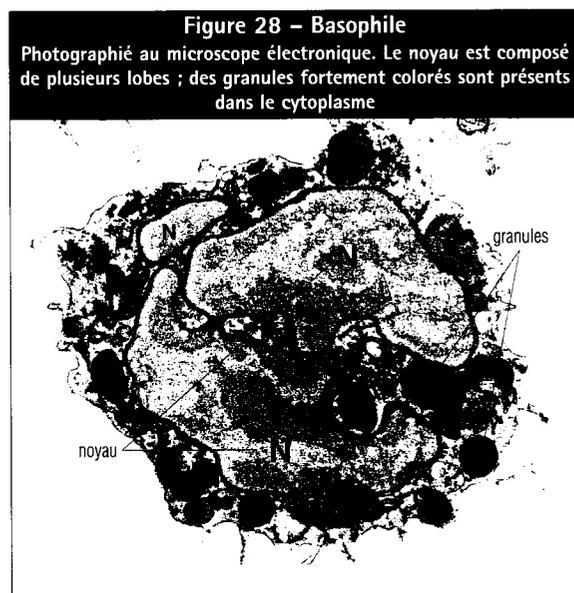


Activité de dilutions d'histamine sur la dégranulation des basophiles

Les basophiles sont des cellules sanguines polynucléaires caractérisées par leurs granules cytoplasmiques contenant de nombreux médiateurs préformés, dont l'histamine, et ayant une affinité pour les colorants basiques [voir figure 28]. Outre leur implication dans la réaction d'hypersensibilité immédiate, le rôle pro-inflammatoire majeur des basophiles est aujourd'hui clairement démontré.



L'hypersensibilité immédiate est une réaction normale de défense de l'organisme, devenant pathologique lorsque ses mécanismes de régulation sont dépassés. Elle est médiée par les immunoglobulines E, anticorps de faible concentration qui ont une haute affinité pour des récepteurs présents sur la membrane plasmique de nombreuses cellules parmi lesquelles les éosinophiles, les cellules de Langerhans, les mastocytes et les basophiles.

Les principales étapes de l'activation de basophiles sont les suivantes [voir figure 29] :

