



Faculté  
de Médecine  
Aix-Marseille Université



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE  
FACULTE DE MEDECINE DE LA TIMONE  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE  
ET DE LA SANTE

LABORATOIRE : Centre de Résonance Magnétique Biologique et  
Médicale (CRMBM) – Unité Mixte de Recherche 7339

**Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur**

Discipline : Pathologie Humaine

Spécialité : Maladies Infectieuses

**Identification de Biomarqueurs de l'Hépatopathie  
Bilharzienne par Imagerie de Résonance Magnétique**

Brice MASI

Soutenue le 11/12/2018 devant le jury composé des :

Pr Vincent LEROY	CHU-Grenoble	Rapporteur
Dr Olivier BEUF	CNRS	Rapporteur
Dr Frank KOBER	CNRS	Examineur
Dr Angèle VIOLA	CNRS	Directrice de thèse

Numéro national de thèse/suffixe local : 2018AIXM0741/186ED62



***« Il est plus facile de renoncer que de persévérer. »***

Le recueil de proverbes français

***« La chute n'est pas un échec. L'échec c'est de rester là où on est tombé. »***

SOCRATE

***« Tant qu'on n'a pas accosté on n'arrête point de pagayer. »***

Le dictionnaire mahorais

***« Ne jamais, jamais, jamais abandonner. »***

Winston CHURCHILL



# Résumé

Seconde affection parasitaire dans le monde derrière la malaria, avec plus de 200 millions de personnes infectées, la bilharziose ou schistosomiase demeure une maladie infectieuse tropicale négligée. Le schistosome est un plathelminthe qui pénètre sous forme de cercaire la peau de son hôte définitif (vertébré). L'espèce *Schistosoma mansoni* est la principale responsable de la forme digestive de la bilharziose humaine pouvant évoluer vers une pathologie chronique grave chez 5 à 10 % des individus infectés. Plusieurs années après l'infection, une fibrose hépatique importante se développe autour des œufs du parasite logés dans le foie et la paroi de l'intestin. La fibrose peut entraîner une hypertension portale et des varices gastro-oesophagiennes dont la rupture est potentiellement létale pour les patients. Cette complication hépatosplénique de la schistosomiase digestive est souvent associée à une hépatomégalie et une splénomégalie. Le meilleur standard pour le diagnostic de la fibrose du foie est l'histologie sur biopsie. Cette méthode présente le désavantage d'être très invasive. L'évaluation non-invasive classique de la fibrose du foie se fait par échographie à l'aide d'une échelle internationale de classification (échelle de Nيامey). L'échographie autorise également l'évaluation de l'hypertension portale par mesure du diamètre de la veine porte et la recherche de varices systémiques portes. L'échographie ne permet cependant pas le suivi quantitatif de la fibrose hépatique. L'objectif de ce travail était de fournir la première caractérisation longitudinale par IRM *in vivo* du modèle murin de schistosomiase digestive obtenu par infection de souris CBA/J avec *Schistosoma mansoni* en étudiant l'atteinte hépatique, splénique et vasculaire (veine porte). Le second objectif était la mise au point d'une technique quantitative ou semi-quantitative permettant d'évaluer la fibrose hépatique dans ce modèle. Ce type de technique serait utile à l'étude des mécanismes fibrogéniques chez la souris sauvage ou génétiquement modifiée, à l'évaluation de l'efficacité de traitement anti-schistosome ou anti-fibrosants. Nos données d'imagerie anatomique avec et sans agent de contraste (Gd-DOTA) et de relaxométrie (cartographies par mesure des temps de relaxation  $T_2$  et  $T_2^*$ ) ont permis de confirmer les points communs entre le modèle murin de schistosomiase et la maladie humaine en termes d'organomégalie, d'inflammation granulomateuse, de fibrose et d'atteinte du système porte. Nous avons caractérisé de façon quantitative l'hépatomégalie, la splénomégalie et l'augmentation du diamètre de la veine porte dans le modèle. Nous avons montré que le développement de la fibrose hépatique était associé à une augmentation de la valeur du  $T_2$ , en particulier le pourcentage de pixels compris entre 16 et 26 ms. La variation du paramètre  $T_2$  a été corrélée à des indicateurs histologiques de la fibrose (score METAVIR et marquage au rouge Sirius). Nos résultats suggèrent que le paramètre  $T_2$  pourrait être un biomarqueur non invasif et semi-quantitatif de la fibrose hépatique bilharzienne qui pourrait être utile dans le diagnostic et le suivi de la complication hépatosplénique et dans l'évaluation de nouvelles thérapies.

**Mots clefs:** Schistosomiase, *S. mansoni*, Organomégalie, Fibrose, Foie, IRM, Relaxométrie,  $T_2$



# Abstract

Bilharzia also called schistosomiasis, the second parasitic disease in the world behind malaria with more than 200 million people infected, remains a neglected tropical infectious disease. The schistosome is a platyhelminth which penetrates the skin of its final host (vertebrate) in its larval form (cercaria). *Schistosoma mansoni* is the main cause of the digestive form of human schistosomiasis that can progress to a severe chronic pathology in 5 to 10% of infected individuals. Several years after infection, significant hepatic fibrosis (HF) develops around parasite eggs in the liver and intestinal wall. Fibrosis can lead to portal hypertension and gastroesophageal varices, the rupture of which is potentially lethal. This hepato-splenic complication of digestive schistosomiasis is often associated with hepatomegaly and splenomegaly. The standard technique for the diagnosis of liver fibrosis is biopsy. This method has the disadvantage of being very invasive with risks of comorbidities. The classical non-invasive evaluation of liver fibrosis is done by ultrasound imaging using an international classification scale (Niaimey scale). Echography allows the assessment of portal hypertension by measuring the diameter of the portal vein and enables the detection of portal varices. However, ultrasound imaging does not allow quantitative monitoring of HF. The aim of this work was to provide the first *in vivo* longitudinal MRI characterization of the murine model of digestive schistosomiasis obtained by infection of CBA/J mice with *Schistosoma mansoni*. To this end, we performed abdominal *in vivo* MRI to explore liver, spleen and vasculature (portal vein). The second objective was to develop a quantitative or semi-quantitative method to evaluate liver fibrosis in this model. An MR biomarker of fibrosis would be useful for the study of fibrogenic mechanisms in wild-type or genetically modified mice, as well as evaluation of anti-schistosome or anti-fibrotic treatment efficacy. Our anatomical and volumetric data showed that the murine model of schistosomiasis was sharing many features with the human disease such as organomegaly, granulomatous inflammation, and portal vein involvement. In order to assess liver fibrosis, we performed relaxometric studies, and obtained T<sub>2</sub> and T<sub>2</sub>\* maps of the liver. We found an increase in T<sub>2</sub> values (percentage of pixels between 16 and 26 ms) in fibrotic livers. This finding was correlated to histological indicators of fibrosis (METAVIR score and percentage of red Sirius coloration). We propose that T<sub>2</sub> mapping could help detect and follow-up semi-quantitatively fibrosis-related schistosomiasis.

**Keywords:** Schistosomiasis, *S. mansoni*, Organomegaly, Fibrosis, Liver, MRI, Relaxometry, T<sub>2</sub>



# Remerciements

Aux rapporteurs et examinateurs membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail :

- Le Pr Vincent LEROY
- Le Dr Olivier BEUF
- Le Dr Frank KOBER

Au Dr Angèle VIOLA ma directrice de thèse pour son mentorat, toujours bienveillante et totalement impliquée pour son équipe.

Au Dr Monique BERNARD pour sa confiance, son accueil et son soutien en tant que directrice du laboratoire et co-directrice de ma thèse.

Au Dr Adriana PERLES-BARBACU pour ses conseils et son support sans faille.

A l'ensemble des membres de l'équipe du laboratoire du CRMBM/CEMEREM scientifiques ou administratifs toujours présents en cas de besoin.

Au Pr Jean-Louis MEGE et au Pr Daniel OLIVE pour leur orientation lors du comité de suivi de thèse.

A tous les co-auteurs des articles présentés dans ce manuscrit.

A tous ceux qui ont constitué l'équipe Inserm U906 avec lesquels j'ai pris plaisir à travailler pendant 4 ans: Dr Sandrine MARQUET, Dr Sandrine CABANTOUS, Dr Laurent ARGIRO, Dr Christophe CHEVILLARD, Yannick KATZ, Dr Laurie LAUGIER, Nicolas DUFLOT et Alexia MATTEI.

A la startup Genepred Biotechnologies pour le financement CIFRE de mes premières années de doctorat. A ses salariés et nombreux anciens employés qui m'ont aidé.

Aux autres collaborateurs : le Pr Jean HARDWIGSEN et son équipe au CHU de La Timone à Marseille, le CRB foie et le Pr ZIOL, les brésiliens et les ougandais.

A ma mère Daouia MASI, mon frère Colas MASI et toute ma famille si précieuse, ma compagne Dr Bénédicte ALDEBERT et les siens pour tant de raisons, mes amis proches, d'enfance ou d'après et mes autres camarades présents quoi qu'il se passe.

A ceux partis bien trop tôt dont j'aurais tant aimé qu'ils puissent voir l'aboutissement de ce travail dont mon père Dr Michel MASI et mon oncle Aissa BOUSSOUAR.

A tous ceux qui n'ont pas été cités nommément, qui m'ont aidé ou supporté directement ou indirectement depuis 30 ans et dont la liste exhaustive serait trop importante. Vous vous reconnaissez et je ne vous oublie pas.



# Table des matières

RESUME.....	5
ABSTRACT.....	7
REMERCIEMENTS.....	9
TABLE DES MATIERES.....	11
TABLE DES FIGURES .....	15
TABLE DES TABLEAUX .....	19
LISTE DES ABREVIATIONS.....	21
INTRODUCTION .....	23
1. LA BILHARZIOSE OU SCHISTOSOMIASE HEPATOSPLENIQUE.....	23
1.1. <i>Épidémiologie générale</i> .....	23
1.2. <i>Le parasite</i> .....	25
1.2.1. Généralités.....	25
1.2.2. Les différentes espèces de schistosomes .....	25
1.3. <i>Hôtes et cycle parasitaire</i> .....	27
1.3.1. Les hôtes du schistosome .....	27
1.3.1.1. L'hôte intermédiaire.....	27
1.3.1.2. L'hôte définitif .....	27
1.3.2. Le cycle de vie naturel du parasite .....	27
1.4. <i>Physiopathologie de la bilharziose digestive</i> .....	30
1.4.1. Quelques rappels sur le foie .....	30
1.4.1.1. Anatomie des systèmes digestif et hépatique.....	30
1.4.1.2. Physiologie hépatique élémentaire.....	36
1.4.2. <b>La Bilharziose hépatosplénique</b> .....	37
1.4.3. <i>Les mécanismes généraux du développement de la fibrose bilharzienne</i> .....	40
1.4.4. Méthodes de diagnostic biologique et examen clinique et de suivi de la schistosomiase digestive	42
1.5. <i>Moyens de lutte contre la maladie</i> .....	45
1.5.1. Moyens de prévention et de contrôle de la Bilharziose .....	45
1.5.2. Traitements médicamenteux de la schistosomiase hépatosplénique.....	46
1.5.3. Traitements médico-chirurgicaux dans la schistosomiase hépatosplénique .....	47
2. IMAGERIE DANS LA BILHARZIOSE/SCHISTOSOMIASE DIGESTIVE .....	48
2.1. <i>Techniques d'imagerie cliniques utilisées pour le suivi de la bilharziose digestive</i> .....	48
*: technique non invasive en absence d'agent de contraste. **: dépend des protocoles. AC= Agent de	
Contraste EUS= Echographie à Ultrasons, HiFu= High intensity Focused ultrasound, IRM= Imagerie par Résonance	
Magnétique, SPECT= single photon emission computed tomography, TDM= Tomodensitométrie, TEP=	
Tomographie par émission de positons, VP= Veine Porte .....	50
2.1.1. L'échographie ultrasonore.....	51
2.1.2. Le scanner X ou tomodensitométrie (TDM) .....	54
2.1.3. L'Imagerie par résonance magnétique (IRM) .....	55
2.1.4. Imagerie en médecine nucléaire, scintigraphie et tomographie par émission de positons (TEP)..	57
2.1.5. Méthodes d'imagerie optique par fibroscopie et endoscopie .....	59
2.1.6. L'élastographie dans la Bilharziose.....	62
2.2. <i>Imagerie pré-clinique de la Bilharziose murine</i> .....	65
2.2.1. Le modèle murin de schistosomiase.....	65

2.2.2. Revue des travaux utilisant des techniques d'imagerie pour l'étude de la schistosomiase digestive murine	67
3. RELAXOMETRIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) ET ETUDE DE LA FIBROSE.....	71
3.1 Eléments de RMN .....	71
3.1.1. L'aimantation nucléaire .....	71
3.1.2. Polarisation et excitation des spins par radiofréquences en RMN.....	72
3.1.3. Relaxation et signal RMN.....	74
3.2. Méthodes relaxométriques.....	77
3.3. Facteurs influençant les valeurs relaxométriques.....	78
3.4. Applications des méthodes de relaxométrie à l'étude de la fibrose des organes .....	79
4. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESES, OBJECTIFS ET STRATEGIE MISE EN ŒUVRE .....	80
4.1. Problématique et hypothèses .....	80
4.1.1. Problématique .....	80
4.1.2. Hypothèses .....	80
4.2. Objectifs et stratégie.....	81
4.2.1. Objectifs de cette étude .....	81
4.2.2. Stratégie mise en œuvre.....	81
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>83</b>
1. MODELE EXPERIMENTAL DE BILHARZIOSE/SCHISTOSOMIASSE DIGESTIVE CHEZ LA SOURIS .....	83
1.1. Les souris.....	83
1.2. Induction de la schistosomiase digestive chez la souris.....	84
1.3. Le cycle artificiel de <i>S. mansoni</i> .....	85
2. PROTOCOLE D'IRM <i>IN VIVO</i> .....	91
2.1. Instrumentation .....	91
2.2. Etude pilote pour la mise au point du protocole d'IRM abdominale <i>in vivo</i> .....	92
2.3. Organisation de l'étude .....	96
2.4. Protocole d'IRM abdominale <i>in vivo</i> .....	97
2.4.1. Préparation des animaux en vue de l'IRM.....	97
2.4.2. Synchronisation des IRM sur la respiration .....	99
2.4.3. Séquences d'IRM <i>in vivo</i> .....	101
2.4.4. Méthode d'analyse et de traitement des données IRM.....	107
2.4.4.1. Analyse des images anatomiques : identification des lésions et volumétrie des organes ...	107
2.4.4.2. Analyses quantitatives des cartes $T_2$ et $T_2^*$ .....	108
2.5. Relaxométrie de solutions de collagène.....	109
2.6. Histologie hépatique.....	109
2.7. Analyses statistiques.....	112
<b>RESULTATS .....</b>	<b>113</b>
1. SUIVI CLINIQUE DES SOURIS .....	113
2. IMAGERIE ANATOMIQUE DU FOIE.....	114
3. IMAGERIE ANATOMIQUE DE LA RATE.....	116
3.1. Aspect radiologique de la rate .....	116
3.2. Volumétrie de la rate .....	118
3.3. Analyse du diamètre maximal de la section de la veine porte.....	119
3.4. Analyse de l'aire de la section de la veine porte .....	119
4. RELAXOMETRIE .....	120
4.1. Cartographie du $T_2$ dans le foie.....	120
4.2. Cartographie du $T_2^*$ dans le foie.....	123
4.3. Relaxométrie <i>in vitro</i> de solutions de collagène .....	125
5. HISTOLOGIE HEPATIQUE.....	126

5.1.	<i>Principaux résultats</i> .....	126
5.2.	<i>Évaluation de la fibrose hépatique</i> .....	129
5.2.1.	Superficie du marquage au rouge Sirius .....	129
5.2.2.	Scores METAVIR.....	129
5.2.3.	Corrélation entre composants du score METAVIR et pourcentage de tissu hépatique marqué au rouge Sirius	130
5.2.4.	Corrélation entre le nombre de granulomes et le pourcentage de tissu hépatique positif au rouge Sirius	132
6.	CORRELATIONS ENTRE DONNEES DE RELAXOMETRIE ET D'HISTOLOGIE HEPATIQUE .....	133
6.1.	<i>Corrélation entre le paramètre <math>T_2</math> et le nombre de granulomes</i> .....	134
6.2.	<i>Corrélation entre le paramètre <math>T_2</math> et le score d'inflammation</i> .....	134
6.3.	<i>Corrélation entre le paramètre <math>T_2</math> et le score de fibrose</i> .....	135
6.4.	<i>Corrélation entre le paramètre <math>T_2</math> et le score METAVIR</i> .....	136
6.5.	<i>Corrélation entre le paramètre <math>T_2</math> et le pourcentage de l'aire marquée au rouge Sirius</i> .....	137
7.	SYNTHESE DES CORRELATIONS.....	139
<b>DISCUSSION</b> .....		<b>141</b>
1.	APPORT DES RESULTATS.....	141
1.1.	<i>Evaluation de l'organomégalie hépatosplénique du modèle bilharzien</i> .....	141
1.2.	<i>Détection de l'inflammation granulomateuse par imagerie anatomique</i> .....	142
1.3.	<i>Détection de signes d'hypertension portale dans le modèle bilharzien par IRM</i> .....	142
1.4.	<i>Evaluation de la fibrose hépatique bilharzienne par IRM quantitative de relaxométrie</i> .....	143
2.	LIMITES DE L'ETUDE .....	147
2.1.	<i>Nombre d'animaux, groupes, temps d'infection et modèle retenu</i> .....	147
2.2.	<i>Précision des paramètres utilisés pour l'imagerie anatomique</i> .....	149
2.3.	<i>Cartographie <math>T_2</math> et histologie du foie non exhaustives de l'organe</i> .....	149
2.4.	<i>Adaptation de méthodes histologiques non spécifiques de la bilharziose</i> .....	149
3.	PERSPECTIVES.....	150
3.1.	<i>Poursuite de travaux avec la méthodologie développée</i> .....	150
3.2.	<i>Combiner les approches IRM avec des méthodes élastométriques</i> .....	152
3.3.	<i>Transfert du marqueur relaxométrique de fibrose à l'Homme</i> .....	152
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>153</b>
<b>PUBLICATIONS</b> .....		<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>157</b>
<b>ANNEXES</b> .....		<b>165</b>
1.	PUBLICATIONS DES RESULTATS .....	165
2.	COMMENTAIRE SUR NOTRE ARTICLE DE RECHERCHE.....	187
3.	REVUE DE LITTERATURE A SOUMETTRE .....	191



# Table des figures

Figure 1 : Distribution globale de la schistosomiase en 2017 .....	23
Figure 2 : Exemple de lieu propice à la transmission de la bilharziose dans un village de pêcheurs ougandais .....	24
Figure 3 : Theodore BILHARZ, le découvreur du schistosome.....	25
Figure 4 : Distribution géographique des espèces de schistosomes dans le monde .....	26
Figure 5 : Cycle de la Bilharziose ou schistosomiase selon les espèces du parasite.....	29
Figure 6 : Schéma général du système digestif humain.....	31
Figure 7 : Vascularisation hépatique et système biliaire .....	32
Figure 8 : Schéma de la circulation porte hépatique.....	33
Figure 9 : Les segments hépatiques selon Couinaud .....	34
Figure 10 : Représentation d'un lobule hépatique dans le système vasculaire hépatique.....	35
Figure 11 : Schéma illustratif des varices formées suite à l'hypertension portale dans la schistosomiase hépatosplénique .....	39
Figure 12 : Schéma du développement de la fibrose hépatique bilharzienne.....	42
Figure 13 : Motifs (patterns) hépatiques typiques basés sur la classification de Niamey et observés dans l'infection à <i>S. mansoni</i> par échographie sur une vue oblique droite.....	53
Figure 14 : Schéma anatomique des organes abdominaux chez la souris.....	66
Figure 15 : Schéma anatomique des lobes hépatiques chez la souris .....	66
Figure 16 : Représentation du moment magnétique spin d'un proton .....	71
Figure 17 : Orientations aléatoires des spins en l'absence de champ magnétique externe $B_0$ .....	72
Figure 18 : Orientations des spins lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique $B_0$ .....	73
Figure 19 : Précession d'un spin et fréquence de Larmor $\omega_0$ .....	73
Figure 20 : Transition d'un spin du point de vue énergétique lorsqu'il est excité par une onde de radiofréquence et condition de résonance.....	74
Figure 21 : Bascule de l'aimantation macroscopique lorsque les protons sont excités par une onde radiofréquence.....	74
Figure 22 : Repousse de l'aimantation longitudinale avec le temps de relaxation $T_1$ lors du retour à l'équilibre.....	75
Figure 23 : Décroissance de l'aimantation transverse avec le temps de relaxation $T_2$ lors du retour à l'équilibre.....	75
Figure 24 : Mesure du signal de précession lors de la décroissance libre de l'aimantation transversale avec le temps de relaxation $T_2^*$ .....	77

Figure 25 : Modélisations de courbes de décroissance des signaux T <sub>2</sub> et T <sub>2</sub> * calculées à l'aide des points expérimentaux obtenus par relaxométrie du foie de souris à 11,75T.....	78
Figure 26 : Comparaison des courbes de poids entre souris CBA/J femelles et mâles d'après Janvier-Labs.....	84
Figure 27 : Infection percutanée par <i>S. mansoni</i> d'une souris CBA/J anesthésiée...	85
Figure 28 : Cycle artificiel de <i>S. mansoni</i> utilisant la souris comme hôte définitif...	86
Figure 29 : Dispositif d'élevage des mollusques pour le maintien de <i>S. mansoni</i> ....	86
Figure 30 : Foies et rate de souris infectées par <i>S. mansoni</i> .....	88
Figure 31 : Matériel de récupération des œufs et infection des mollusques avec des miracidés de <i>S. mansoni</i> .....	89
Figure 32 : Salle d'imagerie préclinique au CRMBM.....	92
Figure 33 : Images évocatrices d'un ascite dans l'abdomen d'une souris 10 semaines après infection par 150 cercaires de <i>S. mansoni</i> .....	96
Figure 34 : Schéma général de l'étude du suivi de l'infection à <i>S. mansoni</i> chez la souris.....	97
Figure 35 : Sonde et berceau dédiés à l'imagerie de la souris (système « corps entier »).....	97
Figure 36 : Dispositif d'anesthésie à l'isoflurane pour souris.....	98
Figure 37 : Contrôle de la fréquence respiratoire d'une souris anesthésiée.....	99
Figure 38 : Principe de fonctionnement de l'outil PC-SAM pour la synchronisation respiratoire chez la souris .....	100
Figure 39 : Positionnement des coupes d'imagerie anatomique pondérée en T1 couvrant le foie sur une image de repérage (tripilote ou localizer, vue coronale) .....	101
Figure 40 : Schéma de la séquence d'écho de spin (RARE) utilisée en imagerie anatomique.....	102
Figure 41 : Schéma de la séquence multi-coupes multi-échos (MSME) utilisée pour la cartographie du T2.....	103
Figure 42 : Schéma de la séquence d'écho de gradient multi-échos (MGE) utilisée pour la cartographie du T2*.....	104
Figure 43 : Position de la tranche pour les cartographies T2 et T2* .....	105
Figure 44 : Déroulement chronologique d'une expérience IRM lors de l'étude ....	106
Figure 45 : Exemple d'un diamètre de Feret sur une section de veine porte .....	108
Figure 46 : Régions d'intérêt (ROI) pour l'analyse des cartes T <sub>2</sub> et T <sub>2</sub> *.....	109
Figure 47 : Délimitation semi-automatique du marquage histologique au rouge Sirius.....	111
Figure 48 : Évolution du poids chez les souris infestées et les souris contrôles ...	114
Figure 49 : Images caractéristiques du foie dans la bilharziose murine.....	115
Figure 50 : Comparaison des volumes hépatiques chez les souris atteintes de schistosomiase et les souris contrôles.....	116
Figure 51 : Images caractéristiques de la rate dans la bilharziose murine.....	117
Figure 52 : Dilatation de la veine splénique chez une souris infectée.....	117

Figure 53 : Comparaison des volumes spléniques mesurés par IRM chez les souris atteintes de schistosomiase digestive et les souris contrôles.....	118
Figure 54 : Diamètre maximum de la veine porte mesuré par IRM dans le modèle de schistosomiase digestive et les souris contrôles.....	119
Figure 55 : Aire de la section de la veine porte mesurée par IRM dans les souris atteintes de schistosomiase digestive et chez les souris contrôles.....	120
Figure 56 : Comparaison des cartographies du T <sub>2</sub> d'un foie sain et d'un foie bilharzien à 10 semaines d'infection.....	121
Figure 57 : Comparaison de la distribution des valeurs T <sub>2</sub> des foies sains et des foies bilharziens à 10 semaines après l'infection .....	122
Figure 58 : Co-localisation des pixels correspondant à des valeurs de T <sub>2</sub> supérieures à 16 ms avec les hyper-intensités après injection de Gd-DOTA visibles en imagerie anatomique .....	122
Figure 59 : Comparaison des fractions d'aire hépatique en pourcentages ayant des valeurs de T <sub>2</sub> supérieures à 16 ms .....	123
Figure 60 : Comparaison des cartographies du T <sub>2</sub> * d'un foie sain et d'un foie bilharzien à 10 semaines d'infection.....	124
Figure 61 : Distribution des valeurs de T <sub>2</sub> * du foie dans le modèle murin à 10 semaines après l'infection.....	125
Figure 62 : Mesures <i>in vitro</i> des temps de relaxation T <sub>1</sub> et T <sub>2</sub> de solutions de collagène.....	125
Figure 63 : Parasite de <i>S. mansoni</i> adulte observé en histologie .....	126
Figure 64 : Granulomes centrés sur des œufs de <i>S. mansoni</i> observés en histologie .....	127
Figure 65 : Nécrose hépatocytaire observée en histologie .....	127
Figure 66 : Fibrose péri-portale inter-granulomateuse observée en histologie ...	128
Figure 67 : Pigments observés par histologie par coloration de Perl's dans les macrophages granulomateux.....	129
Figure 68 : Corrélation entre le grade d'inflammation Ax du score METAVIR et la surface marquée au rouge de Sirius .....	130
Figure 69 : Corrélation entre le grade de fibrose Fx du score METAVIR et la surface marquée au rouge de Sirius.....	131
Figure 70 : Corrélation entre le code METAVIR et le pourcentage de surface hépatique marquée au rouge Sirius.....	132
Figure 71 : Corrélation entre le nombre de granulomes et la surface marquée au rouge Sirius.....	133
Figure 72 : Corrélation entre le nombre de granulomes et le T <sub>2</sub> .....	134
Figure 73 : Analyse de la corrélation entre le score d'inflammation et le T <sub>2</sub> .....	135
Figure 74 : Analyse de la corrélation entre le score de fibrose et le T <sub>2</sub> .....	136
Figure 75 : Analyse de la corrélation entre le score METAVIR et le paramètre T <sub>2</sub>	137
Figure 76 : Corrélation entre la fibrose marquée au rouge Sirius et le signal T <sub>2</sub> ..	138



# Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales des modalités d'imagerie médicale abdominale utilisées en clinique.....	50
Tableau 2 : Intérêts des modalités d'imagerie abdominales pour le suivi de la schistosomiase digestive .....	61
Tableau 3 : Etudes ayant exploité l'élastométrie pour l'évaluation de la fibrose hépatique bilharzienne .....	64
Tableau 4 : Etudes d'imagerie précliniques de la pathologie digestive bilharzienne .....	70
Tableau 5 : Pondérations en RMN selon le TR et le TE .....	77
Tableau 6 : Ordres de grandeur des temps de relaxation $T_1$ et $T_2$ selon les tissus à 3T .....	78
Tableau 7 : Composition de la solution stock d'eau douce artificielle (10x).....	87
Tableau 8 : Récapitulatif des paramètres optimisés au cours de l'étude pilote.....	95
Tableau 9 : Variation du TR effectif en fonction de la fréquence respiratoire lors de la synchronisation respiratoire .....	101
Tableau 10 : Synthèse du protocole IRM employé lors de l'étude.....	106
Tableau 11 : Conversion du code METAVIR en un code numérique.....	132
Tableau 12: Synthèse des corrélations de Spearman de l'étude .....	139



# Liste des abréviations

AC : Agent de Contraste

BPM : Breaths Per Minute (Respirations par minute)

CEH : Cellule Étoilée Hépatique

CHC : Carcinome Hépato-Cellulaire

CT : Contrôle

ERM : Elastographie par Résonance Magnétique

EUS : Échographie Ultra-Sonore

FMT : Fluorescence Molecular Tomography (Tomographie par fluorescence moléculaire)

FOV: Field Of View (Champ de vue)

GPSH : Gradient de pression Porto-cave Sus Hépatique

HCC : Hépatite C Chronique

HE : Hématoxyline-Eosine

HTP : Hypertension Portale

IL : Interleukine

ip : Intrapéritonéal

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

iv : Intraveineux

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MGE : Multi Gradient Echo (Gradient multi échos)

MMP : Métalloprotéase matricielle

MRH : Mesure de la Rigidité Hépatique

MSME : Multi Slice Multi Echo (Multi coupes multi échos)

RARE : Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (Acquisition rapide avec renforcement de la relaxation)

NK : Natural Killer (Tueuse Naturelle)

RF : Radio Fréquence

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROI : Region Of Interest (Région d'intérêt)

SPECT: Single-Photon Emission Computed Tomography (Tomoscintigraphie)

TDM : Tomodensitométrie

TE : Temps d'Écho

TEP : Tomographie par Émission de Positons

TIMP : Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéases

TR : Temps de Répétition

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VP : Veine Porte

# INTRODUCTION

## 1. La Bilharziose ou schistosomiase hépatosplénique

### 1.1. Épidémiologie générale

Présente dans une grande partie des pays tropicaux et sub-tropicaux, la schistosomiase ou bilharziose, est la seconde maladie parasitaire la plus fréquente dans le monde après le paludisme. Elle affecterait plus de 240 million de personnes dans 52 à 78 pays selon les sources et près de 800 millions de personnes seraient à risque de contracter la maladie (1). Elle causerait chaque année entre 24 000 et 200 000 décès (2). Cette pathologie qui peut être très invalidante et à l'origine de retard développemental chez l'enfant, a un impact socio-économique majeur puisque le nombre d'années de vies perdues ajustées sur l'incapacité serait presque égal à celui de l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et pourrait dépasser celui du paludisme ou de la tuberculose (3-5). La maladie présente une prévalence modérée (entre 10% et 50%) à élevée (supérieure à 50%) en Afrique subsaharienne et Madagascar, en Amérique du sud, en Asie du sud-est et au moyen orient (Figure 1).

