à 3 % lorsque les mastocytes ont été préincubés avec la fraction dialysable. On retrouve le même pourcentage d'inhibition, bien que le témoin positif soit beaucoup plus faible. Ceci suggère que l'action de la fraction dialysable se situe au niveau des mastocytes. (Tableau 8)

D- Discussion

La fraction dialysable de l'incubat de vers adultes S. mansoni présente vis-à-vis de la dégranulation mastocytaire une action inhibitrice. Les expériences effectuées in vitro nous ont montré que cette fraction est capable d'inhiber la dégranulation, qu'elle soit induite par un système anaphylactique ou par des agents chimiques. L'utilisation de la méthode isotopique de mesure de la dégranulation permet d'apprécier très exactement l'inhibition. Lorsque la dégranulation est induite par l'action

d'un sérum antiovalbumine et de l'antigène correspondant, des doses de 10 à 30 µl sont responsables d'une inhibition croissante de la libération de sérotonine. Avec de plus fortes concentrations, un effet cytotoxique apparaît. La lyse cellulaire ou tout au moins l'altération de la membrane cellulaire entraîne une libération spontanée de sérotonine. Cette mesure de la libération spontanée de sérotonine constitue ainsi un bon indicateur de la cytotoxicité éventuelle du dialysat. Il est à noter que cette cytotoxicité aux fortes concentrations n'est pas surprenante et correspond aux caractéristiques d'un grand nombre de substances biologiques. Le même effet inhibiteur est observé lorsque la dégranulation est induite par la polymyxine B. Cet effet est beaucoup plus difficile à mettre en évidence lorsqu'il s'agit du composé 48/80. Ceci peut s'expliquer par le fait que la dégranulation induite par le composé 48/80 serait la conséquence d'un mécanisme différent de celui de l'activation classique. Par exemple, la dépendance de la dégranulation vis-à-vis du taux de nucléotides cycliques intracellulaires n'a pu être démontrée lorsqu'elle est induite par le composé 48/80 (JOHNSON et al., 1974) (DIAMANT, 1967) alors qu'elle a été clairement démontrée dans le mécanisme général de la dégranulation (KALINER et AUSTEN, 1974). La possibilité d'inhiber une dégranulation induite par un agent chimique tel que la polymyxine B suggère que le dialysat agit par inhibition d'un signal d'activation intracellulaire plutôt que par des phénomènes de compétition au niveau des récepteurs pour l'IgE.

Les caractéristiques de la substance inhibitrice sont les mêmes que celle du facteur inhibiteur de la prolifération lymphocytaire, c'est-à-dire thermostable (1 h -100°C) et de faible poids moléculaire ($<$ 10 000). Par contre, l'inhibition est irréversible par lavage des cellules, contrairement à ce qui a été observé avec les lymphocytes. Ce résultat suggère que le dialysat induit au niveau de la cellule un signal intracellulaire qui empêche l'activation ultérieure, par exemple en bloquant une étape du métabolisme nécessaire au processus de la dégranulation. On ne peut toutefois exclure pour expliquer ce phénomène irréversible la possibilité d'une liaison de forte affinité entre le mastocyte et le facteur inhibiteur. Les

caractéristiques énumérées précédemment sont bien insuffisantes pour affirmer qu'il s'agit du même facteur agissant sur les 2 types cellulaires lymphocytes et mastocytes. Cependant, il était intéressant de voir si la fraction dialysable de l'incubat possède une action générale sur le développement et la viabilité de cellules quelle que soit leur origine. Les tests effectués sur des cellules Hela et les monocytes humains en culture continue nous ont montré que le dialysat ne présente aucune activité cytotoxique ou cytostatique sur ces cellules, aux doses utilisées pour mettre en évidence un effet inhibiteur sur les lymphocytes ou les mastocytes. Le dialysat dans les conditions utilisées n'est pas une toxine cellulaire mais possède une action spécifique vis-à-vis de certains types cellulaires dont les lymphocytes et les mastocytes.

L'utilisation de la technique de PCA nous a permis de confirmer in vivo le rôle inhibiteur joué par le dialysat. Les composés chimiques 48/80 et polymyxine B présentent l'avantage d'induire une réaction positive immédiate sans période de sensibilisation, ce qui a facilité les expériences dans un premier temps. Le même nombre d'injections est effectué pour chaque point (eau physiologique ou dialysat), ce qui permet d'éliminer l'hypothèse d'une inhibition due au traumatisme de l'injection intradermique. Le dialysat seul n'induit pas de réaction positive. Si l'action du dialysat consistait en une lésion tissulaire au point d'injection, il est probable qu'il en résulterait une lyse des mastocytes avec libération de médiateurs et vasodilatation donc une réaction positive avec le dialysat seul. L'absence de réaction avec le dialysat permet de dire qu'il ne s'agit pas d'une simple réaction cytotoxique. La présence du dialysat entraîne une forte atténuation de la réaction provoquée par le 48/80 ou la polymyxine. Une inhibition presque totale est observée dans le système anaphylactique qu'il s'agisse d'un sérum antiovalbumine ou d'un sérum de rat infecté par S. mansoni. Le fait que le dialysat soit injecté après

l'étape de sensibilisation confirme l'hypothèse élaborée après les expériences in vitro : le dialysat n'entre pas en compétition avec les IgE pour la fixation au niveau du récepteur mastocytaire mais agit probablement au cours des étapes ultérieures en bloquant un stade de l'activation cellulaire.