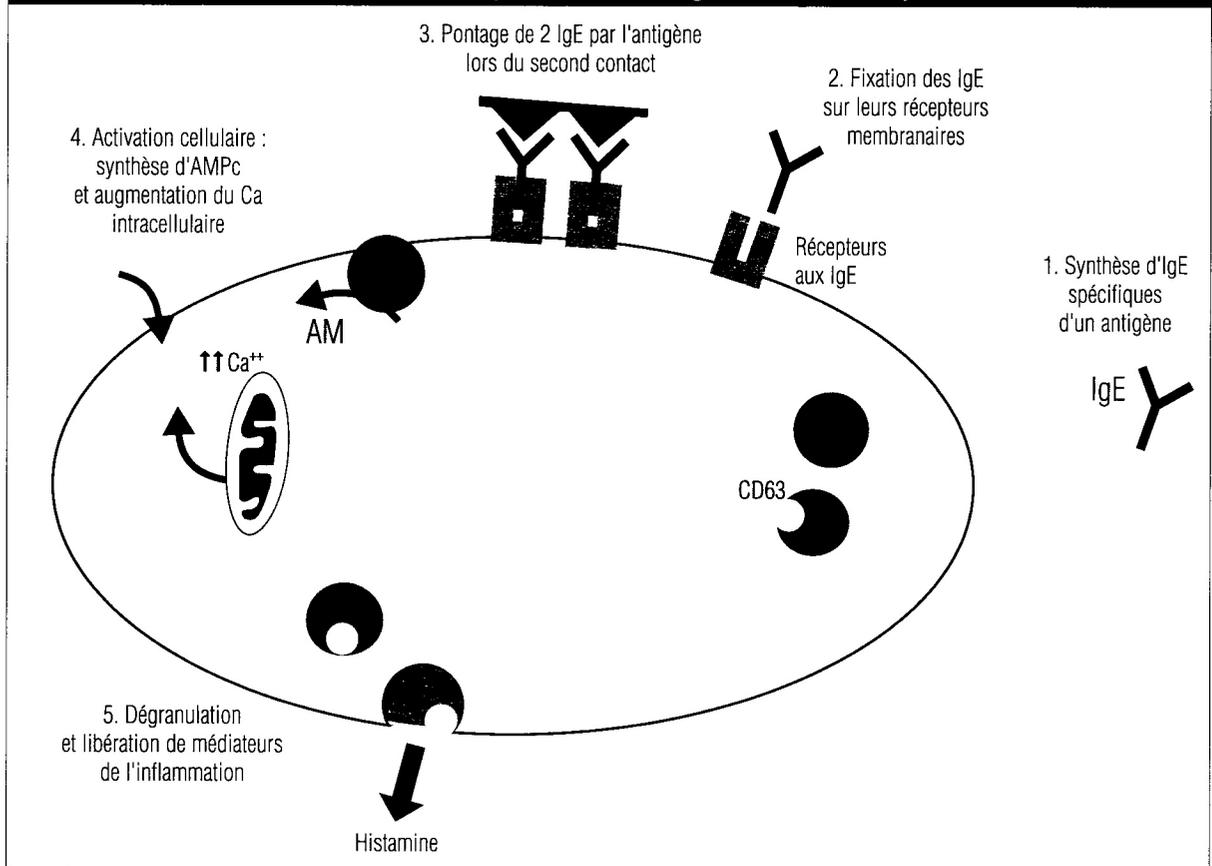
1. Des IgE spécifiques sont synthétisées à la suite d'un premier contact avec l'antigène.
2. Grâce à leur haute affinité, elles se fixent aux récepteurs présents sur la membrane des basophiles.
3. Lors du second contact avec le même antigène, celui-ci peut se lier à plusieurs molécules d'IgE fixées sur leurs récepteurs.
4. L'agrégation des récepteurs induit leur modification structurale et l'activation des basophiles via une cascade de médiateurs intracellulaires : synthèse d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol.
5. Il en résulte une migration des granules et la fusion avec la membrane plasmique. Cette dégranulation conduit à la libération des médiateurs initialement présents dans les granules (en particulier l'histamine). L'activation cellulaire induit également la synthèse de médiateurs néo-formés (comme les peptido-leucotriènes).

La réaction d'hypersensibilité immédiate est soumise, *in vivo*, à des mécanismes de régulation très complexes. Citons le rétro-contrôle négatif de la libération de l'histamine induit par elle-même et par de nombreux agonistes via les récepteurs H_2 présents sur la membrane du basophile.

L'intérêt de l'étude des basophiles est multiple :

- Il s'agit d'un matériel d'origine humaine, relativement facile à obtenir par simple prélèvement sanguin. Il est aujourd'hui admis que la réactivité *in vitro* du basophile est un bon reflet du status immun de l'allergique.

Figure 29 – Schéma représentatif de la dégranulation des basophiles



- Ce modèle expérimental est très reproductible et permet de réaliser un grand nombre d'expériences.

- Il rend possible l'investigation des principes de l'homéopathie. L'infinimentesimal peut être facilement abordé en mettant les cellules en contact avec des souches homéopathiques diluées à volonté. La similitude peut être étudiée en utilisant des souches correspondant aux allergènes responsables de l'hypersensibilité ou aux médiateurs de l'allergie.

L'activation des basophiles peut être étudiée expérimentalement à l'aide de plusieurs techniques ; trois d'entre elles ont été utilisées dans les études présentées ici :

1. Le dosage de l'histamine libérée dans le milieu extracellulaire (nous parlerons du test d'histaminolibération).

2. La coloration : lorsqu'ils sont activés, les basophiles perdent leur affinité pour les colorants basiques, du type bleu de toluidine ou bleu alcian (nous parlerons de test de dégranulation des basophiles).

3. L'expression de marqueurs membranaires : l'exocytose des granules s'accompagne de l'augmentation de l'expression de marqueurs (comme le CD63, initialement présent à l'intérieur des granules et quasi absent de la membrane du basophile au repos).

