

ETUDE HISTOLOGIQUE DU FOIE, DE L'INTESTIN ET DE LA RATE DE SOURIS INFESTÉES À *SCHISTOSOMA* *MANSONI* PUIS SOUMISES À UN TRAITEMENT SUPPRESSIF À L'EXTRAIT AQUEUX DE *SIDA PILOSA* RETZ

Ulrich MEMBE FEMOE^{1,4}, Catherine CANNET²,
Hermine BOUKENG JATSA^{1,4*}, Joseph Bertin KADJI FASSI^{1,4},
Paul Désiré DJOMENI DZEUFIET¹, Théophile DIMO¹,
Louis-Albert TCHUEM TCHUENTE^{3,4} et Pierre KAMTCHOUING¹

*mjatsa@yahoo.fr

1. *Laboratoire de Physiologie Animale, Département de Biologie et Physiologie Animales, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812, Yaoundé, Cameroun*
2. *Laboratoire d'Histomorphométrie, Institut de Médecine Légale, BP 67085, Strasbourg, France*
3. *Laboratoire de Biologie générale, Département de Biologie et Physiologie Animales, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812, Yaoundé Cameroun*
4. *Centre Schistosomiasés et Parasitologie, BP 7244 Yaoundé, Cameroun*

HISTOLOGICAL STUDY OF THE LIVER, INTESTINE AND SPLEEN OF *SCHISTOSOMA MANSONI*-INFECTED MICE SUBMITTED TO A SUPPRESSIVE TREATMENT WITH *SIDA PILOSA* RETZ AQUEOUS EXTRACT

ABSTRACT

Schistosomiasis remains a real public health problem in tropical countries. *Schistosoma mansoni*-induced pathology is mainly caused by eggs which, embolized in the liver and intestine, lead to tissue necrosis, establishment of granulomatous inflammatory reactions which could progress to fibrosis and tissue dysfunction. There is no available vaccine against schistosomiasis and the intensive use of praziquantel, the only drug against all *Schistosoma* species, sometimes resulted to therapeutic failures and could lead to schistosome resistance. This study was undertaken to evaluate by histological analysis, the preventive effect of the aqueous extract of *Sida pilosa* aerial parts (SpAE) on the establishment of *Schistosoma mansoni* pathology in mice. After infection, male mice were treated daily with 100 or 200 mg/kg of SpAE from day 1 to day 28 post-infection (p.i) and sacrificed at day 56 p.i.. The effects of this treatment on hepatic, intestinal and spleen pathologies were evaluated. Liver, small intestine and spleen were removed and fixed in 10% buffered formalin and 5 µm sections realized. The liver and intestine were stained with hematoxylin-eosin to evaluate leukocyte infiltration and granulomatous reaction. Picrosirius staining was used for the detection of collagen, and Periodic Acid Schiff staining (PAS) to visualize the glycoprotein structures of the parasite. Perls staining was performed on the spleen section to highlight tissue bleeding through the presence of siderophages. SpAE treatment prevented infiltration of inflammatory cells into the liver of mice at 56th day p.i.. The number and size of hepatic and intestinal granulomas were considerably reduced. The antifibrotic effect of this extract was also marked by the decrease in collagen deposition in granulomatous foci. Siderophages were more present on the spleen of infected-untreated mice than the ones of infected and SpAE-treated mice. This study confirmed the inefficacy of praziquantel on *Schistosoma mansoni* larval stages and revealed that the aqueous extract of *Sida pilosa* aerial parts could considerably prevent the installation of *Schistosoma mansoni* pathology.

KEY WORDS

***Schistosoma mansoni*, histopathology, *Sida pilosa*, Hematoxylin-eosin, Periodic Acid Schiff, Picrosirius, Perls, mice**

RESUME

La schistosomiase demeure un réel problème de santé publique dans les pays tropicaux. La pathologie à *Schistosoma mansoni* est principalement causée par les œufs qui, embolisés dans le foie et l'intestin, sont à l'origine d'une nécrose tissulaire, de la mise en place d'une réaction inflammatoire granulomateuse pouvant évoluer vers une fibrose et d'un dysfonctionnement tissulaire. L'utilisation intensive du praziquantel, unique médicament contre toutes les formes de schistosomiase, est parfois à l'origine d'échecs thérapeutiques et pourrait conduire à une résistance du schistosome. Cette étude a été entreprise pour évaluer par analyse histologique l'effet préventif de l'extrait aqueux des parties aériennes de *Sida pilosa* (SpAE) sur la mise en place de la pathologie à *Schistosoma mansoni* chez la souris. Après infestation des souris mâles, elles ont été traitées quotidiennement à SpAE du jour 1 au jour 28 post-infection (p.i.) aux doses de 100 et 200 mg/kg. Les souris ont été sacrifiées au jour 56 p.i.. Les effets de SpAE sur l'installation des pathologies hépatique, intestinale et splénique ont alors été évalués. Pour ce faire, le foie, l'intestin grêle et la rate ont été fixés dans le formol 10 % tamponné puis des coupes de 5 µm réalisées. Le foie et l'intestin ont été colorés à l'hématoxyline-éosine afin d'évaluer les infiltrations leucocytaires et la réaction granulomateuse. La coloration au Picrosirius a été entreprise pour la mise en évidence du collagène et la coloration au Periodic Acid Schiff (PAS) pour visualiser les structures glycoprotéiques du parasite. La coloration de Perls a été effectuée sur des coupes de rate pour la mise en évidence d'hémorragies tissulaires à travers la présence de sidérophages. Le traitement à SpAE a prévenu l'infiltration des cellules inflammatoires dans le foie des souris à 56 jours p.i. Le nombre et la taille des granulomes au niveau des parenchymes hépatique et intestinal étaient ainsi considérablement réduits. L'effet de cet extrait de plante a été également marqué par la diminution du dépôt de collagène au niveau des foyers granulomateux. Une présence plus importante de sidérophages a été notée sur la rate des animaux infestés et non traités comparativement à celle des animaux infestés puis traités à SpAE. Cette étude confirme l'inefficacité du praziquantel sur les stades larvaires de *Schistosoma mansoni* et démontre que l'extrait aqueux des parties aériennes de *Sida pilosa* préviendrait considérablement l'installation de la pathologie à *Schistosoma mansoni*.