Le système de cytotoxicité décrit par CAPRON et al. (1978) est un mécanisme effecteur faisant intervenir deux types cellulaires le mastocyte et l'éosinophile. Le dialysat est capable d'inhiber cette réaction de cytotoxicité, et les résultats préliminaires montrent que le dialysat agit seulement au niveau des mastocytes et ne présente pas d'action directe au niveau des éosinophiles ou des schistosomules. Bien que l'efficacité de ce mécanisme in vivo ne soit pas établie, le rôle des éosinophiles en coopération avec les mastocytes a été montré dans plusieurs modèles parasitaires (ANSARI et WILLIAMS, 1976) (WEBER et RUBIN, 1958). On pense que des facteurs solubles lymphocytaires ont la propriété de stimuler la différenciation de cellules souches en éosinophiles (COLLEY, 1973). D'autre part, l'activation des mastocytes par les anticorps anaphylactiques et les allergènes parasitaires conduit à la libération de plusieurs facteurs chemotactiques pour les éosinophiles ce qui permet la localisation de ces cellules au voisinage de la cible. L'éosinophile serait alors capable de détruire le parasite soit par action de phospholipase B (OTTOLENGHI, 1970) ou par production de superoxyde (TAUBER et al., 1976). Ce mécanisme proposé par GOETZL et AUSTEN (1977) n'est encore qu'hypothétique mais tous ces arguments font penser que la réaction de cytotoxicité décrite par CAPRON et al. dans le modèle S. mansoni est un mécanisme effecteur efficace in vivo. La possibilité pour le dialysat d'inhiber cette réaction s'avère donc d'une grande importance.

Bien des points observés restent à éclaircir au sujet de cette substance. Tout d'abord, le mécanisme d'action reste tout à fait inconnu. Le fait que ce facteur parasitaire puisse inhiber la dégranulation, qu'elle soit induite par un système anaphylactique

Schistosomules sensibilisés par SRI (1)	% cytotoxicité	% inhibition
Cellules surnageantes 2h. (Eosinophiles + Mastocytes)	63,6 ± 9,9	
Cellules surnageantes + 10 µl de dialysat	16,6 ± 14,1	74% ($p<0,05$)
Eosinophiles purifiés + 20% Mastocytes	13,9 ± 5,1	
Eosinophiles purifiés + 20 % Mastocytes + 10 µl de dialysat	3,5 ± 1,2	75% (2)

(1) SRI: sérum de rat infecté J 35 (chauffé 56°C)

(2) Résultat statistiquement non significatif en raison du faible effectif.

Tableau 8: Inhibition de la réaction de cytotoxicité mastocyte-éosinophile dépendante par la fraction dialysable de l'incubat.

BUS LILLE

ou par des agents chimiques, suggère une intervention au niveau du métabolisme cellulaire dans l'une des étapes de l'activation conduisant à la dégranulation. On pourrait penser que l'action du dialysat se situe non pas au niveau du mastocyte, mais agit par destruction des médiateurs libérés. L'utilisation de la mesure de la sérotonine tritiée libérée écarte cette hypothèse car la radioactivité est de toute façon mesurée même si la sérotonine libérée a été ultérieurement dégradée.

La purification de cette substance apporterait des renseignements importants sur sa nature, son mécanisme d'action et son identification in vivo. D'autre part, elle permettrait de déterminer si cette substance présente un intérêt pharmacologique dans le traitement des phénomènes allergiques. Le point le plus important est évidemment de déterminer si ce facteur possède un rôle effectif au cours de l'infection. A cet égard, l'infection par Taenia taeniaeformis présente de grandes similitudes avec l'infection par S. mansoni. LEID (1977) dans une revue générale, décrit l'importance des deux classes d'anticorps anaphylactiques IgE et IgGa au cours de l'infection. Il semble que les mastocytes soient activés dans la première phase par l'IgGa et dans une seconde phase par l'IgE. Ceci concorde avec le modèle S. mansoni où l'on pense que le mécanisme IgGa-éosinophile est effectif au cours de la première période de l'infection alors que le système IgE-macrophage l'est au cours de la seconde période. LEID a cependant constaté que bien que les conditions d'activation soient remplies, il existe des périodes de l'infection où l'on observe une nette diminution de la possibilité d'activer les mastocytes. On peut évidemment penser que les récepteurs mastocytaires de ces animaux sont saturés par les IgE produites de façon massive au cours de l'infection mais il est étrange, compte-tenu de la persistance des IgE à la surface des mastocytes, que cette inhibition soit spécifique de certaines périodes et soit réversible au cours du temps. TURNER et al. (1978) ont exploré cette hypothèse. Leurs résultats montrent que le phénomène de compétition des différentes IgE vis-à-vis du mastocyte n'est pas responsable d'une diminution de la réactivité mastocytair

L'hypothèse d'un contrôle exercé par le parasite directement au niveau de la dégranulation semble donc tout à fait plausible et pourrait expliquer cette faible activation à certaines périodes de l'infection. On peut imaginer que chez le rat le rejet des vers induit par le mécanisme de cytotoxicité à éosinophile entraîne la libération de nombreuses molécules d'origine parasitaire dont en particulier le facteur inhibiteur de la dégranulation. Celui-ci en bloquant la dégranulation permet le maintien d'une faible partie de la population parasitaire.

Il apparaît donc urgent de confirmer d'une part dans le modèle S. mansoni l'existence d'une inhibition de la dégranulation au cours de l'infection et de déterminer à quelle période elle se situe ; d'autre part de voir si cette inhibition peut être imputée partiellement ou totalement à la production par le parasite d'un facteur capable d'inhiber ou de limiter la dégranulation.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le but de notre travail était de voir si, compte-tenu de la présence de grandes quantités d'anticorps anaphylactiques, la faible amplitude des phénomènes allergiques observée au cours des helminthiases et la limitation de l'efficacité des mécanismes de cytotoxicité ne peuvent pas s'expliquer par une modulation de la dégranulation au cours de l'infection. La production par le parasite de facteurs interférant avec la réponse immune de l'hôte s'avère maintenant être un mécanisme général expliquant la survie possible du parasite chez un hôte immunologiquement compétent. Par conséquent, la production par le parasite de substance(s) capable(s) d'interférer avec la dégranulation mastocytaire était à envisager pour expliquer le dysfonctionnement de l'activation mastocytaire. Nous nous proposions donc d'étudier la dégranulation de mastocytes in vitro et in vivo en présence d'un extrait parasitaire.

