MASTOCYTES ET ÉOSINOPHILES DE LA MUQUEUSE RESPIRATOIRE DU MOUTON INFESTÉ PAR *OESTRUS OVIS* (LINNÉ, 1761)

NGUYEN VAN-KHANH*, BOURGES N.*, CONCORDET D.** & DORCHIES P.*

Summary : MAST CELLS AND EOSINOPHILS IN UPPER RESPIRATORY MUCOSA OF SHEEP INFECTED WITH *OESTRUS OVIS* (LINNÉ, 1761) LARVAE

Mast cells and eosinophils have been identified by differential stainings and counted in mucous membrane of nasal septum, turbinates and sinus of 77 ewes naturally infected with *Oestrus ovis*. Results have been compared with those of nine parasite free lambs.

Anova tests indicate significant differences between infected and parasite-free sheep for the cell numbers and their distribution among the septum, the turbinates and the sinus and according to their position in mucous membrane, interglandular chorion or sub-mucosa.

In infected sheep, the mean number of mast cells is twice the number present in parasite free animals. The burdens of eosinophils are multiplied by 17 for the septum, 29 for the turbinates and 58 for the sinus.

The hypothesis of the development of an hypersensitivity phenomenon in ovine oestrosis is sustained by these results.

KEY WORDS : *Oestrus ovis*, mast cells, eosinophils, sheep.

MOTS CLÉS : *Oestrus ovis*, mastocytes, éosinophiles, mouton.

Résumé :

La recherche et le dénombrement des mastocytes et des éosinophiles dans les muqueuses respiratoires des sinus, du septum nasal et des cornets ont été faits chez 77 moutons infestés naturellement par *Oestrus ovis*. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus sur neuf agneaux indemnes de parasites car tous les adultes dans la région sont exposés au risque d'infestation.

L'exploitation statistique des valeurs montre qu'il y a des différences très fortement significatives entre infestés et indemnes en ce qui concerne le nombre de cellules réactionnelles et leur distribution dans les sites anatomiques (septum, cornets, sinus) et les localisations histologiques (muqueuse, chorion interglandulaire et sous-muqueuse).

Les populations cellulaires étaient beaucoup plus nombreuses dans le chorion sous-épithélial que dans les parties plus profondes de la muqueuse, chorion interglandulaire et sous-muqueuse.

Le recrutement des mastocytes est doublé par rapport à ce qui est observé chez les sujets indemnes, le nombre d'éosinophiles par unité de surface est environ multiplié par 17 au niveau du septum nasal, 29 dans la muqueuse des cornets et 58 dans les sinus où se font les mues L1-L2 et L2-L3.

Ces observations sont en faveur de l'hypothèse de la participation d'un phénomène d'hypersensibilité dans la pathogénie de l'œstrose.

L'œstrose est une myiase naso-sinusale des petits ruminants causée par les larves d'un Diptère parasite obligatoire : *Oestrus ovis*. Cette infestation est fréquente et répandue dans les pays où l'élevage est important, elle se traduit par du jetage, des éternuements et de la sinusite.

Ce travail a été entrepris pour explorer l'hypothèse de la participation d'un phénomène d'hypersensibilité dans le développement des symptômes et des lésions de l'œstrose. Chez les sujets exposés à des infestations naturelles répétées, la forte congestion et l'inflammation de la muqueuse des cavités nasales, de l'ethmoïde et des sinus ne sont pas toujours associées à un grand nombre de larves. Cela évoque un processus immunitaire en particulier une hypersensibilité immédiate

(Dorchies *et al.*, 1994) comme dans les myiases cutanées à *Lucilia cuprina* (MacDiarmid *et al.*, 1995). Ces manifestations sont peut-être celles d'un phénomène d'auto-guérison comme il en existe pour les nématodes gastro-intestinaux. Si c'est le cas dans l'œstrose, trois éléments doivent y être associés : les mastocytes, les éosinophiles et les IgE.