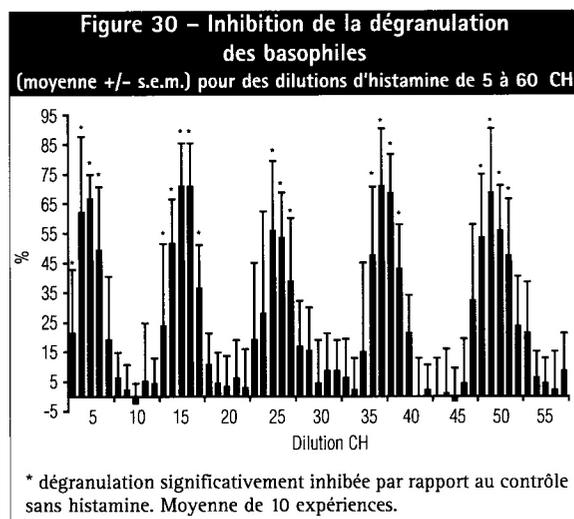
Nous parlerons de test d'activation des basophiles.

Depuis maintenant plus de vingt ans, une, puis plusieurs équipes de chercheurs étudient l'action de dilutions infinitésimales d'histamine sur la dégranulation des basophiles. De nombreux résultats ont été obtenus ; les principales données issues des études publiées sont présentées ici.

Effet de dilutions d'histamine sur le test de dégranulation des basophiles

Méthodes

Des basophiles humains, isolés à partir de prélèvements sanguins, sont passivement sensibilisés à un allergène donné (ici l'acarien *Dermatophagoïdes pteronyssinus*) par incubation en présence de plasma riche en IgE spécifiques prélevé chez des sujets allergiques aux acariens. Les cellules sont ensuite incubées en présence des dilutions d'histamine à étudier. La dégranulation est induite par addition d'une concentration optimale de l'allergène dans le milieu réactionnel. Les basophiles sont finalement colorés par le bleu alcian ; seules les cellules n'ayant pas réagi à l'allergène se colorent puisque les granules des cellules activées ont perdu leur affinité tinctoriale. Le pourcentage de basophiles activés est calculé par rapport à un témoin sans allergène ; le pourcentage d'inhibition par comparaison de deux tests de dégranulation avec ou sans dilution d'histamine.



Résultats

Une gamme très large de dilutions d'histamine est étudiée (5 à 60 CH). Il apparaît que certaines d'entre elles réduisent significativement la dégranulation des basophiles alors que d'autres sont inefficaces [voir figure 30]³. Cet effet est spécifique puisqu'il n'est pas retrouvé avec des dilutions d'histidine, chimiquement proche de l'histamine mais ne possédant pas ses propriétés pharmacologiques⁹. Ces données confirment des résultats préliminaires similaires¹ ; leur régularité lors de la reproduction en grandes séries a permis une modélisation mathématique de cet effet².

Confirmation de l'effet de dilutions d'histamine sur le test de dégranulation par une étude multicentrique

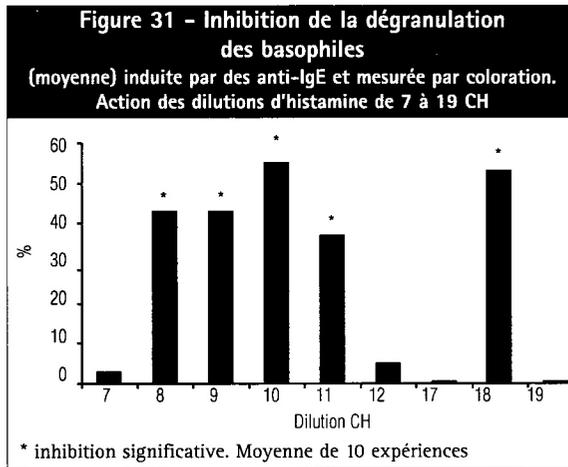
Méthodes

L'activation des basophiles peut être provoquée par l'allergène spécifique, comme pour les expériences précédentes, mais peut également être induite par des stimuli non spécifiques tels que des anticorps anti-IgE. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de phase de sensibilisation passive.