L'étude in vitro a été réalisée grâce à une méthode de mesure de la dégranulation que nous avons tout d'abord adaptée à nos exigences. Cette méthode consistant à mesurer la libération de sérotonine tritiée préalablement incorporée dans les mastocytes s'est avérée extrêmement facile à manier, rapide et précise par comparaison aux méthodes couramment utilisées in vitro. Sa précision nous a permis d'une part d'utiliser un système de sensibilisation passive avec lequel la dégranulation est faible donc difficile à mesurer, d'autre part d'évaluer des effets inhibiteurs de faible amplitude.

L'extrait parasitaire constitué par l'incubation de vers adultes dans un milieu hypotonique présente une action inhibitrice sur la dégranulation in vitro induite par composé chimique ou par système anaphylactique. L'activité inhibitrice est contenue dans la fraction dialysable donc de faible poids moléculaire, thermostable et subsiste après lavage des cellules. La même inhibition est observée in vivo en technique de PCA dans un

système anaphylactique ovalbumine ou S. mansoni. Le parasite est donc capable d'interférer avec la dégranulation mastocytaire. Le fait que l'incubat soit également capable d'inhiber le mécanisme de cytotoxicité à éosinophile souligne l'importance que pourrait jouer cette substance dans la régulation des mécanismes effecteurs.

L'isolement et la purification du facteur inhibiteur permettrait d'étudier plus facilement son mécanisme d'action dont on peut simplement dire qu'il ne s'agit pas d'un phénomène de compétition vis-à-vis des IgE mais plutôt d'un bloquage de l'activation cellulaire. Cela permettrait également de déterminer plus facilement si ce mécanisme d'inhibition est réellement efficace in vivo tout au moins à une période précise de l'infection.

L'existence de cette inhibition de la dégranulation constitue un résultat de plus dans la compréhension des relations hôte-parasite et en particulier pourrait être un mécanisme supplémentaire de survie du parasite chez son hôte.

REFERENCES

ALCASID, M.L.S., CHIARAMONTE, L.T., KIN, J.H., ZOHN, B., BONGIORNO, J.R. & MULLIN, W. (1973)
Bronchial asthma and intestinal parasites.
N.Y. ST. J. Med., 73, 1786.

ANDERSON, M.R. (1974)
The epidemiological and allergic features of asthma in the New Guinea Highlands.
Clin. Allergy, 4, 171.

ANSARI, A. & WILLIAMS, J.F. (1976)
The eosinophilic response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis.
J. Parasitol., 62, 728.

ANWAR, A.R.E. & KAY, A.B. (1977)
The ECF-A tetrapeptides and histamine selectively enhance human eosinophil complement receptors.
Nature, 269, 522.

BACH, M.K., BLOCH, K.J. & AUSTEN, K.F. (1971a)
IgE and IgGa antibody mediated release of histamine from peritoneal cells.
J. Exp. Med., 133, 752.

BACH, M.K., BLOCH, K.J. & AUSTEN, K.F. (1971 b)
IgE and IgGa antibody mediated release of histamine from rat peritoneal cells. II - Interaction of IgE and IgGa at the target cell.
J. Exp. Med., 133, 772.

BACH, M.K. & BRASHLER, J.R. (1973)
On the nature of the presumed receptor for IgE on mast cells. II - Demonstration of the specific binding of IgE to cell-free particulate preparations from rat peritoneal mast cells.
J. Immunol., 111, 324.

BARRNETT, R.J., HAGEN, P. & LEE, F.L. (1958)
Mast cell granules containing 5-hydroxytryptamine, histamine and heparin, morphologically and biochemically distinct from mitochondria.
Biochem. J., 69, 36.

BARTH, E.E.E., JARRETT, W.F.H. & URQUHART, G.M. (1966)
Studies on the mechanism of self-cure reaction in rats infected with Nippostrongylus brasiliensis.
Immunology, 10, 459-464.

BAZIN, H., QUERINJEAN, P., BECKERS, A., HEREMANS, J.F. & DESSY, F. (1974)
Transplantable immunoglobulins-secreting tumours in rats. IV - Sixty-three IgE-secreting immunocytoma tumours.
Immunology, 26, 713.

BECKER, E.L. & AUSTEN, K.F. (1964)
A comparison of the specificity of inhibition by phosphonate esters of the first component of complement and the antigen-induced release of histamine from guinea pig lung.
J. Exp. Med., 120, 491-506

BECKER,K.E., ISHIZAKA, T., METZGER, H., ISHIZAKA, K.& GRIMLEY, P.M. (1973)
Surface IgE on human basophils during histamine release.
J. Exp. Med., 138, 394

BENACERAFF, B., OVARY, Z., BLACK, K.J. & FRANKLIN, E.C. (1963)
Properties of guinea pig 7 s antibodies. I - Electrophoretic separation of two types of guinea pig 7 s antibodies.
J. Exp. Med., 117, 937-949.

BENDITT, E.P. (1957)
Morphology, chemistry and function of mast cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 73, 204-211.

BENDITT, E.P., ARASE, M. & ROEPER, M.E. (1956)
Histamine and heparin in isolated rat mast cells.
J. Histochem. Cytochem., 4, 419-420.