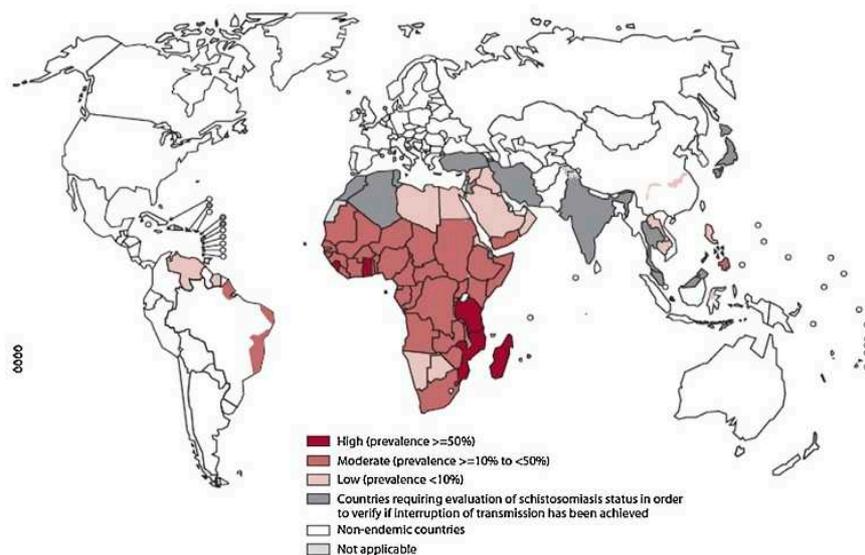


Figure 1 : Distribution globale de la schistosomiase en 2017

Source: Ross AG et al. A new global strategy for the elimination of schistosomiasis. *Int J Infect Dis.* 2017; 54:130-7.

La Bilharziose est une maladie liée à la pauvreté. Elle résulte de la concomitance de plusieurs facteurs tels qu'un accès limité ou inexistant aux installations sanitaires et à une eau non contaminée pour la boisson et l'usage domestique, et des conditions écologiques et climatiques favorables à la survie de l'hôte intermédiaire nécessaire au développement du parasite. Les pêcheurs, les enfants jouant dans l'eau, ou les femmes récupérant de l'eau pour les besoins domestiques sont particulièrement exposés à cette parasitose (Figure 2). La schistosomiase se rencontre principalement dans les pays en voie de développement mais elle affecte également les voyageurs traversant des zones endémiques ainsi que les migrants originaires de ces régions. En effet, il suffit d'une seule exposition à de l'eau infectée lors d'activités de loisir (baignade, rafting, kayak, canyoning...) ou professionnelles (travaux sur un pont par exemple) pour contracter le parasite. Une recrudescence de cas importés a été rapportée en Europe notamment, en lien avec le tourisme, la migration, et l'expatriation (6). Cette maladie concerne également les militaires qui opèrent dans ces régions (7). La bilharziose, considérée comme une pathologie tropicale, a connu des foyers historiques dans les régions méditerranéennes d'Europe et une ré-émergence de la forme urinaire a été récemment rapportée en Corse (8, 9).



Figure 2 : Exemple de lieu propice à la transmission de la bilharziose dans un village de pêcheurs ougandais

*Zone d'embarquement et débarquement de pêcheurs dans un village d'Ouganda (région du West-Nile sur les rives du lac Albert) touché par la schistosomiase digestive. Source : archives personnelles.*

## 1.2. Le parasite

### 1.2.1. Généralités

Le parasite responsable de la schistosomiase est un plathelminthe hématophage. Il s'agit d'un phylum d'animaux qui se présentent sous forme de vers plats. Les parasites responsables de la bilharziose sont de la classe des trématodes et du genre *Schistosoma* (schistosomes). Bien que l'affection soit connue depuis le 16<sup>ème</sup> siècle, le ver du parasite responsable de l'infection n'a été décrit pour la première fois chez l'Homme qu'en 1851 par le médecin allemand Theodore BILHARZ lors d'un examen post-mortem en Egypte (10). Le médecin écossais Patrick MANSON a été quant à lui le premier à suggérer, en 1902, l'existence de plusieurs espèces de schistosomes en décrivant les oeufs contenus dans des selles humaines (Figure 3).



Figure 3 : Theodore BILHARZ, le découvreur du schistosome

Source: Tan SY et al. Discoverer of schistosomiasis. Singapore Med J. 2007; 48 (3): 184

### 1.2.2. Les différentes espèces de schistosomes

Chacune des sept espèces du parasite qui infecte l'Homme (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma guineensis* et *Schistosoma malayensis*) a un tropisme préférentiel pour un hôte intermédiaire donné et un ou plusieurs organes en particulier dans l'hôte définitif. *S. mansoni* et *S. haematobium* sont les deux principales espèces infectant les humains. *S. mansoni* est le premier agent responsable de la forme digestive de la maladie chez l'Homme. Les formes digestives sont aussi causées par *S. mekongi* et *S. intercalum* (1). Les formes génito-urinaires sont causées essentiellement par *S. haematobium*. Enfin, certaines espèces de

schistosomes comme *S. japonicum* vont engendrer des formes mixtes. *S. mansoni* et *S. haematobium* sont présents en Afrique sur de vastes étendues géographiques qui se superposent en partie, tandis que *S. intercalum* est retrouvé dans des zones plus localisées du centre et de l'ouest africain (Figure 4). L'Afrique subsaharienne a la plus forte endémicité et la plus forte morbidité. *S. mansoni* est l'unique espèce retrouvée aux Amériques, elle a été importée lors des mouvements de population historiques engendrés par le commerce triangulaire. *S. japonicum* est présente en Asie de l'est et du sud-est (Chine, Philippines et Indonésie) avec *S. Mekongi* qui se retrouve quant à lui sur les abords du fleuve Mékong.

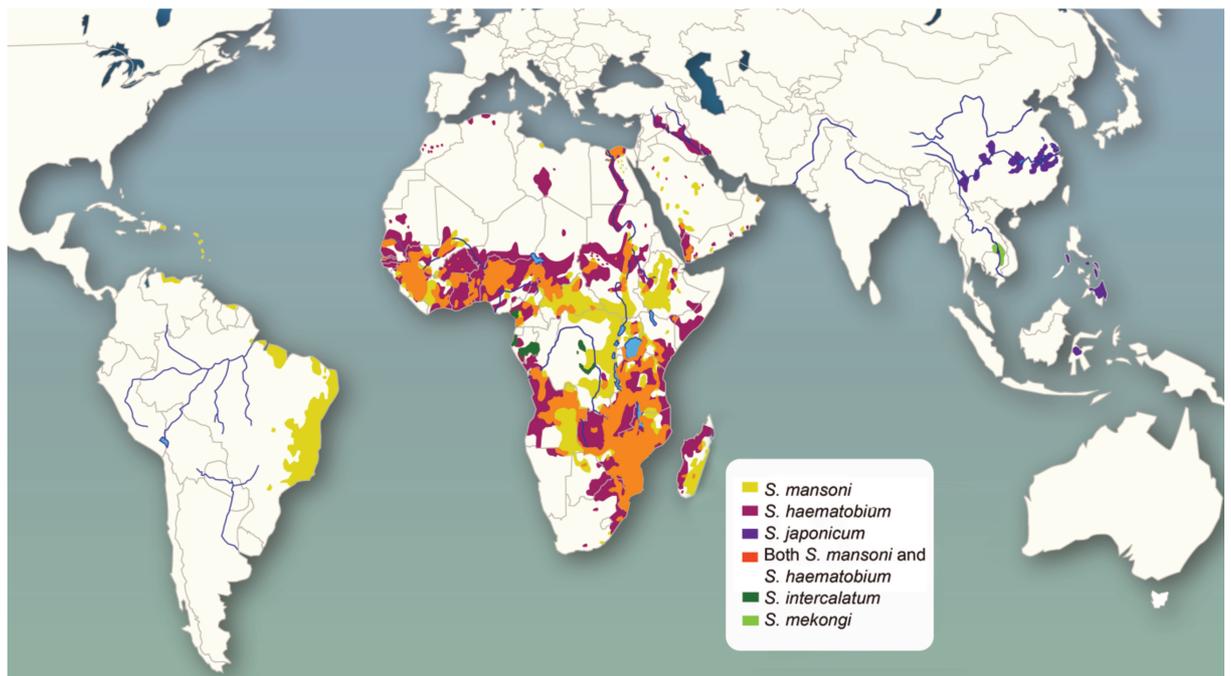


Figure 4 : Distribution géographique des espèces de schistosomes dans le monde

Source : Weerakoon KG et al. *Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. Clinical Microbiology Reviews.* Jul 2015, 28 (4) 939-967

## 1.3. Hôtes et cycle parasitaire

### 1.3.1. Les hôtes du schistosome

#### 1.3.1.1. L'hôte intermédiaire

Les différentes espèces ont en commun d'avoir un hôte intermédiaire obligatoire et un hôte définitif. L'hôte intermédiaire est un mollusque aquatique d'eau douce vivant dans les eaux calmes des lacs, des rivières, des vasques, etc. Chaque espèce de schistosome a un hôte intermédiaire privilégié, *S. haematobium* infecte les espèces du genre *Bulinus*, *S. mansoni* infecte le genre *Biomphalaria* (*B. pfeifferi* en Afrique et *B. glabrata* en Amérique le plus fréquemment), *S. japonicum* le genre *Oncomelania*, *S. mekongi* les *Neotricula* et *S. intercalatum* les espèces de *Bulinus* (Figure 5). Ces hôtes intermédiaires ont la particularité commune d'avoir un mode de reproduction apparié ou hermaphrodite et un individu produirait 10 millions de descendants en 3 mois (11). Infectés, les mollusques ont une espérance de vie réduite à environ 5 mois et seraient plus sensibles aux conditions environnementales défavorables ainsi qu'aux molluscicides (12).

#### 1.3.1.2. L'hôte définitif

Les hôtes dits définitifs des schistosomes sont des vertébrés. Généralement, il s'agit de mammifères dont l'Homme. Certains schistosomes ne sont pas exclusifs de l'hôte humain, et des animaux peuvent également être infectés et servir de réservoir (10). C'est le cas du bétail domestique comme par exemple les cochons, les chèvres ou les veaux (13). La bilharziose peut aussi affecter les chats, les chiens et les rongeurs. La schistosomiase est donc une zoonose.

### 1.3.2. Le cycle de vie naturel du parasite

Les parasites ont pour hôte intermédiaire des gastéropodes aquatiques et pour hôtes finaux les vertébrés. Le gastéropode est infecté par des miracides (*miracidia*) libérées par les œufs des schistosomes. Les miracides se reproduisent asexuellement deux fois (1) dans l'hôte intermédiaire pour former des formes sporocystes du parasite. Les parasites sont expulsés, en majorité la journée entre 11 heures et 17 heures (12), avec la salive du gastéropode environ 30 jours après son infection sous formes de cercaires (*cercariae*), la forme larvaire infectante. Les cercaires peuvent survivre 1 à 3 jours dans l'eau (14), dans laquelle ils se déplacent à l'aide de leur queue motrice. Lorsqu'ils entrent en contact avec l'hôte final, les cercaires sont

capables de perforer la peau du mammifère et de la traverser grâce à leur queue et ainsi de les infecter. A ce stade les parasites perdent leur queue, et se transforment en schistosomules (*schistosomula*). Après passage dans les capillaires et le système lymphatique, les schistosomules migrent dans la circulation sanguine. Ils traversent le cœur droit, les poumons puis rejoignent pour la plupart le foie au travers de la grande circulation afin d'opérer une phase de maturation. Cette maturation des schistosomules aboutit à la différenciation en vers mâles et femelles matures capables de reproduction sexuée après appariement en copula. Les couples migrent alors à contre-courant et rejoignent le réseau veineux mésentérique de l'intestin ou de la vessie où ils se reproduisent. Entre la quatrième et la sixième semaine d'infection pour *S. mansoni* et *S. japonicum*, et après 13 semaines environ pour *S. haematobium* (1), les schistosomes commencent à produire des œufs, en moyenne 300 par jour par femelle fécondée (14), qui pour la plupart vont perforer les parois intestinales ou urinaires et être excrétés dans l'environnement. Cette élimination hors de l'hôte définitif assure la continuité du cycle du parasite (14-16) (Figure 5). Une partie des œufs reste néanmoins piégée dans les tissus de l'hôte et pourra être à l'origine de pathologies chroniques et de complications sévères. Une fois dans l'eau douce, les œufs, d'une taille moyenne de 100 à 150 µm selon les espèces, peuvent survivre une à deux semaines avant d'éclore et infecter de nouveaux intermédiaires (14). Les vers adultes mesurent en moyenne 8 mm et peuvent quant à eux vivre chez l'hôte définitif plusieurs dizaines d'années, le record étant de 37 ans (14).

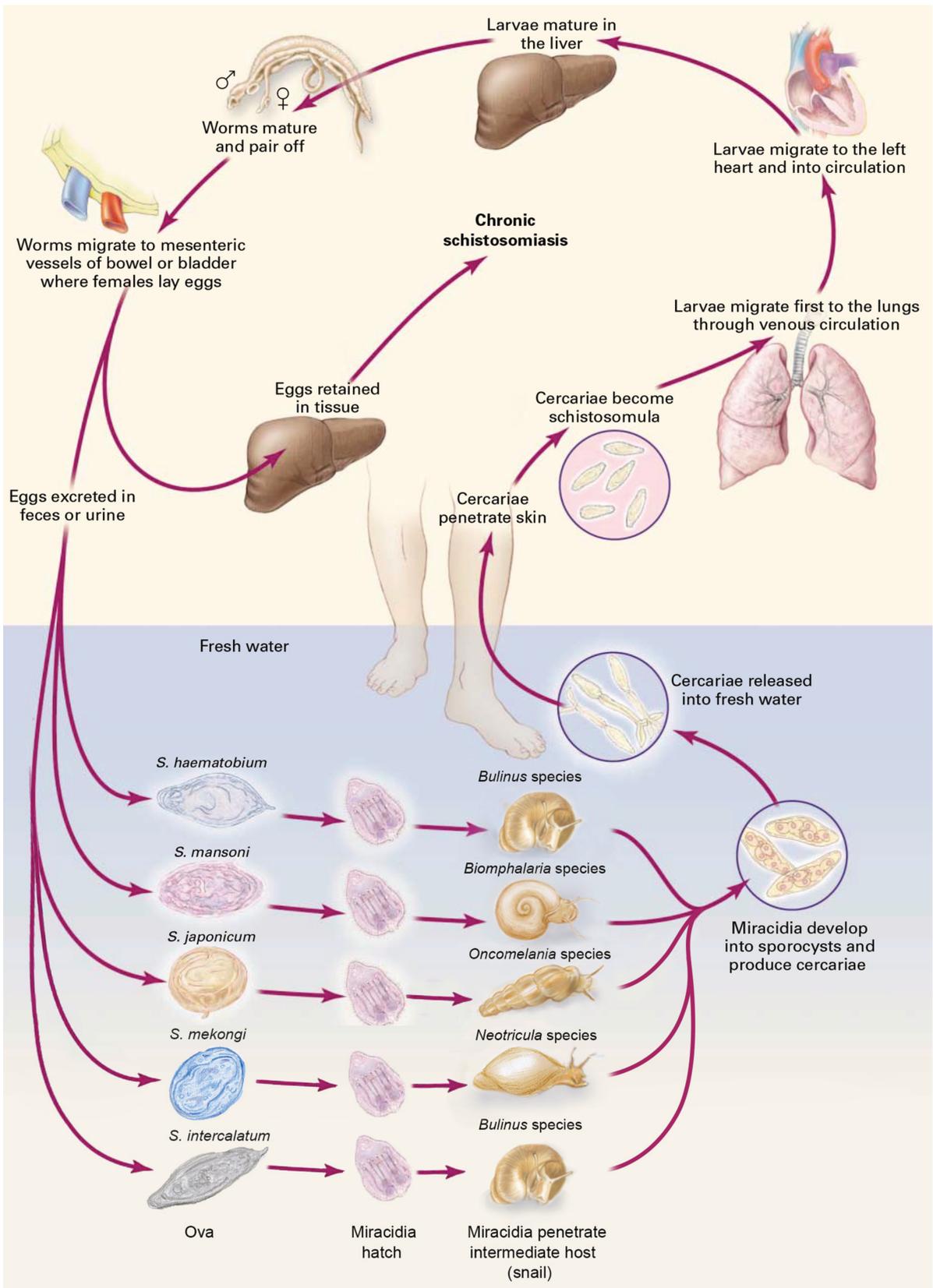


Figure 5 : Cycle de la Bilharziose ou schistosomiase selon les espèces du parasite

Source : Weerakoon KG et al. *Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. Clinical Microbiology Reviews.* Jul 2015, 28 (4) 939-967

## 1.4. Physiopathologie de la bilharziose digestive

### 1.4.1. Quelques rappels sur le foie

#### 1.4.1.1. Anatomie des systèmes digestif et hépatique

- **Description générale du foie**

Le foie est un organe du système digestif, il est le plus volumineux du corps humain et aussi la plus grosse glande pour un poids moyen de 1,2 à 1,5 kg (17). Il est localisé dans la cavité abdominale, du côté droit. Il occupe l'hypochondre droit, l'épigastre, une partie de l'hypochondre gauche et du flanc droit. Le foie présente deux faces, la première est la face diaphragmatique qui est concave et lisse, la seconde face est celle viscérale qui est plane avec des replis et fissures à sa surface. Il se situe en dessous du diaphragme et est en partie protégé par la cage thoracique. Le foie est majoritairement enveloppé par le péritoine. L'innervation hépatique se fait par trois systèmes différents, le système orthosympathique, le système parasympathique avec les nerfs vagues droit et gauche, et le système sensitif provenant du nerf phrénique. Le foie est divisé en quatre lobes chez l'Homme. Ces lobes sont le lobe droit et le lobe gauche pour les plus grands et les lobes carré et caudal. Les lobes droit et gauche sont séparés par le ligament falciforme qui est un reliquat du cordon ombilical.

- **Les autres organes digestifs en rapport avec le foie**

Le foie est en rapport avec d'autres organes du système digestif (Figure 6). Les canaux cholédoque (transportant la bile) et pancréatique se rejoignent pour déverser leurs sucs dans le duodénum au niveau de l'ampoule de Vater. Le foie est également lié par un vaste réseau veineux appelé système porte à la rate, au pancréas et à la quasi-totalité du tube digestif (œsophage, estomac, duodénum, intestin grêle et colon). L'œsophage est un muscle lisse tubulaire qui permet de conduire les aliments venant de la bouche vers l'estomac. L'estomac est une poche musculaire nécessaire à la digestion du bol alimentaire. Les aliments mâchés y sont brassés et soumis à un pH très acide (compris entre 1,5 et 5) et sont déversés dans le duodénum. L'assimilation des nutriments débute au niveau de l'intestin grêle faisant suite au duodénum. Cette partie mesure en moyenne 6 m. La fin de la digestion se fait ensuite dans le gros intestin appelé aussi colon puis se finit dans le colon sigmoïde et le rectum avant la défécation à travers l'anus.

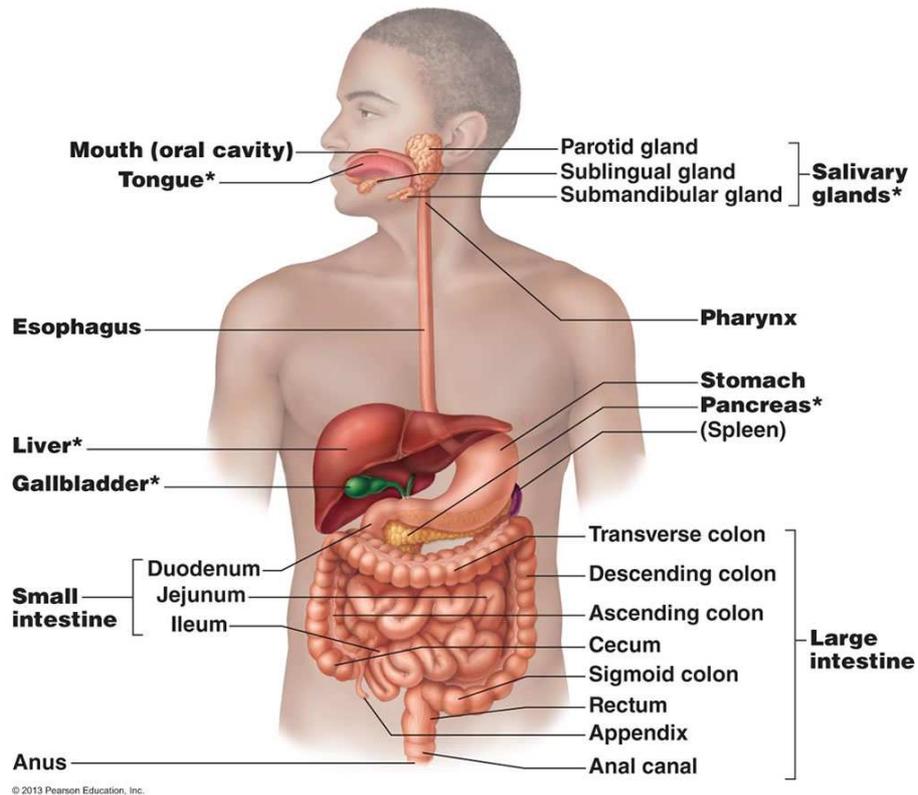


Figure 6 : Schéma général du système digestif humain

Source : Marieb EN et al. *Human Anatomy & Physiology*, 2013 Pearson Education, Inc.

- **La vascularisation hépatique**

Le foie a la particularité d'être vascularisé par deux systèmes veineux. Le premier est celui de la circulation systémique ou grande circulation que l'on retrouve dans tous les organes. Ce système comporte trois veines principales, la veine hépatique droite, la veine hépatique gauche et la veine hépatique médiane (Figure 7).

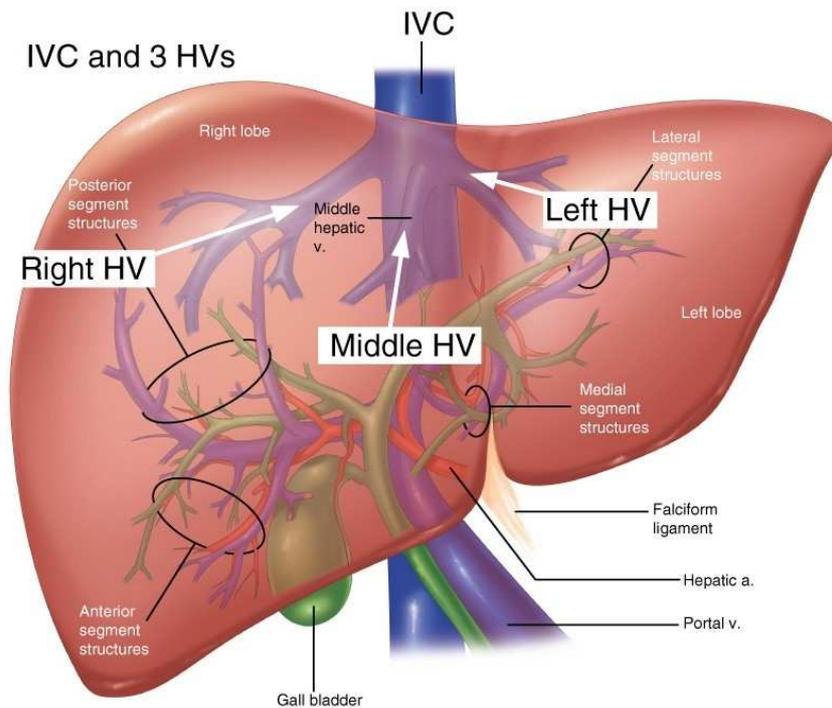


Figure 7 : Vascolarisation hépatique et système biliaire

*IVC= Veine Cave Inférieure, HV= Veine Hépatique. Source: Brunicaud FC et al. Schwartz's Principles of Surgery, 9th Edition: <http://www.accessmedicine.com>*

Ces veines se rejoignent pour irriguer la veine cave inférieure. Le second réseau de veines apporte du sang dans le foie. Ce sang provient des veines du système digestif (veine pancréatique, veines mésentériques supérieure et inférieure) et d'autres régions ou organes de l'abdomen (veines gastriques, veines ombilicale et veine splénique) (Figure 8). Le sang converge ensuite dans la veine porte qui se divise ensuite dans le foie en rameaux principaux et secondaires. Les artères hépatiques qui amènent le sang riche en dioxygène se divisent parallèlement à la vascularisation portale (Figure 7).

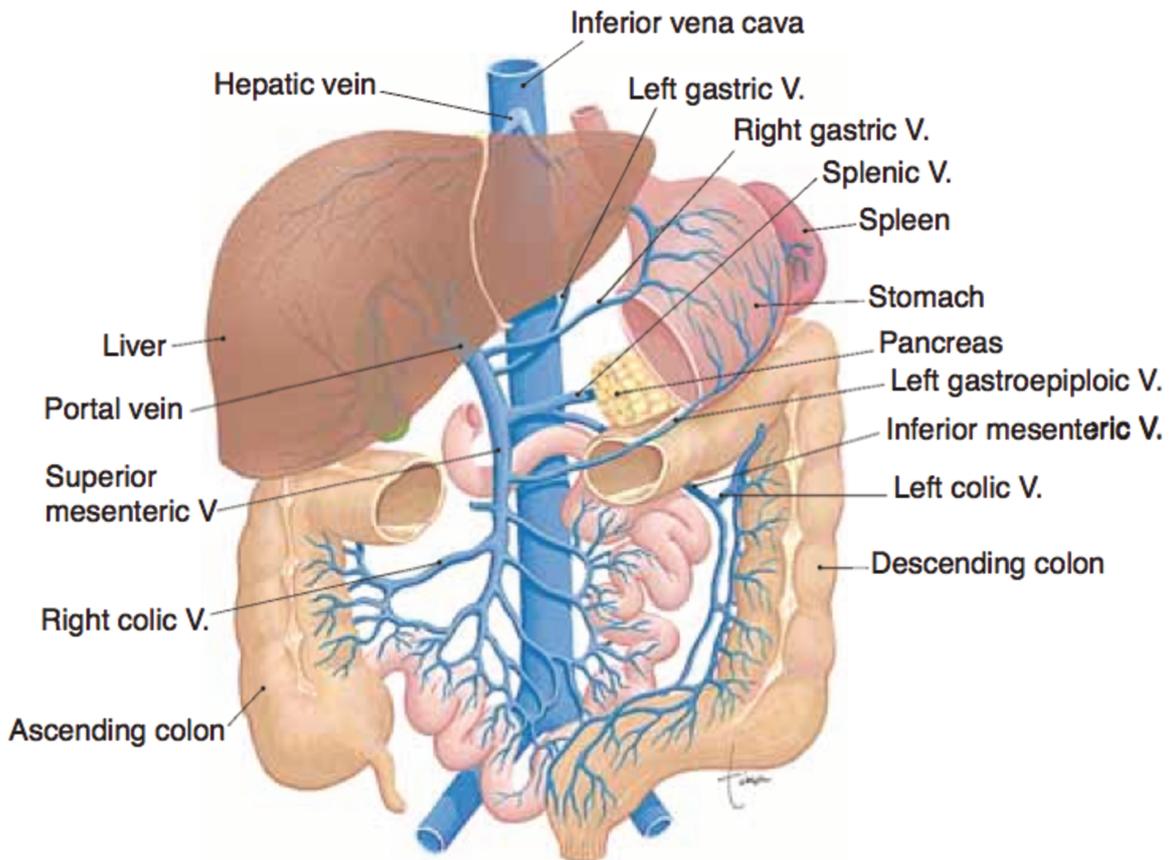


Figure 8 : Schéma de la circulation porte hépatique

Source: Sanders T et al. *Essentials of anatomy and physiology*. 2007, 5th Edition, E.A DAVIS COMPANY, Philadelphia.

- **Le système biliaire**

Le système biliaire permet le stockage de la bile dans la vésicule biliaire et l'évacuation dans l'intestin. Pour cela, la bile produite dans le foie s'écoule dans les canaux biliaires, ces canaux sont jumelés avec les canaux artériels et la veine porte dans le foie (Figure 7). Le flux dans les canaux biliaires est donc en sens inverse du flux sanguin.

- **Segmentation hépatique**

Le foie est divisé anatomiquement en 8 segments hépatiques (Figure 9), ces segments résultent de l'organisation des vaisseaux qui l'irriguent et peuvent être mis à profit lorsqu'une ablation par blocs fonctionnels est nécessaire.

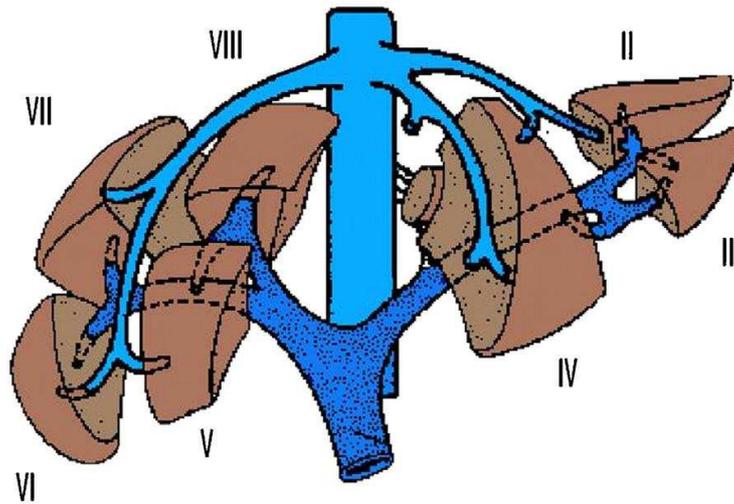


Figure 9 : Les segments hépatiques selon Couinaud

*Source: Couinaud C. Liver anatomy: portal (and supra-hepatic) or biliary segmentation. Dig Surg 1999; 16(6):459—67.*

- **Unités anatomiques et physiologiques du foie**

**Le lobule hépatique** est l'unité structurelle et fonctionnelle du foie, de forme hexaédrique, c'est l'élément central du parenchyme hépatique. Cette unité est organisée autour d'une veine centrale. Le lobule hépatique est un lieu d'échange entre le tissu sanguin et le tissu hépatique au travers de fins capillaires. Le sang provenant du système porte et des artères hépatiques se déverse dans les sinusoides hépatiques avant de rejoindre les capillaires, les veinules puis la veine centrale (Figure 10). Une autre subdivision anatomique du parenchyme hépatique existe, **le lobule porte** se superpose sur plusieurs lobules hépatiques puisque qu'il est organisé avec en son centre la veine du système porte et l'artère qui l'irriguent, en périphérie sont placées les veines centrolobulaires. **L'acinus hépatique** est l'unité la plus fonctionnelle du foie, ses contours sont plus flous car la systématisation a été faite sur une prise en compte physiologique plus qu'anatomique. L'acinus hépatique est à cheval sur deux lobules hépatiques adjacents et comprend les cellules du parenchyme comprises entre des veinules et les artérioles communes (17).