L'objectif de cette recherche a été de confirmer l'existence des mastocytes et des éosinophiles dans la muqueuse pituitaire de brebis exposées à une infestation naturelle non contrôlée par *Oestrus ovis* et de les quantifier par rapport à des témoins indemnes de parasites pour soutenir l'hypothèse pathogénique de l'hypersensibilité immédiate.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

ANIMAUX

Cette étude a été réalisée entre novembre 1994 et juin 1995 sur 77 têtes de brebis de race locale, âgées de 2 à 6 ans, naturellement infes-

* Laboratoire associé INRA de physiopathologie respiratoire des ruminants,

** Département des Sciences biologiques et fonctionnelles, École Nationale Vétérinaire, 23, Chemin des Capelles, F-31076 Toulouse Cedex.

Correspondance : Pr. Ph. Dorchies.
Tél. : 61-19-38-71 - Fax : 61-19-39-44.

tées par *Cestrus ovis* au cours de leur vie au pâturage, et sur neuf têtes d'agneaux, âgés de 3 à 4 mois, nés et élevés à l'intérieur et donc non infestés. Après fente longitudinale de la tête, les larves ont été recherchées selon le protocole décrit par Yilma *et al.* (1991).

PRÉLÈVEMENTS HISTOLOGIQUES

Les prélèvements de muqueuse respiratoire ont été faits dans trois sites anatomiques différents : septum, cornets et sinus frontal. Pour chacun, deux échantillons d'environ 1 cm² ont été réalisés côte à côte toujours dans la même zone durant l'étude.

Un prélèvement a été fixé dans du formol à 10 % (pour la recherche des éosinophiles), et son homologue dans du fixateur Carnoy (pour l'identification des mastocytes).

EXAMEN HISTOLOGIQUE

Après inclusion en paraffine, les coupes de 2 µm ont subi l'une des trois colorations suivantes :

- May-Grünwald-Giemsa : coloration panoptique pour les éosinophiles sur les prélèvements fixés au formol; sur les prélèvements fixés au Carnoy deux autres colorations ont été faites :
- Bleu de Toluidine : pour les mastocytes de type séreux,
- Bleu Alcian-Safranine : pour les mastocytes de type muqueux.

Dans chaque site anatomique, les dénombrements ont été faits au microscope photonique (Objectif × 50 à immersion) dans trois zones bien définies : chorion sous-épithélial, chorion inter-glandulaire et sous-muqueuse. Sur chaque coupe, dix champs optiques ont été examinés pour chaque zone, et donc, au total pour chaque coupe, 30 champs optiques ont été étudiés.

MÉTHODE STATISTIQUE

Une transformation de la forme $\text{Ln}(1 + x)$ a été effectuée sur les comptages bruts des différents types cellulaires, x étant le total des comptages de 10 champs optiques pour chaque zone. Les résultats ont été soumis à une analyse de variance à trois facteurs : le statut parasitologique (animal parasité ou indemne), le site anatomique et la localisation histologique.

RÉSULTATS

POPULATIONS PARASITAIRES

Des larves d'*Oestrus ovis* ont été trouvées chez toutes les brebis. La moyenne globale a été de 12,2 larves par animal avec 85,2 % de L1, 9,1 % de L2 et 4,9 % de L3. Aucune larve et aucune lésion attribuable à l'œstrose n'ont été observées chez les témoins.

POPULATIONS DE MASTOCYTES ET D'ÉOSINOPHILES

Les résultats ont été exploités en tenant compte :

- du type cellulaire identifié : mastocyte séreux coloré au bleu de toluidine, mastocyte muqueux coloré au bleu alcian ou éosinophile;
- du site anatomique des prélèvements : sinus, septum et cornets nasaux,
- de la localisation histologique des cellules étudiées : chorion sous-épithélial, chorion interglandulaire et sous-muqueuse;
- du « statut parasitologique » de l'animal : indemne ou parasité.