BENDITT, E.P. & LAGUNOFF, D. (1963)
Mast cells, endothelium and myocardial infarction.
Symposium on etiology of myocardial infarction, Henry Ford Hospital, Boston, 265-272.

BENDITT, E.P., WONG, R.L., ARASE, M. & ROGER, E. (1955)
5 Hydroxytryptamine in mast cells.
Proc. Soc. Exp. Biol., 90, 303-304.

BENNICH, H., JOHANSSON, S.G.O., VON BAHR-LINDSTROM & KARLSSON, T. (1976)
Function and structure of immunoglobulin E.
Proceedings 33rd Nobel Symposium, 175.

BENVENISTE, J., EGIDO, J. & GUTTEREZ-MILLET R. (1976)
Evidence for the involvement of the IgE basophil system in acute serum sickness.
Clin. Exp. Immunol., 26, 449.

BENVENISTE, J., KAMOUN, P. & POLONSKY, J. (1975)
Aggregation of human platelets by purified platelet activating factor from human and rabbit basophils.
Fed. Proc., 34, 985.

BHATTACHARYA, B.K. & LEWIS, G.P. (1956)
The release of 5-hydroxytryptamine by histamine liberators.
Brit. J. Pharmacol., 11, 202-208.

BLOOM, G. (1960)
Studies on cytology, cytochemistry and pathology of the mast cell.
Ross, Stockholm.

BOKISCH, V.A., DIERICH, M.P., MULLER-EBERHARD, H.J. (1975)
Third component of complement (C_3): structural properties in relation to functions.
Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 1989

BROCKLEHURST, W.E. (1960)
The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock.
J. Physiol., 151, 416.

BUTTERWORTH, A.E., DAVID, J.R., FRANKS, D., MAHMOUD, A.A.F., DAVID, P.H., STURROCK, R.F. & HOUBA, V. (1977)
Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ^{51}Gr-labeled schistosomula of S. mansoni : damage by purified eosinophils.
J. Exp. Med., 145, 136.

BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V., MAHMOUD, A.A.F., SHER, A. & REES, P.H. (1975)
Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula.
Nature, 256, 727.

BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V. & TAYLOR, R. (1976)
S. mansoni in baboons. Antibody dependent cell-mediated damage to ^{51}Cr -labelled schistosomula.
Clin. Exp. Immunol., 25, 95.

CAMPBELL, W.C., HARTMAN, R.K. & CUCKLER, A.C. (1963)
Effects of certain antihistamine and antiserotonin agents upon experimental trichinosis in mice.
Exp. Parasit., 14, 23-28.

CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A. & AFCHAIN, D. (1968)
Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite.
Path. Biol., 16, 121-138.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M. & BAZIN, H. (1975)
Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to Schistosoma mansoni.
Nature, 253, 474.

CAPRON, A., DESSAINT, J.P., JOSEPH, M., ROUSSEAUX, R., CAPRON, M. & BAZIN, H. (1977)
Interaction between IgE complexes and macrophages in the rat : a new mechanism of macrophage activation.
Eur. J. Immunol., 7, 315.

CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D. & JOSEPH, M (1978)
Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells.
Eur. J. Immunol., 8, 127.

CARSON, D., METZGER, H. & BLOCH, K.J. (1975)
Serum IgE levels during the potentiated reagin response to egg albumin in rats infected with Nippostrongylus brasiliensis.
J. Immunol., 114, 521.

CHACKO, D.D. (1970)
Intestinal parasites and asthma.
New Eng. J. Med., 283, 101.

CHEAH, J.S. & KAHN, S.P. (1972)
Lack of association between helminthic infestations and bronchial asthma in Singapore.
Aust. N.Z. J. Med., 4, 383.

CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R. (1972)
The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of Schistosoma mansoni during cultivation in vitro.
Int. J. Parasit., 2, 79.

COCA, A.F. & GROVE, E.F. (1925)
Studies in hypersensitiveness. A study of the atopic reagin.
J. Immunol., 10, 445.

COLLEY, D.G. (1973)
Eosinophils and immune mechanisms. I - Eosinophil stimulation promotor (ESP) : a lymphokine induced by specific antigen or phytohemagglutinin.
J. Immunol., 110, 1419-1423.

CONRAD, D.H., BAZIN, H., SEHON, A.H. & FROESE, A. (1975)
Binding parameters of the interaction between rat IgE and rat mast cell receptors.
J. Immunol., 114, 1688.

CONRAD, D.H., BERCZI, I. & FROESE, A. (1976)
Characterisation of the target cell receptor for IgE. I - Solubilization of IgE receptor complexes from rat mast cells and rat basophilic leukemia cells.
Immunochemistry, 13, 329.

CONRAD, D.H., FROESE, A., ISHIZAKA, T. & ISHIZAKA, K. (1978)
Evidence for antibody activity against the receptor for IgE in a rabbit antiserum prepared against IgE-receptor complexes.
J. Immunol., 120, 507.

DEAN, D.A., MURRELL, K.D., MINARD, P. & VANNIER, W.E. (1976)
Evidence for mast cell requirement in immunity of mice to schistosome infection.
Fed. Proceed., 35, 228.

DESSAINT, J.P., CAMUS, D., FISCHER, E. & CAPRON, A. (1977)
Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by Schistosoma mansoni.
Eur. J. Immunol., 7, 624-629.

DIAMANT, B. (1967)
The effect of compound 48/80 and distilled water on the adenosine triphosphate content of isolated rat mast cells.
Acta Physiol. Scand., 71, 283.

ECCLESTON, E., LEONARD, B.J., LOWE, J. & WELFORD, H. (1973)
Basophilic leukemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin.
Nature, 244, 73.