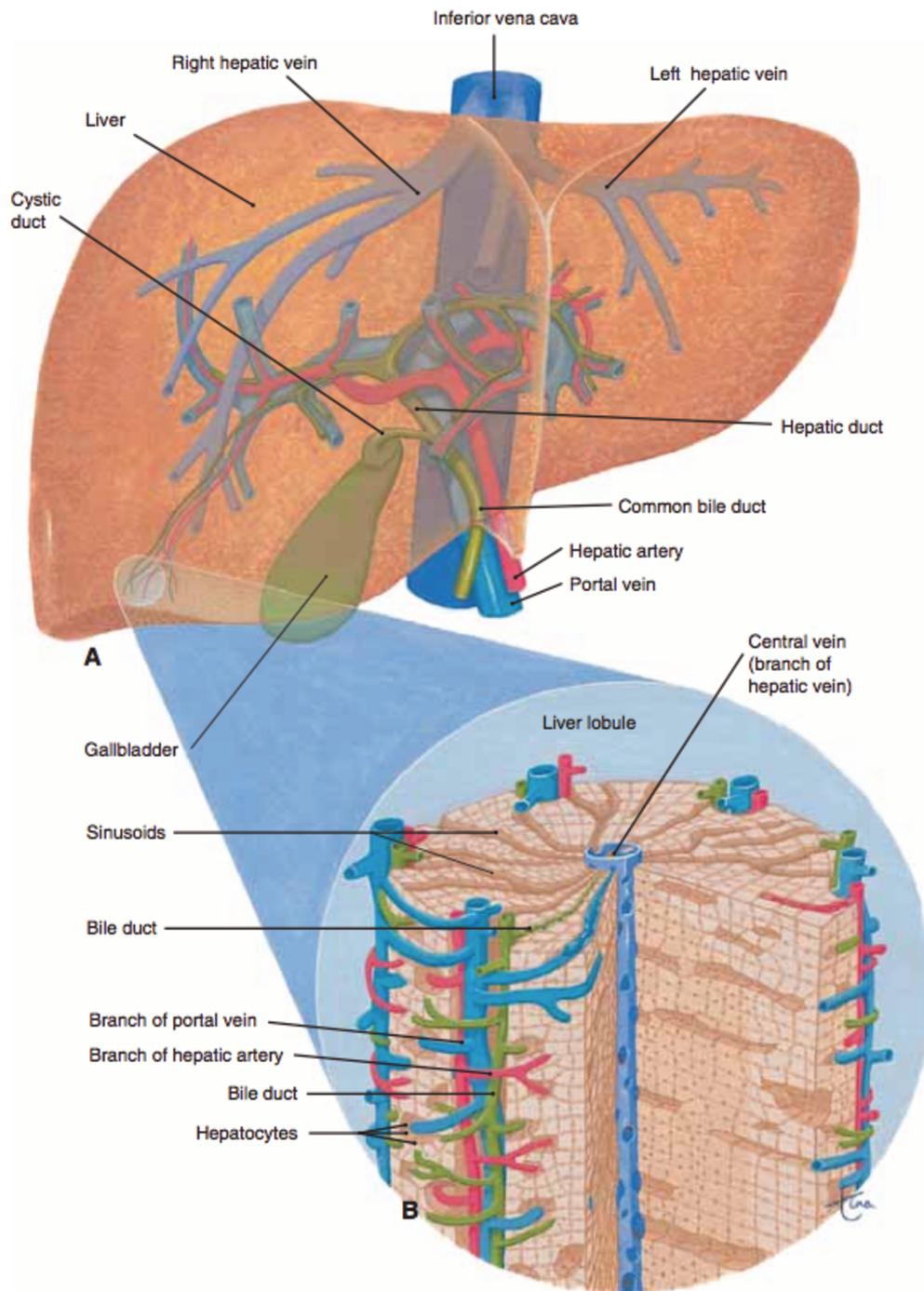


Figure 10 : Représentation d'un lobule hépatique dans le système vasculaire hépatique

Source: Sanders T et al. *Essentials of anatomy and physiology*. 2007, 5th Edition, E.A DAVIS COMPANY, Philadelphia.

- **Les tissus et cellules hépatiques**

Le foie est composé de différents tissus eux-mêmes comportant un type cellulaire prédominant. Les cellules les plus nombreuses dans le foie sont les hépatocytes qui représentent environ 80 % de l'ensemble des cellules hépatiques. Elles sont localisées dans le

parenchyme et assurent les grandes fonctions métaboliques de l'organe. Le foie héberge des cellules de l'immunité comme les cellules de Kupffer qui sont des macrophages, des lymphocytes hépatocytaires et des cellules étoilées (cellules stellaires hépatiques ou cellules d'Ito). Le foie est un organe qui se régénère rapidement et contient des cellules ovales pluripotentes. Les cellules endothéliales qui constituent les parois des sinusoides jouent le rôle de filtre entre le sang et les hépatocytes, cet espace est nommé espace de Disse. Les cholangiocytes sont les cellules du système biliaire. Le bon fonctionnement ou la souffrance de ces cellules jouent un rôle important dans les mécanismes physiopathologiques tels que la fibrose ou le cancer hépatiques.

#### 1.4.1.2. Physiologie hépatique élémentaire

Le foie joue un rôle central dans l'organisme. C'est un organe vital, dont la défaillance hépatique peut entraîner de très graves problèmes de santé voire le décès (18).

- **Rôle de filtre du sang**

Le foie assure la sécurité du sang qui va dans la circulation systémique en contrôlant et en détoxifiant les substances absorbées par le système digestif. Ces substances peuvent venir de toxines, être des hormones circulantes à dégrader ou bien des drogues, le foie étant l'organe de détoxification des xénobiotiques.

- **Sécrétion d'hormones**

Le foie joue un rôle dans de nombreux systèmes hormonaux, tels que l'« insulin-like growth factor » IGF1 et IGF2, l'angiotensine et l'hepcidine (protéine hépatique bactéricide).

- **Rôle dans la digestion et la sécrétion de bilirubine**

La sécrétion de bile est une fonction importante du foie pour la digestion. Les hépatocytes métabolisent un pigment, la bilirubine, nécessaire à la constitution de la bile en plus de sels, de cholestérol, d'électrolytes et d'eau. La bilirubine permet également la destruction des vieilles cellules érythrocytaires (globules rouges).

- **Rôle de stockage**

Le foie est un organe qui stocke du fer sous forme de ferritine, du cuivre, des vitamines (A

ou rétinol dont 95% de la quantité dans le corps est stockée dans le foie (18). Il stocke aussi les vitamines B12, D et K et des sucres sous forme de glycogène. Cette réserve en sucre est nécessaire pour maintenir une glycémie stable lorsque celle-ci diminue entre les repas.

- **Métabolismes intra-hépatiques**

Les graisses sous forme de triglycérides qui arrivent dans le foie peuvent être utilisées après transformation en glycérol ou acides gras libres par hydrolyse afin de produire de l'énergie. Les triglycérides peuvent aussi être libérés sous forme de lipoprotéines dans la circulation sanguine à destination de tissus adipeux.

- **Rôle hémodynamique**

Le foie peut être un lieu de stockage de sang suivant la pression sanguine et cette réserve peut s'avérer utile lors d'hémorragies. Le foie synthétise aussi la prothrombine, le fibrinogène, des produits, des facteurs de coagulation et des vitamines (K et lipophiles comme la vitamine E) qui ont des fonctions hémostatiques. L'albumine et les globulines sont des protéines plasmatiques aussi produites par le foie.

- **Foie et immunité**

Les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie, sont impliquées dans la lutte contre les pathogènes. Elles peuvent par exemple détruire les bactéries circulantes provenant du système digestif. Mais les macrophages ne sont pas les seuls types cellulaires immunitaires dans le foie, on y trouve également des lymphocytes T NK (Natural Killer) en quantités importantes.

## **1.4.2. La Bilharziose hépatosplénique**

La schistosomiase est classée parmi les infections intravasculaires et non intracellulaires contrairement aux hépatites virales. Dans les jours suivant l'infection par les cercaires, une éruption cutanée peut apparaître au site de pénétration. Il existe une forme aiguë de bilharziose pouvant survenir lors des premières semaines après l'infection, aussi appelée fièvre de Katayama. Cette fièvre apparaît par suite de la réponse initiale du système immunitaire de l'hôte à la présence du parasite dans sa forme juvénile. Ce syndrome se caractérise par de la fièvre, des myalgies, des diarrhées sanglantes, des douleurs et une fatigue

intense (16, 19). La schistosomiase aiguë (20) peut être intense chez les personnes immunologiquement naïves comme les voyageurs exposés pour la première fois au parasite, alors qu'elle serait moins intense chez les enfants, surtout ceux dont les mères étaient infectées, et d'une façon générale dans les populations endémiques chroniquement infectées depuis la petite enfance. Certaines formes aiguës très graves peuvent entraîner un décès en quelques semaines. Après cette phase aiguë, des formes pathologiques chroniques, dont l'expression varie en fonction de la localisation des œufs piégés dans les tissus de l'hôte, peuvent apparaître comme la schistosomiase génito-urinaire ou la schistosomiase digestive qui fait l'objet de ce travail. Le schistosome peut avoir des localisations ectopiques comme par exemple dans la forme neurologique moins courante mais très grave appelée neuroschistosomiase. Celle-ci est causée par la présence d'œufs dans le système nerveux central (21). La forme chronique digestive peut se présenter sous une forme intestinale pouvant évoluer vers une complication très sévère appelée schistosomiase hépatosplénique.

L'atteinte hépatosplénique est causée par les œufs pondus par les vers femelles n'ayant pas traversé les parois intestinales et se trouvant entraînés par le flux sanguin du système porte. Ces œufs se retrouvent séquestrés dans la paroi intestinale et les veinules pré-sinusoïdales dans le foie (de 10 à 50%) (14, 15, 22). Ces œufs présentent à leur surface des antigènes qui stimulent la réponse immunitaire de l'hôte. Les œufs se retrouvent ainsi encapsulés à l'intérieur d'un granulome péri-ovulaire qui protégera l'hôte des antigènes toxiques et dont la formation facilitera le passage dans la lumière de l'intestin en vue de l'élimination dans les fèces. Lorsque les œufs sont piégés dans les veinules pré-sinusoïdales, la formation des granulomes est la cause d'une inflammation chronique responsable du développement d'une fibrose progressive (forme de cicatrisation anormale du parenchyme). La fibrose se développe dans les régions périportales et autour des branches secondaires de la veine porte avant de s'étendre plus largement le long des vaisseaux hépatiques portes, autour de la vésicule biliaire puis dans le parenchyme. Dans l'infection par *S. japonicum*, la fibrose hépatique et l'hépatopathie se présentent sous une forme différente de celle causée par *S. mansoni* (23).

Par un principe similaire, la fibrose peut aussi se former dans la paroi intestinale pour *S. mansoni* et dans le tractus génito-urinaire pour *S. haematobium*. Dans la schistosomiase intestinale chronique, c'est la présence de granulomes dans la paroi intestinale qui est responsable de colites, d'ulcération et de la formation de polypes intestinaux (24). Les signes

cliniques associés à la schistosomiase intestinale chronique sont des douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes.

La morbidité de la schistosomiase hépatosplénique est liée à la charge parasitaire, en particulier la quantité d'œufs et à la durée de l'infection sans traitement adéquat. La schistosomiase digestive peut ainsi demeurer asymptomatique pendant une longue période avant d'évoluer vers une forme clinique sévère, la schistosomiase hépatosplénique. L'hépatomégalie (augmentation du volume du foie) apparaît tôt dans la maladie comme conséquence de l'inflammation granulomateuse (15, 16). La schistosomiase hépatosplénique survient 5 à 20 ans après l'infection par les cercaires, elle est caractérisée par une hépatomégalie généralement associée à une splénomégalie, une fibrose hépatique importante, une hypertension portale, parfois un ascite, des varices digestives systémiques généralement oesophagiennes mais aussi gastriques, spléno-rénales, pancréatico-duodénales, voir périombilicales, dont la rupture entraîne des saignements importants et une hématomèse (hémorragie se traduisant par le vomissement de sang) et/ou un méléna (rejet de sang par voie rectale) pouvant entraîner le décès des malades (14, 16, 22, 25, 26) (Figure 11).

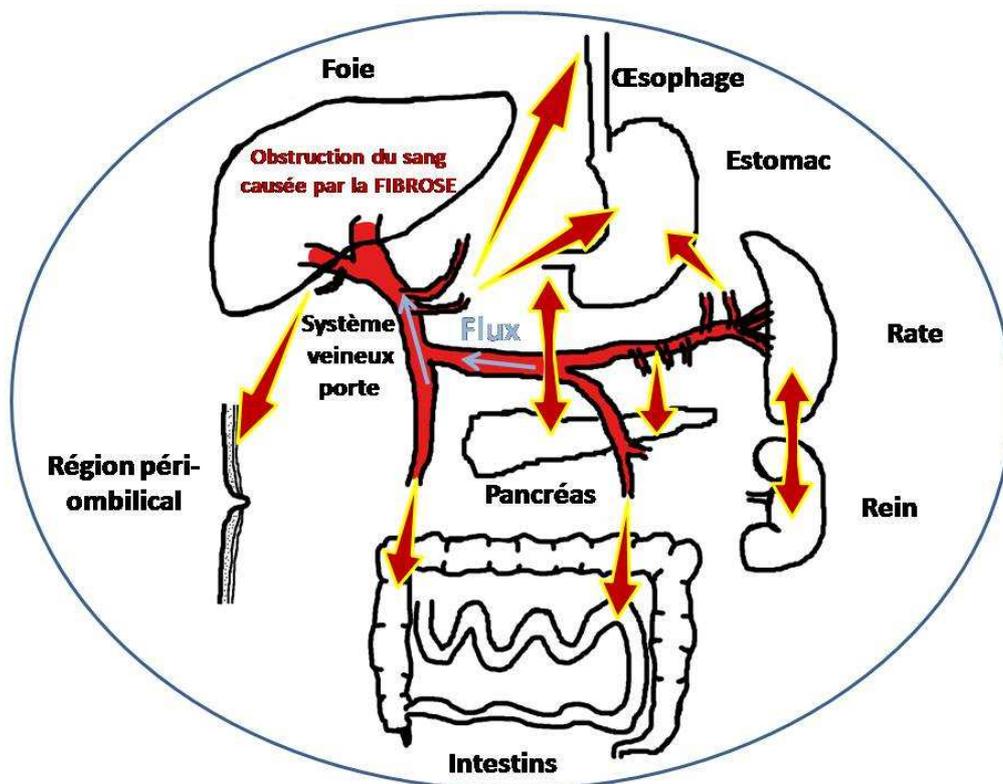


Figure 11 : Schéma illustratif des varices formées suite à l'hypertension portale dans la schistosomiase hépatosplénique

*Une fibrose hépatique importante entraîne une augmentation de la pression dans la veine porte et les vaisseaux afférents par résistance pré-sinusoidale du flux sanguin. Généralement, cette pression chez le sujet en bonne santé est inférieure à 5 mm Hg dans la veine porte et on considère qu'il existe une hypertension portale sévère non compensée dès 10 mm Hg. Le diamètre des vaisseaux peut donc augmenter lorsque cette pression est trop élevée, ce qui provoque des varices dans les vaisseaux en amont. Les varices systémiques les plus fréquemment observées dans la schistosomiase digestive sont localisées dans l'œsophage, le gastre, le mésentère, autour du côlon, dans la région péri-ombilicale, mais peuvent également être pancréatiques, duodénales, spléno-rénales et périnéales.*

Ces formes graves sont assez rares, elles surviendraient chez 5 à 20 % des patients. Des complications sévères incluant l'hypertension artérielle pulmonaire accompagnée d'insuffisance cardiaque, des glomérulopathies, une thrombocytopénie sont aussi un résultat de la fibrose bilharzienne (14, 16, 20, 22, 25, 26). Les patients atteints de schistosomiase digestive chronique présentent souvent une anémie qui s'explique par les saignements mais aussi par la consommation d'hémoglobine par le parasite. La schistosomiase chronique a aussi été associée à un risque de thrombose vasculaire, de dommage vasculaire et une augmentation de l'incidence de carcinome hépatocellulaire (14, 27) bien que la fibrose dans la bilharziose survienne généralement sans dommage ou dysfonction hépatocellulaires (20, 28).

### **1.4.3. Les mécanismes généraux du développement de la fibrose bilharzienne**

La fibrose, un processus de cicatrisation activé par un facteur déclenchant inflammatoire, est fréquente dans les maladies inflammatoires chroniques du foie. Elle se caractérise par une accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire (collagènes fibrillaires, fibronectine, unduline, élastine, laminine, hyaluronane, protéoglycanes) (29, 30) pouvant entraîner des cicatrices permanentes et une distorsion des tissus. La fibrose affecte l'architecture tissulaire et les propriétés mécaniques, elle est généralement associée à une augmentation de la rigidité du tissu fibrosé ainsi qu'à une diminution de son élasticité. Dans la schistosomiase, la fibrose est liée à la réponse immunitaire de l'hôte contre les œufs piégés dans les tissus. Au cours du stade initial de la formation des granulomes, une réponse pro-inflammatoire modérée de lymphocytes T

auxiliaires de type 1 (Th1) se produit, provoquée par la présence de vers juvéniles et adultes. Cette réponse passe à une réponse Th2 intense lorsque des œufs fortement antigéniques sont pondus et se retrouvent piégés dans les tissus hôtes. Lors de l'inflammation granulomateuse, les œufs sont entourés d'un infiltrat de macrophages, d'éosinophiles et / ou de neutrophiles, en fonction de l'espèce de schistosome. La réponse des cytokines Th2 induite par les antigènes de l'œuf est caractérisée par la production d'IL4 et d'IL13 qui activent les cellules de Kupffer (macrophages résidents) en macrophages M2. Bien que les macrophages M2 puissent produire du collagène à partir de la proline et contribuer au dépôt de collagène, on pense qu'ils pourraient en réalité réduire la fibrose (31). L'IL13 est une cytokine cruciale dans la fibrogénèse et stimule les cellules étoilées hépatiques (CEH) qui sont les principales cellules productrices de matrice extra cellulaire (MEC). Les CEH sont situées dans l'espace de Disse au niveau des sinusoides hépatiques et participent au stockage des rétinoïdes et à la régulation de la régénération de la MEC. Avec l'activation par l'IL13, les CEH se différencient en myofibroblastes activés ayant des propriétés contractiles et sécrètent des composants de la MEC (principalement des collagènes fibreux, de la fibronectine et des protéoglycanes). C'est lors de cette activation que les CEH perdent leurs réserves en vitamine A (rétinol) qu'elles stockent sous forme de gouttelettes lipidiques (18). Elles sécrètent également des enzymes contrôlant le renouvellement de la MEC, telles que les métalloprotéases matricielles (MMP) dégradant la MEC et des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) régulant les activités protéolytiques des MMP (29, 32). Un déséquilibre entre une synthèse excessive de composants de la MEC et une protéolyse matricielle réduite entraîne une accumulation de tissu conjonctif fibrillaire causant des cicatrices persistantes (32-35). Les CEH activées se trouvent généralement à la périphérie du granulome. La dernière étape de la modulation de la réponse granulomateuse implique la production de cellules T régulatrices, de cellules B et d'anticorps. À la fin de ce processus, l'œuf est détruit et le granulome est remplacé par une cicatrice fibreuse persistante.

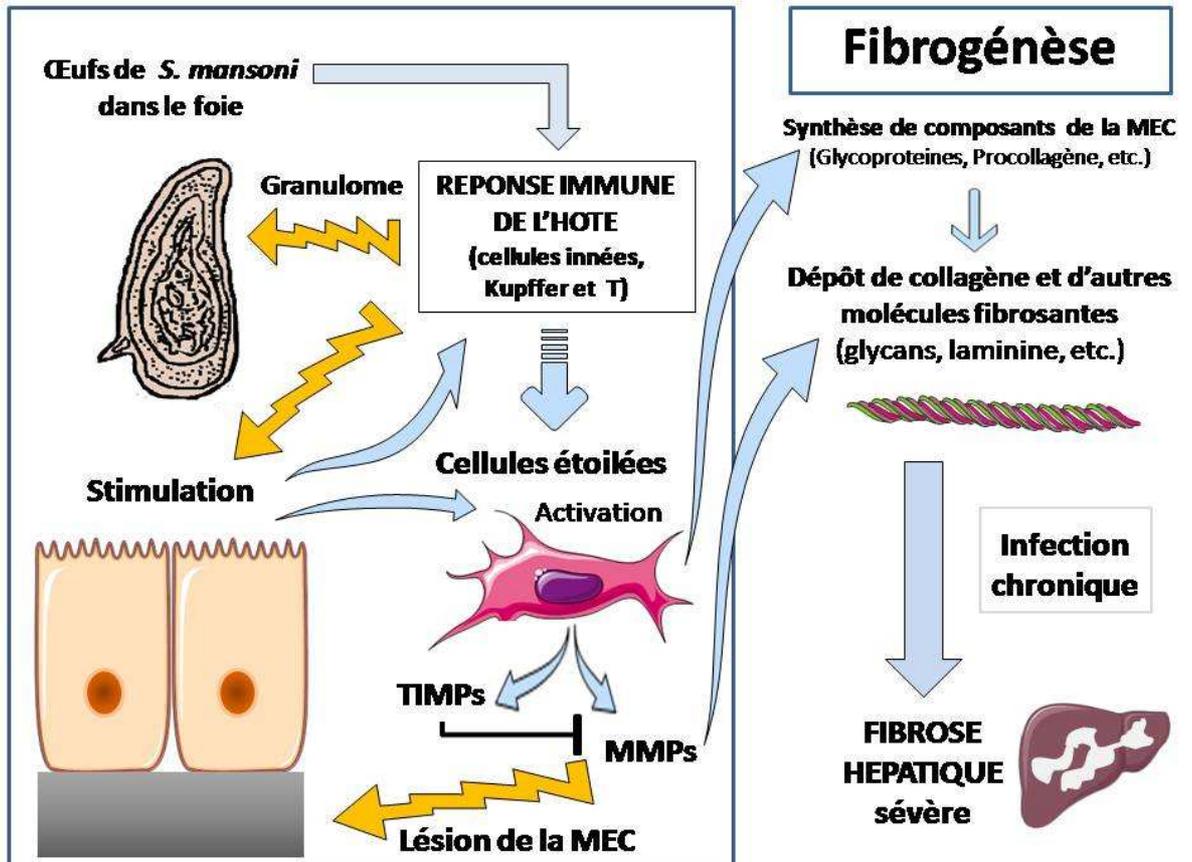


Figure 12 : Schéma du développement de la fibrose hépatique bilharzienne

*La fibrose résulte de la présence d'œufs de Schistosoma mansoni dans le foie après une forte réponse immunitaire et une accumulation de néo matrice extracellulaire (MEC) due à un processus de cicatrisation chronique en réponse à l'inflammation granulomateuse. La réaction immunitaire engendre également une stimulation des hépatocytes et des cellules endothéliales qui vont aussi activer le processus de fibrogénèse en produisant des cytokines pro-inflammatoires. Après maturation du granulome autour des œufs, les cellules étoilées sont activées et produisent des molécules et des enzymes impliquées dans la fibrogénèse. Les métalloprotéases matricielles (MMP) lysent la MEC dans un premier temps et favorisent la transformation du procollagène en collagène. Les MMP sont régulées par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP).*

#### 1.4.4. Méthodes de diagnostic biologique et examen clinique et de suivi de la schistosomiase digestive

Outre l'imagerie biomédicale dont nous parlerons plus tard, d'autres techniques peuvent être utilisées dans le suivi et la prise en charge de la schistosomiase digestive.

- **Diagnostic de la parasitose**

Le diagnostic peut être réalisé directement (détection du parasite) ou indirectement (résultats biologiques modifiés par l'infection). Le bilan sanguin peut présenter une eosinophilie au moment de l'invasion par le schistosome mais celle-ci n'est pas spécifique (36). L'identification et la quantification d'œufs dans l'urine et les selles est la méthode la plus utilisée pour diagnostiquer la schistosomiase actuellement. La technique de Kato-Katz est la méthode de référence et permet d'identifier l'espèce concernée. Elle permet d'évaluer l'intensité de l'infection par comptage des œufs. Elle repose sur un échantillonnage quantitatif, généralement répété plusieurs fois, en raison de l'excrétion très variable des œufs, dans des quantités définies de selles. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle requiert la présence de parasites adultes capables de pondre des œufs. Elle ne permet donc pas de détecter la parasitose dans les premières semaines suivant l'infection, lorsque seules des formes juvéniles sont présentes.

L'analyse histologique de biopsies de la muqueuse du rectum en vue de la détection des parasites est généralement utilisée lorsque le test de Kato-Katz est négatif, malgré une forte suspicion d'infection.

Des tests immunologiques et de biologie moléculaire permettant de détecter le parasite à différents stades de l'infection ont été mis au point. Un test intradermique injectant des antigènes de schistosomes (cercaires, vers adultes, œufs ou miracides) a très tôt été utilisé (37), mais il engendre un très fort taux de faux positifs chez les patients traités même après de nombreuses années (1). La détection d'anticorps anti-schistosome ou d'antigènes parasitaires dans le sérum, les selles ou l'urine est également disponible. Les techniques de COPT (Circumoval Precipitin Test), CHR (Cercarienhüllen reactions), IHT (indirect hemagglutination test), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) et IFA (Indirect Fluorescence Antibody) sont utilisées en détection immunologique. L'ADN schistosomal peut être détecté par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans de petits échantillons et la détection de miRNA (micro Acide Ribo Nucléique) peut aussi être employée.

Il est possible de diagnostiquer l'infection au schistosome en histologie sur les biopsies hépatiques principalement utilisées pour le diagnostic de fibrose et que nous allons voir plus en détail dans le chapitre suivant.

- **Histologie et diagnostic de la fibrose**

La biopsie avec histologie est l'examen considéré comme le meilleur standard. L'histologie permet l'observation du parasite dans le tissu hépatique et notamment les formations granulomateuses autour des œufs. Les colorations histologiques telles que l'hématoxyline/éosine (HE) pour l'établissement du score METAVIR (développé initialement pour les hépatites virales), le rouge Sirius ou le trichome de Masson pour la détection du collagène permettent une analyse semi-quantitative de la fibrose en coupe ainsi que l'évaluation de l'inflammation, de la présence de parasites adultes, d'œufs, de nécrose et les signes de co-infection par l'hépatite B ou C. L'histologie ne peut cependant permettre d'appréhender l'hépatomégalie, la splénomégalie, l'hypertension portale ou les varices, car limitée à des échantillons de petits volumes. L'étude des lipides pouvant jouer un rôle dans la fibrose hépatique peut se faire en histologie mais sur coupes congelées de préférence car les produits du protocole de fixation des tissus élimine fortement leurs contenus gras. Des marqueurs biochimiques détectés dans le sérum peuvent aider au diagnostic. Il existe des tests combinant des marqueurs sanguins avec des mesures physiques d'élastométrie (exemple : fibrotest) dont les valeurs prédictives égaleraient la biopsie (38) mais n'a pas été utilisé à notre connaissance pour la schistosomiase digestive. Plusieurs marqueurs présumés de la fibrose ont été évalués dans la fibrose de la schistosomiase, tels que le collagène III, l'acide hyaluronique, la laminine (glycoprotéine) et la protéine analogue à la chitinase-3 (YKL-40, glycoprotéine) (24).

- **Diagnostic de l'organomégalie**

En dehors du support de l'imagerie médicale, l'organomégalie peut quant à elle être suspectée et diagnostiquée par l'examen physique, c'est-à-dire la palpation et la percussion notamment, mais cet examen clinique manque de sensibilité.

- **Diagnostic de l'hypertension portale**

L'hypertension portale (HTP) se définit par une augmentation de la pression dans le système vasculaire porte estimée classiquement à l'aide du gradient de pression porto-cave sus hépatique (GPSH) lorsque celui-ci est supérieur à 5 mmHg (39). Dans le cadre de la bilharziose il s'agit d'une hypertension portale pré-sinusoïdale, secondaire au dépôt de matrice extracellulaire au niveau sinusoïdal et à de la thrombose résultant d'une obstruction des vaisseaux portes causée par la présence de granulomes. Dans ce cas, le GPSH serait

d'abord normal puis s'élèverait dans une phase plus tardive de la maladie. La pression intra-splénique est élevée dans la schistosomiase digestive et l'HTP peut aussi être responsable d'un shunt porto-cave (sang passant directement du système porte à la veine cave sans passer par le foie). Le développement de varices œsophagiennes consécutivement à une hypertension portale dans un contexte de cirrhose surviendrait pour un GPSH supérieur à 10-12 mm Hg (40-43). Au-delà de ces valeurs, il n'y aurait aucune corrélation entre le GPSH et la taille des varices œsophagiennes ou le risque d'hémorragie (40, 43-45). L'HTP peut se diagnostiquer par des techniques invasives, ou non invasives ces dernières relevant du domaine de l'imagerie médicale (veinographies, Doppler, etc). Des mesures invasives ont encore lieu, souvent sous contrôle radiologique. Ces techniques sont des cathétérismes des systèmes portal (par voie percutanée transhépatique) ou veineux sus-hépatique (abord veineux jugulaire voir fémoral). La pression des varices œsophagiennes peut se mesurer directement mais avec le recours à une ligature ou des produits sclérosants pour éviter les hémorragies induites par le geste qui empêche une nouvelle exploration de ces mêmes varices, ou encore avec un capteur de pression appliqué par endoscopie et directement contre la varice (46).

## 1.5. Moyens de lutte contre la maladie

### 1.5.1. Moyens de prévention et de contrôle de la Bilharziose

Malgré de nombreuses recherches, aucun vaccin anti-schistosomiase n'est aujourd'hui disponible (47, 48).

Les actions de prévention et de contrôle de la maladie s'articulent autour de plusieurs axes:

- Traitement des malades et des populations à risques avec le praziquantel (traitements de masse répétés).
- Surveillance de la population pédiatrique, en particulier d'âge pré-scolaire, la première exposition au parasite se produisant en général avant l'âge de 1 an et adaptation de la forme galénique du praziquantel à la population pédiatrique.
- Sensibilisation et éducation des populations vivant dans les zones endémiques aux risques infectieux liés aux schistosomes mais également des voyageurs se rendant dans ces régions.

- Amélioration des outils diagnostiques (détection directe du parasite, mise au point de méthodes immunologiques (anticorps, antigènes) ou de biologie moléculaire (ADN, ARN etc.), détection des complications sévères (notamment de la fibrose par dosage de marqueurs sanguins ou imagerie).
- Recherche de nouveaux traitements susceptibles de cibler les formes juvéniles du parasite (schistosomules) qui ne sont pas sensibles au praziquantel.
- Amélioration de l'habitat humain (installations sanitaires, construction de puits et installation de pompes permettant l'accès à l'eau des nappes phréatiques, construction de passerelles ou pontons d'accès aux bateaux, utilisation de bottes, etc.)
- Élimination de l'hôte intermédiaire par l'épandage de produits molluscicides dans l'habitat des gastéropodes.

Essais de modifications génétiques chez les mollusques pour les rendre résistants à l'infection ou les rendre stériles (49).

Il existe cependant des verrous limitant les actions de traitement de masse malgré le don de praziquantel par les principaux fabricants, ces verrous résultant parfois de problèmes de corruption. La couverture humaine et géographique par les traitements de masse est encore insuffisante dans de nombreux pays endémiques. Quant aux techniques de détection, des complications de la schistosomiase (imagerie biomédicale en particulier), elles sont souvent peu accessibles dans les zones les plus pauvres.

### 1.5.2. Traitements médicamenteux de la schistosomiase hépatosplénique

Le traitement standard est le praziquantel (trematodicide), actif sur toutes les espèces de schistosomes (traitement per os, dose de 40 mg/kg) (50). Les comprimés disponibles sont en dose de 600 mg. Le praziquantel a une demi-vie moyenne d'une heure trentre dans l'organisme (51). Il tue les vers adultes mais est inefficace contre les schistosomes au stade juvénile (schistosomules). Le mécanisme d'action et les cibles moléculaires du praziquantel sont inconnues. Toutefois, plusieurs études ont rapporté une vacuolation et un bossellement des téguments du ver suggérant un effet disruptif direct sur les canaux calciques. Un travail récent a décrit des effets distincts du praziquantel sur les vers mâles et femelles. Bien que le traitement soit efficace même à dose unique, la réinfection est fréquente et en 2013, seulement 13% des personnes nécessitant un traitement en auraient bénéficié (19, 52). Un traitement

répété est donc nécessaire en raison de la courte demi-vie du praziquantel et des fréquentes réinfections.