Le tableau I récapitule les moyennes des totaux cellulaires dénombrés dans chaque site anatomique (total

	Mastocytes séreux		Mastocytes muqueux		Éosinophiles	
	Témoins	Parasités	Témoins	Parasités	Témoins	Parasités
Sinus						
Moyenne	20,8	52,5	39,6	79	2,3	134,6
SD	4,8	6,3	9,2	9	2,3	55
Médiane	20	53,6	41	76,8	2	134,7
Cornets						
Moyenne	17,9	49,4	31	70,9	2,8	83,1
SD	4,9	5,2	6,5	10	2	21,6
Médiane	19	49,1	30	69,4	2	83,7
Septum						
Moyenne	15,1	41,2	31,1	60	2,9	50,9
SD	4,9	5,7	6,3	8,4	2,8	14,9
Médiane	15	42,8	32	59,4	2	54

Tableau I. — Récapitulation des moyennes des résultats exprimés par le nombre total de cellules comptées sur 30 champs microscopiques : dix par localisation histologique.

des comptages sur dix champs par localisation histologique). La figure 1 compare les populations cellulaires des différents sites.

Les analyses de variance révèlent que les pourcentages de dispersion non expliqués sont de 30 % pour les mastocytes muqueux, 25 % pour les mastocytes séreux et 46 % pour les éosinophiles.

Pour tous les types cellulaires, les différences sont très fortement significatives entre les agneaux témoins indemnes et les brebis infestées ($p < 0,001$).

Les différences sont aussi très fortement significatives en ce qui concerne la distribution des mastocytes muqueux et séreux selon les sites anatomiques ($p < 0,001$) et les localisations histologiques ($p < 0,001$). Par rapport aux témoins, les mastocytes séreux et muqueux sont respectivement 2,5 et 1,99 fois plus nombreux dans les sinus (où se font les mues), 2,75 et 2,3 dans les cornets et 2,7 et 1,85 dans le septum. Ils sont aussi toujours plus nombreux dans le chorion sous-épithélial que dans le chorion interglandulaire et la sous-muqueuse.

Pour les éosinophiles, la distribution montre aussi des différences très fortement significatives en ce qui concerne les sites anatomiques ($p < 0,01$) et les localisations histologiques ($p < 0,001$). Par rapport aux témoins, ils sont 58,5 fois plus nombreux dans les sinus (où se font les mues), 29,7 dans les cornets et 17,5 dans le septum. Pour les éosinophiles, il y a aussi des interactions significatives entre les sites anatomiques, la localisation histologique et le statut ($p < 0,05$).

DISCUSSION

Comme il est impossible dans notre région de trouver des moutons adultes qui n'aient pas été soumis à l'infestation par *Oestrus ovis*, nous ne pouvions que choisir des agneaux nés en bergerie en hiver et engraisés à l'intérieur jusqu'à l'abattage pour pouvoir être assurés de l'absence de parasites. La première question qui se pose est de savoir si les populations cellulaires dénombrées chez les agneaux indemnes peuvent être considérées comme des valeurs normales, de « référence » et si le facteur âge intervient dans la population cellulaire de la muqueuse respiratoire. Aucune étude n'a été publiée et nous ne disposons d'aucune valeur de référence pour répondre à cette question.

Une autre question est celle de la charge parasitaire moyenne des brebis étudiées. Elle est de 12 larves par animal ce qui correspond à ce qui est habituellement rencontré chez les animaux de la région d'étude : ces résultats sont donc bien représentatifs du niveau parasitaire habituel dans l'œstrose ovine.