MOTS CLES

***Schistosoma mansoni*, histopathologie, *Sida pilosa*, Hématoxyline-éosine, Periodic Acid Schiff, Picrosirius, Perls, souris**

INTRODUCTION

La schistosomiase ou la bilharziose est une maladie tropicale négligée causée par des vers plats du genre *Schistosoma*. C'est la seconde endémie parasitaire dans le monde après le paludisme car elle affecte plus de 220,8 millions de personnes avec plus de 90 % de cas en Afrique et plus de 200 000 décès par an en Afrique subsaharienne [1]. Les œufs du parasite, principalement retrouvés au niveau du foie, de l'intestin ou de la vessie, libèrent des antigènes cytolytiques et induisent une réaction inflammatoire granulomateuse intense pouvant évoluer vers une fibrose hépatique et une splénomégalie [2 ; 3]. Le praziquantel (PZQ) est l'unique médicament disponible pour le traitement de la schistosomiase depuis plus de trois décennies. Une stratégie de contrôle de la schistosomiase utilisant la distribution communautaire du PZQ a été mise en place par l'OMS ; son but étant de réduire significativement la morbidité liée à cette pathologie. L'efficacité ponctuelle de cette stratégie est quasi certaine mais la nécessité de fréquents traitements pourrait aboutir au développement de souches de schistosomes résistantes à ce médicament [4 ; 5]. De plus, le PZQ n'est actif que sur le ver adulte, mais n'a aucun effet sur les formes larvaires et juvéniles du parasite [6]. Son effet n'est pas également très marqué sur les pathologies hépatique et splénique lorsqu'elles sont déjà installées [7 ; 8]. A tout ceci, s'ajoute l'absence d'un vaccin contre la schistosomiase et le problème de la réinfestation des personnes vivant en zone endémique. Une stratégie préventive associée à la chimiothérapie offrirait une meilleure perspective de contrôle efficace et durable de la schistosomiase. Il devient donc nécessaire de développer des mesures thérapeutiques alternatives et/ou complémentaires présentant à la fois une efficacité et une innocuité avérées. De nos jours, l'OMS encourage l'usage de la phytothérapie pour le traitement de nombreuses pathologies. Les plantes médicinales sont une source considérable de nombreuses molécules bioactives à activité antibilharzienne. Une étude histologique antérieure nous a permis de mettre en évidence l'effet bénéfique sur les lésions hépatiques de *Ozoroa pulcherrima* après un traitement curatif contre l'infection à *Schistosoma mansoni* chez la souris [9]. Dans l'étude actuelle, nous avons porté notre attention sur *Sida pilosa* Retz, plante médicinale de la famille des Malvaceae qui est utilisée au Cameroun pour le traitement des helminthiases intestinales [10]. Encore appelée *Sida javensis* ou *Sida cordata* ou encore *Sida veronicifolia*, *S. pilosa* se caractérise par son port rampant et sa tige grêle qui s'enracine généralement au niveau des nœuds. Cette plante présente une pubescence modérée. Le limbe, largement cordé à la base et acuminé au sommet, a une marge doublement dentée ;

le pétiole est sensiblement aussi long que le limbe. Les fleurs sont solitaires ou par deux et de couleur jaune crème (**Figure 1**) [11]. Les travaux antérieurs réalisés sur *Sida pilosa* ont montré que l'extrait aqueux de ses parties aériennes a un effet curatif sur la pathologie induite par *Schistosoma mansoni* chez la souris, notamment par ses activités schistosomicide, anti-inflammatoire, hépatoprotectrice et anti-oxydante [12 ; 13 ; 14]. De plus, il a également été démontré que cet extrait est dénué de toute toxicité [15]. Ce travail avait donc pour objectif, d'évaluer par analyse histopathologique, l'effet préventif de l'extrait aqueux des parties aériennes de *Sida pilosa* sur l'installation des pathologies hépatique, intestinale et splénique induites par *Schistosoma mansoni* chez la souris.

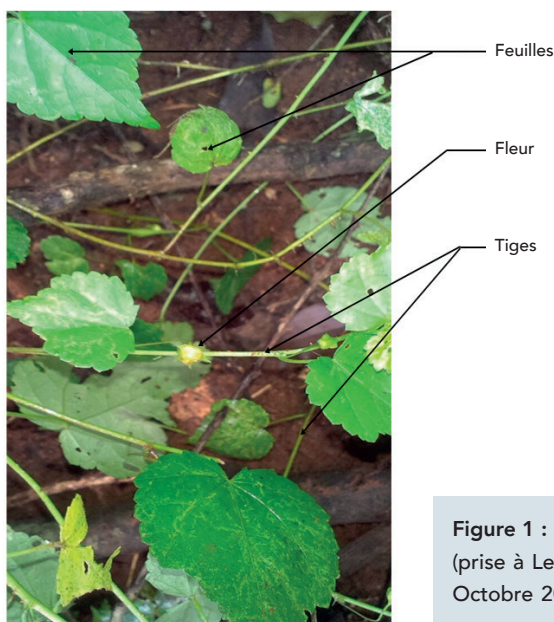


Figure 1 : Photo de *Sida pilosa* Retz (prise à Leboudi 2 au Cameroun en Octobre 2016)

MATERIELS ET METHODES

1. Récolte de la plante et préparation de l'extrait

Les parties aériennes de *Sida pilosa* ont été récoltées dans la localité de Leboudi près de la ville de Yaoundé dans la région du Centre au Cameroun en Octobre 2016. La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à l'échantillon N° 53202 HNC. L'extrait aqueux a été préparé par macération de

1000g de poudre dans de l'eau du robinet pendant 48 heures. Le macérat a été filtré puis lyophilisé pour élimination totale du solvant. Après lyophilisation, nous avons obtenu 176,21g d'extrait aqueux de *Sida pilosa* (SpAE), soit un rendement d'extraction de 17,62%.

2. Infestation et traitement des animaux

Les animaux utilisés pour notre expérimentation étaient des souris mâles de la souche Balb/c et âgées d'environ 60 jours. Elles ont été individuellement infestées avec 80 cercaires de *S. mansoni* provenant des mollusques hôtes intermédiaires *Biomphalaria pfeifferi*, par la technique d'immersion de la queue et des pattes [16]. Après l'infestation, un traitement quotidien pendant 28 jours à SpAE aux doses de 100 mg/kg (groupe SpAE 100) ou 200 mg/kg (groupe SpAE 200) a été effectué. Trois groupes témoins ont été constitués : l'un constitué de souris saines (HC), un autre de souris infestées et non traitées (IC) puis un constitué de souris infestées et traitées au praziquantel (Cesol®, Merck) à la dose de 100 mg/kg pendant 5 jours (PZQ). Après cette période de traitement, les animaux ont été laissés en observation les jours suivants avant d'être sacrifiés au 56^{ème} jour post-infestation.

L'utilisation des animaux dans cette étude a respecté les principes d'éthique et d'utilisation des animaux de laboratoire et la réglementation de la "Communauté Européenne" (EEC Directive 2010/63/EEC). Cette étude a été approuvée par le Comité d'Éthique Animale du Laboratoire de Physiologie Animale de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I-Cameroun.