D'autres molécules ont également un effet sur le parasite. L'artesumab utilisé pour le traitement de la malaria est efficace sur les schistosomes non matures (schistosomules), on lui préfère le praziquantel afin d'éviter une possible résistance en cas d'infection paludéenne. Bien tolérée, l'oxamniquine sous forme de gélule de 250 mg ou en sirop (250 mg/5 ml) est un dérivé de la tétrahydroquinoléine mais dont l'action est inégale et sélective sur *S. mansoni*. Des cas de résistance ont été signalés en Amérique du sud où elle a été très utilisée à des doses variables de 15 mg/kg (monodose) à 60 mg/kg (traitement sur plusieurs jours) selon les zones géographiques (50).

L'hypertension portale peut être médicalement traitée avec l'administration prophylactique de propranolol, un bêtabloquant utilisé pour abaisser la pression porte et limiter les risques de saignements digestifs notamment dans les cirrhoses (53).

### 1.5.3. Traitements médico-chirurgicaux dans la schistosomiase hépatosplénique

Les traitements médicaux utilisés pour diminuer les saignements de varices sont à base de ligatures et scléroses des varices œsophagiennes sous endoscopie pour lutter contre l'HTP. L'ablation de la rate a également été pratiquée avec dévascularisation des varices. Les résultats de cette dernière technique semblent contradictoires selon les études (54).

## **2. Imagerie dans la bilharziose/schistosomiase digestive**

Nous allons traiter dans cette partie des techniques d'imagerie digestives cliniques puis précliniques en décrivant leurs applications dans le cadre de la bilharziose.

### **2.1. Techniques d'imagerie cliniques utilisées pour le suivi de la bilharziose digestive**

Avant de passer en revue, au cours des chapitres suivants, les avantages et inconvénients de chacune des techniques d'imagerie clinique dans le cadre de la schistosomiase digestive, nous proposons un tableau comparatif et récapitulatif des caractéristiques de ces modalités auquel il sera possible de se référer dans le texte (Tableau 1).

Avantages/ Inconvénients	EUS	TDM	IRM	Scintigraphie + SPECT	TEP	Endoscopie
<b>Portabilité</b>	oui	non	non	non	non	non
<b>Coût de l'équipement</b>	Faible (environ 30k \$)	>EUS (1M \$)	>TDM (>1M \$)	<TDM (environ 500k \$ pour la scintigraphie)	>TDM (<2 M\$)	<EUS
<b>Invasivité</b>	non*	non*	non*	oui	oui	Oui – anesthésie requise
<b>Temps d'acquisition / durée de la procédure d'imagerie</b>	Temps réel / 5 min	30s / 10 min**	5 / 30 min**	30 min / 4 heures	20 min, mais un radionucléide est injecté 1 h avant l'imagerie TEP	Temps réel mais 1 à 2 h sont requis pour la préparation
<b>Principe de base /type de radiation – interaction avec les tissus</b>	Propagation d'ondes acoustiques à très hautes fréquences (ultrasons : 1à 20 M Hz)	Atténuation de rayonnements X transmis	Absorption et ré-émission d'ondes radiofréquences par résonance magnétique des protons des tissus	Détection de photons de rayonnement gamma émis par une biomolécule marquée (radio- pharmaceutiques) injectée au patient	Détection de photons de rayonnement gamma émis par un positon du <sup>18</sup> FDG et un électron du tissu qui s'annihilent	Introduction d'un endoscope qui conduit de la lumière visible par l'intermédiaire de fibres optiques
<b>Applications principales</b>	Imagerie anatomique Imagerie fonctionnelle	Imagerie anatomique	Imagerie anatomique Imagerie fonctionnelle, physiologique et métabolique	Imagerie fonctionnelle, physiologique et métabolique	Imagerie fonctionnelle, physiologique et métabolique	Imagerie anatomique
<b>Agents de contraste (AC) ou traceurs radionucléides (RN) principaux</b>	AC: Micro bulles	AC: composés à base d'Iode essentiellement	AC : composés paramagnétiques (exemple: chélates de Gadolinium)	<b>RN</b> : molécules marquées par un radioélément émetteur gamma (exemple : Technétium 99m)	<b>RN</b> : surtout molécules marquées au <sup>18</sup> F (2-désoxy Glucose)	non
<b>Radiation ionisante</b>	non	Oui, externe	non	Oui, interne (radionucléides)	Oui, interne (radionucléides) plus externe si combinée à la TDM	non
<b>Résolution spatiale (ordre de grandeur)</b>	0,3 à 1,5 mm selon la fréquence	0,3 à 1 mm selon les dimensions du tube à rayons X et la taille du détecteur	0,5 à 3 mm selon le temps d'acquisition, la force du champ magnétique statique et les gradients de champ magnétique	5 à 12 mm selon le collimateur et le système de détection	4 à 10 mm selon la taille du détecteur	< 0,1 mm selon la matrice de la caméra

<b>Profondeur de pénétration dans les tissus</b>	1 à 30 cm selon la fréquence	sans limite	sans limite	sans limite	sans limite	superficielle
<b>Contraste des tissus mous</b>	Bon (>TDM)	Moyen (>TEP)	Excellent (>EUS)	na	na	Aspect visuel
<b>Imagerie vasculaire -Anatomie des vaisseaux (AV) -Hémodynamique (HD)</b>	<b>AV:</b> 2D, angiographie, veinographie. <b>HD:</b> flux sanguin, volume sanguin, vitesse en utilisant le Doppler ou l'injection de AC	<b>AV:</b> angiographie 2D et 3D, veinographie. <b>HD:</b> flux sanguin, volume sanguin, vitesse, temps artériel, veineux et de perfusion en injectant du AC	<b>AV:</b> angiographie 2D et 3D, veinographie. <b>HD:</b> flux sanguin, volume sanguin, vitesse, perfusion. AC pas forcément nécessaire	<b>HD :</b> flux sanguin (55)	<b>HD:</b> flux sanguin	Visualisation de varices
<b>Imagerie 2D ou 3D organe en totalité</b>	Imagerie 2D, imagerie 3D peu commune	Imagerie 2D et 3D	Imagerie 2D et 3D	Imagerie 2D et 3D	Imagerie 3D corps entier mais requérant la TDM ou l'IRM pour une localisation anatomique	Imagerie 2D vidéo
<b>Intervention guidée par l'image /Théranostique</b>	Utilisation de radiofréquences pour le traitement de cancers abdominaux par HiFu et biopsies hépatiques	Pas pour les maladies abdominales	Non (HiFu en recherche clinique)	Yttrium pour les cancers hépatiques	Non (Théranostique pour d'autres maladies infectieuses)	Oui, ligation de varices et sclérothérapie
<b>Limitations</b>	Opérateur dépendant, seulement un faible nombre d'images sont usuellement sauvegardées, la présence de gaz dans les organes creux stoppe le signal	Risque allergique aux AC à base d'Iode, l'exposition répétée aux radiations ionisantes n'est pas recommandée	Sensible au mouvement, les AC à base de Gd ne doivent pas être administrés aux sujets ayant une défaillance rénale	L'exposition répétée aux radiations ionisantes n'est pas recommandée, nécessite un générateur de radionucléides sur site	Peu d'appareils disponibles, l'exposition répétée aux radiations ionisantes n'est pas recommandée, nécessite un générateur de radionucléides sur site	Risques infectieux, sédation ou anesthésie, équipe et matériel opératoire requis

Tableau 1 : Caractéristiques générales des modalités d'imagerie médicale abdominale utilisées en clinique

\*: technique non invasive en absence d'agent de contraste. \*\*: dépend des protocoles. AC= Agent de Contraste EUS= Echographie à Ultrasons, HiFu= High intensity Focused ultrasound, IRM= Imagerie par Résonance Magnétique, SPECT= single photon emission computed tomography, TDM= Tomodensitométrie, TEP= Tomographie par émission de positons, VP= Veine Porte

### 2.1.1. L'échographie ultrasonore

- **Principe de base de l'échographie ultrasonore**

L'échographie est une modalité d'imagerie médicale de première intention utilisant les propriétés de propagation des ultrasons dans les tissus. Une sonde est déplacée à la surface de la peau en contact avec un gel et émet par un transducteur des ondes mécaniques comprises entre 20 kHz et 20 MHz dans l'organisme. Elle reçoit des échos résultant d'interactions de ces ondes avec les tissus (56). Les temps et les intensités des échos sont analysés en direct pour construire des images. L'effet Doppler des ondes ultrasonores permet d'évaluer la vitesse du flux sanguin dans les vaisseaux en mesurant les variations de fréquence des échos dues aux éléments en mouvement.

- **Application de l'échographie dans la bilharziose digestive**

L'échographie ultrasonore (EUS) est l'examen d'imagerie médicale de première intention pour l'exploration par imagerie des maladies gastro-intestinales humaines et permet l'évaluation de l'atteinte hépatique et de l'hypertension portale (57, 58). Il s'agit de l'examen d'imagerie médicale le plus utilisé pour le diagnostic de la schistosomiase intestinale humaine (57, 58). La portabilité de l'équipement, la courte durée de la procédure et le faible coût de l'équipement d'imagerie médicale sont les principaux avantages de cette méthode qui permet un accès relativement bon à cette technique d'imagerie dans le monde entier. L'imagerie en temps réel offre une exploration rapide des maladies. Il est possible d'obtenir des images anatomiques et fonctionnelles. L'écoulement sanguin peut être étudié par l'effet Doppler qui offre la possibilité de mesurer la vitesse du sang dans les vaisseaux et un code couleur donne la direction du flux (du bleu au rouge en général). Une autre méthode consiste à utiliser un agent de contraste (injection de micro-bulles) pour étudier le système vasculaire. Les hautes fréquences des ultrasons et leurs propriétés permettent une imagerie de haute résolution spatiale et un bon contraste des tissus mous avec un compromis sur la profondeur de pénétration (la pénétration en profondeur étant limitée lorsque l'on augmente les fréquences ultrasonores pour améliorer la résolution spatiale). La plupart des images utilisant l'EUS sont planes, mais le mode vidéo permet également une visualisation dynamique et des images en trois dimensions peuvent être produites avec les systèmes les plus récents. Le traitement guidé par l'image combinant radiofréquences et EUS est utilisé dans le traitement de certains

cancers de l'abdomen tels que le carcinome hépato-cellulaire. Les biopsies hépatiques peuvent également être guidées par EUS. Les limites de l'EUS consistent en des variations potentielles des résultats d'examen en fonction des opérateurs, la nécessité d'une formation poussée des opérateurs pour limiter la variabilité, toutes les images visualisées par l'opérateur ne peuvent pas être sauvegardées en pratique clinique et les ultrasons ne permettent pas d'images postérieures aux organes contenant du gaz telles certaines régions intestinales.

Selon l'espèce de schistosome l'aspect radiologique de la maladie hépatosplénique diffère (23). Nous nous focaliserons sur les images échographiques obtenues dans l'infection par *S. mansoni* car c'est la plus répandue dans le monde et il s'agit de l'espèce avec laquelle nous avons travaillé. Selon le protocole de Niamey établi en 1996 (59), l'EUS est toujours la principale méthode radiologique d'exploration de la schistosomiase hépatosplénique. L'échographie permet de détecter une inflammation granulomateuse et une fibrose du foie par l'échogénéité du signal, mais il n'est pas possible de les séparer. Une inflammation granulomateuse est observée dans le schéma de Niamey de motif (pattern) B où le parenchyme hépatique est décrit comme un «ciel étoilé» dans l'infection à *S. mansoni* (Figure 13 B) (60). Le parenchyme hépatique normal est gris et homogène, mais dans le pattern B, de petites taches hyper-échogènes sont visibles. La fibrose le long des vaisseaux des branches portales secondaires est décrite par le pattern de Niamey C comme des «anneaux» et des «tubes» (Symmer's pipes), selon l'axe de vision dépendant de la position de la sonde (imagerie en coupe). La fibrose peut également être localisée autour de la bifurcation de la veine porte en tant que "collerette" (Ruff en anglais), cette forme sur les images est le signe d'un motif D de Niamey. L'EUS permet de mesurer l'épaisseur des parois des branches portes du second ordre (par soustraction des mesures intérieures et extérieures, vue en coupe récurrente) de la vésicule biliaire (vue en coupe récurrente ou transthoracique) et de l'épaisseur de la collerette (vue en coupe oblique, Figure 13 D). Dans les formes avancées de la maladie, les schémas E et F sont décrits dans la classification de Niamey avec des patchs autour des vaisseaux hépatiques portes pour le pattern E et des patchs étendus à la périphérie du foie en tant que «griffes d'oiseau» pour le pattern F. Des combinaisons de motifs sont possibles, telles que Db, Dc, Ec, etc. (Figure 13 C). L'hypertension portale est évaluée par EUS en mesurant le diamètre de la veine porte (vue en coupe oblique), la dilatation des branches du deuxième ordre, le diamètre de la veine splénique et la détection de varices. Les fonctions Doppler et couleur de l'EUS sont des outils puissants pour l'étude de l'écoulement sanguin et la recherche de varices systémiques ou d'un éventuel thrombus porte (potentiel

motif de non indication du traitement à base de propranolol). L'EUS permet d'évaluer l'hépatomégalie en mesurant la longueur d'un ou plusieurs axes hépatiques. La volumétrie est possible avec les nouveaux systèmes mais n'est pas facilement disponible en zone endémique. La splénomégalie, une conséquence de l'inflammation ou de l'hypertension, peut être mesurée par la longueur de l'axe longitudinal joignant les deux pôles sur une coupe passant par la veine splénique. Il est possible également d'observer l'aspect échographique de la rate (granulaire ou non). L'ascite, les masses cancéreuses (pattern Z) ou les hémangiomes et la cirrhose avancée peuvent également être détectés par EUS mais le diagnostic différentiel peut être compliqué par une stéatose hépatique donnant une image hyper-échogène du parenchyme, dans ce cas un pattern Y de la classification de Niamey est attribué et la schistosomiase ne peut pas être étudiée lorsque la stéatose est trop importante.

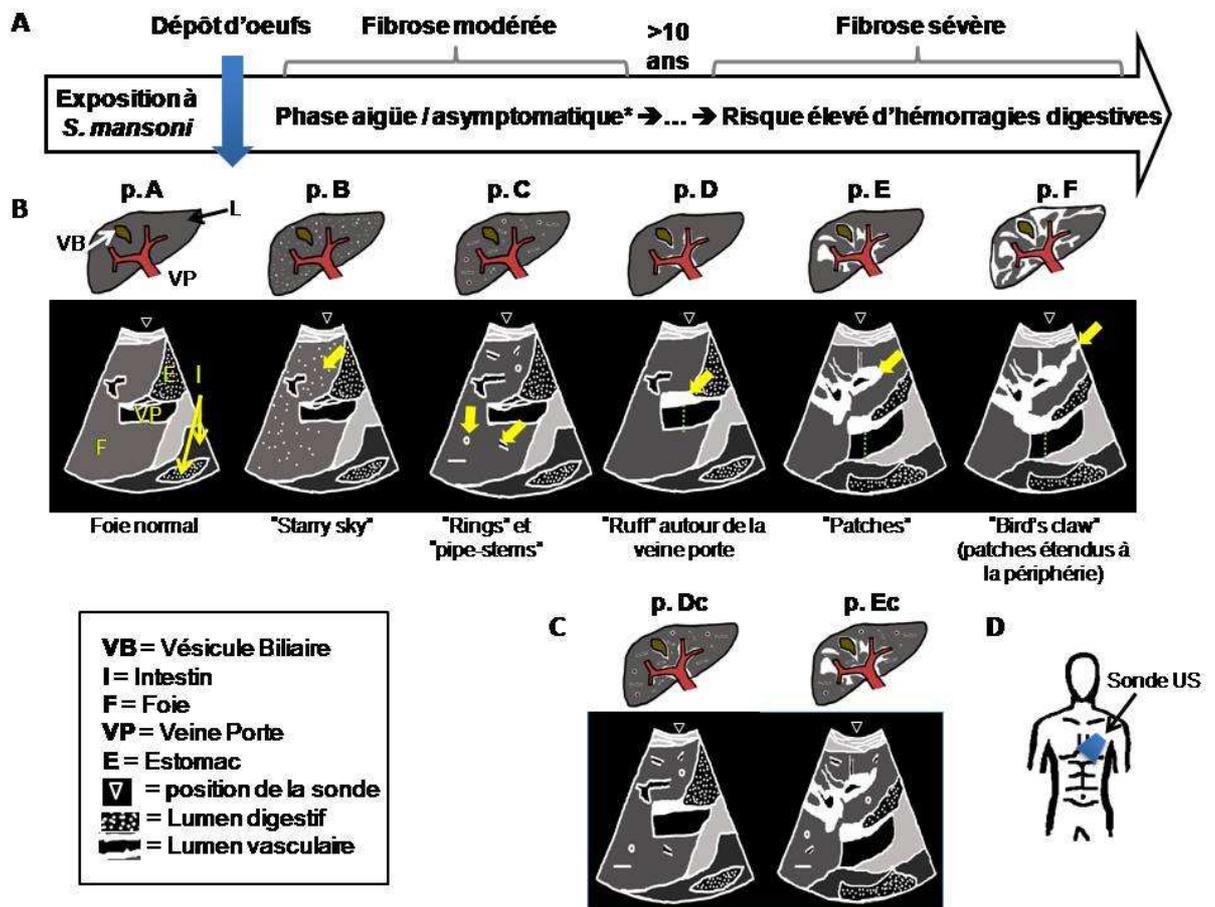


Figure 13 : Motifs (patterns) hépatiques typiques basés sur la classification de Niamey et observés dans l'infection à *S. mansoni* par échographie sur une vue oblique droite

*A : Chronologie de la Bilharziose digestive humaine à S. mansoni. B: Illustration de la progression de la maladie hépatique dans le foie humain infesté par des œufs de S. mansoni. Pour chaque illustration il y a un signal associé retrouvé en échographie par abord cutané. Les phases aiguës et / ou asymptomatiques sont généralement associées aux patterns B et C. Le pattern B ciel étoilé (« starry sky »), correspond aux taches échogènes du parenchyme hépatique dues à une inflammation et à une fibrose autour du granulome. Le motif C présente des signaux échogènes autour des branches portales et est également considéré comme un stade de fibrose modéré. D : La vue oblique droite permet de regarder dans la région hépatique une partie longitudinale de la veine porte (VP) et des vaisseaux autour ou de la fibrose périportale comme dans le motif D. Cette vue permet la mesure du diamètre de la VP et l'évaluation de l'hypertension (ligne en pointillés dans les illustrations des patterns D, E et F)). Une grande zone de fibrose dans le parenchyme décrit comme des «patches» est associée au motif E. L'extension de la fibrose à la périphérie du foie à partir de patches a été décrite comme une «griffe d'oiseau» (Bird's claw) et associée au motif F. C :Dc et EC sont des exemples de motifs combinés. US=Ultra Sons*

### 2.1.2. Le scanner X ou tomодensitométrie (TDM)

- **Principe de base de la TDM**

Comme la radiographie classique, le scanner utilise les propriétés d'absorption des rayons (photons) X des tissus pour obtenir des images médicales. Un tube émet des rayons X et tourne autour de la zone d'intérêt. A l'opposée, une autre pièce composée de détecteurs multiples effectue des mouvements circulaires pour enregistrer les atténuations de photons qui traversent le patient. Les mesures croisées permettent par le principe de rétroprojection de reconstruire des images anatomiques tridimensionnelles représentant les coefficients d'absorption dans chaque voxel en unités de Houndfield.

- **Application de la tomодensitométrie dans la bilharziose digestive**

Le scanner X est une autre modalité radiologique rapide utilisée pour explorer les maladies digestives. La durée de l'examen ne dépasse pas quelques minutes sans agent de contraste (AC) à 10 minutes avec une injection d'AC (principalement composée d'agents contenant des noyaux benzéniques tri-iodés) et la reconstruction des images permet rapidement d'obtenir des coupes axiales du volume scanné (Tableau 1). La résolution spatiale dans le plan axial est meilleure qu'en EUS ou en IRM et aujourd'hui inférieure à 0,1 mm. La résolution spatiale dans la troisième direction spatiale est moins bonne, généralement aux alentours de 0,5 mm. Le contraste des tissus mous peut être moins bon que celui obtenu avec l'EUS. Une limitation importante de cette technique est le risque d'allergie aux AC à base d'iode et une exposition répétée aux radiations ionisantes. Le scanner permet de visualiser la

fibrose. L'analyse des caractéristiques de texture à partir d'images de tomодensitométrie (TDM) permet la stadification de la fibrose dans tout le foie mais elle est moins précise en cas d'une distribution hétérogène de la fibrose et elle est considérée comme inférieure à l'élastographie transitoire par ultrasons (61). Les signes d'hypertension portale peuvent être détectés par scanner grâce à l'injection d'un AC qui permet d'identifier les phases artérielle ou veineuse et de calculer des paramètres de perfusion. La veine porte et les veines mésentériques peuvent être visualisées par TDM. Les varices peuvent être diagnostiquées facilement à partir des images, ce qui est un avantage de cette méthode. L'hépatomégalie et la splénomégalie peuvent être évaluées quantitativement par scanner X. La tomодensitométrie est un bon examen d'exploration et permet de suspecter un éventuel carcinome ou un autre type de tumeur maligne ainsi que d'autres maladies digestives (inflammatoires, cirrhose, etc.). La TDM est peu utilisée dans la schistosomiase digestive car elle est indisponible dans la plupart des pays endémiques, elle ne donne pas plus d'informations que l'EUS et n'est pas la technique de référence pour le diagnostic et le « grading » de la fibrose bilharzienne (59).

### 2.1.3. L'Imagerie par résonance magnétique (IRM)

- **Principe de base de l'IRM**

L'IRM requiert la présence de noyaux atomiques ayant des propriétés magnétiques, c'est-à-dire ayant un spin nucléaire non nul. C'est le cas du proton de l'hydrogène présent majoritairement dans l'eau dans les tissus biologiques. Le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN) nécessite la polarisation des spins nucléaires par un champ magnétique statique fort ( $B_0$  champ magnétique du scanner), conduisant à une orientation parallèle ou anti-parallèle des moments magnétiques  $\mu$  des spins selon la direction de  $B_0$  (cas d'un spin  $\frac{1}{2}$ ) et correspondant à une levée de dégénérescence des états d'énergie des spins nucléaires. La différence d'énergie entre les états « parallèle » et « anti-parallèle » dépend de  $B_0$ . La résultante de tous les moments magnétiques appelée aimantation  $M$  est parallèle à  $B_0$ , l'état parallèle de plus basse énergie étant favorisé. Les spins ont une fréquence angulaire de précession autour de  $B_0$  (fréquence de Larmor) qui dépend de l'amplitude de  $B_0$ . Dans une seconde étape, le système de spins nucléaires est excité par une onde de radiofréquence  $B_1$  à la fréquence de Larmor (cette fréquence est spécifique d'un noyau donné). Par le phénomène

de résonance cette excitation apporte de l'énergie au système de spins et induit un basculement de l'aimantation des spins par rapport à la direction de  $B_0$ . Il en résulte une diminution de la composante longitudinale de  $M$  (selon l'axe  $z$  de  $B_0$  dans un repère  $xyz$ ) appelée  $M_z$  et l'apparition d'une composante transverse appelée  $M_{xy}$ . L'aimantation longitudinale est liée à l'écart de population des états parallèle et anti-parallèle, tandis que la composante transverse reflète la mise en phase des spins nucléaires. L'excitation est réalisée en présence de gradients de champs magnétiques pour la localisation spatiale du signal. Lorsque l'excitation s'arrête, le système de spins nucléaires revient à l'état d'équilibre en restituant l'énergie absorbée par un phénomène dit de « relaxation ». Il existe deux composantes principales à la relaxation, la composante  $T_1$  ou longitudinale et la relaxation  $T_2$  ou transverse. Ces deux processus sont caractérisés par des temps de relaxation, dits «  $T_1$  » et «  $T_2$  », correspondant à la « repousse » de l'aimantation longitudinale ( $M_z$ ) et à la disparition de l'aimantation transverse ( $M_{xy}$ ). Ces deux temps sont différents pour un même noyau, et varient en fonction des molécules portant les atomes d'hydrogène (eau, graisses etc.), de leur environnement, de leur mobilité, de la viscosité du milieu etc. Le contraste en IRM du proton (IRM- $^1H$ ) dépend principalement de la quantité de protons dans les tissus et des temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ . La mesure quantitative par IRM des temps de relaxation et leur cartographie spatiale est appelée relaxométrie.

Les principes de la relaxométrie seront détaillés dans un prochain chapitre.

- **Application de l'IRM dans la bilharziose digestive**

L'IRM comme le scanner X est une technique couteuse et non mobile, ce qui limite son accès. Toutefois, des aimants résistifs à bas champ, portables, sont en cours de développement afin d'équiper les régions les plus pauvres (62). L'IRM est une technique non invasive qui permet d'obtenir des images anatomiques et fonctionnelles avec une haute résolution spatiale (Tableau 1). Les chélates de gadolinium peuvent être utilisés comme agents de contraste, mais ne sont pas recommandés pour les patients atteints d'insuffisance rénale sévère (risque de fibrose systémique néphrogénique) et les nombreuses techniques d'acquisition IRM sans agent de contraste permettent un excellent contraste des tissus mous. Des techniques permettent la visualisation de la vascularisation en 2D ou en 3D : l'angiographie et la veinographie. D'autres techniques autorisent aussi l'étude du débit sanguin, du volume sanguin et la perfusion tissulaire (normalement débit sanguin et perfusion tissulaire sont

équivalentes). Selon Lambertucci et al, l'IRM fournirait des informations plus précises que l'EUS sur la fibrose périportale, la vésicule biliaire et le système veineux abdominal (54, 63). Contrairement à l'EUS une couverture abdominale complète peut également être réalisée avec l'IRM. Une exploration des dimensions de la veine porte et des varices oesophagiennes sur les images classiques d'IRM est possible (54).

Le parasite ne peut pas être détecté directement par IRM, mais les agents de contraste renforcent la détectabilité de l'inflammation granulomateuse et de la fibrose du foie (Tableau 2). Les signes d'hypertension portale tels qu'un diamètre augmenté de la veine porte et les varices peuvent être étudiés par IRM. L'hépatomégalie et la splénomégalie, les ascites et les anomalies de la vésicule biliaire peuvent être détectées en IRM 2D et 3D.

#### 2.1.4. Imagerie en médecine nucléaire, scintigraphie et tomographie par émission de positons (TEP)

- **Principe de base de la scintigraphie**

La scintigraphie est une modalité de médecine nucléaire, dont le principe est basé sur la détection du rayonnement gamma d'un agent radiopharmaceutique (molécule porteuse d'un isotope radioactif tel que le Technétium 99m) administré généralement par injection intraveineuse. La partie pharmaceutique utilisée est localisée au contact de molécules d'affinité et la biodistribution du radiopharmaceutique est définie par la détection d'un photon gamma émis par le radio-isotope. Les détecteurs plans externes nommés  $\gamma$  caméras permettent de détecter après plusieurs minutes des hyperfixations correspondant à des zones d'accumulation des produits radiopharmaceutiques. Cette technique permet d'obtenir des images fonctionnelles bidimensionnelles en fonction des caractéristiques du produit radiopharmaceutique et de visualiser la perfusion des vaisseaux dans les premières minutes avant la localisation spécifique. La tomographie par émission de photons uniques ou single photon emission computed tomography (SPECT) permet des images tridimensionnelles à l'aide de caméras gamma planes.

- **Principe de base de la TEP**

La TEP est une autre modalité de médecine nucléaire pour laquelle le produit radiopharmaceutique injecté dans le corps contient un radiotraceur qui cette fois-ci émet un

positon. La plupart du temps, la molécule associée au radiotracer est le désoxyglucose qui se fixe sans être métabolisé dans les zones tissulaires présentant une consommation élevée de glucose (cellules musculaires actives, tumeurs, zones inflammatoires, etc.). Le positon émis interagit avec un électron du tissu dans l'environnement proche où le radiopharmaceutique est fixé. Le résultat de cette interaction est l'émission de deux photons gamma d'annihilation avec l'énergie précise de 511keV et de directions opposées (180°). Grâce à des détecteurs placés tout autour de la zone d'intérêt, des images tridimensionnelles fonctionnelles sont obtenues et reconstruites lorsque deux détecteurs opposés reçoivent un signal coïncident.

- **Application des techniques de médecine nucléaire dans la bilharziose digestive**

En tant que modalités conventionnelles d'imagerie médicale, les techniques de médecine nucléaire peuvent aider à explorer une maladie digestive telle que la schistosomiase, bien que la plupart des applications de cette technique concernent principalement l'oncologie. La scintigraphie et la TEP nécessitent un équipement et des radiotraceurs coûteux. Ce sont des techniques qui ont l'inconvénient d'être ionisantes et invasives par l'injection de radiopharmaceutiques, mais qui permettent d'obtenir des images fonctionnelles, physiologiques et métaboliques (Tableau 1).

La durée de la procédure de scintigraphie est d'environ 4 heures pour la détection de molécules marquées au Technétium 99m au contact des cellules cibles et celle d'analyse environ 30 minutes. Une utilisation théranostique est également possible en oncologie (cancers du foie traités avec l'Yttrium). La circulation sanguine peut être étudiée par scintigraphie et une démonstration de la détection de l'hypertension portale et des shunts portosystémiques à l'aide de techniques de médecine nucléaire dynamiques a été réalisée (64). L'hépatomégalie et la splénomégalie peuvent être évaluées avec une efficacité inférieure à celle des techniques radiologiques de référence pour l'imagerie anatomique en raison d'une faible résolution spatiale. La scintigraphie de perfusion hépatique ou l'angioscintigraphie permettent d'étudier l'hypertension portale et le profil hémodynamique de la schistosomiase (Tableau 2).

Le temps d'acquisition en TEP est d'environ 20 minutes, mais le radiopharmaceutique (ex : 2-Desoxy Glucose marqué par du Fluor 18 (radionucléide) doit être injecté une heure avant l'imagerie. Les images 3D et 2D obtenues par TEP peuvent être superposées à des

images de TDM ou d'IRM pour une meilleure localisation anatomique des radiotraceurs détectés. La TEP permet de détecter l'inflammation granulomateuse dans la schistosomiase (65) (Tableau 2).