EHRLICH, P. (1877)
Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopichen Technik.
Arch. Mikr. Anat., 13, 263-277.

ERANKO, O. & JANSSON, S.E. (1967)
Uptake of monoamines by mouse peritoneal mast cells in vitro.
Acta physiol. scand., 70, 449.

FELDBERG, W. (1956)
Distribution of histamine in the body.
Ciba Foundation Symposium on histamine, London, 4-13.

FOREMAN, J.C., MONGAR, J.L. & GOMPERTS, J.D. (1973)
Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process.
Nature, 245, 249-251.

FURTH, J., HAGEN, P. & HIRSCH, E.I. (1957)
Transplantable mastocytoma in the mouse containing histamine, heparin, 5-hydroxytryptamine.
Proc. Soc. exp. Biol., 95, 824-828.

GARLAND, L.G. & MONGAR, J.L. (1976)
Differential histamine release by dextran and the ionophore A23187 : the action of inhibitors.
Int. Archs. Allergy appl. Immun., 50, 27.

GODFREY, R.C. (1975)
Asthma and IgE levels in rural and urban communities of the Gambia.
Clin. Allergy, 25, 201.

GOETZL, E.J., AUSTEN, K.F. (1975)
Purification and synthesis of eosinophilotactic tetrapeptides of human lung tissue : identification as eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis.
Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 4123.

GOETZL, E.J. & AUSTEN, K.F. (1977)
Cellular characteristics of the eosinophil compatible with a dual role in host defense in parasitic infections.
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 26, 142.

GROSSBERG, A.L. & GARCIA-AROCHA, H. (1954)
Histamine liberation in vitro and mode of binding histamine in tissues.
Science, 120, 762-763.

HAGEN, P. & LEE, F.L. (1958)
Aminoacid decarboxylases of mouse mast cells.
J. Physiol., 143, 7.

HALPER, J. & METZGER, H. (1976)
The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. VI - Inhibition by IgGa immune complexes.
Immunochemistry, 13, 907.

HARRIS, H.F. (1900)
Histology and microchemic reactions of some cells to anilin dyes-identity of the plasma cell and osteoblast-fibrous tissue a secretion of the plasma cells-mast cell elaborates murin of connective tissues.
Philad. Med., 5, 757-764.

HOGBERG, B. & UVNAS, B. (1957)
The mechanism of disruption of mast cells produced by compound 48/80.
Acta physiol. scand., 41, 345-369.

HOGBERG, B. & UVNAS, B. (1960)
Further observations on the disruption of rat mesentery mast cells caused by compound 48/80, antigen-antibody reaction, lecithinase A and decylamine.
Acta physiol. scand., 48, 133-145.

HSU, S.Y. & HSU, H.F. (1976)
The role of IgE in the mechanism of immunity to schistosome infection.
Fed. Proceed., 35, 752.

ISHIZAKA, K. & ISHIZAKA, T. (1968)
Induction of erythema-wheal reactions by soluble antigen-γ E antibody complexes in humans.
J. Immunol., 1968, 101, 68.

ISHIZAKA, K. & ISHIZAKA, T. (1969)
Immune mechanisms of reversed type reaginic hypersensitivity.
J. Immunol., 103, 588.

ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. & HORNBROOK, M.M. (1966)a
Physicochemical properties of human reaginic antibody. IV - Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity.
J. Immunol., 97, 75.

ISHIZAKA, K., ISHIZAKA, T. & HORNBROOK, M.M. (1966)b
Physicochemical properties of human reaginic antibody. V - Correlation of reaginic activity with γ E antibody.
J. Immunol., 97, 840.

ISHIZAKA, K., TOMIOKA, H. & ISHIZAKA, T. (1970)a
Mechanisms of passive sensitization. I - Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes.
J. Immunol., 105, 1459.

ISHIZAKA, T. (1976)
Functions and development of cell receptors for IgE in "Molecular and biological aspects of the acute allergic reaction". Proceedings 33rd Nobel Symposium, p 199

ISHIZAKA, T., CHANG, T.H., TAGGART, M. & ISHIZAKA, K. (1977)
Histamine release from mast cells by antibodies against rat basophilic leukemia cell membrane.
J. Immunol., 119, 1589.

ISHIZAKA, T. & ISHIZAKA, K. (1974)
Mechanisms of passive sensitization. IV - Dissociation of IgE molecules from basophil receptors at acid pH.
J. Immunol., 112, 1078.

ISHIZAKA, T., ISHIZAKA, K., BENNICH, H. & JOHANSSON, S.G.O. (1970b)
Biologic activities of aggregated immunoglobulin E.
J. Immunol., 104, 854.

ISHIZAKA, T., SOTO, C.S. & ISHIZAKA, K. (1973)
Mechanisms of passive sensitization. III. Number of IgE molecules and their receptor sites on human basophil granulocytes.
J. Immunol., 111, 500.

JANSSON, S.E. (1970)
Uptake of 5-hydroxytryptamine by rat peritoneal mast cells in vitro.
Acta physiol. scand., 79, 484.

JARRETT, E.E.E. & BAZIN, H. (1974)
Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection.
Nature, 251, 613.

JARRETT, E.E. & STEWART, D.C. (1972)
Potentiation of rat reaginic (IgE) antibody by helminth infection. Simultaneous potentiation of separate reagins.
Immunology, 23, 749.

JARRETT, E.E.E. & STEWART, D.C. (1974)
Effect of dose of antigen on primary and secondary reaginic antibody responses.
Immunology, 27, 365.

JOHNSON, A.R., MORAN, N.C. & MAYER, S.E. (1974)
Cyclic AMP content and histamine release in rat mast cells.
J. Immunol., 112, 511.