3. Analyses histologiques

Le lobe latéral gauche du foie, le jéjunum ainsi que la rate ont été prélevés puis fixés dans du formol à 10% tamponné, pH 7,2 pendant 5 semaines. A l'issue de la fixation, les tissus ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de degré croissant (70% à 100%), éclaircis dans du xylène et inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Reichert-Jung 2030, Germany). Les sections obtenues ont été dépliées dans un bain marie à 40°C et placées sur des lames porte-objet. Trois jeux de lames ont été préparés par animal, puis les lames ont été séchées dans une étuve (Memmert, Germany) à 45°C pendant 24 heures. Après séchage, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains de xylène par séjour de 5 min/bain. Elles ont ensuite été réhydratées par passages successifs dans une série de trois bains d'éthanol 100° (5 min/bain),

puis un bain d'éthanol 95° (5 min) et enfin un bain d'éthanol 70° (5 min). Les lames ont été rincées à l'eau distillée puis les colorations à l'hématoxyline-éosine (H&E), au Picosirius (PS) et au Periodic Acid Schiff (PAS) réalisées sur les coupes de foie et d'intestin et la coloration de Perls sur les coupes de rate.

3.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine

Cette coloration a été effectuée afin d'évaluer les infiltrations leucocytaires et la réaction granulomateuse liée à la schistosomiase chez la souris. Pour ce faire, après le rinçage à l'eau distillée, les lames de foie et d'intestin ont été immergées pendant 10 min dans un bac contenant de l'hématoxyline (Color Index (CI) 75290, Sigma-Aldrich), préparée selon Mayer, 1896 [17] pendant 10 min, puis rincées à l'eau courante du robinet pendant 10 min. Elles ont ensuite été plongées tour à tour dans un bain d'éthanol à 70% puis d'éthanol à 95% pendant 5 min et enfin contre-colorées dans une solution d'éosine Y (Color Index (CI) 45380, Sigma-Aldrich) à 0,5% dans l'éthanol à 95% pendant 5 min. Les coupes ont enfin été déshydratées par immersion des lames dans trois bains d'éthanol à 100% (5 min/bain), puis éclaircies après trois séjours de 5 min chacun dans du xylène. Le montage des lames a été effectué à l'aide d'une lamelle après ajout de quelques gouttes de résine Pertex® (VWR).

3.2. Coloration au Picosirius

Cette coloration a été entreprise pour mettre en évidence la fibrose au niveau des foyers granulomateux hépatiques et intestinaux. Le Sirius F3BA, entrant dans la composition du Picosirius est un colorant spécifique du collagène [18, 19]. La préparation des colorants est décrite ci-après.

- L'hématoxyline de Weigert a été préparée à partir d'un mélange volume/volume (v/v) d'hématoxyline alcoolique (préparée par dissolution de 1 g d'hématoxyline (CI 75290, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'éthanol à 95%) et d'une solution de chlorure ferrique acide (mélange de 11,6 g de chlorure de fer anhydre (Sigma-Aldrich) et 10 mL d'acide chlorhydrique à 25% dans 990 mL d'eau distillée).
- L'eau acétifiée à 0,5% a été obtenue à partir d'un mélange de 0,5 mL d'acide acétique glacial (Sigma-Aldrich) avec 99,5 mL d'eau distillée.
- La solution de Picosirius a été préparée par dissolution de 0,1 g de rouge Sirius (Sirius F3B (CI 35782, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'une solution d'acide saturée picrique (référence 197378, Sigma-Aldrich).

Les lames de foie et d'intestin déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans la solution d'hématoxyline de Weigert pendant 12 min, puis rincées à l'eau courante du robinet pendant 10 min et à l'eau distillée pendant 3 min. Après ce lavage, les lames ont été introduites dans la solution de Picrosirius pendant 1 heure et différenciées dans deux bains d'eau acétifiée à 0,5% (10 à 20 secondes/bain). À l'issue de cette étape de différenciation, les lames ont été égouttées pendant deux minutes, puis déshydratées dans deux bains d'éthanol 100% (5 min/bain), éclaircies dans du xylène (3x5 min) et enfin montées sous résine Pertex® (VWR).

3.3. Coloration au Periodic Acid Schiff

Cette coloration a été réalisée afin de mettre clairement en évidence les glycoprotéines des œufs du parasite ainsi que la larve (miracidium) qu'ils renferment. Les colorants et les solutions utilisés pour cette coloration ont été préparés suivant le protocole décrit par Mc Manus [20].

- Le réactif de Schiff a été préparé en faisant dissoudre 1 g de Fuchsine acide (CI 42520, Sigma-Aldrich) dans 200 mL d'eau distillée puis le mélange a été porté à ébullition pendant 5 minutes. Après refroidissement jusqu'à 50°C, la solution a été filtrée et 20 mL de solution d'acide chlorhydrique préparée à 1N (8 mL d'acide chlorhydrique (HCl, Sigma-Aldrich) a été ajouté à 92 mL d'eau distillée) a été ajoutée. Après avoir refroidi le mélange jusqu'à 25°C, 1g de bisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Sigma-Aldrich) a été ajouté et la solution a été laissée au repos à l'obscurité pendant 24 heures.
- L'acide périodique à 0,5% a été préparé en faisant dissoudre 0,5g d'acide périodique (H_5IO_6 , Sigma-Aldrich) dans 99,5 mL d'eau distillée.
- L'eau sulfureuse a été obtenue en mélangeant 60 mL de disulfite de sodium à 10 % (préparée par dissolution de 10g de disulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'eau distillée), 50 mL d'acide chlorhydrique 1N et 890 mL d'eau distillée.

Les lames de foie déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans la solution d'acide périodique à 0,5% pendant 5 min. Après un rinçage à l'eau distillée pendant 5 min, les lames ont été plongées dans le réactif de Schiff pendant 15 min, puis 5 min dans l'eau sulfureuse et rincées à nouveau à l'eau de robinet courante (5 min) puis à l'eau distillée (2 min). Les lames ont ensuite été colorées à l'hématoxyline de Mayer pendant 5 min et rincées également à l'eau de robinet courante et à l'eau

distillée. A l'issue de cette étape de rinçage, les lames ont été déshydratées par immersion dans trois bains d'alcool (dont un à 80% et deux autres à 100%) pendant 5 min/bain, puis éclaircies dans du xylène (3x5 min) et enfin montées sous résine Pertex® (VWR).

3.4. Coloration de Perls

La coloration de Perls a été effectuée pour rechercher d'éventuelles hémorragies tissulaires au niveau de la rate des souris infectées par *S. mansoni*. Ceci s'est réalisé à travers la mise en évidence du fer ferrique des érythrocytes phagocytés par les macrophages appelés sidérophages ou erythrophages. Les solutions utilisées pour cette coloration ont été préparées selon le protocole décrit par Perls [21].

- La solution d'incubation a été obtenue en faisant un mélange (v/v) de la solution de ferrocyanide de potassium à 2% (préparée par dissolution de 2g ferrocyanide de potassium ($K_4FeC_6N_6$, $3H_2O$, Sigma-Aldrich) dans 100 mL d'eau distillée) et de la solution d'acide chlorhydrique à 2 % (préparée par mélange de 2 mL d'acide chlorhydrique concentré (HCl, Sigma-Aldrich) avec 98 mL d'eau distillée).
- La solution de rouge nucléaire solide à 0,1% a été préparée par dissolution sous agitation de 25g de sulfate d'aluminium dans 500 mL d'eau distillée. Par la suite, après ajout de 0,5g de rouge nucléaire solide (Cl 60760, Sigma-Aldrich), la solution a été portée à ébullition pendant 5 minutes puis filtrée après refroidissement.