Le problème le plus difficile à résoudre est celui de la validité des méthodes de colorations différentielles des mastocytes. Pour Enerbäck *et al.*, 1986, et pour Miller (communication personnelle) ces techniques ne sont pas les meilleures pour l'identification des mastocytes des moutons tout en permettant une appréciation globale de la population. Nous l'avons vérifié pour un certain nombre de prélèvements en comparant le nombre

Fig. 1. — Populations cellulaires.

total de mastocytes comptés par la méthode de Ker-manizadeh (1995) avec le total des mastocytes séreux et muqueux identifiés par le Bleu Alcyan et le Bleu de Toluidine. Les deux méthodes donnent des résultats très comparables aussi bien pour les éosinophiles que pour les mastocytes (Dorchies *et al.*, 1996). Nous en déduisons que le total des mastocytes comptés est bien constitué des deux populations séreuses et muqueuses et que les colorations différentielles sont utilisables.

Pour les mastocytes nous avons choisi de pratiquer un dénombrement visuel sur coupe histologique tout en reconnaissant les insuffisances reconnues à cette méthode. Dans les zones où ont lieu les réactions allergiques, les granules des nombreux mastocytes immatures présents et actifs sont difficilement colorables, par ailleurs les mastocytes mûrs sont souvent dégranulés donc peu colorables (Rothwell, 1989). Une autre voie d'exploration aurait été le dosage des protéinases mastocytaires (sheep mast cell proteinase) qui apparaît comme une alternative intéressante (Huntley *et al.*, 1986, 1987, 1992).

Au cours de travaux précédents, nous avons observé que chez des agneaux soumis à plusieurs infestations artificielles, le nombre de mastocytes séreux était multiplié par 11 et celui des mastocytes muqueux par 5 à 7 par rapport aux témoins (Dolbois-Charrier *et al.*, 1993). Les résultats relatés ici confirment ces observations, cependant les nombres de mastocytes sont beaucoup plus faibles : ils ne sont multipliés que par 2 ou 3 selon les sites et les localisations. Il est possible que chez les sujets adultes infestés naturellement la cinétique de la réponse cellulaire soit différente de celle des agneaux infestés expérimentalement. L'immuno-déficience mise en évidence par les tests de transformation lymphoblastique (Dorchies *et al.*, 1994) induit peut-être une réaction limitée. Enfin, les infestations contrôlées (Dolbois-Charrier *et al.*, 1993) n'ont peut-être pas eu une durée suffisante pour permettre de constater la diminution du recrutement cellulaire local.

Le second acteur des réactions d'hypersensibilité est l'éosinophile. Jagannath *et al.* (1989) l'ont mis en évidence dans la pituitaire de moutons et chèvres infestés par *Oestrus ovis*. Ces cellules ont été retrouvées par Dolbois *et al.* (1993). Elles traversent la muqueuse et sont présentes dans le jetage où leur nombre varie en fonction des réinfestations. Les éosinophiles provenant de moutons infestés par *Oestrus ovis* sont capables aussi, *in vitro*, de détruire les L1 (résultats non publiés).

Il faut remarquer que les mastocytes et les éosinophiles sont plus abondants dans le chorion sous-épithélial et que leur densité décroît plus en profondeur : ils sont proches des sites réactionnels au contact avec les parasites ou leurs antigènes. Les populations de cellules réactionnelles sont aussi concentrées dans cer-

taines zones comme par exemple les sinus où se font les mues L2-L3 montrant la relation entre la présence et l'activité antigénique des parasites avec la densité cellulaire.

Le troisième facteur impliqué dans l'hypersensibilité est l'anticorps de type IgE. Actuellement, les IgE des ruminants ne sont mises en évidence que par de très rares laboratoires possédant des anticorps monoclonaux spécifiques. Nous n'avons pu identifier cet élément qu'indirectement par le recrutement local des cellules ayant des récepteurs spécifiques des IgE : les mastocytes et les éosinophiles mis en évidence par des colorations histochimiques dont on connaît les insuffisances (Rothwell, 1989).