### 2.1.5. Méthodes d'imagerie optique par fibroscopie et endoscopie

- **Principe de base de l'imagerie endoscopique et fibroscopique**

L'endoscopie est une méthode d'exploration non chirurgicale permettant de visualiser l'intérieur du corps (endoscope) à l'aide d'un système optique (fibroscope). Un accès naturel comme le tube digestif ou bien une incision cutanée peuvent être utilisés pour entrer en contact avec l'organe étudié. Une anesthésie est la plupart du temps nécessaire. L'endoscopie peut être associée à un système d'imagerie médicale échographique ou à des outils pour la réalisation de biopsies ou d'interventions médicales (exemple : prélèvement de polype). L'exploration des maladies humaines par imagerie peut être réalisée à l'aide de méthodes optiques permettant de diagnostiquer et de traiter. Par endoscopie, il est possible de visualiser directement l'intérieur du corps du patient en conduisant une petite caméra et la lumière visible via des fibres optiques à l'intérieur du tractus gastro-intestinal ou dans la cavité péritonéale. L'endoscopie nécessite des conditions chirurgicales d'asepsie selon les examens (bloc opératoire), une ressource humaine importante pour gérer l'anesthésie et l'exploration médicale.

- **Application des techniques de fibro/endo-scopie dans la bilharziose digestive**

Le coût et le risque infectieux associés à une technique invasive expliquent que l'endoscopie ne soit pas très courante dans les pays d'endémie de la schistosomiase (Tableau 1). L'EUS peut être combinée à une endoscopie pour obtenir plus d'informations sur l'état/les lésions des tissus qui ne seraient pas détectables visuellement à l'endoscopie. Des images 2D et des films peuvent être sauvegardées par endoscopie. L'endoscopie est utilisée pour le traitement des varices comme la ligature ou la sclérothérapie. L'endoscopie est utilisée dans le traitement de référence des varices œsophagiennes provoquées par l'hypertension portale dans la schistosomiase. Elle permet de visualiser et de traiter les collatérales, d'identifier la

présence d'ascite, d'hypertension portale, d'hépatomégalie, de splénomégalie et d'inflammation granulomateuse du foie par coelioscopie (Tableau 2).

	<b>Modalités d'imagerie <i>in vivo</i></b>					
	<b>EUS</b>	<b>TDM</b>	<b>IRM</b>	<b>Scintigraphie</b>	<b>TEP</b>	<b>Endoscopie</b>
<b>Schistosome</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Non
<b>Inflammation granulomateuse</b>	Oui, signal échogénique	Oui, prise de contraste	Oui, hyperintensités en imagerie anatomique pondérée T <sub>1</sub> et T <sub>2</sub> , prise de contraste	Non	Oui (65)	Oui (celioscopie)
<b>Fibrose hépatique (Symmer's pipestem)</b>	Oui, motifs standards, mesures des épaisseurs autour de la VP, de ses branches ainsi que de la vésicule biliaire	Oui	Oui, non quantitative	Non	Non	Non
<b>Hypertension portale</b>	Diamètre de la VP, vitesse du sang en Doppler	Temps portal après injection d'AC permettant de voir la dilatation des vaisseaux	Oui, veinographie	Perfusion hépatique par scintigraphie ou angioscintigraphie (64)	Non	Oui, qualitative (celioscopie)
<b>Hépatomégalie</b>	Evaluation qualitative et mesures de l'axe de l'organe, pas de volumétrie sans l'option 3D	Oui, analyse volumétrique	Oui, analyse volumétrique	Evaluation morphologique (66-68)	Non	Oui, qualitative (celioscopie)
<b>Splénomégalie</b>	Evaluation qualitative et mesures de l'axe de l'organe, pas de volumétrie sans l'option 3D	Oui, analyse volumétrique	Oui, analyse volumétrique	Non	Non	Oui, qualitative (celioscopie)
<b>Anomalies de la vésicule biliaire</b>	Oui, mesure de l'épaississement de l'épaisseur du bord de la vésicule biliaire	Oui	Oui	Non	Non	Non
<b>Varices oesophagiennes</b>	Oui avec une sonde spéciale	Oui, veinographie	Oui, veinographie	Non	Non	Oui, examen de référence
<b>Collatérales viscérales</b>	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui, qualitative (celioscopie)
<b>Ascite</b>	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui, qualitative (celioscopie)

Tableau 2 : Intérêts des modalités d'imagerie abdominales pour le suivi de la schistosomiase digestive

*AC= agent de contraste, EUS= Echographie à Ultrasons, HiFu= High intensity Focused ultrasound, IRM= Imagerie par Résonance Magnétique, TDM= Tomodensitométrie, TEP= Tomographie par émission de positons, VP= veine porte*

### 2.1.6. L'élastographie dans la Bilharziose

La fibrose hépatique peut être surveillée à l'aide de l'élastographie transitoire ultrasonore (FibroScan), une technique permettant d'évaluer la rigidité du foie (69). L'élastographie est basée sur la mesure de l'élasticité tissulaire suite à la propagation d'une onde de cisaillement mécanique à travers le foie. Cependant, l'élastographie transitoire ultrasonore a l'inconvénient d'être fortement dépendante de l'opérateur et moins fiable pour les organes profonds (70). L'analyse des caractéristiques de texture à partir des images de tomodensitométrie (TDM) permet la stadification de la fibrose dans le foie, mais est moins précise en cas de distribution hétérogène de la fibrose et est considérée comme inférieure à l'élastographie transitoire échographique (61).

L'élastographie par résonance magnétique (ERM) mesure les propriétés viscoélastiques du tissu hépatique, à savoir sa capacité à revenir dans le temps à sa forme initiale après application de forces de déformation, ceci en quantifiant la propagation des ondes de cisaillement. Cette technique peut être implémentée sur un système standard d'IRM mais requiert un dispositif de vibreur mécanique pour la génération des ondes de cisaillement. Il a été montré que la rigidité du foie corrèle avec le stade de fibrose chez des patients (71) et dans les modèles animaux (72). Une étude récente suggère que l'ERM discrimine plus précisément les fibroses de premiers stades que l'élastographie transitoire échographique (73). Toutefois, l'augmentation de la rigidité du foie n'est pas spécifique à la fibrose (74) et l'ERM peut être gênée chez les sujets avec une surcharge en fer sévère (73).

Références	Schistosomiase sans autres maladies hépatiques	Espèce de parasite	Caractéristiques de la population d'étude	Technologie élastographique	Modalités d'imagerie utilisées en complément de l'élastométrie	Contributions et conclusions principales	Limites
Wu et al, Parasitology International, 2018	Non	<i>S. japonicum</i>	106 patients (Chinois) avec une schistosomiase avancée et aucune infection en cours dont 80 patients sans autre maladie hépatique, 73 patients aux informations complètes (Score METAVIR: 3 F0, 11 F1, 22 F2, 24 F3, 13 F4)	Fibroscan®	Echographie pour classer en 5 grades + Doppler, Histologie	Pas de corrélation entre la MRH et le classement par ultrasons mais bonne corrélation avec l'histologie. La MRH est un paramètre fiable pour la prédiction de la fibrose hépatique avancée et la cirrhose chez les patients atteints de schistosomiase avancée à <i>S. japonicum</i>	Faible nombre de patients dans les sous groupes
Veiga et al, Wolters Kluwer Health, 2017	Non	<i>S. mansoni</i>	77 patients brésiliens: 30 atteints de schistosomiase hépatosplénique (24% motif B de Niamey, 28% motif C de Niamey, 48% motif D de Niamey), 30 VHC avec cirrhose et 17 contrôles.	Fibroscan®	EUS avec fluométrie Doppler, Doppler Couleur avec sonde convexe de 3,5 Mhz	La schistosomiase augmente les valeurs de la MRH par rapport aux contrôles.	Faible nombre de patients par sous-groupe. Aucune analyse n'incluant que des patients atteints de schistosomiase avancée (motifs D) et aucune forme sévère (E ou F) dans l'étude. La différenciation des patients atteints de schistosomiase en cirrhose par la MRH est biaisée.

Ramzy et al, Acta Tropica 2, 2017	VHC	Inconnu, <i>S. mansoni</i> très probablement*	352 Egyptiens avec hépatite chronique au VHC (cirrhose non décompensée, sans CHC): 122 contrôles, 122 positifs aux anticorps antischistosome et sans épaissement périportal, 108 positifs aux anticorps antischistosome et avec un épaissement périportal.	Fibroscan®	Echographie	Les tests aux antigènes de schistosome, aux anticorps anti-schistosome et l'épaississement périportal n'ont pas d'impact sur l'accord entre résultats de la biopsie et du fibroscan. Il y aurait seulement un rôle des forts taux d'anticorps anti schistosome.	L'analyse n'inclut pas l'épaisseur des branches du second ordre, l'état de la vésicule biliaire et on note l'absence d'analyse multivariée incluant les motifs de Niamey par EUS.
Bonnard et al, Journal of viral hepatitis, 2015	VHC	Inconnu, <i>S. mansoni</i> très probablement*	4 patients avec schistosomiase hépatosplénique détectés sur 500 biopsies hépatiques d'égyptiens avec HCC de VHC de génotype 4	Fibroscan®	Non	Aucune influence des sérologies positives pour la schistosomiase sur les résultats d'élastométrie.	Très faible nombre de patients présentant des lésions histologiques de la schistosomiase et aucune prise en compte des stades de la coinfection.
Esmat et al, Arab Journal of Gastroenterology, 2013	VHC	Inconnu, <i>S. mansoni</i> très probablement*	67 patients présentant une sérologie positive au schistosome chez 231 égyptiens infectés chroniquement au VHC (31 F0-F1, 13 F2, 14 F3 et 9 F4)	Fibroscan®	Non	Le statut sérologique positif au schistosome est en désaccord avec les résultats de la biopsie du foie et du fibroscan. Plus évidemment aux stades F2 et F3.	Petit nombre de patients par sous-groupes. Aucune autre technique utilisée comme l'échographie pour déterminer les motifs. Manque d'informations sur l'infection actuelle ou passée.

Tableau 3 : Etudes ayant exploité l'élastométrie pour l'évaluation de la fibrose hépatique bilharzienne

CHC= Carcinome Hépatocellulaire, EUS= Echographie Ultrasonore, HCC=Hépatite C Chronique, MRH=Mesure de la Rigidité Hépatique, VHC=Virus de l'Hépatite C. \*Epidemiology of schistosomiasis innovation Egypt : travel through time, Rashida M.R. Barakat, J Adv Res, 2013 Sept ; 4(5) :425-432.

## 2.2. Imagerie pré-clinique de la Bilharziose murine

### 2.2.1. Le modèle murin de schistosomiase

- **Généralités**

Plusieurs espèces de petits animaux peuvent être utilisées en recherche préclinique pour la réalisation de modèles expérimentaux de schistosomiase car le schistosome infecte une grande variété de mammifères, dont les rongeurs. Si le hamster a récemment été utilisé dans une étude sur le lien entre l'hépatocarcinome et l'infection (75), les souris sont les plus utilisées. Les souris sont des animaux dont l'élevage en grande quantité est facilement contrôlable tout comme le sexe des groupes expérimentaux, les caractéristiques génétiques et les temps d'infection sont des facteurs maîtrisables. C'est en partie pour cela qu'il est plus aisé d'étudier la maladie chez la souris que chez l'Homme (76).

Mais des différences existent entre les modèles précliniques et la maladie humaine. Généralement les hommes seraient plus touchés que les femmes mais chez la souris les femelles sont plus sensibles, la distribution dans le corps des œufs a aussi été montrée comme différente chez la souris (76). Les souris ont une durée moyenne de vie (2 ans environ) bien inférieure au temps de développement de la maladie hépatosplénique chez l'Homme. Les quantités de cercaires ne sont pas proportionnelles non plus. On utilise une charge 10 fois plus élevée par kg chez la souris (50 contre 5 parasites par kg chez l'Homme). Seulement 20 % à 50 % des cercaires infectants arriveraient au stade de vers reproducteur chez la souris (76). La réaction granulomateuse est à son maximum à la 8<sup>ème</sup> semaine d'infection chez la souris. La fibrose chez la souris serait davantage granulomateuse que chez l'Homme où elle serait majoritairement périportale. Enfin selon les souches de souris le développement de la fibrose peut varier (77). Un avantage du modèle est que la fibrose s'y développe rapidement. Il a été découvert du collagène entre la 9<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine d'infection à *S. mansoni* chez la souris (78).

Malgré de nombreuses différences notamment dans la difficulté de reproduire les « Symmer's pipes » dans le foie de souris elles restent le meilleur moyen d'étude préclinique avant d'envisager de passer sur des primates ou chez l'Homme lors d'essais thérapeutiques.

- **Anatomie générale de l'abdomen chez la souris**

L'anatomie digestive de la souris présente quelques variantes anatomiques par rapport à

l'Homme. Notamment au niveau du foie avec cinq lobes (latéral gauche, intermédiaire droit, latéral droit, carré et caudé) contre deux chez l'Homme (Figures 14 et 15).

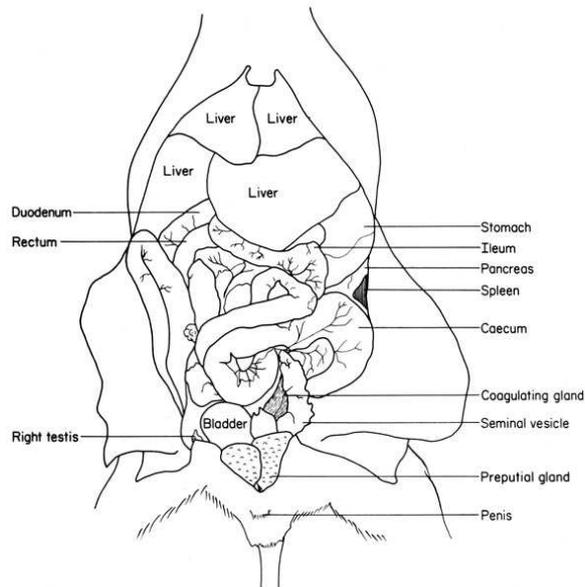


Figure 14 : Schéma anatomique des organes abdominaux chez la souris

Source: Cook MJ. *The Anatomy of the Laboratory Mouse*.  
 (<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure54.shtml>).

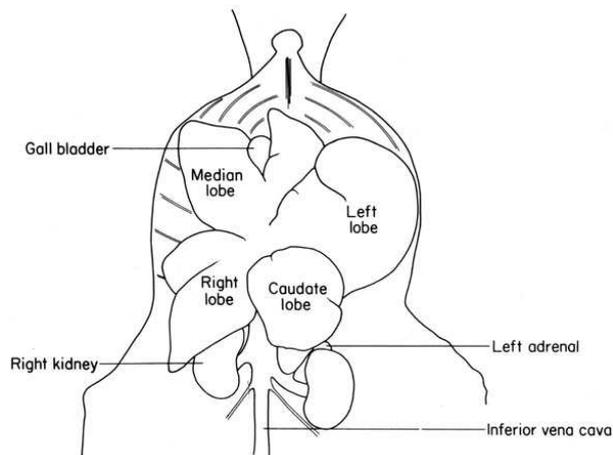


Figure 15 : Schéma anatomique des lobes hépatiques chez la souris

Source: Cook MJ. *The Anatomy of the Laboratory Mouse*.  
 (<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures/figure60.shtml>).

## 2.2.2. Revue des travaux utilisant des techniques d'imagerie pour l'étude de la schistosomiase digestive murine

Outre les méthodes translationnelles précédemment décrites pour l'exploration de la maladie humaine (échographie, TDM, IRM, TEP, Scintigraphie, etc.), d'autres méthodes d'imagerie appliquées en recherche pré-clinique exclusivement ont été également utilisées dans le but de mieux comprendre la pathogénèse de la schistosomiase, de visualiser directement le parasite, ou de réaliser des essais pré-cliniques. Ces méthodes non translationnelles sont brièvement décrites ci-dessous.

- **Principe de la tomographie par fluorescence moléculaire (FMT)**

Cette technique est basée sur l'injection de sondes fluorescentes à un animal que l'on soumet à une excitation laser. Les fluorochromes sont injectés plusieurs heures avant l'examen. Les animaux sont rasés puis placés dans une cassette avant d'être exposés à un système de balayage laser. La fluorescence émise est détectée par une caméra lorsqu'elle atteint la surface cutanée ce qui permet de déterminer et quantifier la distribution spatiale. Une imagerie tridimensionnelle peut être obtenue après reconstruction de données tomographiques permettant de déterminer la distribution des fluorochromes à toutes les profondeurs tissulaires.

- **Principe de l'imagerie de bioluminescence**

L'imagerie de bioluminescence d'ingénierie génétique qui repose sur l'utilisation de souris transgéniques. Un système gène promoteur / gène rapporteur est inséré dans le génome de la souris à l'aide d'un vecteur viral afin d'obtenir une coexpression de ces gènes dans le modèle étudié. Le gène promoteur est le gène dont on veut étudier l'expression grâce à l'émission de lumière par l'intermédiaire de l'action du gène rapporteur. Le gène rapporteur est un gène codant pour un enzyme dont l'action sur son substrat (souvent l'oxydation de la luciférine par la luciférase) génère une molécule bioluminescente. Cette réaction ne nécessite aucune exposition préalable à la lumière mais nécessite l'injection du substrat de l'enzyme avant l'imagerie. L'émission produite est faible et peut être comprise entre 400 nm et 700 nm de longueur d'onde selon le type d'enzyme utilisé. La détection du rayonnement se fait généralement par l'utilisation d'une caméra CCD.

Très peu de travaux d'imagerie préclinique ont été effectués à ce jour sur la bilharziose digestive. En dehors de notre étude, seulement 7 autres articles ont été publiés à notre connaissance.

Le Tableau 4 présente une synthèse des études réalisées jusqu'à présent sur le modèle expérimental de bilharziose digestive.

Références	Modalités d'imagerie et méthode	Modèle animal et groupes	Parasite, nombre et mode d'infection	Période d'observation	Caractéristiques de l'infection observées	Principaux résultats	Applications potentielles
Maezawa K et al. Tropical Medicine and Health, 2018	Imagerie classique à ultrasons (sonde humaine de 18 à 4 MHz) et système à haute résolution (30 µm avec sonde de 50 MHz)	Souris BALB/c femelles âgées de 5 semaines, infectées (n=22) et contrôles (nombre inconnu)	<i>S. japonicum</i> (souche <i>Yamanashi</i> ), 25 cercaires (n=12) et 10 cercaires (n=10), voie percutanée	Jusqu'à 13 semaines (n=12) et jusqu'à un an (n=10) post infection	Morphométrie de la rate et du foie, signes d'hypertension portale, épaissement de la paroi intestinale, motifs de fibrose hépatique	Visualisation de vers vivants dans la veine porte. Evaluation en temps réel de l'impact de la schistosomiase sur les organes digestifs.	Études des effets de nouvelles molécules antiparasitaires, études longitudinales de nouveaux traitements et gènes ou molécules d'intérêt sur la schistosomiase hépatosplénique. Amélioration de l'évaluation de la maladie des patients en clinique.
Cheng et al, Parasite Immunol, 2013	Micro SPECT/TDM avec injection de 188Re-OCTAM	Souris BALB/c males de 6 à 8 semaines divisées en 3 groupes de souris infectées et un groupe contrôle (n=7-10 par groupe)	<i>S. mansoni</i> (souche Puertoricaine), 100 cercaires, voie percutanée	Imagerie à 1, 4, 24 et 48h post injection de 188Re-OCTAM, 9, 12 et 18 semaines post infection	Inflammation du foie, nécrose et fibrose	188Re-OCTAM identifie des niveaux variables de fonctions hépatiques restantes à différents stades de la maladie.	Études longitudinales sur les médicaments antifibrosants, les gènes ou d'autres molécules avec des effets sur l'inflammation du foie, la fibrose et la nécrose.
Salem N et al, PLoS Negl Trop Dis, 2010	microTEP utilisant du 18FDG + FMT avec un agent d'imagerie proche de l'infrarouge et IRM 7T pour des images MSME pondérée T <sub>2</sub> images avec produit de contraste	Souris femelles nude (nu/nu) âgées de 6 semaines infectées (n=35) et contrôles (n=4). Six souris traitées au praziquantel	<i>S. mansoni</i> , nombre inconnu de cercaires, voie percutanée.	5-6 semaines d'infection avant l'imagerie, comparaison avec l'histologie.	Détection de la présence des vers de schistosomes, quantification et localisation.	<i>S. mansoni</i> fixe le 18FDG qui pourrait être utilisable pour quantifier la charge en vers. Corrélation observée uniquement chez les souris avec moins de 60 vers.	Études sur les effets de nouvelles molécules antiparasitaires sur les vers. Diagnostic en exploration clinique.
Krautz-Peterson et al, Faseb J, 2009.	FMT avec un agent d'imagerie émetteur proche infra-rouge	Souris femelles BALB/c âgées de 6 à 8 semaines (nombre exact inconnu)	<i>S. mansoni</i> (souche Puertoricaine), 100 ou 50 cercaires par souris. <i>S. hematobium</i> , 25 cercaires par souris et <i>S. japonicum</i> , 25 cercaires par souris, voie percutanée.	5 semaines ( <i>S. mansoni</i> ), 8 semaines ( <i>S. hematobium</i> ) et 6 semaines ( <i>S. japonicum</i> ) post infection	Détection de la présence des vers de schistosomes, leur quantification et leur localisation.	Nouvelle méthode de détection, de quantification et de localisation des vers permettant d'évaluer des traitements antiparasitaires sur les schistosomes.	Études d'effets de nouvelles molécules antiparasitaires sur les vers

Davies S et al. Int J Parasitol, 2005	Imagerie par bioluminescence avec injection intrapéritonéale de luciférine substrat de la luciférase	Souris EPX334-luc et EPX339-luc et EPX-luc hétérozygotes comme contrôles (nombre exact inconnu). EPX= gène activé dans les cellules éosinophiles	<i>S. mansoni</i> , 50 cercaires, voie sous-cutanée.	Sur une période de 84 jours suivant l'infection	Eosinophilie et éosinopoièse	Démonstration de l'efficacité d'EPX-luc pour détecter et quantifier l'éosinophilie et l'éosinopoièse dans la schistosomiase. Première description <i>in vivo</i> de la réponse éosinopoiétique aux schistosomes.	Etude de l'impact de nouvelles molécules sur l'éosinophilie et l'éosinopoièse dans la schistosomiase.
Kosaka et al. Jpn J Physiol, 2000	Spectromètre IRM à 9.4T, séquences pondérées en T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , T <sub>2</sub> *, T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub> * et RARE (cholangiographie) sans agent de contraste	Souris BALB/c âgées de 10 à 20 semaines et contrôles (nombre exact inconnu)	<i>S. mansoni</i> , 150 cercaires, voie sous-cutanée.	Suivi pendant 13 semaines après l'infection	Etat du foie et des conduits biliaires intrahépatiques	Aucun changement significatif jusqu'à 4 semaines après l'infection, régions à intensité de signal plus élevée dispersées dans tout le foie après 6 semaines et régions plus étendues (patches) observées à 13 semaines.	Développement de nouvelles séquences IRM pour étudier la schistosomiase et suivre la maladie. Utilisable dans les explorations humaines.
Oxamniquin: a labeling procedure with technetium-99m and a biodistribution study in mice. Rebello. <i>Journal of nuclear biology and medicine (Turin, Italy : 1991)</i> Volume: 38 Issue 4 Suppl 1 (1994) ISSN: 0368-3249	na	na	na	na	na	na	na

Tableau 4 : Etudes d'imagerie précliniques de la pathologie digestive bilharzienne

« na » a été attribué lorsque nous n'avons pas eu accès à l'article. Abréviations: FMT= Fluorescence molecular tomography (tomographie par fluorescence moléculaire), IRM= Imagerie par Résonance Magnétique, SPECT= Single-photon emission computed tomography (tomoscintigraphie), TDM= Tomodensitométrie, TEP= Tomographie par Emission de Positrons

# 3. Relaxométrie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et étude de la fibrose

## 3.1 Eléments de RMN

### 3.1.1. L'aimantation nucléaire

La RMN repose sur les propriétés physiques des noyaux des atomes. Certains noyaux possèdent un moment magnétique de spin  $I$  et un moment magnétique de spin  $\mu$  liés par la relation  $\mu = \gamma \cdot \hbar \cdot I$  ( $\hbar$  = constante de Planck/2 $\pi$ ,  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique). Le nombre quantique de spin dépend des nucléons qui constituent le noyau donc du nombre de masses  $A$  et du numéro atomique  $Z$  ( $A$  étant le nombre de nucléons et  $Z$  le nombre de protons contenus dans un noyau atomique donné). Si  $A$  et  $Z$  sont pairs le nombre quantique de spin  $I$  est nul,  $A$  est pair et  $Z$  impair  $I$  est entier et si  $A$  est impair et  $Z$  pair ou impair  $I$  est un demi entier. Les protons, constituants avec les neutrons des noyaux atomiques, chargés d'énergie positive (à l'opposé des électrons chargés négativement qui gravitent autour du noyau), possèdent une propriété appelée spin représentée par une rotation autour de leurs axes. Le cas du spin  $1/2$  est le plus fréquent, c'est le cas considéré pour toutes les explications qui suivent. Le moment magnétique existe car toute charge en mouvement génère un champ magnétique (Figure 16).

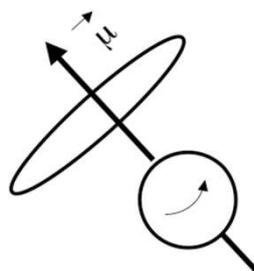


Figure 16 : Représentation du moment magnétique spin d'un proton

Source: CRMBM

Les protons peuvent tourner dans un sens ou dans le sens inverse. Selon leur sens de rotation le spin aura une valeur positive ou négative. Lorsque le nombre de protons est pair dans un noyau il y a autant de protons dont le spin est positif que négatif. Il ne résulte donc

aucun magnétisme du noyau. A l'inverse lorsque le nombre  $Z$  est impair il demeure un proton non apparié et le noyau atomique aura un moment magnétique. Ce sont les propriétés de ces moments magnétiques surnuméraires présents par exemple dans les  $^1\text{H}$  de l'eau qui seront exploitées en RMN.

### 3.1.2. Polarisation et excitation des spins par radiofréquences en RMN

Sans champ magnétique externe (celui de la terre étant négligeable) les moments magnétiques constitutifs des tissus biologiques ont des orientations aléatoires si bien que la somme des vecteurs de ces moments est nulle. Il n'y a donc aucune aimantation détectable macroscopiquement (Figure 17).

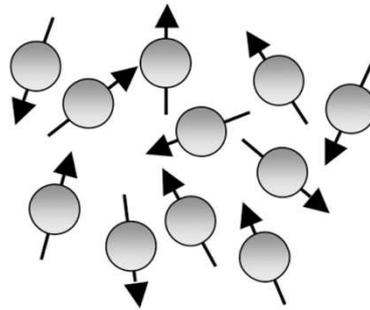


Figure 17 : Orientations aléatoires des spins en l'absence de champ magnétique externe  $B_0$

Source: CRMBM

Lorsque l'on soumet les spins à un champ magnétique intense ( $B_0$ ), les vecteurs d'aimantation vont alors s'orienter parallèlement ou anti-parallèlement à ce champ (Figure 18). Les spins nucléaires se répartissent entre ces deux états, celui parallèle à  $B_0$  étant le plus stable sera légèrement plus peuplé. Plus ce champ sera intense, plus ils seront nombreux car l'écart en énergie de ces deux états est déterminé par  $B_0$ . L'aimantation  $M$  qui résulte des moments magnétiques de spin nucléaire est appelée aimantation  $M_z$  ou aimantation longitudinale puisqu'elle sera à l'équilibre sur l'axe  $z$  du même sens que  $B_0$ . Les spins précèdent autour de  $B_0$  avec un angle (la phase) variable à la fréquence de Larmor ( $\omega_0$ ) en décrivant un cône (Figure 19).

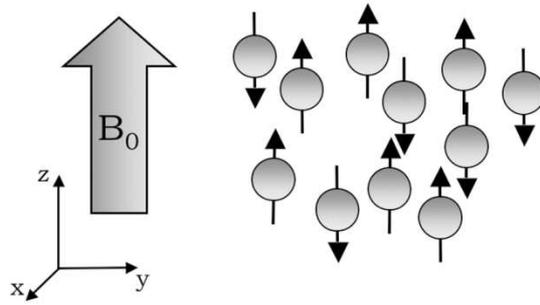


Figure 18 : Orientations des spins lorsqu'ils sont soumis à un champ magnétique  $B_0$

*Le schéma néglige l'angle entre le moment magnétique de spin et  $B_0$  (d'environ  $55^\circ$ ). Source: CRMBM*

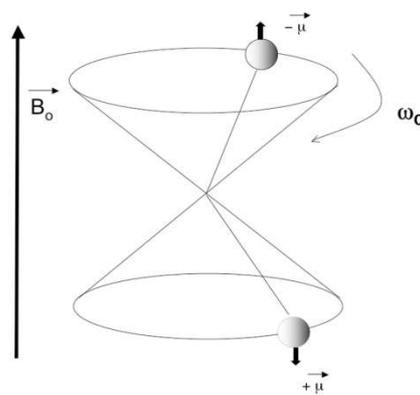


Figure 19 : Précession d'un spin et fréquence de Larmor  $\omega_0$

*Source: CRMBM*

Pour étudier les propriétés magnétiques de ces noyaux il faut les sortir de cet équilibre (état énergétique le plus stable) en les excitant avec une onde de radiofréquence (RF) permettant l'apport de l'énergie nécessaires à la transition entre l'état  $\alpha$  parallèle à  $B_0$  et l'état antiparallèle  $\beta$  moins stable énergétiquement (Figure 20).

A l'équilibre, les vecteurs d'aimantations longitudinaux sont déphasés et donc la somme de leurs composantes transversales (aimantation dans le plan Mxy) est nulle. Par conséquent il n'y a pas d'aimantation transverse macroscopique à l'équilibre. La fréquence de rotation des spins dépend de l'intensité du champ magnétique  $B_0$  et du rapport gyromagnétique  $\gamma$ , une constante spécifique d'un noyau donné, correspondant à un coefficient traduisant la colinéarité de  $I$  et  $\mu$  ; et se calcule par la relation de Larmor. En soumettant le milieu à une onde de RF de fréquence proche de la fréquence de Larmor  $\omega_0$  les spins vont entrer en résonance et absorber l'énergie apportée par la RF. Quelques spins passeront au niveau énergétique supérieur en absorbant cette RF (Figure 20) et du point de vue macroscopique l'aimantation va basculer. Par exemple, si on applique une onde de RF de  $90^\circ$

(l'angle étant fonction de l'intensité et la durée de l'onde), du point de vue macroscopique l'aimantation va basculer dans le plan xy et on l'appellera  $M_{xy}$  (Figure 21).