Après déparaffinage et réhydratation, les lames de rate ont été plongées dans la solution d'incubation pendant 10 min puis rincées à l'eau de robinet courante pendant 3 min. Ensuite, elles ont été tour à tour plongées dans la solution de rouge nucléaire solide à 1% (3 min), rincées à l'eau distillée (1 min), déshydratées dans de l'alcool absolu (3x5min) puis éclaircies dans du xylène (3x5 min) et enfin montées sous résine Pertex® (VWR).

3.5. Analyses microscopiques

Après quelques heures de séchage à l'air, toutes les coupes ont été observées au microscope optique à fond clair (Axiophot, Zeiss®) connecté à une caméra digitale CMOS (IDS, Germany). Les cartographies ont été réalisées au grossissement 10x et 20x et analysées à l'aide du logiciel PathScan Touch (Excilone, France).

RESULTATS

La coloration à l'hématoxyline et éosine (H&E) a permis de mettre en évidence chez les animaux sains, un parenchyme hépatique normal et le maintien de l'intégrité de la paroi intestinale. Au niveau du foie, chaque lobule est composé de travées d'hépatocytes irriguées par un réseau de capillaires sinusoides qui confluent dans la veine centro-lobulaire. Les coupes de jéjunum colorées à l'H&E présentent un agencement normal, continu et bien délimité des différentes couches de la paroi intestinale uniformément disposées de façon concentrique autour de la lumière (**Figure 2a**). Chez les animaux infestés et non traités (IC) et ceux traités au praziquantel (PZQ), nous avons observé une désorganisation des architectures tissulaires hépatique et intestinale caractérisée par la présence de nombreux et volumineux granulomes inflammatoires associés à une importante infiltration leucocytaire répartie sur le parenchyme hépatique et la paroi intestinale. On y décèle également un épaissement important de la paroi intestinale (**Figures 2b et 2c**). Par contre, l'observation des lames des souris infestées et traitées à l'extrait aqueux de *S. pilosa* aux doses de 100 ou 200 mg/kg ($SpAE_{100}$ et $SpAE_{200}$) révèle une faible atteinte de l'intégrité structurale du parenchyme hépatique et de la paroi intestinale, marquée par une faible infiltration leucocytaire, une réduction du nombre et de la taille des granulomes inflammatoires et une épaisseur quasi-normale de la paroi intestinale (Figures 2d et 2e).

Figure 2 : Coupes histologiques du foie et de l'intestin de souris colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E)

2a = HC : souris saines ;

2b = IC : souris infestées à *S. mansoni* et non traitées ;

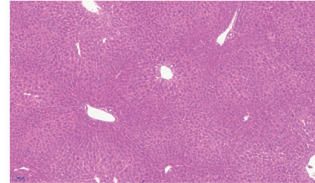
2c = PZQ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées au praziquantel à la dose de 100 mg/kg ;

2d = $SpAE_{100}$: Souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 100 mg/kg ;

2e = $SpAE_{200}$: Souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 200 mg/kg.

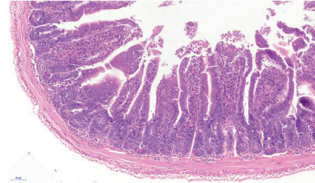
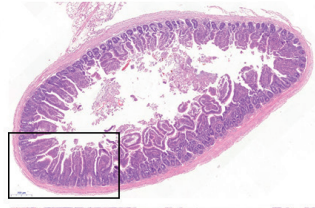
L'infection à *S. mansoni* (groupe IC) entraîne une réponse granulomateuse intense (flèches) qui est réduite après un traitement préventif à $SpAE$ à la dose de 100 ou de 200 mg/kg (groupes $SpAE_{100}$ et $SpAE_{200}$) mais qui persiste après traitement au praziquantel (groupe PZQ).

Foie

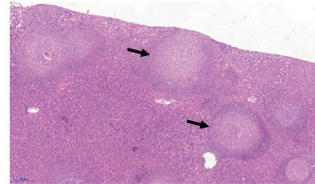
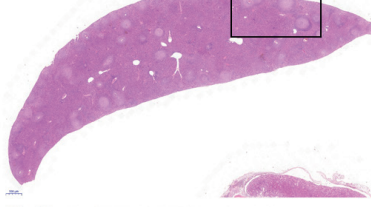


2a : HC

Intestin

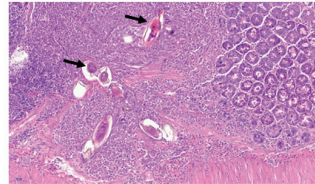
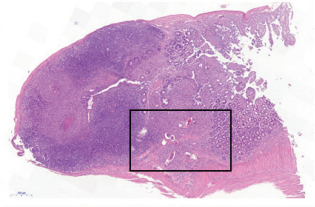


Foie

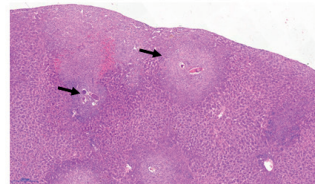
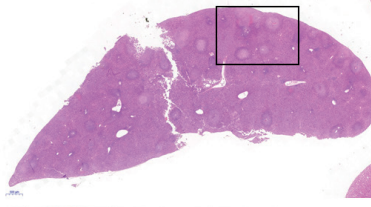


2b : IC

Intestin

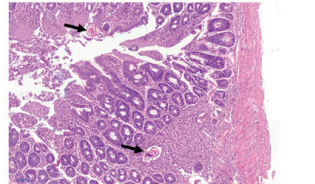
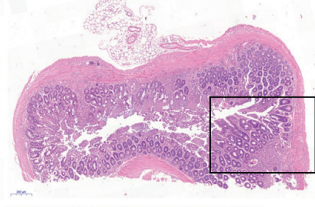