Ces études ont été conduites en deux étapes :

1. Vérification de l'activité biologique inhibitrice des dilutions d'histamine sur la dégranulation des basophiles induite par un anti-IgE [voir figure 31]⁴.
2. Réalisation d'une étude européenne multicentrique : cette étude avait pour but de confirmer la reproductibilité de l'effet observé dans différents laboratoires avec plusieurs expérimentateurs. Ceci paraît particulièrement intéressant dans le cas de l'étude des dilutions homéopathiques dont l'effet reste encore très controversé. Les tests sont réalisés, en aveugle, dans quatre laboratoires différents.

Le contrôle de l'étude ainsi que la préparation des dilutions sont effectués dans un cinquième laboratoire. Enfin, l'analyse statistique est réalisée par un statisticien indépendant. Des dilutions d'histamine (15, 16, 17, 18 et 19 CH) sont étudiées comparativement aux dilutions correspondantes d'eau distillée.



Résultats

Sur l'ensemble des données recueillies par les quatre laboratoires (3 906 mesures !), les dilutions d'histamine inhibent significativement la dégranulation des basophiles par rapport à un témoin H₂O ($p \leq 0,0001$).

Cette étude multicentrique menée en aveugle confirme les résultats du premier laboratoire^{8,10}.

Confirmation par des techniques différentes

Test d'activation des basophiles (expression du CD63)

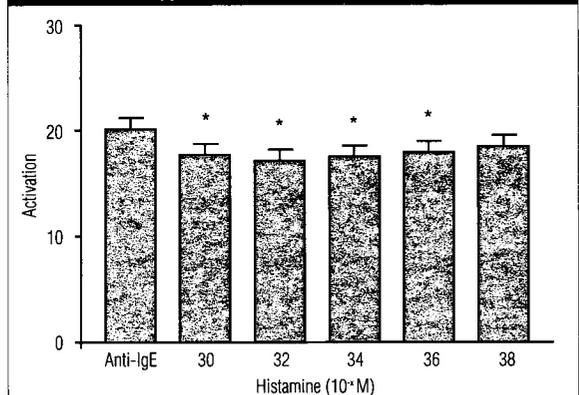
Méthodes

Une méthode automatisée a été mise au point au début des années 1990, fondée sur l'analyse par cytométrie* en flux⁷. Le rapport de cellules exprimant le CD63 dans les lots contrôles et traités permet de calculer le pourcentage d'inhibition de l'activation.

Résultats

L'étude de l'inhibition de l'activation des basophiles par des dilutions d'histamine montre que cette inhibition est significative pour les dilutions allant de 15 à 18 CH (moyenne de 36 expériences)⁵ [voir figure 32].

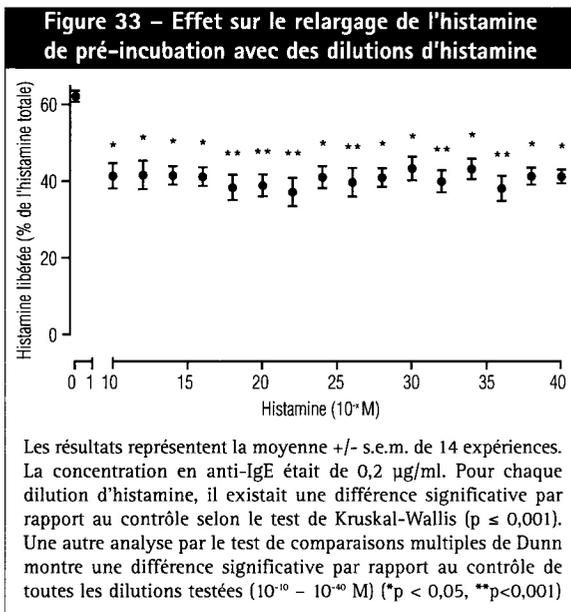
Figure 32 - Pourcentage d'activation des basophiles après incubation avec l'anti-IgE et en absence ou en présence de différentes dilutions d'histamine (les chiffres se rapportent aux concentrations molaires théoriques)