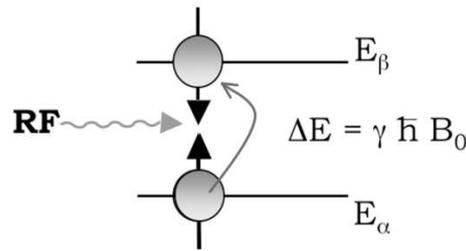


Figure 20 : Transition d'un spin du point de vue énergétique lorsqu'il est excité par une onde de radiofréquence et condition de résonance

Source: CRMBM

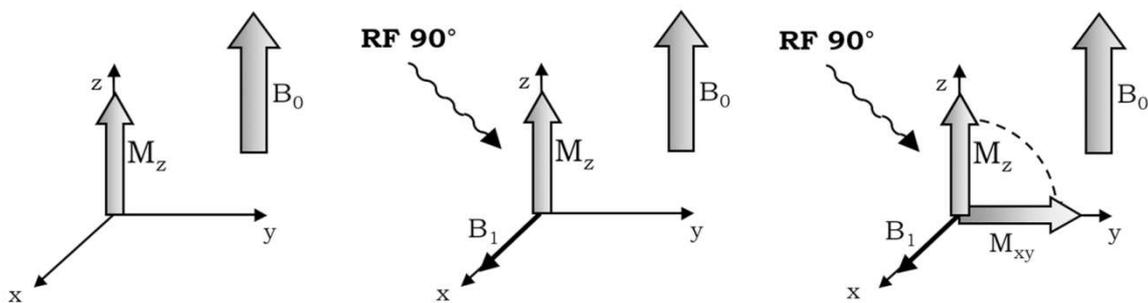


Figure 21 : Bascule de l'aimantation macroscopique lorsque les protons sont excités par une onde radiofréquence

L'aimantation longitudinale  $M_z$  alignée avec le champ magnétique intense  $B_0$  est basculée dans le plan transverse (xy) par une onde radiofréquence (RF) de  $90^\circ$  représenté par un champ magnétique variable  $B_1$ .

Source: CRMBM

### 3.1.3. Relaxation et signal RMN

Après excitation, un retour vers l'équilibre thermodynamique se fait progressivement de sorte que le vecteur d'aimantation macroscopique retrouve sa valeur initiale  $M_z$  et que plus aucune aimantation transverse macroscopique ne persiste. Ce retour à l'équilibre s'appelle la relaxation et est dû à deux phénomènes qui ont lieu simultanément : la repousse de l'aimantation longitudinale  $M_z$  et la décroissance de l'aimantation transverse  $M_{xy}$ . Les deux relaxations ont une évolution exponentielle.

La constante de temps de la relaxation longitudinale, le  $T_1$  se définit par le temps écoulé entre l'impulsion RF d'excitation et une repousse de 63% de  $M_z$  (Figure 22).

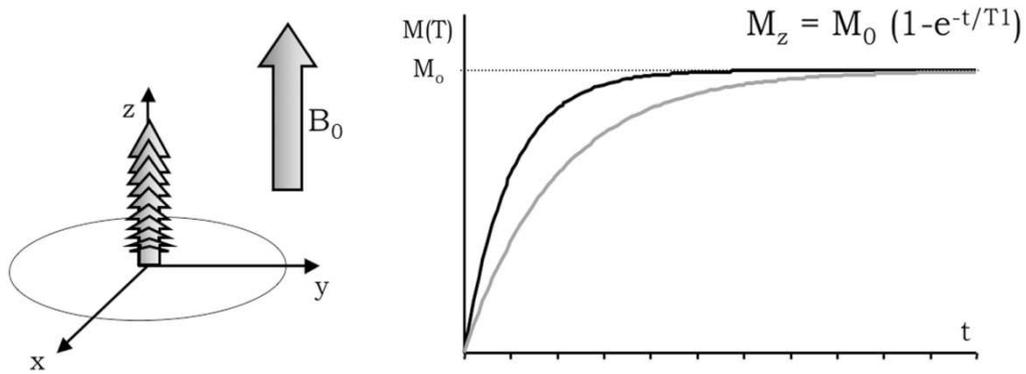


Figure 22 : Repousse de l'aimantation longitudinale avec le temps de relaxation  $T_1$  lors du retour à l'équilibre

Source: CRMBM

La constante de temps de la relaxation transverse, le  $T_2$ , se définit par le temps écoulé entre l'impulsion RF d'excitation et une décroissance de 37% de  $M_{xy}$  (Figure 23).

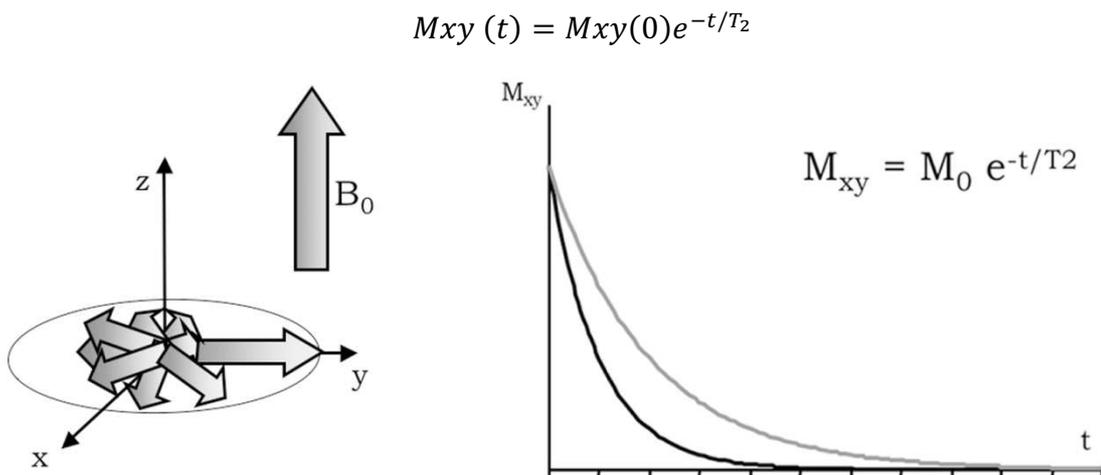


Figure 23 : Décroissance de l'aimantation transverse avec le temps de relaxation  $T_2$  lors du retour à l'équilibre

Source: CRMBM

Le  $T_1$  est toujours plus grand ou égal au  $T_2$ .

On observe une décroissance du signal de la précession libre ou « FID » (Free Induction Decay) émis par les moments magnétiques en précession. Le FID est un signal de décroissance libre, c'est-à-dire un signal sinusoïdal décroissant avec une constante de temps  $T_2^*$  (Figure 24).

Il s'agit d'une relaxation transverse accélérée par la présence des inhomogénéités du champ magnétique statique  $B_0$ . Pour s'affranchir des effets des inhomogénéités du champ

magnétique sur le signal on peut utiliser une impulsion RF d'inversion (de  $180^\circ$ ) à mi-temps entre l'impulsion RF d'excitation et l'acquisition du signal.

Le signal acquis dépend finalement de l'aimantation longitudinale et transverse au moment de l'acquisition, c'est-à-dire du temps que l'on laisse aux relaxations longitudinale et transverse pour avoir lieu. Le temps laissé à la repousse de l'aimantation longitudinale  $M_z$  par la relaxation longitudinale est le plus souvent le temps de répétition (TR) défini entre deux impulsions d'excitation. Le temps laissé à la décroissance de l'aimantation transverse  $M_{xy}$  par la relaxation transverse est le temps d'écho (TE) défini entre l'impulsion d'excitation et l'acquisition du signal. Dans ce cas, le signal apparaît sous forme d'écho généré soit par une impulsion d'inversion ce qui résulte en un signal dépendant de  $T_2$ , soit par l'inversion d'un gradient de champ magnétique, ce qui génère un écho de gradient qui est un signal dépendant de  $T_2^*$ . Les acquisitions d'échos sont effectuées à l'aide d'antennes (bobines), et des gradients de champs magnétiques sont mis en jeu pour coder l'espace afin que chaque voxel (unité volumique de l'espace) ait une fréquence de résonance et une phase bien précise. Les échos serviront ensuite à remplir une matrice (espace k de Fourier) par itération dont une transformation mathématique (transformée de Fourier inverse) permet la reconstruction des images.

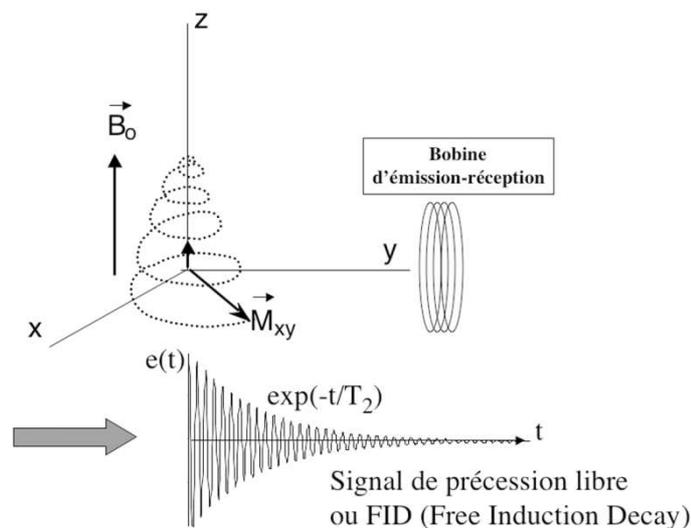


Figure 24 : Mesure du signal de précession lors de la décroissance libre de l'aimantation transversale avec le temps de relaxation  $T_2^*$

Source: CRMBM

En ce qui concerne les acquisitions d'IRM dites anatomiques, selon le contraste recherché dans l'image, on acquiert des échos à des TR et des TE différents (Tableau 5). Si le TR est court par rapport au  $T_1$ , le signal sera plutôt pondéré en  $T_1$ . Si le TE est long par rapport au  $T_2$ , le signal sera plutôt pondéré en  $T_2$ . Si le TR est long par rapport au  $T_1$  et le TE court par rapport au  $T_2$  on a un faible effet des relaxations longitudinale et transverse sur l'aimantation, et le contraste sera uniquement dû à la densité de protons dans les tissus.

Pondération	TR court	TR long
TE court	$T_1$	Densité de protons
TE long	Pondération mixte $T_1$ et $T_2$	$T_2$

Tableau 5 : Pondérations en RMN selon le TR et le TE

*TE= Temps d'Echo, TR = Temps de Répétition.*

### 3.2. Méthodes relaxométriques

Les constantes de temps de relaxation dépendent de la structure et de la composition des tissus, qui peuvent varier avec les processus physiologiques ou pathologiques, et influencent fortement le contraste en IRM. A partir d'images IRM pondérées selon un des paramètres de relaxation, des cartes dérivées représentant une distribution spatiale de valeurs quantitatives d'une constante de temps de relaxation particulière ( $T_2$ ,  $T_2^*$  ou  $T_1$ ) peuvent être générées. Pour produire des cartes de temps de relaxation on acquiert plusieurs échos pour chaque voxel de l'image, par exemple en faisant varier le paramètre TE pour chaque acquisition pour obtenir des échos avec une pondération variable par la relaxation  $T_2$ . Selon les paramètres d'acquisition et les séquences utilisés, ces échos représentent une série de points sur la courbe de relaxation et permettent de déduire le  $T_2$  (Figure 25A), le  $T_2^*$  (Figure 25B) ou le  $T_1$ . Ces points permettent, à la condition qu'ils soient assez nombreux et leurs valeurs non artefactées, de modéliser la courbe de relaxation exponentielle du signal et de calculer la valeur du temps de relaxation étudié pour chaque voxel (unité tridimensionnelle de l'espace).

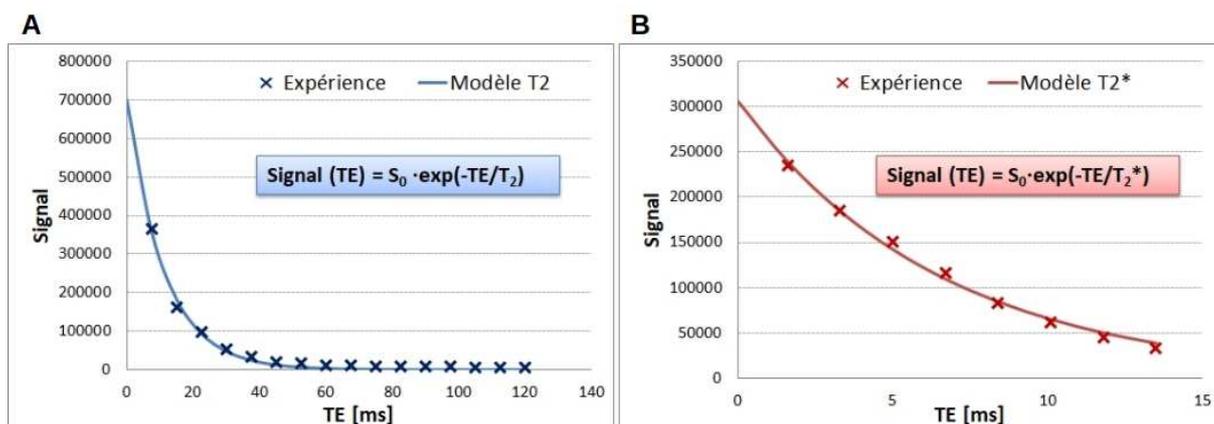


Figure 25 : Modélisations de courbes de décroissance des signaux  $T_2$  et  $T_2^*$  calculées à l'aide des points expérimentaux obtenus par relaxométrie du foie de souris à 11,75T  
*Les données de l'expérience de relaxométrie  $T_2$  (A) ou  $T_2^*$  (B) dans un voxel donné sont représentées par des croix pour chaque temps où le signal a été mesuré (TE). Une fonction passant au plus près de ces points est alors ajustée en utilisant un modèle mono exponentiel (équations en encadrés). Les signaux sont donnés en unités arbitraires et sont des exemples des relaxométries obtenues dans notre étude.*

### 3.3. Facteurs influençant les valeurs relaxométriques

Bien que les valeurs de constante de temps de relaxation puissent varier avec l'intensité du champ magnétique, la tendance à augmenter ou à diminuer lors d'un processus physiologique ou pathologique est indépendante du champ magnétique. Dès les années 70, Raymond Damadian a observé une alteration des constantes de temps de relaxation des tissus lors d'un processus pathologique ce qui a ensuite été confirmé par de nombreuses études.

La présence de fer raccourci les  $T_2$  et  $T_2^*$ . La perfusion sanguine, l'oxygénation du sang, la viscosité, le contenu en graisse, la température et de multiples autres paramètres influencent les constantes de temps de relaxation. L'inflammation, généralement accompagnée d'un œdème et d'une hyper-perfusion augmente les temps de relaxation.

Tissus	$T_1$	$T_2$
Liquide synovial	3600 ms	770 ms
Graisse	400 ms	100 ms
Parenchyme hépatique	800 ms	30 ms
Muscle	1200 ms	30 ms

Tableau 6 : Ordres de grandeur des temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  selon les tissus à 3T

Source: *What are normal relaxation times of tissues a 3T? Magn Reson Imaging, 2017 Jan ;35 :69-80.*

### 3.4. Applications des méthodes de relaxométrie à l'étude de la fibrose des organes

La relaxométrie a été proposée pour la stadification de la fibrose hépatique et a été évaluée dans un certain nombre d'études. Chez l'Homme, les altérations du temps de relaxation transversal  $T_2$  au cours du processus de fibrogénèse hépatique étaient généralement plus sensibles que l'augmentation du temps de relaxation longitudinal  $T_1$  (79-81). Ex vivo il a été noté une baisse des temps de relaxation  $T_2$  à l'inverse des résultats in vivo (82).

Dans les études IRM précliniques utilisant des systèmes IRM équipés d'un haut champ magnétique ou ultra-haut ( $3T < B_0 < 21T$ ) pour augmenter la résolution spatiale ou le rapport signal sur bruit, les temps de relaxation  $T_1$  tendent à différer moins entre les tissus fibrosés que les temps de relaxation transversaux. En outre, l'obtention des acquisitions IRM nécessaires pour la cartographie du  $T_2$  est moins difficile et plus fiable que pour la cartographie  $T_1$  dans un contexte de synchronisation respiratoire (synchronisation des séquences IRM avec la respiration). Tous les échos requis pour l'analyse  $T_2$  sont acquis en quelques centaines de millisecondes après le déclenchement de l'impulsion d'excitation par la synchronisation avec la respiration, tandis que la cartographie  $T_1$  nécessite un échantillonnage répété avec des TR précis allant jusqu'à quelques secondes, sans que les TR soient influencés par la synchronisation respiratoire. De plus, les temps de relaxation  $T_2$  et  $T_2^*$  sont également des marqueurs sensibles des dépôts de fer et des hémorragies (83, 84).

## 4. Problématique, hypothèses, objectifs et stratégie mise en œuvre

### 4.1. Problématique et hypothèses

#### 4.1.1. Problématique

Notre état de l'art nous a permis d'identifier des besoins, notamment dans le diagnostic non invasif et quantitatif de la fibrose hépatique bilharzienne. En effet la fibrose provoquée par cette infection est trop peu étudiée en clinique à l'aide de méthodes d'imagerie novatrices car il peut s'avérer difficile en zone d'endémie d'accéder à des modalités innovantes et de plus les études sont longues à mettre en œuvre sur le plan thérapeutique.

Les études précliniques sont nécessaires pour avancer dans la connaissance et le traitement de cette infection mais sont coûteuses en animaux et nécessitent un sacrifice pour pratiquer l'analyse histologique du foie pour l'étude de la fibrose hépatique. Très peu de suivis longitudinaux ont été effectués sur les modèles murins qui n'ont pas complètement été caractérisés *in vivo* afin d'évaluer de nouvelles stratégies médicales. Il fallait donc trouver une technique non invasive et quantitative pour évaluer la fibrose hépatique et ses conséquences chez les souris infectées par *S. mansoni* sans avoir à les sacrifier.

#### 4.1.2. Hypothèses

Notre première hypothèse est que le modèle murin de la schistosomiase convient à la recherche pharmaceutique et à la recherche fondamentale les souris étant infectées par des espèces parasitaires pathogènes pour l'homme, nous avons donc supposé qu'il reproduirait les caractéristiques anatomopathologiques de la maladie humaine.

Deuxièmement, nous pensons que de nouvelles méthodes d'imagerie médicale pourraient être développées ou exploitées pour la recherche clinique et préclinique sur la bilharziose digestive, nous proposons donc d'investiguer l'intérêt de la mesure relaxométrique du T<sub>2</sub> comme marqueur candidat de la fibrose hépatique bilharzienne.

## 4.2. Objectifs et stratégie

### 4.2.1. Objectifs de cette étude

L'objectif premier de cette étude était de fournir la première caractérisation *in vivo* de l'évolution des atteintes hépatiques et spléniques de la schistosomiase intestinale murine en utilisant l'IRM. Le second objectif était de rechercher des biomarqueurs quantitatifs et non-invasifs permettant l'évaluation future de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la forme digestive de la maladie dans des modèles murins.

Plus généralement, nous avons voulu démontrer l'intérêt de développer dans un but de recherche translationnelle des outils d'imagerie performants qui puissent servir dans diverses études sur les hépatopathies chroniques infectieuses en nous appuyant sur l'exemple de la bilharziose.

### 4.2.2. Stratégie mise en œuvre

Une couverture abdominale totale peut être obtenue avec l'IRM. En plus de la détection d'indicateurs morphologiques de la fibrose hépatique tels que la splénomégalie et l'hypertension portale sur des images conventionnelles (54), diverses méthodes IRM peuvent être utilisées pour l'étude des maladies hépatiques comme la Bilharziose.

L'IRM pondérée en diffusion, une technique sensible à la diffusivité de l'eau généralement utilisée pour étudier la microstructure tissulaire, a également été utilisée puisque la fibrose devrait limiter le mouvement de l'eau (85). Cependant, en raison du manque de normalisation et de facteurs confondants tels que la perfusion altérée ou l'inflammation qui l'accompagne, cette technique se révèle peu sensible aux premiers stades de la fibrose hépatique (86, 87). Une autre technique d'IRM, connue sous le nom d'imagerie par mouvement incohérent intravoxel (88), permet de distinguer le mouvement microscopique des molécules d'eau dans les compartiments intra- et extracellulaires et la microcirculation du sang. Par conséquent, les paramètres dérivés sont mieux corrélés au stade de la fibrose que l'imagerie pondérée par diffusion chez les patients (89) et les modèles animaux (90). Cependant, cette technique ne s'est pas révélée supérieure à l'ERM pour distinguer les stades de fibrose légers à intermédiaires chez les patients (91).

Les scores qualitatifs et quantitatifs des caractéristiques de la texture hépatique par IRM double contraste, une technique d'IRM basée sur l'injection de deux types de produits de contraste (oxydes de fer super paramagnétiques et chélates de gadolinium) ont permis de

distinguer la fibrose légère et de la fibrose sévère (92). Dans les modèles de rongeurs, l'IRM utilisant un agent de contraste à base de gadolinium ciblant le collagène de type I a montré une fixation dans les foies fibrosants en bonne corrélation avec la quantification histologique du collagène (93, 94).

Fort de l'intérêt des études précliniques de développements pharmacologiques et diagnostiques dans l'évolution de la prise en charge de la bilharziose digestive, nous avons choisi d'explorer la pathologie hépatosplénique bilharzienne et de la caractériser chez le modèle murin de schistosomiase à *S. mansoni* en utilisant la modalité d'IRM et les techniques histologiques classiques ; afin de suivre *in vivo* et dans le temps les complications physiologiques et également pour tenter d'exploiter la relaxométrie T<sub>2</sub> et T<sub>2</sub>\* dans le but de définir un paramètre quantitatif de la fibrose du foie causée par cette infection.

# MATERIELS ET METHODES

## 1. Modèle expérimental de bilharziose/schistosomiase digestive chez la souris

### 1.1. Les souris

Le projet de recherche a été réalisé en accord avec la réglementation française (décret n° 2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013) et la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010. Le projet a été approuvé par notre comité institutionnel sur l'éthique en recherche animale (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale n° 14 (CEEA14), autorisation de projet n° 02157.02).

Le modèle expérimental de schistosomiase a été mis en œuvre sur la souche CBA/J qui est souvent utilisée pour ce modèle (95). Les animaux utilisés dans notre étude étaient des femelles âgées de 6 semaines à leur arrivée au laboratoire et provenaient du centre d'élevage (Charles River Laboratories, France). Le choix d'individus femelles a été guidé par deux considérations : 1) les femelles sont moins agressives que les mâles, ce qui réduit le risque de blessures et de mutilations au sein des cages, 2) leur poids est plus faible que celui des mâles (Figure 26), ce qui est un avantage dans le cadre d'un suivi longitudinal de 10 semaines. Il fallait en effet que les animaux puissent être positionnés sans difficulté dans la sonde corps entier en fin de suivi alors que les animaux étaient âgés de 17 à 18 semaines (la sonde ayant un diamètre intérieur de 3 cm et étant prévue pour des souris dont le poids corporel n'excède pas 40g) (Figure 35).

Les souris étaient hébergées en armoire ventilée à une température comprise entre 22°C et 24°C avec un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité ainsi qu'un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les animaux étaient maintenus en groupes sociaux de 4 à 5 individus par cage afin de respecter leur comportement grégaire naturel et de réduire le stress. Ils étaient hébergés dans un environnement enrichi leur permettant d'exprimer différents comportements, afin de diminuer l'agressivité et de réduire l'ennui (rondins de bois à ronger, coton pour la nidification, refuge en plastique pour se cacher, et fast-track pour l'exercice).

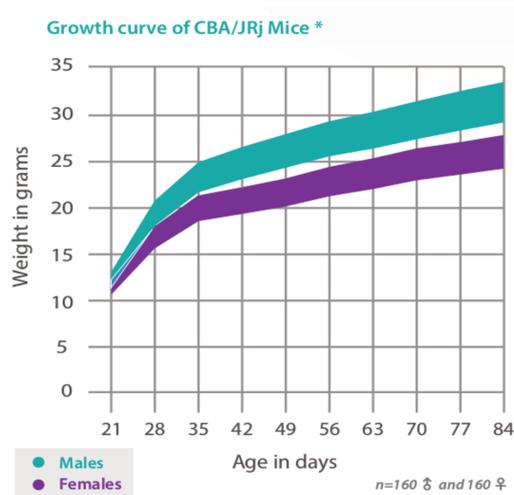


Figure 26 : Comparaison des courbes de poids entre souris CBA/J femelles et mâles d'après Janvier-Labs

*Les femelles ont un poids inférieur aux mâles qui dépassent 30 g dès 10 semaines. Ces données proviennent du fournisseur Janvier-Labs car le graphique de Charles River n'allait pas au-delà de 10 semaines d'âge.*

## 1.2. Induction de la schistosomiase digestive chez la souris

Après un délai d'acclimatation d'au minimum une semaine, les souris étaient infectées par voie percutanée à l'âge de sept semaines avec 30 cercaires de la souche vénézuélienne de *S. mansoni* sous anesthésie (injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine/xylazine (kétamine 100 mg/kg, xylazine 4 mg/kg). Les cercaires, maintenus par passage à travers le mollusque d'eau douce *Biomphalaria glabrata*, étaient comptés sous microscope binoculaire au grossissement 40X. L'abord percutané a été préféré car correspondant au mode naturel d'infection par le parasite. Le comptage a été effectué sur au moins 5 dépôts de 10 à 50 µl déposés sur une lame. Après comptage des cercaires dans chacun des dépôts de volumes connus, une concentration moyenne de cercaires/µl était calculée. Une fois déterminé, le volume de solution infectante contenait 30 cercaires (nombre nécessaire à l'infestation d'une souris dans notre protocole). Ce dernier était dilué avec de l'eau de façon à obtenir un volume final de 500 µl et placé pendant 60 minutes sur l'abdomen tondu des souris. Afin d'éviter que le liquide infectant ne coule sur les flancs de l'animal, les souris étaient placées en décubitus dorsal dans une gouttière de contention fixée sur la paillasse à l'aide de pâte à modeler. Un anneau métallique sur la partie tondu de l'abdomen était également placé afin de circonscrire le liquide infectant (Figure 27).



Figure 27 : Infection percutanée par *S. mansoni* d'une souris CBA/J anesthésiée

Après induction de la maladie, les animaux étaient suivis cliniquement. Aucune perte de poids n'ayant été signalée dans ce modèle, les animaux étaient pesés uniquement à chaque session d'IRM. En revanche, ils étaient observés quotidiennement (apparence, comportement général, possibles signes cliniques) afin d'identifier toute anomalie indiquant une souffrance nécessitant le retrait du protocole, voire l'euthanasie (ex : prostration, vocalises, absence de toilettage, saignement, respiration altérée, etc).

### 1.3. Le cycle artificiel de *S. mansoni*

Afin de conserver le parasite accessible au sein du laboratoire, il fallait recréer le cycle de vie de manière artificielle pour que nous puissions infecter les souris au moment opportun. Il était donc nécessaire de maintenir en permanence un élevage de *Biomphalaria glabatra*, l'hôte intermédiaire de *S. mansoni*, en vue de la production de cercaires nécessaires à l'infestation de l'hôte définitif, c'est-à-dire la souris. Le protocole utilisé avait été développé dans l'unité de recherche « Génétique et Immunologie des Maladies Parasitaires » (GIMP) INSERM UMR S906, Dir Alain DESSEIN, et se rapprochait d'autres protocoles publiés dans la littérature (96) (Figure 28).

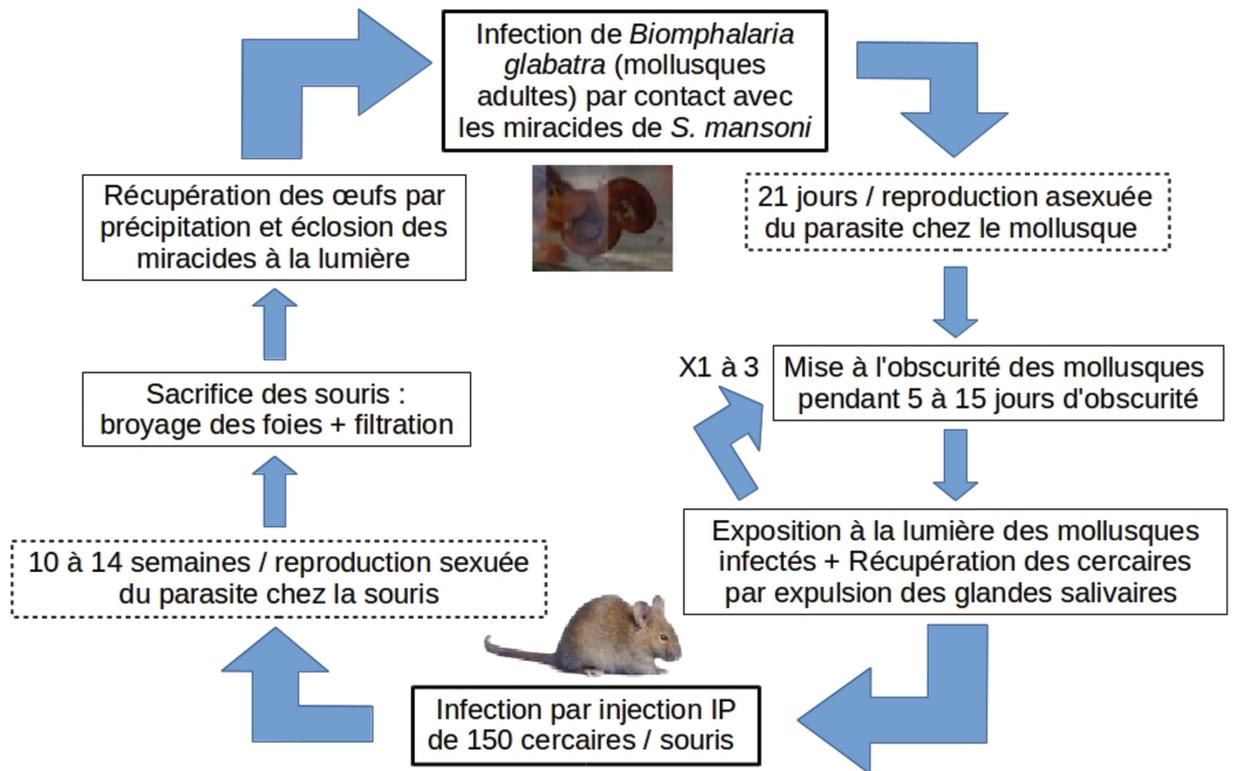


Figure 28 : Cycle artificiel de *S. mansoni* utilisant la souris comme hôte définitif

### 1.3.1 Elevage de *Biomphalaria glabatra* hôte intermédiaire de *S. mansoni*

Les mollusques d'eau douce du genre *Biomphalaria* (espèce *glabatra*) originaires du Venezuela étaient élevés dans une pièce dédiée, fermée et uniquement accessible aux personnes formées et autorisées à y pénétrer. Les mollusques étaient élevés en aquarium (au maximum 50 individus par bac de 5 l) (Figure 29A).



Figure 29 : Dispositif d'élevage des mollusques pour le maintien de *S. mansoni*

A : Bacs alimentés en air par des tuyaux et utilisés pour l'élevage des mollusques. B : Bac de mollusques reproducteurs. C : Mollusques se nourrissant de laitue.

Les bacs étaient remplis d'une solution tampon faisant office d'eau douce artificielle

reproduisant les caractéristiques du milieu naturel dans lequel vivent les mollusques. Cette eau douce artificielle était préparée par dilution d'une solution stock (X10) (Tableau 7).

Composés	Masse molaire moléculaire (g/mole)	Quantité (g/30 l)	Concentration (mol/l)
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	147,014	22,5	0,00510
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	246,474	36,9	0,00499
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174,259	1,29	0,00025
NaHCO <sub>3</sub>	84,007	12,6	0,00500
FeCl <sub>3</sub>	162,204	0,10	0,00002
Eau ultra pure Milli-Q® 30 l	-	-	-

Tableau 7 : Composition de la solution stock d'eau douce artificielle (10x)

Les bacs étaient aérés par un système de pompes redondantes et de tuyaux qui alimentaient une pierre à air au fond de chaque bac formant un petit chapelet de bulles dans les aquariums (Figure 29 B). Trois bacs étaient dédiés aux animaux reproducteurs, servant de réservoir à mollusques pour le maintien du cycle de *S. mansoni*.