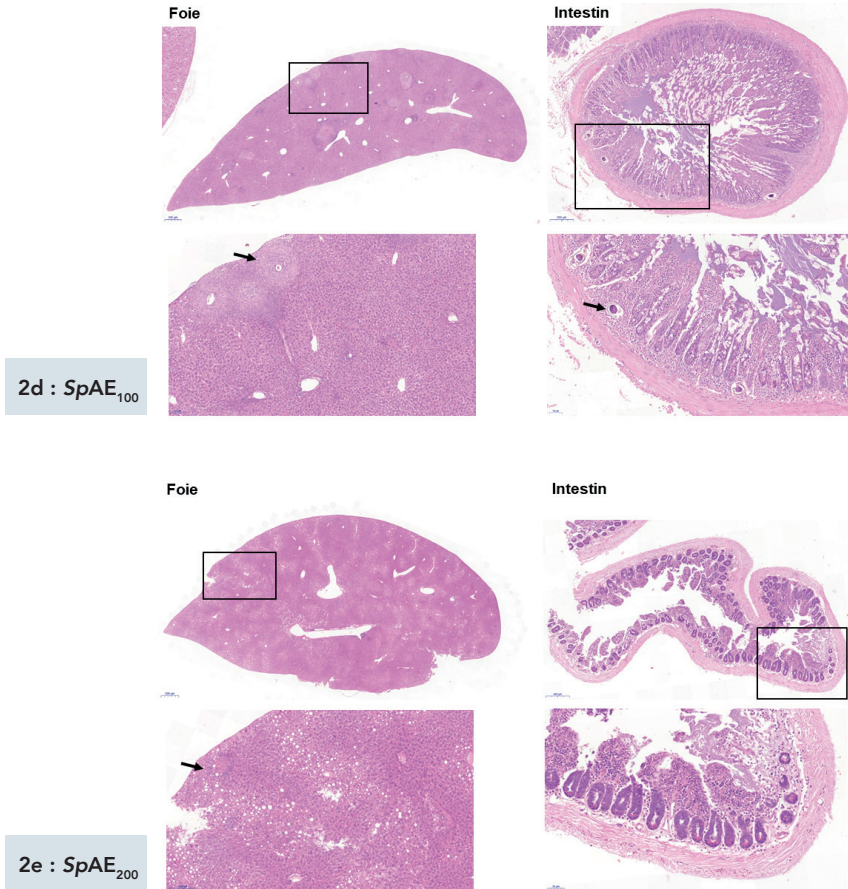
Foie



2c : PZQ

Intestin





La coloration au PAS a permis de mettre évidence sur des coupes de foie et d'intestin de souris infestées et non traitées (IC), de nombreux nodules parasitaires constitués chacun pour la plupart d'un œuf du parasite renfermant la larve (miracidium) (Figure 3a). Par contre, chez les animaux traités à SpAE, il est noté une diminution du nombre de nodules parasitaires (**Figures 3b** et **3c**) associée à une absence d'œufs ou de larve parasitaire au niveau des nodules présents (**Figure 3d**).

Après observation des coupes de foie et d'intestin d'animaux sains (HC) colorées au Picrosirius, nous avons pu noter la présence normale de collagène au niveau de l'endothélium de la veine centro-lobulaire et au niveau de la sous muqueuse de la paroi intestinale (**Figure 4a**). De nombreux et volumineux foyers fibrotiques

Figure 3 : Coupes histologiques du foie et de l'intestin de souris colorées au Periodic Acid Schiff (PAS)

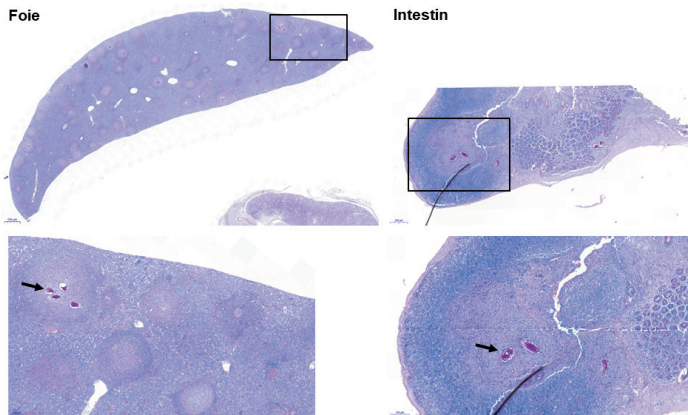
3a = IC : souris infestées à *S. mansoni* et non traitées ;

3b = PZQ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées au praziquantel à la dose de 100 mg/kg ;

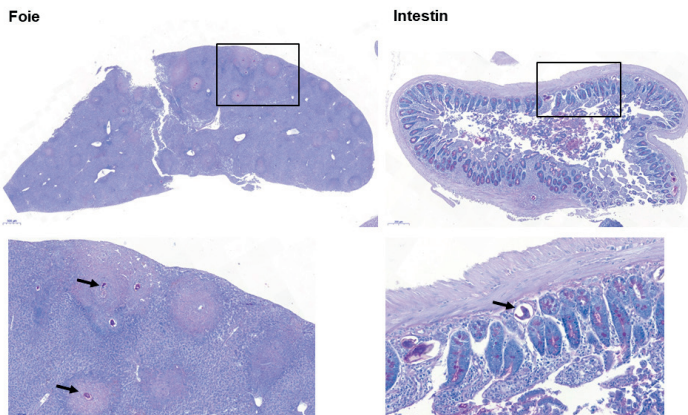
3c = SpAE₁₀₀ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 100 mg/kg ;

3d = SpAE₂₀₀ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 200 mg/kg.

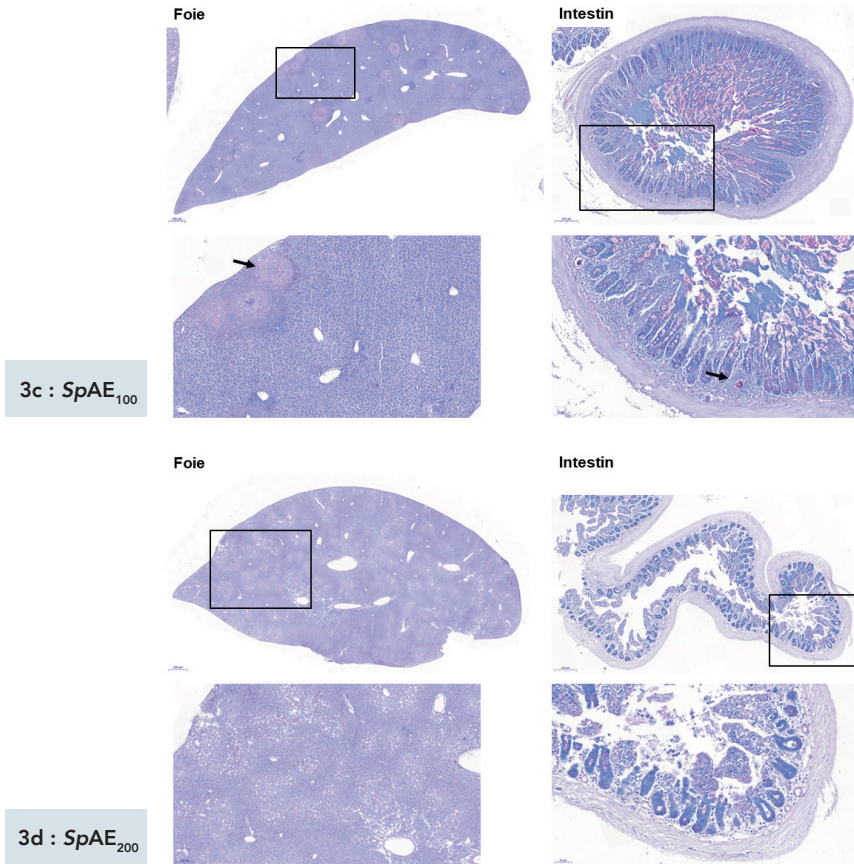
Des nodules parasitaires renfermant de nombreux œufs de *S. mansoni* (flèches) sont mis en évidence sur les coupes de foie et d'intestin des souris du groupe IC ainsi que sur celles traitées au praziquantel (groupe PZQ), tandis que chez les souris traitées à SpAE, le nombre de nodules parasitaires, ainsi que d'œufs de parasite diminue (SpAE₁₀₀ et SpAE₂₀₀).