Les données représentent la moyenne de 36 expériences réalisées trois fois chacune. L'activation des basophiles a été déterminée par la mesure du pourcentage de cellules exprimant le CD63 en cytométrie de flux. Toutes les dilutions testées, à l'exception de 10⁻³⁸ M, sont significativement différentes du contrôle d'après le test de Wilcoxon ($p < 0,01$)

Test d'histamino-libération

Un dosage de l'histamine libérée après dégranulation des basophiles est réalisé dans le milieu extra-cellulaire. Ceci a permis de confirmer, par une troisième technique, que des dilutions d'histamine diminuaient l'activation des basophiles [voir figure 33]¹⁰.



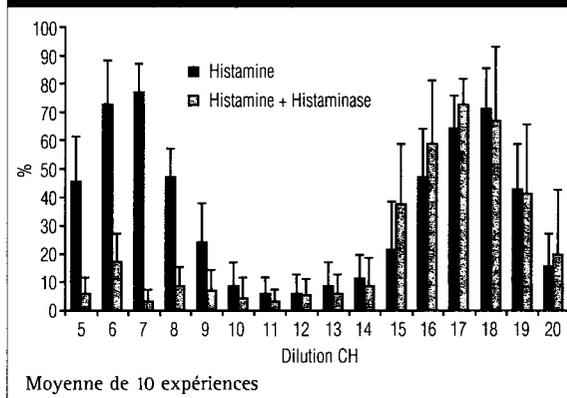
Modulations de l'action de l'histamine

A l'aide des différentes techniques décrites ci-dessus, il a été possible d'étudier la modulation pharmacologique des dilutions d'histamine.

Action de l'histaminase

L'histaminase est une enzyme susceptible de lyser l'histamine. La technique de coloration des basophiles a permis de montrer que l'histaminase, à concentration pharmacologique, inhibe l'action de l'histamine à forte concentration (5 à 8 CH) mais pas celle des hautes dilutions d'histamine [voir figure 34]³.

Figure 34 – Inhibition de la dégranulation des basophiles (moyenne +/- s.e.m.) mesurée par coloration, pour des dilutions d'histamine de 5 à 20 CH, en présence et en absence de cimétidine

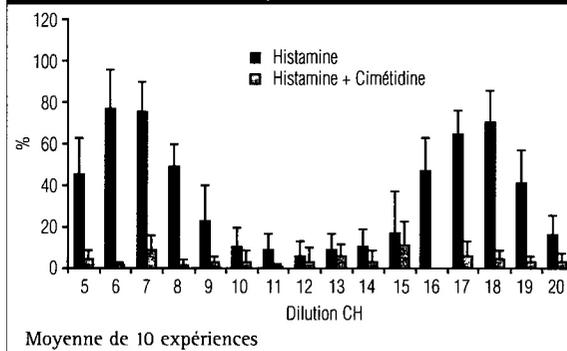


Action d'antagonistes des récepteurs H₂ à l'histamine

a) par test de dégranulation des basophiles

A concentration pharmacologique, l'histamine exerce un rétrocontrôle, sur sa propre libération, via les récepteurs H₂. Des études réalisées par coloration des basophiles [voir figure 35]³.

Figure 35 – Inhibition de la dégranulation des basophiles par l'histamine (moyenne +/- s.e.m.) mesurée par coloration, pour des dilutions d'histamine de 5 à 20 CH, en présence et en absence d'histaminase



b) par test d'activation des basophiles

Des résultats similaires ont été obtenus pour les hautes dilutions puisque leur action est en partie inhibée par un antagoniste H_2 , la cimétidine [voir figure 36]⁶ et ont montré des résultats similaires pour les hautes dilutions puisque leur action est en partie inhibée par un antagoniste H_2 ,

- par un laboratoire avec la cimétidine ;
- par un autre laboratoire avec la cimétidine et la ranitidine [voir tableau 7].