CONCLUSION

L'œstrose ovine est une infestation très répandue pour laquelle la taille et le nombre de parasites présents ont expliqué longtemps et trop sommairement les troubles observés. Des travaux expérimentaux récents ont permis d'envisager que la pathogénie de cette infestation reposait sur un phénomène d'hypersensibilité immédiate de type 1. Cette étude réalisée sur brebis infestées naturellement confirme ces premières hypothèses en montrant que, pour les mastocytes et les éosinophiles, il y a des différences très significatives en ce qui concerne leur distribution selon les positions anatomiques et les localisations histologiques en relation avec le statut parasitologique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs sont très reconnaissants au Pr H. Miller, University of Edimburg, et au Dr H. Hoste de l'INRA de Tours qui ont bien voulu revoir le manuscrit et les faire bénéficier de leurs remarques et suggestions.

RÉFÉRENCES

- BAIXENCH M.T. & MAGNAVAL J.F. Éosinophiles ; IgE et Helminthiases. *Revue de Médecine vétérinaire*, 1993, 144, 12, 967-974.
- DOLBOIS-CHARRIER L. & DORCHIES P. *Oestrus ovis* of sheep: pituitary eosinophils and mast-cells. *Veterinary Research*, 1993, 24, 362-363.
- DORCHIES P. & YILMA JOBRE MAKONNEN. Current knowledge in immunology of *Oestrus ovis* infection. ICOPA VIII, Izmir Oct. 1994.
- DORCHIES P., NGUYEN VAN-KHANH, CABANIE P. & CONCORDET D. Eosinophils and mast cell staining in sheep infected by *Oestrus ovis* larvæ. *Parasitology Today*, 1996, 12, p. 250.

- ENERBÄCK L., MILLER H.R.P. & MAYRHOFFER G. Methods for the identification and characterization of mast cells by light microscopy. *In: Mast cell differentiation and heterogeneity*. Ed. A. Dean Befus, John Bienenstock.
- ENERBÄCK L., Wingren U., PIPKORN U. & ALDENBORG F. Mast cell heterogeneity in man: properties and function of human mucosal mast cells. *In: Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease*. Ed. Galli (S.J.), Austen (K.F.) New York, Raven Press, 1989, p. 27.
- HUNTLEY J.F., GIBSON S., KNOX D. & MILLER H.R.P. The isolation and purification of a proteinase with chymotrypsin-like properties from ovine mucosal mast cells. *International Journal of Biochemistry*, 1986, 18, 8, 673-682.
- HUNTLEY J.F., GIBSON S., BROWN D., SMITH W.D., JACKSON F. & MILLER H.R.P. Systemic release of a mast cell proteinase following nematode infections in sheep. *Parasite Immunology*, 1987, 9, 603-614.
- HUNTLEY J.F., NEWLANDS G.F.J., JACKSON F. & MILLER H.R.P. The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus*-infected sheep. *Parasite Immunology*, 1992, 14, 429-440.
- JAGANNATH M.S., NURELLA COZAB & VIJAYASARATHI S.K. Histological changes in the nasal passages of sheeps and goats infested with *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Indian Journal of Animal Science*, 1989, 59, 87-91.
- KERMANIZADEH P., HAGAN P. & CROMPTON D.W.T. A differential staining method for mast cells and eosinophils in murine intestine, Liver and spleen. *Parasitology Today*, 1995, 11, 194-196.
- MACDIARMID J.A., CLARKE R., MCCLURE S.J., BOWEN F.R. & BURREL D.H. Use of a monoclonal antibody to ovine IgE for fly strike studies in sheep. *International Journal for Parasitology*, 1995, 25, 1505-1507.
- ROTHWELL T.L.W. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. *International Journal for Parasitology*, 1989, 19, 139-168.
- YILMA JOBRE MAKONNEN & DORCHIES P. Epidemiological study of *Oestrus ovis* in south west France. *Veterinary Parasitology*, 1991, 40, 315-323.

Reçu le 29 février 1996
 Accepté le 11 juin 1996