JORPES, J.E., HOLMGREN, H. & WILANDER, O. (1937)
Uber das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen
Z. mikr. anat. Forsch., 42, 279-300.

KALINER, M. (1977)
Human lung tissues and anaphylaxis. Evidence that cyclic nucleotides modulate the immunologic release of mediators through effects on microtubular assembly.
J. Clin. Invest., 60, 951-959.

KALINER, M., AUSTEN, K.F.(1973)
A sequence of biochemical events in the antigen- induced release of chemical mediators from sensitized human lung tissue
J. Exp. Med, 138, 1077

KALINER, M. & AUSTEN, K.F. (1974)
Cyclic AMP, ATP and reversed anaphylactic histamine release from rat mast cells.
J. Immunol., 112, 664.

KAY, A.B. & AUSTEN, K.F. (1971)
The IgE-mediated release of an eosinophil leukocyte chemotactic factor from human lung.
J. Immunol., 107, 899.

KELLER, R. (1961)
Zum mechanisms der mastzelldisruption.
Path. Microbiol., 24, 932-944.

KELLER, R. (1962)
Zur funktionellen Bedeutung der Gewebemastzellen.
Schweiz. med. Wschr., 92, 1638-1641.

KELLER, R. (1964a)
Zytolytische Aktivität von Lysolecithin.
Helv. physiol. pharmacol. Acta, a 122, C24-C26.

KELLER, R. (1964b)
Anaphylaxis in isolated rat mast cells. III - Localisation of the chymotrypsin type proesterase in heat-labile serum components.
Int. Arch. Allergy, 24, 255-277.

KELLER, R. (1966)
Tissue mast cells in immune reactions.
S. karger, New York.

KELLER,R. (1971)
Nippostrongylus brasiliensis in the rat: failure to relate intestinal histamine and mast cells with worm expulsion
Parasit., 63, 473

KELLER, R. & OGILVIE, B.M. (1972)
The effects of drugs on worm expulsion in the Nippostrongylus brasiliensis infected rat : a discussion of the interpretation of drug action.
Parasitol., 64, 217-227.

KELLY, J.D. & DINEEN, J.K. (1972)
The suppression of rejection of Nippostrongylus brasiliensis in the rat by promethazine hydrochloride. The site of immunological impairment.
Immunology, 22, 361-370.

KELLY, J.D. & OGILVIE, B.M. (1973)
Intestinal mast cells and eosinophil numbers during worm expulsion in milliparous and lactating rats infected with Nippostrongylus brasiliensis.
Int. Arch. Allergy, 43, 497-509.

KERP, L. & STEINHAUSER, G. (1961)
Uber einen ternaren Heparin- Metall- Histamin- Komplex
Klin. Wschr., 39, 762-764

KULCZYCKI, A.Jr., Mc NCARNEY, T.A. & PARKER, C.W. (1976)
The rat basophilic leukemia cell receptor for IgE. I - Characterization as a glycoprotein.
J. Immunol., 117, 661.

KULCZYCKI, A.Jr. & METZGER, H. (1974)
The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. II - Quantitative aspects of the binding reaction.
J. Exp. Med., 140, 1676.

LAGUNOFF,D. (1972)
The mechanism of histamine release from mast cells.
Biochem. Pharmacol., 21, 1889

LEID, R.W. (1977)
Immunity to the metacestode of Taenia taeniaeformis in the laboratory rat.
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 26, 142

BUS LILLE

LEHRER, S.B. (1977)
Role of mouse IgG and IgE homocytotropic antibodies in passive cutaneous anaphylaxis.
Immunology, 32, 507.

LEVINE, B.B. & REDMOND, A.P. (1968)
The nature of the antigen-antibody complexes initiating the specific wheal-and-flare reaction in sensitized man.
J. Clin. Invest., 47, 556.

LEWIS, R.A., GOETZL, E.J., WASSERMAN, S.I., VALONE, F.H., RUBIN, R.H. & AUSTEN, K.F. (1975)
The release of four mediators of immediate hypersensitivity from human leukemic basophils.
J. Immunol., 114, 87.

LEWIS, R.A., WASSERMAN, S.I., GOETZL, E.J. & AUSTEN, K.F. (1974)
Formation of SRS-A in human lung tissue and cells before release.
J. Exp. Med., 140, 1133.

MACKENZIE, C.D., RAMALHO-PINTO, F.J., McLAREN, D.J. & SMITHERS, S.R. (1977)
Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of Schistosoma mansoni in vitro.
Clin. Exp. Immunol., 30, 97.

Mc INTOSH, F.C., PATON, W.D.M. (1949)
The liberation of histamine by certain organic bases.
J. Physiol., 109, 190-217.

MENCIA-HUERTA, J.M., BENVENISTE, J. (1978)
Le facteur d'activation des plaquettes (PAF) libéré par les macrophages.
Réunion annuelle de la Société Française d'Immunologie, Clermont-Ferrand.

MENDOZA, G. & METZGER, H. (1976)
Distribution and valency of receptor for IgE on rodent mast cells and related tumour cells.
Nature, 264, 549.

MILLER, H.R.P., MURRAY, M. & JARRETT, W.F.H. (1968)
Globule leukocytes and mast cells.
Proceedings of the third international conference of the world association for the advancement of veterinary parasitology in "the reaction of the host to parasitism" E.J.L. Soulsby, Germany, p 198.

MORRISON, D.C., ROSER, J.F., HENSON, P.M. & COCHRANE, G. (1974)
Activation of rat mast cells by low molecular weight stimuli.
J. Immunol., 112, 573.

MORSE, H.C., AUSTEN, K.F. & BLOCK, K.J. (1969)
Biologic properties of rat antibodies. III - Histamine release mediated by two classes of antibodies.
J. Immunol., 102, 327.