3a : IC



3b : PZQ



caractérisés par un dépôt accru de collagène ont été mis en évidence sur les coupes de foie et d'intestin d'animaux infestés et non traités (IC) (**Figure 4b**) et sur celles des souris traitées au praziquantel (**Figure 4c**). Le traitement à SpAE (100 ou 200 mg/kg) a considérablement prévenu l'installation de la fibrose par réduction de la densité du collagène au niveau du parenchyme hépatique et de la paroi intestinale (**Figures 4d** et **4e**).

La coloration de Perls a révélé la présence de sidérophages ou érythrophages matérialisés par la coloration bleu d'hémosidérine répartie de façon diffuse sur le parenchyme splénique de tous les animaux infectés par *Schistosoma mansoni*. La densité de ces érythrophages est plus importante au niveau de la rate des souris infectées et non traitées (IC) comparativement à celle des souris traitées à 100 ou 200 mg/kg de SpAE. (**Figure 5**).

Figure 4 : Coupes histologiques du foie et de l'intestin de souris colorées au Pricosirius

4a = HC : souris saines ;

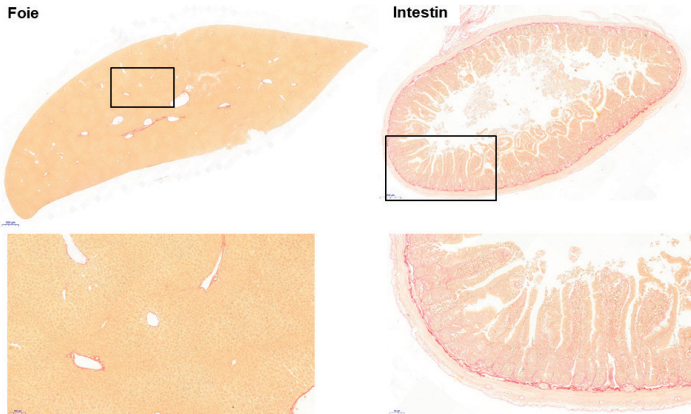
4b = IC : souris infestées à *S. mansoni* et non traitées ;

4c = PZQ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées au praziquantel à la dose de 100 mg/kg ;

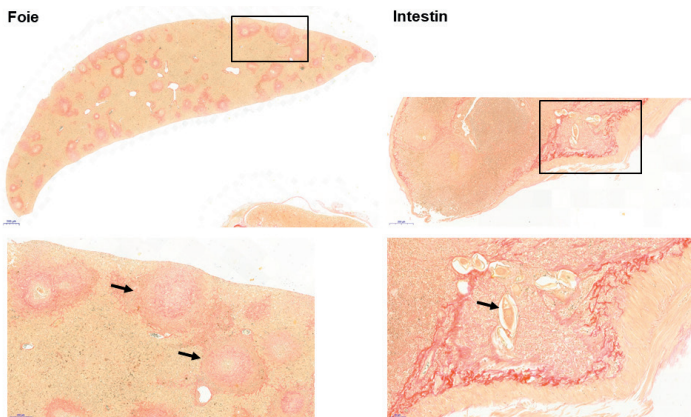
4d = SpAE₁₀₀ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 100 mg/kg ;

4e = SpAE₂₀₀ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 200 mg/kg.

Les coupes de foie des souris infestées par *S. mansoni* montrent d'intenses foyers fibrotiques (flèches) chez les animaux du groupe IC qui diminuent considérablement après traitement par SpAE. Le traitement au praziquantel n'a entraîné aucune diminution des fibres de collagène.

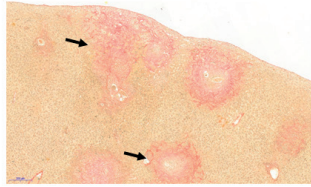
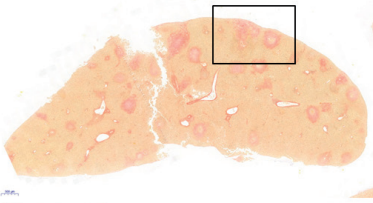


4a : HC



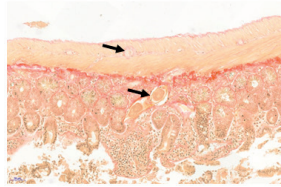
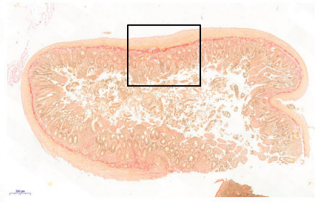
4b : IC

Foie

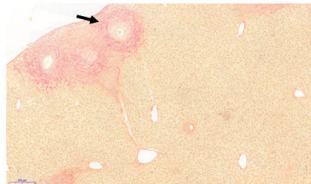
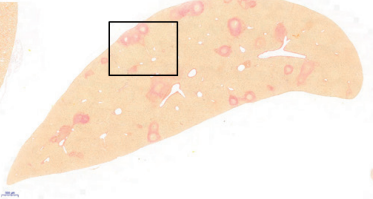


4c : PZQ

Intestin

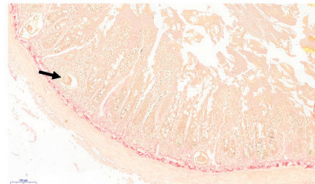
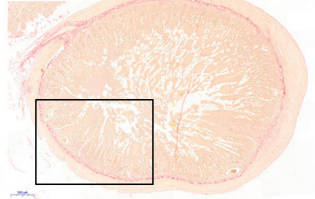


Foie



4d : SpAE₁₀₀

Intestin



Foie



4e : SpAE₂₀₀

Intestin

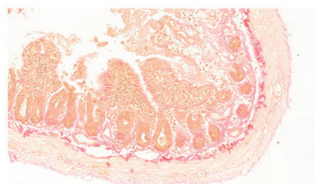
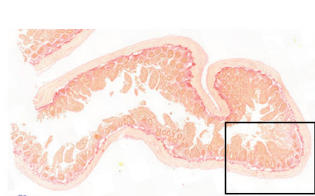