Les œufs fécondés, libérés par les mollusques dans l'eau des aquariums étaient récupérés pour produire de nouveaux individus destinés soit à être infectés *par S. mansoni*, soit au remplacement des reproducteurs âgés. Les œufs des mollusques adhérant aux parois des bacs, il suffisait donc de verser le contenu des aquariums (eau et mollusques) au travers d'une passoire, de transférer délicatement les mollusques dans un nouveau bac d'eau en veillant à ne pas casser leur coquille et de remplir d'eau le bac initial sans le laver. Ainsi les œufs pouvaient éclore et donner naissance à de nouveaux mollusques.

Dans chaque bac était placé un demi bâton de craie blanche riche en calcium (carbonate de calcium, CaCO<sub>3</sub> et sulfate de calcium, CaSO<sub>4</sub>) nécessaire à la constitution des coquilles des mollusques. Les mollusques étaient nourris tous les deux jours environ avec les parties vertes de feuilles de laitue, abondamment rincées à l'eau ultra pure (Figure 29 C). Des compléments alimentaires à base de nourriture pour poissons rouges en paillettes étaient également administrés. Un cycle de lumière naturelle ou artificielle (en allumant les lumières de la pièce d'hébergement selon la luminosité) de 10h à 12h alternant avec 12 à 14 h d'obscurité, était maintenu. L'eau des bacs était changée régulièrement (en moyenne tous les 20 jours).

### 1.3.2 Infection des mollusques

Dix souris étaient systématiquement infectées avec *S. mansoni* en vue de l'infection des mollusques et 5 à 10 d'entre elles étaient euthanasiées selon les besoins en parasites. L'infection des mollusques était obtenue à partir de foies de souris infectées depuis 10 semaines au moins. Ces souris avaient été infestées avec 150 cercaires dans 500  $\mu$ l de sérum physiologique par injection intrapéritonéale à l'état vigile à l'aide d'une seringue et d'une aiguille à injection sous cutanée de 25G. Dix semaines après l'infestation, les souris étaient sacrifiées par dislocation cervicale, et les foies prélevés. Les foies infectés présentaient un aspect granulaire avec des points blanchâtres à leur surface (granulomes), signe de l'infection par *S. mansoni* (Figure 30).

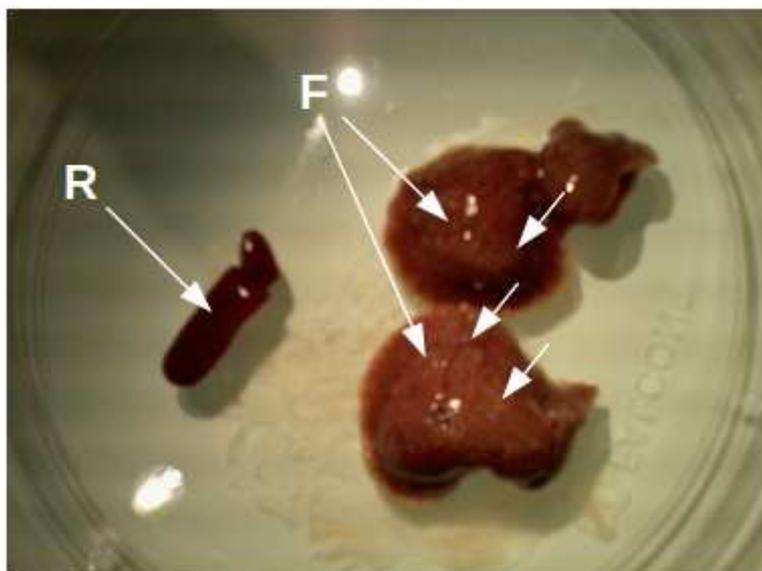


Figure 30 : Foies et rate de souris infectées par *S. mansoni*

*Contrairement à la rate (R) les foies (F) présentent des granulomes à leur surface (points blancs à l'image pointés par les petites flèches).*

Les foies étaient coupés en petits morceaux au scalpel et placés dans des tubes de 7ml pré-remplis de billes en céramiques de 2,8 mm de diamètre (Ozyme, France) et de NaCl à 1,4%, puis insérés pour broyage dans l'homogénéisateur Precellys (Bertin Instruments, France) et soumis à 2 cycles successifs de rotation à 3900 tours par minute d'une durée de 30 secondes chacun.

L'homogénat était alors mis pendant 10 minutes à 4°C puis filtré au travers d'un tamis métallique (maillage de 400  $\mu$ m) et récupéré dans un bécher conique laissé également 10 min à 4°C, le temps de laisser les œufs former un culot (Figure 31 A). A l'aide d'une pompe à vide

le liquide contenant du sang et des impuretés tissulaires était aspiré depuis la surface et 4 à 5 cm de hauteur de liquide était conservé. Du NaCl dilué à 1,4% était ajouté dans le bécher et l'ensemble était de nouveau laissé à 4°C pendant 15 min avant une nouvelle étape d'aspiration. Ensuite le fond du bécher était distribué dans plusieurs cristallisoirs, ces derniers étaient alors exposés à la lumière du soleil pendant 30 minutes afin de faire éclore les œufs. Après vérification de l'apparition des miracides (taille proche de celle des œufs, environ 150 µm de long et 50 µm de largeur) au microscope binoculaire de jeunes mollusques adultes étaient placés dans les cristallisoirs durant 18h auprès d'une vitre pour bénéficier de la lumière du soleil. Les cristallisoirs étaient recouverts de papier aluminium afin d'éviter que les individus ne s'échappent (Figure 31 B).

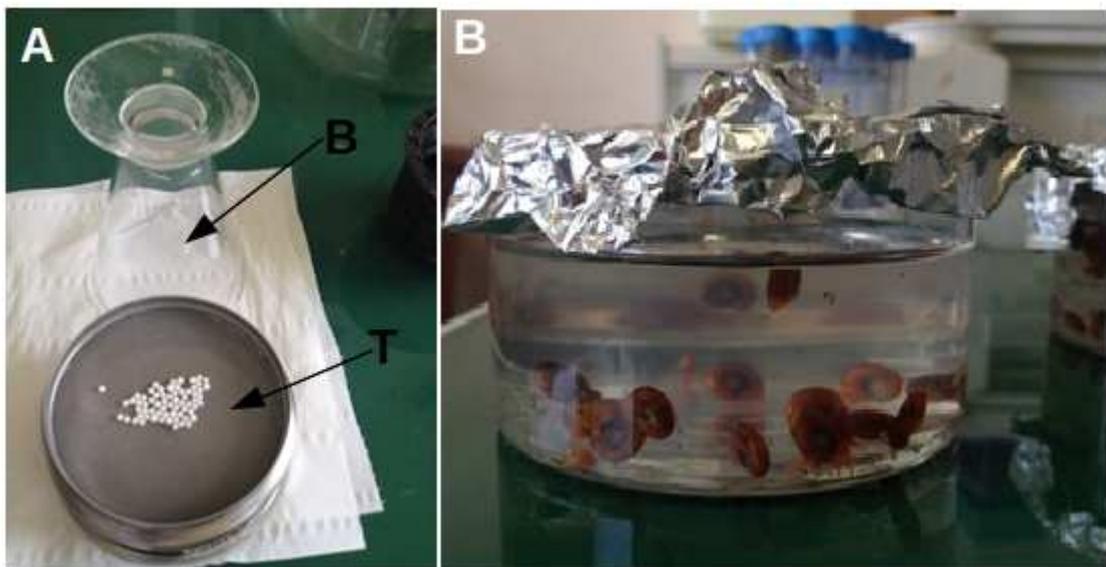


Figure 31 : Matériel de récupération des œufs et infection des mollusques avec des miracides de *S. mansoni*

*A : Tamis (T) avec billes de céramique (blanches) et bécher (B) permettant la récupération des œufs de S. mansoni. B : Mollusques placés dans un cristallisoir couvert pendant leur infection.*

Après 21 jours les bacs des mollusques infectés étaient placés dans une armoire fermée à l'abri de la lumière et restaient dans ces conditions au minimum cinq jours et au maximum 15 jours avant que ne soient récupérés de nouveaux cercaires utilisés pour l'infection des souris.

### 1.3.3 Collecte des cercaires après expulsion induite par la lumière chez les mollusques

La collecte des cercaires en vue de l'infection des souris se faisait après leur expulsion

par les glandes salivaires des mollusques. L'expulsion des cercaires était déclenchée par l'exposition des mollusques à la lumière. Pour cette raison, les mollusques étaient placés en moyenne une semaine avant dans l'obscurité afin que les parasites soient concentrés dans les glandes salivaires et récupérés au moment opportun. Une première expulsion était induite afin de s'assurer que les mollusques en produisaient une quantité suffisante (vérification par comptage au microscope binoculaire). Généralement, la concentration en cercaires récupérés/ $\mu$ l était plus élevée lors des secondes et troisièmes séances d'expulsion. Après la quatrième séance, les mollusques n'étant plus exploitables étaient alors éliminés (immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à 2,6% minimum de chlore actif pendant 24h puis élimination dans une poubelle destinés aux déchets à risque infectieux. Les séances d'expulsion étaient espacées (au minimum) d'une semaine afin de maintenir un bon rendement en cercaires expulsés.

Étant donné que l'expulsion des cercaires était provoquée par l'exposition des mollusques à la lumière, les bacs étaient sortis de l'armoire lors d'une journée ensoleillée, durant la tranche horaire allant de 12h00 à 15h00 de l'après-midi selon la période de l'année (possibilité d'utiliser des phares à halogène en complément si besoin mais donnant de moins bons résultats qu'une forte luminosité naturelle). De l'eau ultra pure était versée dans le fond de cupules (une cupule par bac de mollusques) sur une hauteur d'eau d'environ cinq millimètres. Les mollusques étaient ensuite récupérés à l'aide d'une passoire et déposés très délicatement dans les cupules à l'aide d'une pince. Les mollusques étaient alors exposés à la lumière du soleil derrière une vitre durant 45 à 60 minutes en fonction du nombre de cercaires détectés au microscope binoculaire.

Au bout de 90 minutes maximum, le liquide contenu dans une cupule était versé dans un tube Falcon de 50 ml, après filtration au travers d'un tissu à mailles infra-millimétriques. Dans un second tube (noté « Mix ») qui était commun ensuite à la même manipulation avec les autres cupules, 5 ml d'eau ultra pure étaient passés au travers du même tissu-filtre qui contenait encore les mollusques. On répétait la procédure pour les autres cupules en utilisant un nouveau tube Falcon de 50 ml et toujours le tube « Mix ». Les concentrations en cercaires pour chaque tube utilisé étaient ensuite estimées au microscope binoculaire par comptage selon la méthode décrite précédemment. En général, la concentration de cercaires était plus élevée dans le tube « Mix » et le contenu servait à l'infection des souris afin d'augmenter les chances d'infecter correctement les animaux. Si ce n'était pas le cas, on pouvait utiliser le contenu d'un des autres tubes qui contenaient eux aussi des cercaires. Après chaque étape d'expulsion des cercaires, l'eau de bac des mollusques était renouvelée, un demi bâton de

craie ainsi que de la nourriture étaient déposés dans les aquariums et les mollusques replacés dans le noir.

**Remarque : précautions particulières pour la manipulation des cercaires de *Schistosoma mansoni***

La manipulation des cercaires, des mollusques et objets ayant été au contact des cercaires nécessitait une extrême vigilance afin d'éviter tout risque d'infection pour l'expérimentateur. Les équipements de protection individuelle consistaient en une blouse de laboratoire à manches longues dédiée à l'espace du cycle portée par-dessus les vêtements de ville (pantalons et chaussures fermées obligatoires), des gants en latex et une visière en plexiglas pour le visage. La désinfection du matériel était obtenue par trempage pendant une heure minimum dans une solution d'hypochlorite de sodium, NaClO (eau de Javel) d'au moins 2,6%. Le matériel était ensuite rincé puis mis à sécher avant réutilisation (les cercaires ne peuvent survivre sans eau). Le petit matériel utilisé par exemple pour la dissection des animaux était systématiquement autoclavé avant réutilisation.

## **2. Protocole d'IRM *in vivo***

### **2.1. Instrumentation**

Les expérimentations d'IRM ont été réalisées sur un spectromètre imageur vertical AVANCE 500 WB MR (Bruker, Allemagne) opérant à très haut champ magnétique (11,75 T), équipé de gradients blindés (de 1 T/m et 9 kT/m/s en vitesse de commutation maximum) et d'une bobine de type cage d'oiseau émettrice/réceptrice de 30 mm de diamètre interne (Figure 32).

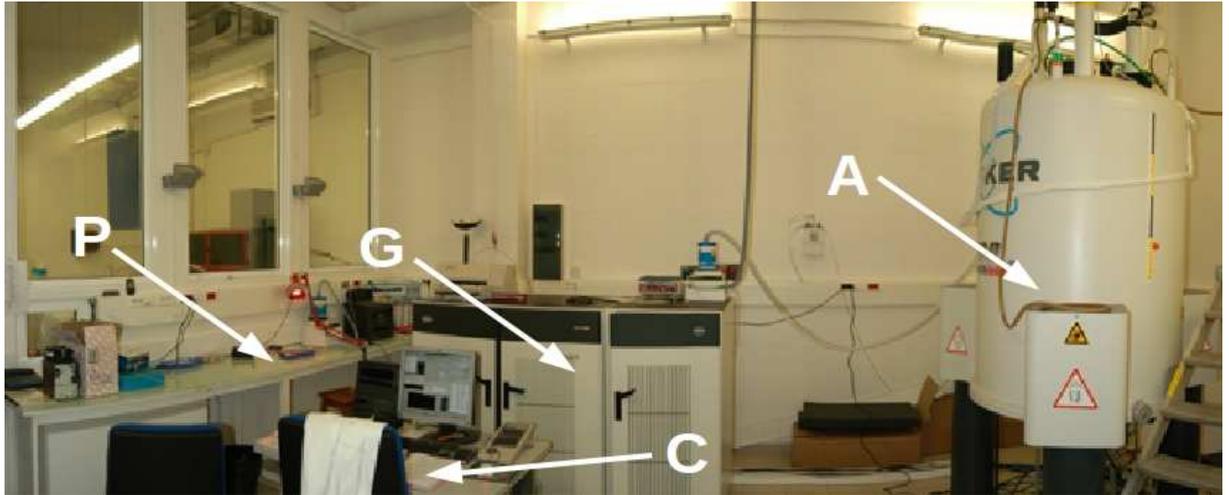


Figure 32 : Salle d'imagerie préclinique au CRMBM

*Aimant vertical à 11,75T (A), paillasse de préparation de l'animal avec poste d'anesthésie (P), armoire des gradients (G) et poste avec console d'acquisition (C).*

## 2.2. Etude pilote pour la mise au point du protocole d'IRM abdominale *in vivo*

Notre stratégie d'exploration par IRM privilégiée pour la caractérisation du modèle murin de schistosomiase reposait sur une approche d'imagerie anatomique (avec et sans injection d'agent de contraste) pour le suivi longitudinal de l'organomégalie, de l'inflammation granulomateuse, et la détection des varices, tandis que l'approche relaxométrique était susceptible de fournir un marqueur de fibrose.

L'étude pilote menée sur un nombre limité de souris saines (n=4) et malades (n=7) avait plusieurs objectifs tant sur le plan biologique que méthodologique :

- Optimiser les paramètres d'acquisition des séquences d'imagerie anatomique et relaxométriques ( $T_2$  et  $T_2^*$ ) afin de diminuer autant que possible le temps d'acquisition, tout en conservant un bon rapport signal sur bruit, et un bon rapport contraste sur bruit, dans des conditions de synchronisation respiratoire visant à réduire les artefacts liés aux mouvements des organes.
- Vérifier la pertinence des paramètres  $T_2$  et  $T_2^*$  comme marqueurs potentiels de la fibrose bilharzienne sur des foies ayant une inflammation granulomateuse et une fibrose d'intensité variable (souris infectées avec 30 cercaires, n=4, ou 150 cercaires, n=3).
- Vérifier que le modèle de schistosomiase induit avec un faible nombre de cercaires (30), plus proche de la maladie humaine, produisait des lésions du système digestif

déTECTABLES en IRM dans un délai raisonnable.

- Évaluer l'intérêt de l'IRM avec un agent de contraste à base de gadolinium (Gadolinium 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétate ou Gd-DOTA) délivré par voie intrapéritonéale (IP), et non intraveineuse (IV), pour la détection des granulomes. La méthode IP permettait de simplifier le protocole et de limiter les échecs de cathétérisation et embolies gazeuses fréquents en IV.
- Déterminer la fenêtre temporelle optimale pour le suivi longitudinal des souris par IRM en s'assurant que la prise de poids probable avec le temps et le développement de l'organomégalie n'empêchait pas le positionnement des animaux dans la sonde « corps entier » qui n'est pas adaptée aux souris dont la masse corporelle excède 40 g.
- Définir un niveau anatomique reproductible chez toutes les souris permettant de co-localiser le plus précisément possible le positionnement des cartographies des paramètres  $T_2$  et  $T_2^*$  et de la coupe dans laquelle étaient effectuées les mesures de la section de la veine porte.
- Évaluer la taille d'effet sur les paramètres mesurés afin de mettre en œuvre un test statistique de calcul des effectifs sur la base d'un risque  $\alpha$  de 0,05, d'un risque de 2<sup>ème</sup> espèce  $\beta$ , et d'une puissance  $1-\beta = 0,8$ .

Séquences	Paramètres testés	Caractéristiques pathologiques recherchées	Conclusions
<b>RARE</b>	<p><b>Paramètres géométriques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- FOV= 24x24 mm<sup>2</sup> ou 30x24mm<sup>2</sup></li> <li>- Matrice : 256x256, 240x240, 160x160, 150x150</li> <li>- Nb de coupes=20 ou 25</li> <li>- Épaisseur de coupe = 0,5 ou 0,3 mm</li> <li>-Plans : axial, coronal et sagittal</li> </ul> <p><b>Paramètres d'acquisition :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nb d'accumulations =1 ou 2 ou 3</li> <li>- TE= 14ms ou 7 ms ou 4 ms</li> <li>- TR≥264 ms ou TR≥448 ms</li> <li>- RARE factor=1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organomégalie (foie et rate)</li> <li>- Dilatation de la veine porte</li> <li>- Ascite</li> </ul>	Le plan axial est suffisant pour la morphométrie envisagée mais 2 séries de 20 coupes contiguës sont nécessaires pour couvrir rate + foie chez les animaux malades.
<b>RARE avec Gd-DOTA</b>	<p><b>Acquisition des images post-contraste :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10, 15 et 20 min après injection IP de Gd-DOTA</li> </ul> <p><b>Paramètres géométriques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- FOV= 24x24 mm<sup>2</sup> ou 30x24mm<sup>2</sup></li> <li>- Matrice : 240x240, 160x160 ou 150x150</li> <li>- Nb de coupes=20</li> <li>- Épaisseur de coupe = 0,5</li> <li>-Plans : axial, coronal et sagittal</li> </ul> <p><b>Paramètres d'acquisition :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nb d'accumulations = 2, 3 et 4</li> <li>- TE= 14ms ou 7 ms ou 4 ms</li> <li>- TR≥264 ms ou TR≥448 ms ou TR≥ 492ms</li> <li>- RARE factor=1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volumes du foie et de la rate</li> <li>- Dilatation de la section de la veine porte</li> <li>- Granulomes</li> </ul>	<p>Le produit de contraste rehausse le signal des granulomes dans le parenchyme hépatique.</p> <p>Prise de contraste optimale à 15 min post injection.</p> <p>4 accumulations donnent une bonne qualité d'image pour la segmentation manuelle des organes.</p>
<b>MSME / cartographie T<sub>2</sub></b>	<p><b>Paramètres géométriques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- FOV= 30*24mm<sup>2</sup>, 24*24 mm<sup>2</sup> et 30*30 mm<sup>2</sup></li> <li>- Matrice : 64*64 ou 240*240</li> <li>- Coupe axiale unique de 0,5mm d'épaisseur</li> </ul> <p><b>Paramètres d'acquisition :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nombre d'accumulations =2 ou 3</li> <li>- Nombre d'échos : 8, 12 et 16</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflammation</li> <li>- Fibrose hépatique</li> </ul>	Probable augmentation du T <sub>2</sub> chez les animaux les plus malades.
<b>MGE / cartographie T<sub>2</sub>*</b>	<p><b>Paramètres géométriques :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- FOV= 30*24 mm<sup>2</sup>, 24*24 mm<sup>2</sup></li> <li>- Matrice : 240*240</li> <li>- Coupe axiale unique de 0,5 mm d'épaisseur</li> </ul> <p><b>Paramètres d'acquisition :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nombre d'accumulations =2 ou 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inflammation</li> <li>- Fibrose hépatique</li> </ul>	Cartes sans artefacts difficiles à obtenir.

Tableau 8 : Récapitulatif des paramètres optimisés au cours de l'étude pilote

*Les séquences ont été testées sur plusieurs animaux de différents phénotypes (infectés avec 30 ou 150 cercaires, contrôles) afin de s'assurer de la fiabilité de nos mises au point.*

A l'issue de cette phase préparatoire, nous avons :

- Utilisé une séquence RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) (97), une séquence d'écho de spin rapide, sans exploiter le «RARE factor» qui permet de remplir plusieurs lignes de l'espace de Fourier pour une émission de RF. Ce facteur ayant été abaissé à une valeur de 1, il s'agissait en fait d'une simple séquence d'écho de spin.
- Optimisé le protocole IRM d'une durée totale inférieure à 2h30 min par animal.
- Confirmé la détectabilité des granulomes et de la fibrose hépatique sur le modèle de schistosomiase induit avec 30 cercaires.
- Déterminé la durée du suivi longitudinal pour la détection IRM de l'organomégalie, de l'inflammation granulomateuse, et de la fibrose.
- Montré l'intérêt de l'IRM post-contraste pour la détection de l'inflammation granulomateuse
- Validé la voie intra-péritonéale moins traumatisante et techniquement plus facilement accessible donc plus reproductible que la voie intra-veineuse pour le suivi longitudinal.
- Validé la pertinence de l'approche relaxométrique pour la détection de la fibrose *in vivo*.
- Optimisé le post-traitement des cartes  $T_2$  et  $T_2^*$  sous ImageJ (98) à l'aide des scripts développés dans notre équipe.
- Déterminé la taille d'effet sur le plan volumétrique (>30%) nécessaire au calcul des effectifs à l'aide du logiciel JMP9.0 (SAS Institute Inc, USA).
- Observé un signal provenant d'un liquide évocateur d'un ascite, tel que décrit dans une étude sur un modèle murin de tumeurs du pancréas (99), dans l'abdomen d'un animal 10 semaines après avoir été infecté avec 150 cercaires (**Figure 33**).

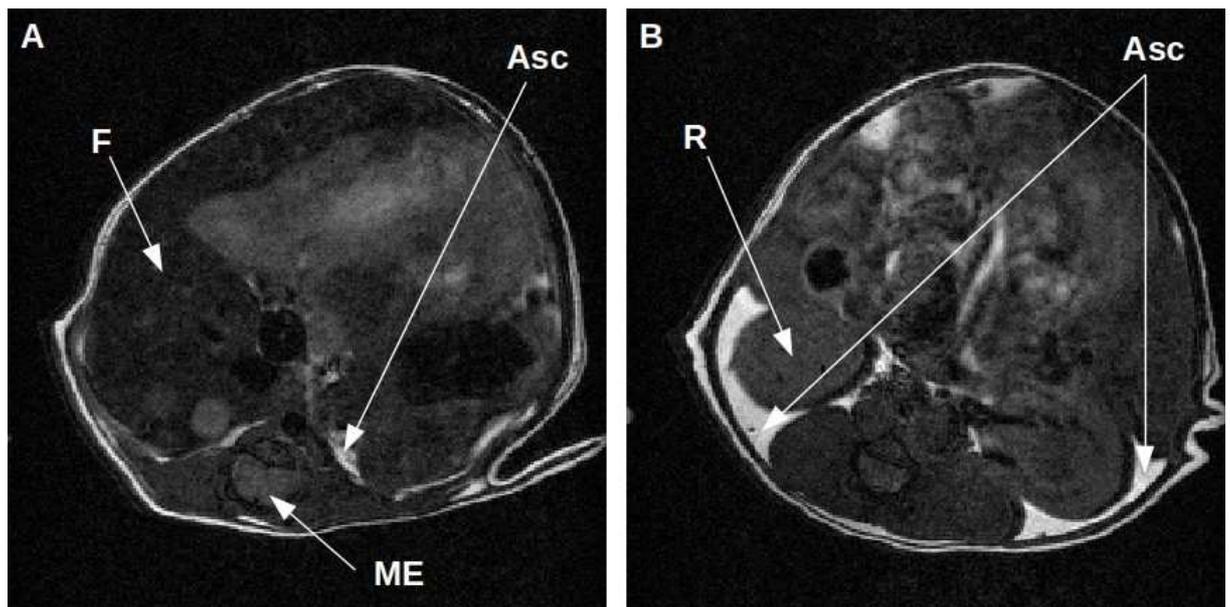


Figure 33 : Images évocatrices d'un ascite dans l'abdomen d'une souris 10 semaines après infection par 150 cercaires de *S. mansoni*

*A* : Signal évocateur d'ascite (*Asc*) sur une coupe passant par le foie (*F*). *ME*=Moelle Épineière. *B* : Le liquide est davantage visible sur une coupe au niveau des reins (*R*), la quantité accrue en région caudale de l'abdomen s'explique par la position verticale de la souris dans l'aimant

### 2.3. Organisation de l'étude

Les résultats de l'étude pilote ont montré la nécessité de suivre les animaux pendant au moins 10 semaines après l'infestation. Étant donné le besoin de recourir à l'histologie pour valider les résultats d'IRM *in vivo*, il était indispensable de prévoir plusieurs groupes d'animaux qui seraient sacrifiés à différents temps du suivi. L'IRM *in vivo* a donc été réalisée sur deux cohortes d'animaux. La première comprenait un groupe de 6 souris infectées et un groupe de 6 souris contrôles (naïves). Ces deux groupes ont été imagés à 2 et 6 semaines après l'infection par les cercaires. L'exploration par IRM réalisée à 6 semaines a été suivie du sacrifice des animaux en vue d'une histologie hépatique. La deuxième cohorte, constituée d'un groupe de 6 souris infectées et d'un groupe de 6 souris contrôles a été explorée une seule fois à 10 semaines après l'infection, temps d'infection où la fibrose devait commencer à apparaître dans le foie. Les animaux ont été euthanasiés après la procédure d'IRM afin de procéder à l'analyse histologique des foies prélevés (**Figure 34**).

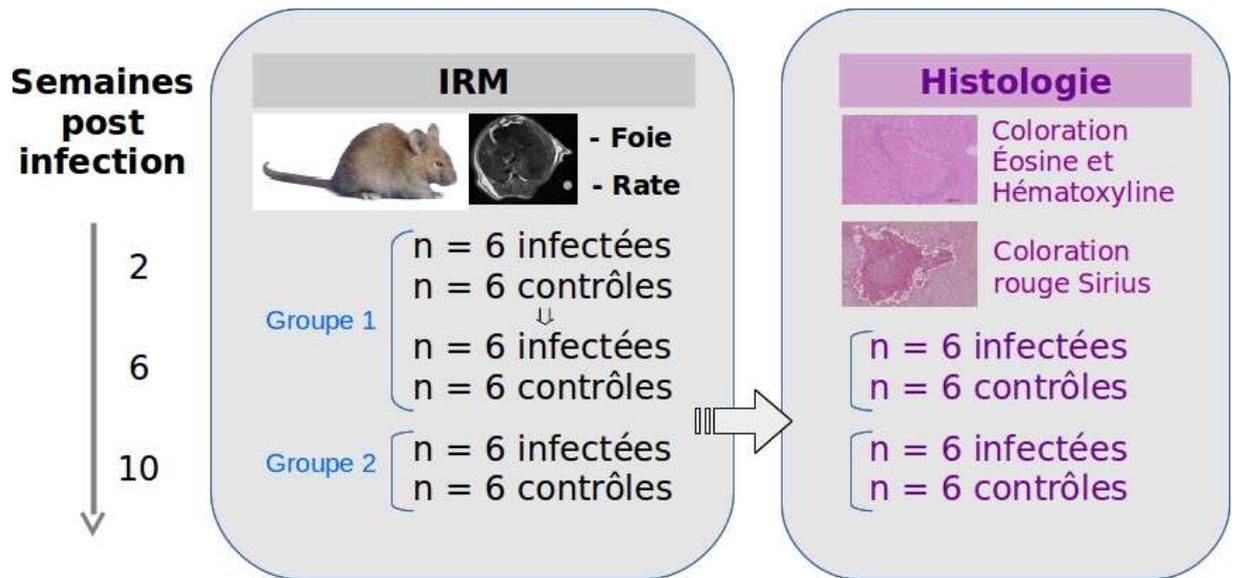


Figure 34 : Schéma général de l'étude du suivi de l'infection à *S. mansoni* chez la souris  
*Après l'IRM abdominale, les deux groupes d'animaux ont été sacrifiés respectivement après 6 et 10 semaines d'infection pour une étude histologique du foie en utilisant les colorations Eosine/ Hématoxyline, rouge Sirius et Perls (cette dernière n'étant pas représentée sur la figure).*

## 2.4. Protocole d'IRM abdominale *in vivo*

### 2.4.1. Préparation des animaux en vue de l'IRM

Après une induction anesthésique en chambre d'induction (anesthésique volatil : Isoflurane 4%, gaz vecteur : oxygène délivré avec un débit de 2l/min), les animaux étaient installés dans le berceau de l'antenne « corps entier », et maintenus immobilisés (Figure 35).