MORSE, H.C., BEACH, K.J. & AUSTEN, K.F. (1968)
Biologic properties of rat antibodies. II - Time-course of appearance of antibodies involved in antigen-induced release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) ; association of this activity with rat IgGa.
J. Immunol., 101, 658.

MOTA, I. (1959)
Effect of antigen and octylamine on mast cells and histamine content of sensitized guinea-pig tissues.
J. Physiol., 147, 425-436.

MOTA, I. & DIAS DA SILVA (1960)
Antigen-induced damage to isolated sensitized mast cells.
Nature, 186, 245-246.

MULLER- EBERHARD, H.J.(1975)
Complement
Ann. Rev. Biochem., 44, 697

MURRAY, M., SMITH, W.D., WADDELL, A.H. & JARRETT, W.F.H. (1971)
Nippostrongylus brasiliensis : histamine and 5-hydroxytryptamine inhibition and worm expulsion.
Exp. Parasitol., 30, 59-63.

NUSSENWEIG, R.S., MERRYMAN, C. & BENACERAFF, B. (1964)
Electrophoretic separatin and properties of mouse anti-hapten antibodies involved in passive cutaneous anaphylaxis and passive hemolysis.
J. Exp. Med., 120, 315.

OGILVIE, B.M. (1967)
Reagin-like antibodies in rats infected with the nematode parasite Nippostrongylus brasiliensis.
Immunology, 12, 113-131.

OLIVER, J., BLOOM, F. & MANGIERI, C. (1947)
On the origin of heparin. An examination of the heparin contact and the specific cytoplasmic particles of neoplastic mast cells.
J.exp. Med., 86, 107-116.

ORANGE,R.P., MURPHY, R.C. & AUSTEN, K.F. (1974)
Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by arylsulfatases.
J. Immunol., 113, 316.

ORANGE, R.P., MURPHY, R.C., KARNOVSKY, M.L. & AUSTEN, K.F. (1973)
The physicochemical characteristics and purification of slow reading substance of anaphylaxis.
J. Immunol., 110, 760.

ORANGE,R.P., STECHSCHULTTE, D.J. & AUSTEN, K.F. (1970)
Immunochemical and biologic properties of rat IgE. II - Capacity to mediate the immunologic release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis.
J. Immunol., 105, 1087.

ORR, T.S. & BLAIR, A.M. (1969)
Potentiated reagin response to egg albumin and conalbumin in Nippostrongylus brasiliensis infected rats.
Life Sci., 8, 1073.

OTTOLENGHI, A. (1970)
The relationship between eosinophilic leukocytes and phospholipase B activity in some rat tissue.
Lipids, 5, 531-538.

OVARY, Z. (1958)
Immediate reactions of the skin of experimantal animals provoked by antigen-antibody interaction.
Prog. Allergy, 5, 459.

PATON,W.D.M. (1958)
The release of histamine.
Progr. Allergy, 5, 79-148.

PERELMUTTER, L. & LIAKOPOULOU, A. (1971)
Detection of IgE mediated hypersensitivity reactions in the sera of raqweed sensitive individuals using rat mast cells.
Int. Arch. Allergy, 40, 481.

PESKAR, B. & SPECTOR, S. (1973)
Serotonin : radioimmunoassay.
Science, 179, 1340-1341.

PETERSSON, B.A., NILSSON, A.& STALENHEIM, G. (1975)
Induction of histamine release and désensitization in human leucocytes. Effect of anaphylatoxin.
J. Immunol., 114, 1581

PICKART, L., THAYER, L., THALER, M.M. (1973)
A synthetic tripeptide which increases survival of normal liver cells, and stimulates growth in hepatoma cells.
Biochem. biophys. res. commun., 54, 562.

PORTIER, P. & RICHET, C. (1902)
De l'action anaphylactique de certains venins.
C.R. Soc. Biol., 54, 170-172.

PRAUSNITZ, C. & KUSTNER, H. (1921)
Studien über die Uberempfindlichkeit.
Zbl. Bakt., 86, 160.

RILEY, J.F. (1953)
The relationship of the tissue mast cells to the blood vessels in the rat.
J. Path. Bact., 65, 471-479.

RILEY, J.F. (1959)
The mast cells
Livingstone, Edinburgh.

ROTHWELL, T.L.W., DINEEN, J.K. & LOVE, R.J. (1971)
The role of pharmacogically active amines in resistance to Trichostrongylus colubriformis in the guinea pig.
Immunology, 21, 925-938.

ROTHWELL, T.L.W., PRICHARD, R.K. & LOVE, R.J. (1974)
Studies on the role of histamine and 5-hydroxytryptamine in immunity against the nematode Trichostrongylus colubriformis.
Int. Arch. Allergy, 46, 1-13.

SCHAYER, R.W. (1956)
Formation and binding of histamine by free mast cells of rat peritoneal fluid.
Amer. J. Physiol., 186, 199-202.

SCHLESSINGER, J., WEBB, W.W., ELSON, E.L. & METZGER, H. (1976)
Lateral notion and valence of Fc receptors on rat peritoneal mast cells.
Nature, 264, 550.

SEEGERS, W., JANOFF, A. (1966)
Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. VI. partial purification and characterisation of a mast-cell rupturing component.
J. Exp. Med., 124, 833-849

SHER,A. (1976)
Complement-dependance adherence of mast cells to schistosomula.
Nature, 263, 336.

SINGER, S.J. & NICOLSON, G.L. (1972)
The fluid mosaic model of the structure of cell membrane.
Science, 175, 720.

SIRAGANIAN, R.P., HOOK, W.A. & LEVINE, B.B. (1975)
Histamine release from basophils. Activation by bivalent haptens.
Immunochemistry, 12, 149.