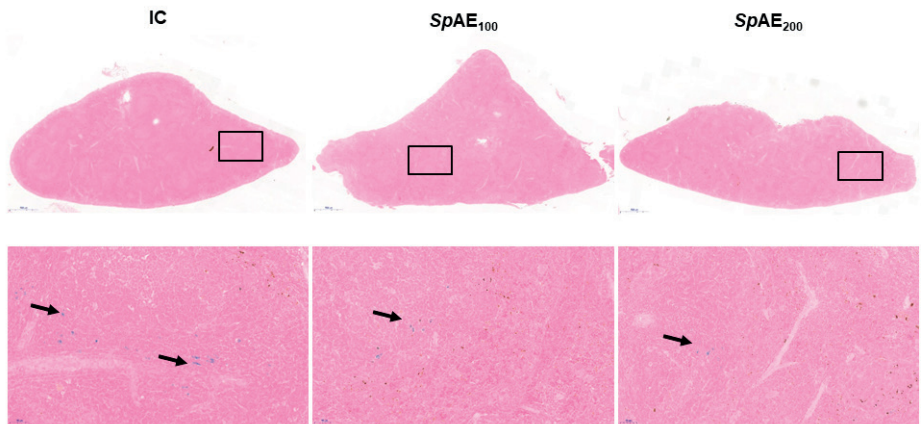
Figure 5 : Coupes histologiques de la rate de souris colorées au Perls

IC : souris infestées à *S. mansoni* et non traitées ;

SpAE₁₀₀ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 100 mg/kg ;

SpAE₂₀₀ : souris infestées à *S. mansoni* et traitées à l'extrait aqueux de *Sida pilosa* à la dose de 200 mg/kg.

L'intensité des pigments d'hémosidérine matérialisant la présence des érythrophages ou sidérophages (flèches) et caractéristique d'une hémorragie importante est visible sur la rate des souris infestées par *S. mansoni* et non traitées (IC). La teneur de ces pigments est considérablement réduite dans les groupes d'animaux traités par SpAE.



DISCUSSION

Dans l'infection à *Schistosoma mansoni*, la pathologie induite est le résultat de la formation d'un granulome autour des œufs du parasite piégés au niveau des tissus de l'hôte. En effet, au niveau de ces organes, la larve (le miracidium) contenue dans les œufs du parasite libère des antigènes solubles à activité cytolytique. Ces antigènes solubles déclenchent la réponse immunitaire de type T helper 2 marquée par une activation et une mobilisation accrue de lymphocytes CD₄⁺ au niveau des foyers granulomateux [22; 23; 24]. Bien que la formation de ces granulomes soit bénéfique pour l'hôte, car ils le protègent contre la propagation des antigènes toxiques et cytolytiques, ce processus est à l'origine de l'augmentation de la synthèse du collagène induisant une fibrose tissulaire sévère et irréversible [25; 26; 27].

Les granulomes inflammatoires à *Schistosoma mansoni* sont bien identifiés sur nos coupes de foie et d'intestin colorées à l'hématoxyline-éosine. Les larves du parasite sont clairement visibles après coloration au PAS et les foyers fibrotiques périovulaires à travers la mise en évidence du collagène par la coloration au Picrosirius. Dans l'infection à *S. mansoni*, s'agissant des pathologies hépatique et intestinale, bien que la phase initiale de la réaction inflammatoire granulomateuse périovulaire puisse sembler similaire, les granulomes intestinaux abritent moins d'éosinophiles, de lymphocytes T et de lymphocytes B que les granulomes hépatiques, mais davantage de macrophages. Seuls les taux de neutrophiles et de basophiles sont communs à ces deux types de granulomes (hépatique et intestinal) [24]. Au cours des phases ultérieures, les granulomes deviennent fibrotiques au niveau hépatique tandis qu'au niveau intestinal, les œufs piégés au niveau de la paroi sont généralement libérés dans la lumière avant que la fibrose ne se développe. Cependant, en absence de traitement et/ou lorsque les charges parasitaires et ovulaires sont importantes, les œufs du parasite piégés au niveau de la sous-muqueuse développent des réactions granulomateuses chroniques qui, lors du processus de réparation tissulaire donne naissance à des granulomes fibrotiques intestinaux dont la forme et la teneur en collagène sont identiques à ceux observés au niveau du foie [24 ; 27].

Le nombre de granulomes, leur taille, ainsi que la fibrose périovulaire peuvent cependant être considérablement réduits en cas de traitement. Cette atteinte n'a cependant pas été comblée après traitement au praziquantel des souris infestées, confirmant ainsi son inefficacité sur les formes larvaires et juvéniles de *Schistosoma mansoni* [6]. Dans notre étude, sur les coupes de foie et d'intestin des souris infestées à *S. mansoni* puis traitées par SpAE, la réduction du nombre et de la taille des granulomes serait la conséquence de la diminution des charges ovulaires hépatique et intestinale consécutive à la réduction de la charge parasitaire. En effet, l'activité schistosomicide de l'extrait aqueux de *Sida pilosa* a été démontrée par Jatsa et Coll. [12 ; 13 ;14]. Le traitement par SpAE a également considérablement prévenu l'installation de la fibrose. En effet, l'extrait aurait entraîné la destruction des œufs du parasite, ce qui induirait les effets suivants : la mort des miracidiums, l'inhibition de la libération et de la propagation des antigènes cytolytiques et la réduction de la lyse des cellules environnantes. Cette dernière action pourrait avoir comme conséquence l'inhibition de la synthèse du collagène et des protéines de la matrice extracellulaire, limitant ainsi la destruction tissulaire à l'origine de la fibrose. Ce résultat confirme l'activité antifibrotique de SpAE au niveau du foie et

de l'intestin des souris infestées à *S.mansoni* telle que précédemment démontré par Jatsa et Coll. avec la diminution de la synthèse d'hydroxyproline, marqueur du collagène dans les processus fibrotiques [13].

L'une des fonctions de la rate est l'élimination des hématies vieilles et/ou des produits issus de leur dégradation. Cette élimination a lieu dans la pulpe rouge. Il est bien connu que les schistosomes sont hématophages et que l'infection est généralement accompagnée d'une anémie ferriprive [28]. En effet, les schistosomes provoquent la lyse des hématies et se nourrissent du noyau hème de l'hémoglobine qu'ils dégradent. Cette dégradation de l'hémoglobine libère du fer partiellement fixé dans l'hémosidérine. Celle-ci est un pigment intracellulaire qui est rendu visible par la coloration de Perls qui a permis de mettre en évidence une surcharge ferrique consécutive à une lyse accrue des hématies [28]. Chez les souris traitées à SpAE, la quasi-absence de ces pigments serait la conséquence de l'activité schistosomicide de notre extrait de plante qui préviendrait ainsi la lyse des hématies.