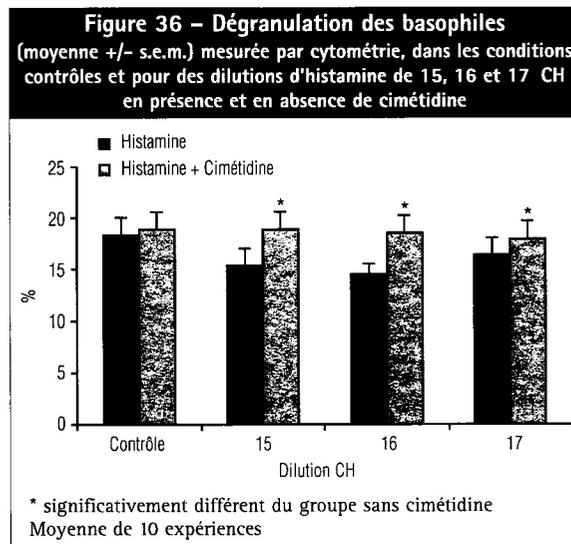


Tableau 7 – Comparaison du pourcentage de dégranulation en présence et en absence de dilutions d'histamine
(moyenne +/- s.e.m.) pour un nombre de mesures n dans les 4 laboratoires. La dégranulation est induite par 0,04 $\mu\text{g/ml}$ d'anti-IgE

	Tous contrôles	Toutes dilutions d'histamine
Laboratoire 1 (n=54)	46,2 ± 0,96	34,1 ± 2,5 *
Laboratoire 2 (n=156)	50,3 ± 0,82	47,8 ± 2,42
Laboratoire 3 (n=93)	51,3 ± 0,94	47,3 ± 1,46 *
Laboratoire 4 (n=75)	46,4 ± 1,29	37,4 ± 2,14 *

* significativement différent du contrôle correspondant

Bibliographie

(par ordre chronologique)

- 1 – Sainte-Laudy J., Belon P., Halpern G., Homeopathy. Effect of histaminum on “in vitro” basophil degranulation, *Abstract of XI ICACI*, London, 1982 ; 338 p.
- 2 – Cherruault Y., Guillez A., Sainte-Laudy J., Belon P., Étude mathématique et statistique des effets de dilutions successives de chlorhydrate d’histamine sur la réactivité des basophiles humains, *Bio-sciences*, 1989 ; 7 : 63-72.
- 3 – Sainte-Laudy J., Sambucy J.L., Belon P., Biological activity of ultra low doses : I / Effects of ultra low doses of histamine on human basophil degranulation triggered by *D. pteronissinus* extract, In *Ultra Low Doses*, Taylor & Francis Ltd., 1991 ; 127-138.
- 4 – Sainte-Laudy J., Belon P., Inhibition of human basophils activation by high dilutions of histamine, *Agents Actions*, 1993 ; 38 : C245-7.
- 5 – Sainte-Laudy J., Belon P., Analysis of immunosuppressive activity of serial dilutions of histamine on human basophil activation by flow cytometry, *Inflammation Research*, 1996 ; 45 : S33-S34.
- 6 – Sainte-Laudy J., Belon P., Application of flow cytometry to the analysis of the immunosuppressive effects of histamine dilutions on human basophil activation : effects of cimetidine, *Inflammation Research*, 1997 ; 46 : S27-S28.
- 7 – Sainte-Laudy J., Sabbah A., Vallon C., Guerin J.C., Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry, Comparison with histamine release, *Inflammation Research*, 1998 ; 47(10) : 401-8.
- 8 – Belon P., Cumps J., Ennis M., Mannaioni P.F., Sainte-Laudy J., Roberfroid M. et Wiegant F.A.C., Inhibition of human basophil degranulation by successive histamine dilutions : results of a european multicentre trial, *Inflammation Research*, 1999 ; 48 : S17-S18.
- 9 – Sainte-Laudy J., Modulation of allergen and anti-IgE induced human basophil activation by serial histamine dilutions, *Inflammation Research*, 2000 ; 49 : S5-S6.
- 10 – Belon P., Cumps J., Ennis M., Mannaioni P.F., Roberfroid M., Sainte-Laudy J., Wiegant F.A.C., Histamine dilutions modulate basophil activation, *Inflammation Research*, 2004 ; 53 : 001-08.