SIRAGANIAN, R.P. & OSLER, A.G.(1971)
Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I - Evidence of basophil involvement.
J. Immunol., 106, 1252.

SJOERDSMA, A., WAALKES, T.P. & WEISSBACH, H. (1957)
Serotonin and histamine in mast cells.
Science, 125, 1202-1203.

SHORE, P.A., BURKHALTER, A. & COHN, V.H. (1959)
A method for the fluorometric assay of histamine in tissues.
J. Pharmac. Exp. Ther., 127, 182-186.

SNYDER, S.H., AXELROD, J. & ZWEIG, M. (1965)
A sensitive and specific fluorescence assay for tissue serotonin.
Biochem. Pharmacol., 14, 831.

SOUZA, C.M., MARIA, S. & VAZ, N.M. (1974)
Susceptibility to cutaneous anaphylaxis in inbred strains of mice.
J. Immunol., 112, 1369.

STAMMLER, M. (1921)
Untersuchung über Vorkommen und Bedentung der histiogenen Mastzellen in menschlichenkörjer unter normalen und pathologischen Verhälmissen
Frankf. Z. Path., 25, 391-435.

STANWORTH, D.R. & SMITH, A.K. (1973)
Inhibition of reagin-mediated PCA reaction in baboons by the human IgG4 subclass.
Clin. Allergy, 3, 37-41.

SULLIVAN, A.L., GRIMLEY, P.M. & METZGER, H. (1971)
Electron microscopic localisation of immunoglobulin E on the surface membrane of human basophils.
J. Exp. Med., 134, 1403.

SULLIVAN, T.J., PARKER, K.L., EISEN, S.A. & PARKER, W. (1975)
Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. II - Studies on the relationship between intracellular cyclic AMP concentrations and histamine release.
J. Immunol., 114, 1480.

TAUBER, A.I., GOETZL, E.J. & BABIOR, B. (1976)
The production of superoxyde (O_2^-) by human eosinophils.
Blood, 48, 968A.

TULLIS, D.C.H. (1970)
Bronchial asthma associated with intestinal parasites.
New Eng. J. Med., 282, 370.

TURNBULL, L.W., EVANS, D.P. & KAY, A.B. (1977)
Human eosinophils, acidic tetrapeptides (ECF-A) and histamine.
Immunology, 32, 57.

TURNER, K.J., BALDO, B.A. & ANDERSON, H.R. (1975)
Asthma in the Highlands of New Guinea. Total IgE levels and incidence of IgE antibodies to house dust mite and Ascaris lumbricoïdes.
Int. Arch. Allergy appl. Immunol., 48, 784.

TURNER, K.J., QUINN, E.H., ANDERSON, H.R. (1978)
Regulation of asthma by intestinal parasites. Investigation of possible mechanisms.
Immunology, 35, 28

URQUHART, G.M., MULLIGAN, W., EADIE, R.M. & JENNINGS, F.W. (1965)
Immunological studies on Nippostrongylus brasiliensis infection in the rat. The role of local anaphylaxis.
Exp. Parasit., 17, 210-217.

UVNAS, B. (1961)
Mechanism of histamine release from mast cells.
Chemotherapia, 3, 137-149.

UVNAS, B. (1964)
Release processes in mast cells and their activation by injury.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 116, 880-890.

UVNAS, B. & THON, I.L. (1959)
Isolation of "biologically intact" mast cells.
Exp. Cell. Res., 18, 512-520.

UVNAS, B. & WOLD, J.K. (1967)
Isolation of a mast cell degranulating polypeptide from Ascaris suis.
Acta physiol. scand., 70, 269-276.

VAN DELLEN,R.G. & THOMPSON, J.H. (1971)
Absence of intestinal parasites in asthma.
New Eng. J. Med., 285, 146.

WASSERMAN, S.I., GOETZL, E.J. & AUSTEN, K.F. (1974)
Preformed eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A)
J. Immunol., 112, 351.

WASSERMAN, S.I., VHITNER, D., GOETZL, E. & AUSTEN, K.F. (1975)
Chemotactic deactivation of human eosinophils by the eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med.. 148, 301-306

WEBER, T.B. & RUBIN, R. (1958)
The eosinophilic response to infection with cattle lung worm, Dictyocaulus viviparus.
J. Infect. Dis., 102, 214-218.

WECK, A.L. de & SCHNEIDER, C.H. (1972)
Specific inhibition of allergic reactions to penicillin in man by a monovalent hapten. I - Experimental immunological and toxicologic studies.
Int. Archs. Allergy app. Immun., 42, 782.

WELLS, P.D. (1962)
Mast cell, eosinophil and histamine levels in Nippostrongylus brasiliensis infected rats.
Exp. Parasit., 12, 82-101.

WELSH,R.A., GEER, J.C. (1959)
Phagocytosis of mast cell granule by the eosinophilic leukocyte in the rat.
Amer. J.Path, 35, 103-111

WEST, G.B. (1955)
Histamine in mast-cell granules.
J. Pharm. Pharmacol., 7, 80.

WHUR, P. (1966)
Relationship of globule leukocytes to gastro-intestinal nematodes in the sheep and Nippostrongylus brasiliensis and Hymenolepis nana infections in rats.
J. comp. Path., 76, 57-65.

WHUR, P. (1967)
Globule leukocyte response in hyperimmune rats infected with Nippostrongylus brasiliensis.
J. Comp. Path., 77, 271-277.

YURT, R.W., LEID, R.W., SPRAGG, J., AUSTEN, K.F. (1977)
Immunologic release of heparin from purified peritoneal mast cells.
J. Immunol., 118, 1201.