CONCLUSION

Il ressort de cette étude que l'extrait aqueux des parties aériennes de *Sida pilosa*, de par ses activités anti-inflammatoire et antifibrotique, préviendrait considérablement l'installation de la pathologie à *Schistosoma mansoni*. Cette activité préventive est d'ailleurs meilleure que celle du praziquantel. Cette étude a également permis de confirmer l'utilisation empirique de cette plante pour le traitement des helminthiases intestinales et hisse ainsi *Sida pilosa* en bonne place parmi les potentiels candidats pour le développement d'un médicament efficace contre la schistosomiase. La perspective d'une combinaison de traitements alliant à la fois l'extrait de *Sida pilosa* à effet préventif et l'extrait de *Ozoroa pulcherrima* à effet curatif pourra être réalisée dans le modèle murin de la schistosomiase dans nos travaux de recherche ultérieurs.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'association Pathologie, Cytologie et Développement (PCD) pour son implication dans cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO. Schistosomiasis. Fact sheet N°115, World Health Organization, Geneva, 2017
2. FALLON PG, RICHARDSON EJ, MCKENZIE GJ, MCKENZIE AN : Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J.Immunol.*, 2000, **164**, 2585-2591.
3. STAVITSKY AB : Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infect.Immun.*, 2004, **72**, 1-12.
4. CAFFREY CR : Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr.Opin.Chem.Biol.*, 2007, **11**, 433-439.
5. UTZINGER J, N'GORAN EK, N'DRI A, LENGELER C, TANNER M : Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* with particular consideration for intensity of infection. *Trop.Med.Health*, 2003, **5**(11), 771-778.
6. WANG LW, WANG, LIANG YS : Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review, *Parasitol.Res.*, 2012, **111**, 1871-1877.
7. DIAS MM, ZUZA O, RIANIA RL, PINTO PF, SILVA PINTO PLS, SILVA MP, DE MORAES J, ATAIDE ACZ, SILVA FO, CECILIO AB, DA SILVA AAF : *In vitro* schistosomicidal and antiviral activities of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) against *Schistosoma mansoni* and Herpes simplex virus-1. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, **94**, 489-498.
8. DOENHOFF MJ, CIOLI D, UTZINGER J : Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr.Opin.Infect.Dis.*, 2008, **21**, 659-667.
9. JATSA HB, CANNET C, FEMOE UM, FEUSSOM NG, DZEUFIE PDD, TCHUEM TCHUENTE LA, KAMTCHOUING P : Analyses histologiques du foie des souris infectées par *Schistosoma mansoni* après traitement par *Ozoroa pulcherrima* Schweinf. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 2018, **30**, 31-50.
10. ADJANOHOUN JE, ABOUBAKAR N, DRAMANE K, EBOT ME, EKPERE JA, ENOW-OROCK EG, FOCHO D, GBILE ZO, KAMANYI A, KAMSU KOM J, KEITA A, MBENKUM T, MBI CN, MBIELE AL, MBOME IL, MUBIRU NK, NANCY WL, NKONG-MENECK B, SATABIE B, SOFOWORA A, TAMZE V. & WIRMUM CK. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. CSTR/OUA, CNPMS, Porto-Novo, 1996.
11. VIAROUGE N, MARNOTTE P, MERLIER H : Détermination pratique des mauvaises herbes du genre *Sida* L. *Agr.développ.*, 1995, **8**, 43 - 50.
12. JATSA HB, PEREIRA CAJ, PEREIRA ABD, NEGRÃO-CORREA DA, BRAGA FC, MACIEL GM, CASTILHO RO, KAMTCHOUING P, TEIXEIRA MM : *In vitro* evaluation of *Sida pilosa* Retz (malvaceae) aqueous extract and derived fractions on *Schistosoma mansoni*. *Pharmacol.Pharm.*, 2015, **6**, 380-390.

13. JATSA HB, RUSSO RC, DE JESUS PEREIRA CA, AGUILAR EC, GARCIA CC, ARAUJO ES, OLIVEIRA JLR, RODRIGUES VF, DE OLIVEIRA VG, ALVAREZ-LEITE JI, BRAGA FC, TCHUEM TCHUENTE LA, KAMTCHOUING P, NEGRÃO-CORREA DA, TEIXEIRA MT : Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J.Ethnopharmacol.*, 2016, **180**, 114-123.
14. JATSA HB, FEMOE UM, NJIAZA J, TOMBE DS, MBOLANG LN, NKONDO ET, TCHUEM TCHUENTE LA, DIMO T KAMTCHOUING P : Efficacy of *Sida pilosa* Retz aqueous extract against *Schistosoma mansoni* – induced granulomatous inflammation in the liver and the intestine of mice: histomorphometry and gastrointestinal motility evaluation. *BMC Complement.Altern.Med.*, 2018, **18**, 247-261.
15. JATSA HB, ENDOUGOU AME, KEMETA DRA, KENFACK CM, TCHUEM TCHUENTE LA, KAMTCHOUING P : *In vivo* antischistosomal and toxicological evaluation of *Sida pilosa* Retz on mice BALB/c. *Pharmacologyonline*, 2009, **3**, 531–538.
16. SMITHERS SE, TERRY RJ : The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and recovery of worms. *J.Parasitol.*, 1965, **55**, 695-700.
17. MAYER P: Uber schleimfärbung. *Mitt.Zool.Stn.Neapel.*, 1896, **12**, 303.
18. PUCHTLER H, WALDROP FS, VALENTINE LS : Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picosirius red FBA. *Beitr.Pathol.*,1973, **150**, 174-187.
19. JUNQUEIRA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR: Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem.J.*, 1979, **11**, 447-455.
20. MC MANUS JFA : Histological demonstration of mucin after periodic acid, *Nature*, 1946, **158**, 202.
21. PERLS M : Nachweis von eisenoxyd in geweissen pigmentation, *V.Archiv.Pathol. Anat.Physiol.Klin.Med.*, 1867, **39**, 42.
22. ANDRADE ZA : Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol.*, 2009, **31**, 656–663.
23. ZHU J, ZHANG W, ZHANG L, XU L, CHEN X, ZHOU S, XU Z, XIAO M, BAI H, LIU F, SU C : IL-7 suppresses macrophage autophagy and promotes liver pathology in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Cell.Mol.Med.*, 2018, **00**, 1–11.
24. SCHWARTZ C, FALLON PG : *Schistosoma* “Eggs-Iting” the host: granuloma formation and egg excretion. *Front.Immunol.*, 2018, **9**, 2492.
25. HOFFMANN KF, CASPAR P, CHEEVER AW, WYNN AT : IFN- γ , IL-12, and TNF- α are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *J.Immunol.*, 1998, **161**, 4201-4210.

26. STADECKER MJ, ASAHI H, FINGER E, HERNANDEZ HJ, RUTITZKY LI, SUN J : The immunobiology of Th1 polarization in high pathology schistosomiasis. *Immunol. Rev.*, 2004, **201**, 168–79.
27. TAMER E, GAMAL E: Hepatic and intestinal schistosomiasis: *Review.J.Adv.Res.*, 2013, **4**, 445-452.
28. BONNARD P, KALACH N, CADRANEL JF, REMOUE F, RIVEAU G, ANDRE CAPRON A : Manifestations digestives et hépatiques de la bilharziose. *Gastroentérol.Clin. Biol.*, 2000, **24** (4), 409-419.

NOTE DE LA REDACTION

Le Prix du meilleur Poster a été attribué aux auteurs de ces travaux originaux dans le cadre du 32^{ème} Congrès de l'AFH à Strasbourg en juin 2019.