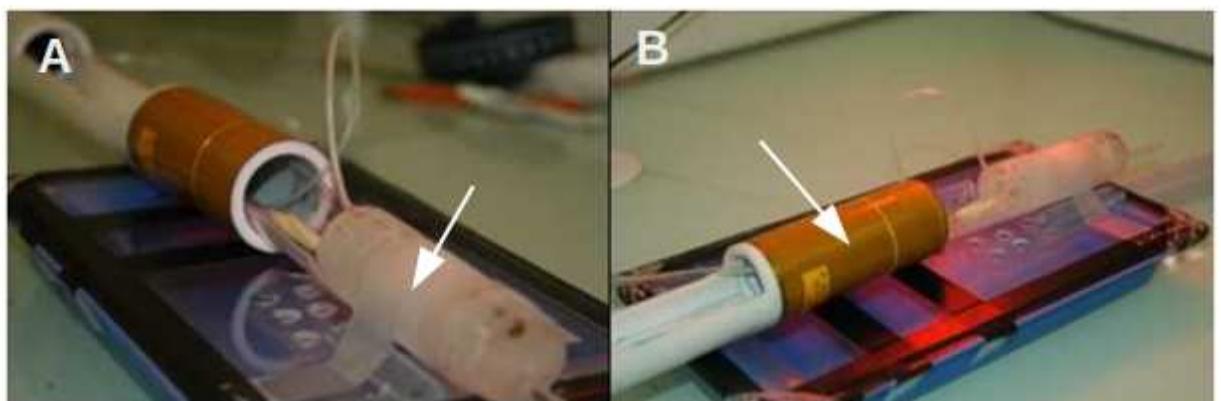


Figure 35 : Sonde et berceau dédiés à l'imagerie de la souris (système « corps entier »)

*Les souris étaient placées dans un berceau, élément en plexiglass dans lequel est insérée la tige du mors (A), que l'on faisait ensuite coulisser dans le haut de la sonde (B).*

Leur tête était placée dans un masque respiratoire alimenté en isoflurane ( $\approx 1,5\%$ , gaz vecteur : air délivré à un débit d'environ 350 ml/min) (Figure 36) et leurs dents accrochées à un mors. Un capteur de pression pneumatique relié à un système PC-Sam (SA Instruments, USA) de monitoring physiologique du petit animal compatible avec l'IRM était placé sous leur abdomen pour la surveillance en temps réel de la respiration. Un cathéter de 24G de taille 0,7 x 19 mm (BD Insyte, USA) était inséré dans la cavité péritonéale pour l'administration de l'agent de contraste (Gd-DOTA, DOTAREM® 0,5mmol/ml). Durant le protocole d'imagerie, 50  $\mu$ l de Gd-DOTA était injectés suivis de 200  $\mu$ l de sérum physiologique afin de purger la tubulure reliée au cathéter et s'assurer ainsi de la délivrance du Gd-DOTA dans la cavité péritonéale. Un capteur de température rectale relié au système PC-Sam était également mis en place pour la surveillance de la température centrale de l'animal en temps réel. Une référence externe consistant en un capillaire rempli de DOTAREM® dont le  $T_2$  était de 21 ms était placée contre un flanc de la souris. Celle-ci était ensuite totalement immobilisée à l'aide d'une plaque en Téflon souple positionnée sans compression sur son thorax et son abdomen et maintenue à l'aide de ruban adhésif. Grâce au contrôle de la profondeur d'anesthésie par le réglage de la concentration d'isoflurane inhalée, le rythme respiratoire était stabilisé à 80-90 respirations par minute (« breaths per minute » ou BPM) pendant l'exploration IRM, tandis que la température corporelle était maintenue aux alentours de 36°C en utilisant la chaleur dégagée par les gradients (air réchauffé par la circulation d'eau du système de refroidissement des gradients de l'appareillage d'IRM réglé à 42°C).



Figure 36 : Dispositif d'anesthésie à l'isoflurane pour souris

*Le système est composé d'un pousse-seringue Univentor 400 à débitmètre et évaporateur combinés. L'apport en gaz vecteur (air) est assuré par une pompe d'aquarium.*

## 2.4.2. Synchronisation des IRM sur la respiration

Le foie étant en mouvement en raison de la respiration, une synchronisation des acquisitions d'imagerie avec le rythme respiratoire était nécessaire afin de minimiser la présence d'artéfacts de mouvement sur les images. Une synchronisation dite prospective a été utilisée dans cette étude. Cette méthode s'appuie sur la détection d'un signal physiologique qui déclenche l'acquisition. Cette technique permet d'obtenir une image à partir des signaux acquis lorsque l'organe est dans une position particulière du cycle respiratoire. La pression détectée par le capteur pneumatique abdominal en fonction du temps (Figure 37) nécessaire pour cette synchronisation est enregistrée en temps réel par le système PC-SAM.

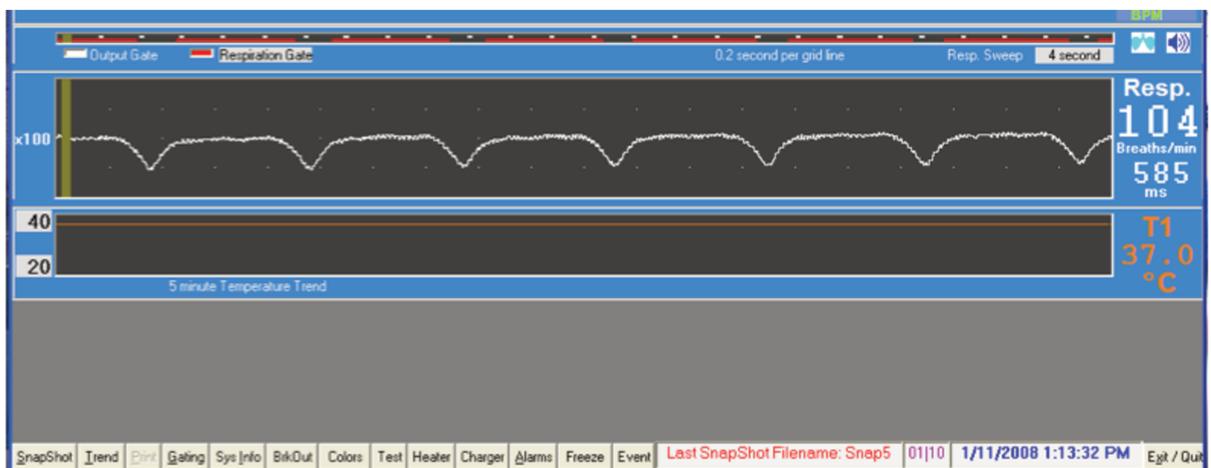


Figure 37 : Contrôle de la fréquence respiratoire d'une souris anesthésiée

*Capture d'écran du logiciel PC-SAM permettant le suivi de la respiration, le déclenchement et la synchronisation des acquisitions avec la respiration de l'animal. D'après le manuel de PC-SAM.*

La détection du début de la phase expiratoire, phase la plus favorable aux acquisitions d'imagerie représentée par un plateau et un intervalle rouge dans la représentation inversée de l'onde respiratoire par PC-SAM, autorise (« trig ») après un délai prédéfini (« trigger delay » de 0.03 ms sous Paravision 5.1) le déclenchement de l'impulsion excitatrice (RF) et l'acquisition d'une ligne de l'espace de Fourier (réglage « per phase step » sous Paravision 5.1). Afin que ce déclenchement soit effectué au moment opportun, le réglage de plusieurs paramètres de l'outil PC-SAM est nécessaire. La détection du début de la phase d'expiration s'appuie sur le réglage du paramètre « begin delay » (10 ms dans nos expériences) et la sélection du paramètre optionnel « pulse invert » afin de détecter le point moyen de montée précédent le plateau de l'expiration (« pulse inverted trigger »). Ce point de repère est le point où la valeur de la dérivée de la courbe inversée qu'enregistre PC-SAM est à son maximum (le

minimum étant situé lors de l'inspiration). Il détermine le point de départ du « Begin delay ». Le second paramètre est la période pendant laquelle le déclenchement de l'acquisition est possible (phase de « gating ») lors de la phase d'expiration. Elle est déterminée par le paramètre « max width », réglé à 100 ms dans nos expériences. (Figure 38)

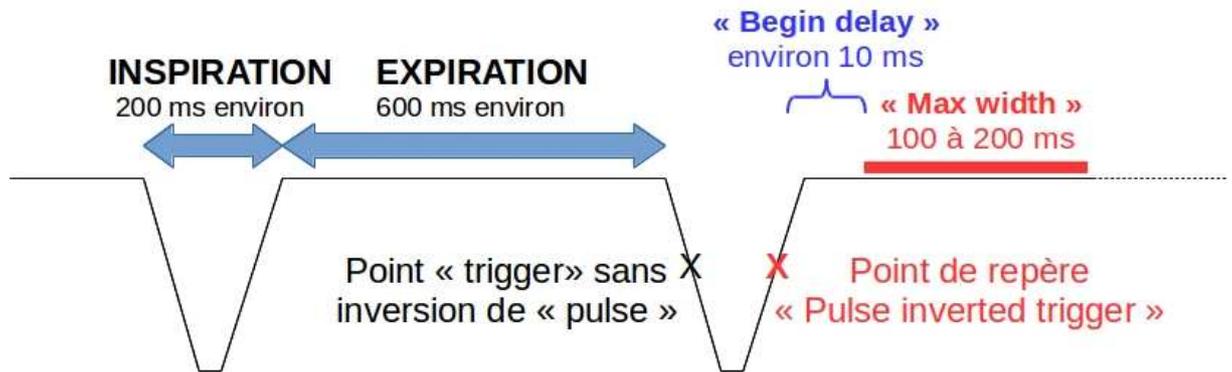


Figure 38 : Principe de fonctionnement de l'outil PC-SAM pour la synchronisation respiratoire chez la souris

*Le point de repère (croix rouge) permet de définir un instant reproductible dans chaque cycle respiratoire. Deux valeurs pré-enregistrées vont alors définir le moment où la synchronisation va débuter par rapport au point de repère (« begin delay ») et la durée de la phase de « gating » durant laquelle le déclenchement de l'acquisition IRM est autorisé (« Max width »).*

Cette synchronisation a pour effet d'allonger la durée de l'imagerie, l'acquisition ne se faisant que sur une fraction limitée du cycle respiratoire. Par ailleurs, elle peut entraîner une certaine variabilité du temps de répétition (TR), et donc de la pondération des images, si la fréquence respiratoire est irrégulière. En effet, lorsqu'il y a synchronisation, le délai entre deux impulsions (TR) est déterminé par le délai entre deux respirations. C'est la raison pour laquelle il est difficile de faire des mesures de  $T_1$  fiables (cartographie  $T_1$ ), qui nécessitent de faire varier le TR de façon précise.

Une respiration de faible amplitude sera difficilement détectable et interrompra la synchronisation, de même qu'une apnée. Des mouvements non-respiratoires de l'animal détectés par le capteur pneumatique perturbent également la synchronisation de l'acquisition avec le rythme respiratoire. Pendant l'exploration IRM, les souris ont été maintenues sous une anesthésie à l'Isflurane, qui peut être ajustée à tout moment. Il est possible de maintenir la fréquence respiratoire dans une fourchette de valeurs prédéfinies (entre 80 et 120 bpm), afin de conserver une relative maîtrise du TR (Tableau 9).

Fréquence respiratoire	Durée d'un cycle respiratoire	TR effectif
80 bpm	=60 s/80 soit 750 ms	≥ 750 ms
100 bpm	=60 s/100 soit 600 ms	≥ 600 ms
120 bpm	=60 s/120 soit 500 ms	≥ 500 ms

Tableau 9 : Variation du TR effectif en fonction de la fréquence respiratoire lors de la synchronisation respiratoire

### 2.4.3. Séquences d'IRM *in vivo*

Toutes les images ont été acquises dans le plan transversal (axial) avec un champ de vue de  $24 \times 24 \text{ mm}^2$ , une matrice de  $240 \times 240$  et une épaisseur de coupe de 0,5 mm.

**L'imagerie anatomique** à haute résolution dans le plan ( $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) a été réalisée en utilisant une séquence d'écho de spin 2D (temps de répétition  $\text{TR} \geq 448 \text{ ms}$  dépendant de la fréquence respiratoire et temps d'écho  $\text{TE} = 4 \text{ ms}$ ) (Figure 40) avec 20 coupes contiguës et répétées (Figure 39). Vingt coupes adjacentes supplémentaires étaient ajoutées dans une deuxième acquisition pour assurer une couverture entière du foie et de la rate.

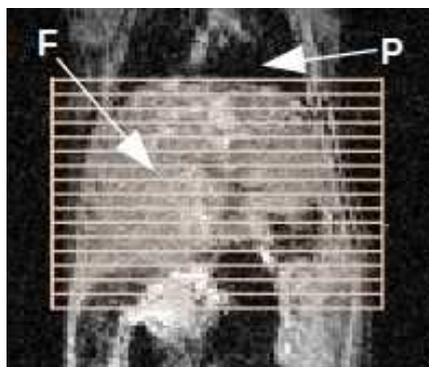


Figure 39 : Positionnement des coupes d'imagerie anatomique pondérée en T1 couvrant le foie sur une image de repérage (tripilote ou localizer, vue coronale)

*Couverture du foie (F) situé sous le poumon (P) et de la rate (non visible sur cette image) par une série de 20*

*coupes axiales en vue d'établir la position ultérieure des cartographies de relaxométrie et d'évaluer la volumétrie hépatique et splénique. Une série supplémentaire de coupes a été ajoutée pour assurer une couverture complète de la rate sur cet animal (souris infectée vue à 10 semaines).*

Cette séquence réalisée avec un TE court et un TR court car proche de 500 ms en pratique (cas des souris avec fréquence respiratoire stable sous anesthésie) était donc pondérée en T<sub>1</sub>. L'utilisation du Gd-DOTA dans la suite du protocole avait par conséquent comme effet le rehaussement du signal IRM notamment des zones d'inflammation granulomateuse où le Gd-DOTA s'accumule préférentiellement.

Les images ont été acquises avant et 15 minutes après l'injection intrapéritonéale de 50 µl de Gd-DOTA à 0,5 M (Guerbet, France). Le nombre d'accumulations pour chaque acquisition était respectivement de 2 et de 4 correspondants à des durées d'acquisition d'environ 10 et 20 minutes. La première acquisition (séquence d'écho de spin pondérée en T<sub>1</sub> dérivée d'une séquence RARE avec un facteur de 1) avant injection de Gd-DOTA devait servir à positionner les cartographies du T<sub>2</sub> et du T<sub>2</sub>\*, alors que l'image acquise après injection de Gd-DOTA était destinée à l'analyse volumétrique des organes par segmentation manuelle (évaluation de l'organomégalie). Cette dernière nécessitait une meilleure qualité d'image en termes de rapport signal sur bruit et contraste sur bruit d'où le choix de 4 accumulations. Limiter la première acquisition à 2 accumulations a permis de réduire le temps total d'exploration des animaux.

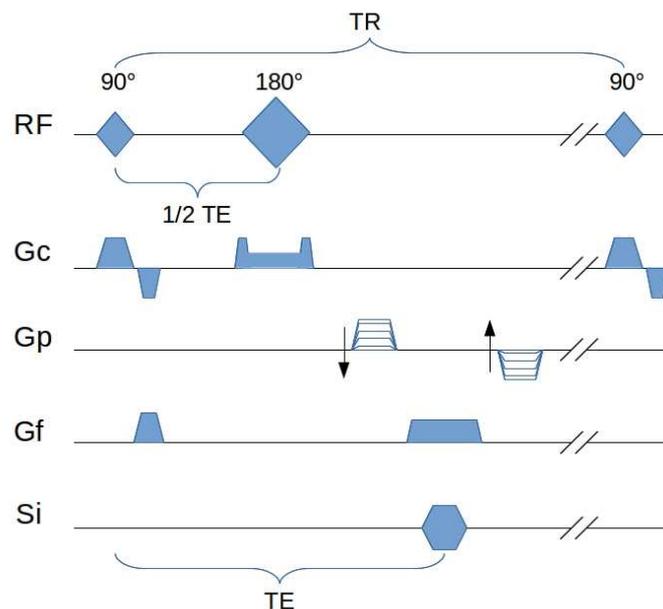


Figure 40 : Schéma de la séquence d'écho de spin (RARE) utilisée en imagerie anatomique

Une première impulsion radio fréquence (RF) de  $90^\circ$  est émise pendant l'application d'un gradient de sélection de coupe ( $G_c$ ) et fait basculer l'aimantation des protons dans une coupe précise sur l'axe transverse. Puis un gradient de fréquence ( $G_f$ , aussi appelé gradient de lecture) est appliqué en tant que gradient de déphasage en préparation de la lecture du signal ( $S_i$ ). Après un demi temps d'écho ( $1/2 TE$ ) l'impulsion RF de  $180^\circ$  inverse le sens de l'aimantation des protons de la coupe définie par l'application du  $G_c$  et initie le rephasage. Le gradient de phase ( $G_p$ ) est allumé avant l'acquisition du signal puis dans le sens opposé après l'acquisition du signal, ceci afin de sélectionner une ligne de l'espace  $k$  différente pour chaque enregistrement de  $S_i$ . Lors du rephasage de la précession et l'apparition de l'écho, le signal est acquis en présence du  $G_f$ .

Les cartes  $T_2$  et  $T_2^*$  de  $TR \geq 9s$  (le délais entre deux impulsions RF comprenait donc plusieurs cycles de respiration successifs, la durée de chaque cycle dépendant de la fréquence respiratoire et l'anesthésie n'étant pas une science exacte le TR ne pouvait avoir une valeur fixe), avec une matrice de  $64 \times 64$  et 2 accumulations, ont été acquises avant l'injection de l'agent de contraste (réalisée en fin de protocole) sur une seule coupe positionnée à 0,5 mm de la bifurcation de la veine porte en utilisant une séquence multi-coupes multi-échos (dérivée d'une séquence Multi Slice Multi Echo (MSME), mais limitée à une coupe) comprenant 12 échos équidistants avec des TE allant de 7,5 à 120 ms (Figure 41) et une séquence multi-échos de gradient « Multi Gradient Echo » (MGE) comprenant 8 échos équidistants avec des TE allant de 1,6 à 13,5 ms, respectivement (Figure 42).

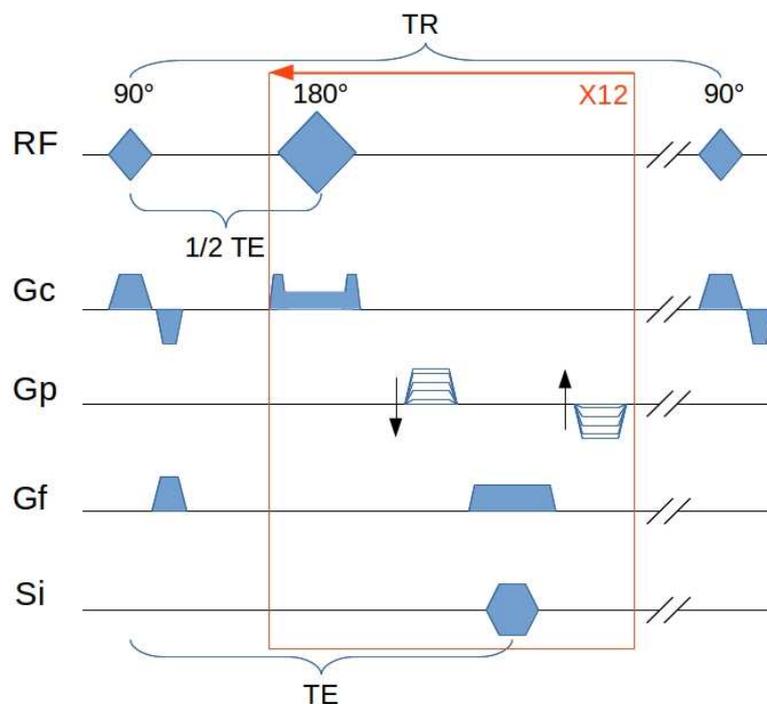


Figure 41 : Schéma de la séquence multi-coupes multi-échos (MSME) utilisée pour la cartographie du  $T_2$ .

Le principe de base est identique à celui de la séquence d'écho de spin mais avec de multiples impulsions RF de  $180^\circ$  suivies de l'acquisition des échos (Si) pour une même ligne de l'espace k pendant le TR. Il y a donc une première impulsion RF de  $90^\circ$  en présence du gradient de sélection de coupe (Gc) afin que seuls les protons de la coupe d'intérêt soient excités. C'est alors que s'enchainent les 12 cycles (cadre rouge) d'acquisition du Si qui vont constituer le train d'échos de spin de la séquence. Les 12 acquisitions auront lieu pour une même ligne de l'espace k sélectionnée par le gradient de phase (Gp). A ce stade de la séquence, seul le TE change pour les 12 acquisitions du Si. Durant le TR suivant, une nouvelle RF de  $90^\circ$  excite les protons pour l'acquisition de 12 échos à TE variable sur une ligne de l'espace k différente. Cette séquence permet de mesurer la décroissance du signal  $T_2$  par reconstruction d'une courbe exponentielle décroissante passant au plus près des 12 points de mesure pour chaque pixel de l'image. Lorsque la séquence est terminée, une cartographie de la valeur du  $T_2$  peut alors être calculée.

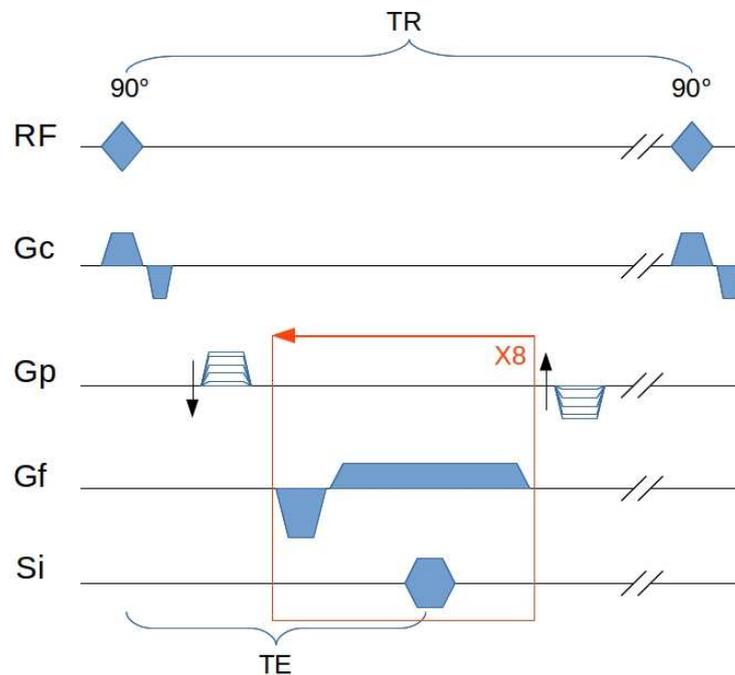


Figure 42 : Schéma de la séquence d'écho de gradient multi-échos (MGE) utilisée pour la cartographie du  $T_2^*$ .

Dans la séquence MGE, une première excitation par une impulsion RF de  $90^\circ$  précède les acquisitions des 8 échos. L'absence de RF de  $180^\circ$  dans cette séquence permet de conserver les inhomogénéités locales et statiques du champ magnétique et d'étudier la décroissance en  $T_2^*$  à la place de celle en  $T_2$ . Les échos (Si) sont générés à l'aide du gradient de fréquence (Gf) uniquement. Il y a donc un cycle de Gf (encadré en rouge) qui se répète 8 fois à intervalles de temps réguliers. Avant ces cycles, un gradient de phase (Gp) aura été employé pour sélectionner une ligne de l'espace k pour laquelle on veut effectuer la mesure, puis le même gradient avec un signe opposé pour annuler l'encodage de phase est appliqué à la fin des 8 cycles. A la suite de chaque TR, la séquence est relancée mais seul le Gp variera afin de remplir à la fin de l'acquisition toutes les lignes de l'espace k nécessaires à l'image. Pour chaque pixel on obtiendra 8 signaux différents reliés comme pour la

*cartographie  $T_2$  par une courbe de décroissance exponentielle et la valeur du  $T_2^*$  en sera extrapolée par un ajustement mathématique. En répétant cet ajustement mathématique pour chaque pixel on peut calculer la carte de  $T_2^*$  de la coupe sélectionnée.*

La coupe axiale sélectionnée pour les cartographies était située au même niveau que celles utilisées en IRM anatomique pour la mesure du diamètre de la veine porte. En utilisant la bifurcation de la veine porte comme point de repère, cette position de coupe axiale était optimale car reproductible entre les animaux et elle incluait suffisamment de tissu hépatique pour étudier son altération au cours de la pathologie (Figure 43).

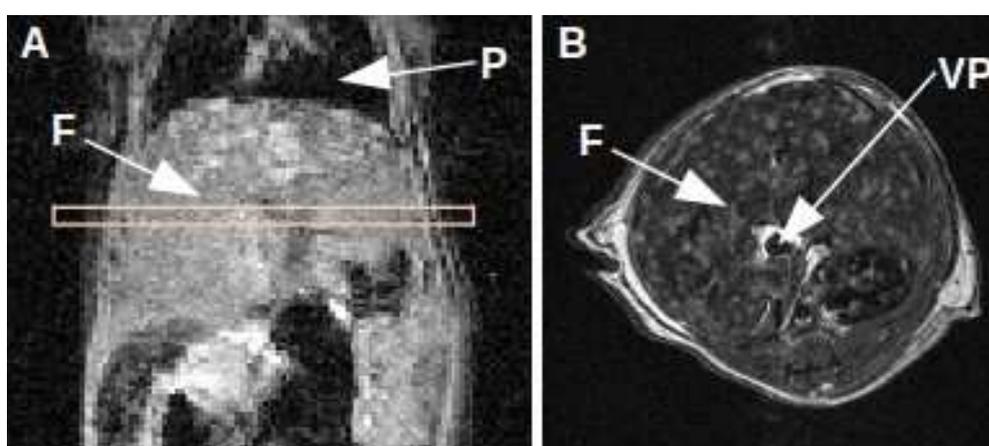


Figure 43 : Position de la tranche pour les cartographies  $T_2$  et  $T_2^*$

*A : Position de la coupe sur l'image obtenue par l'image de repérage rapide (localizer 3D). La coupe passe par le foie (F) situé sous le poumon (P). B : La coupe sélectionnée pour positionner les cartographies est située une coupe en dessous de la bifurcation de veine porte (VP), ce repère anatomique permet d'être le plus reproductible possible.*

Étapes	Séquence utilisée	Caractéristiques principales de la séquence	Injection de Gd-DOTA	Durée moyenne
1	<u>Préparation :</u> Anesthésie de l'animal, pose du cathéter IP, insertion dans la sonde et mise en place des capteurs pour le suivi des paramètres vitaux (température corporelle + rythme respiratoire)			10 min
2	Localizer 3D	Épaisseur de coupe = 1 mm, matrice 128x128, FOV=30x30 mm <sup>2</sup> , TE= 1,36 ms, TR=15 ms, Angle=30°, nombre	Non	30 s

		d'accumulations = 1		
3	RARE / anatomie volumétrie	20 coupes adjacentes de 0,5 mm d'épaisseur, matrice 240x240, FOV=24x24mm <sup>2</sup> , TE= 4 ms, TR≥448 ms, nombre d'accumulations=2	Non	10 min
4 (optionnelle)	RARE / anatomie volumétrie	Identique à l'étape 3 avec décalage des coupes pour couvrir la rate en totalité si besoin	Non	10 min
5	MSME / cartographie T <sub>2</sub>	Épaisseur de coupe = 0,5 mm, TR≥9s, 12 TE de 7,5 à 120 ms, matrice 64x64, FOV= 24x24 mm <sup>2</sup> , nombre d'accumulations=2	Non	20 min
6	MGE / cartographie T <sub>2</sub> *	Épaisseur de coupe = 0,5 mm, TR≥9s, 8 TE de 1,6 à 13,5 ms, matrice 64x64, FOV= 24x24 mm <sup>2</sup> , nombre d'accumulations = 2	Non	20 min
7	<u>Injection ip</u> du Gd-DOTA sans sortir l'animal de l'aimant : 50 µl + 0,5 ml de sérum physiologique			2 min
8	<u>Diffusion</u> du produit de contraste			15 min
9	RARE / anatomie volumétrie	20 coupes adjacentes de 0,5 mm d'épaisseur, matrice 240x240, FOV=24x24mm <sup>2</sup> , TE= 4 ms, TR≥448 ms, nombre d'accumulations = 4	Oui	20 min
10 (optionnelle)	RARE / anatomie volumétrie	Identique à l'étape 9 avec décalage des coupes pour couvrir la rate en totalité si besoin	Oui	20 min

Tableau 10 : Synthèse du protocole IRM employé lors de l'étude.

FOV=Field Of View (Champ de vue), IP= Intra-Péritonéal, MGE =Multi-Gradient-Echo, MSME=Multi-Slice Multi-Echo, RARE=Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement.

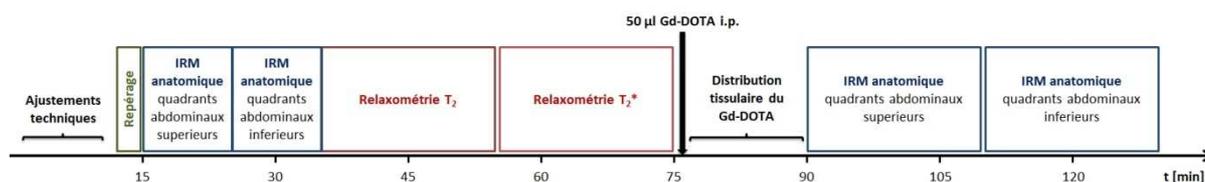


Figure 44 : Déroulement chronologique d'une expérience IRM lors de l'étude

#### 2.4.4. Méthode d'analyse et de traitement des données IRM

Les images ont été analysées à l'aide du logiciel de traitement d'image ImageJ pour l'analyse volumétrique du foie et de la rate, le diamètre de la veine porte, et la génération des cartes T<sub>2</sub>(\*).

##### 2.4.4.1. Analyse des images anatomiques : identification des lésions et volumétrie des organes

**Analyse qualitative :** recherche de la présence de granulomes, et d'autres signes radiologiques remarquables pouvant être observés dans le parenchyme hépatique et au niveau des vaisseaux abdominaux.

**Analyse quantitative :** le volume du foie et de la rate et la mesure du diamètre de la veine porte ont été obtenus par segmentation manuelle des images anatomiques.

Le foie et la rate ont été délimités sur chaque coupe (*i*) au moyen d'un outil de contourage d'ImageJ permettant la mesure de l'aire (*A<sub>i</sub>*) de la section transversale des organes dans la coupe *i*. Ces aires ont ensuite été utilisées pour le calcul des volumes (*V*) du foie et de la rate en mm<sup>3</sup> en tenant compte de l'épaisseur de coupe (0,5 mm) selon la formule :

$$V = 0.5 \sum_i A_i$$

Pour évaluer la déformation portale (liée à l'hypertension), la coupe transversale de la veine porte a été mesurée sur la coupe située 0,5 mm caudal de la bifurcation portale. Son diamètre a été estimé avec le diamètre de Feret. Le diamètre de Feret est la longueur maximale d'un étrier, à savoir la distance la plus longue entre deux points le long de la limite de la section de la veine porte. En d'autres termes, c'était le diamètre maximum mesurable sur le contourage de la section de la veine porte. L'aire de la veine porte a aussi été mesurée (Figure 45).

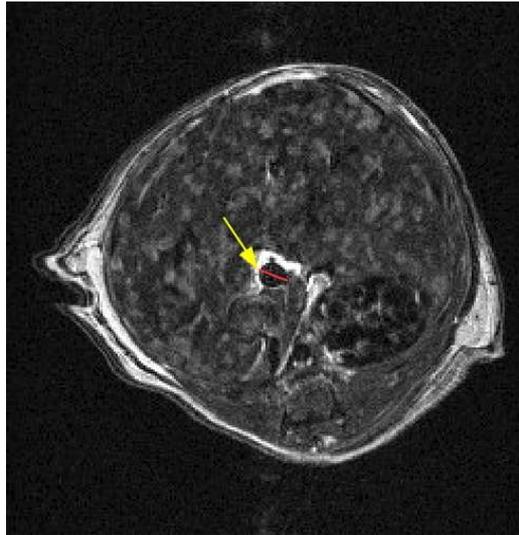


Figure 45 : Exemple d'un diamètre de Feret sur une section de veine porte

*Le diamètre de Feret de la section de la veine porte est représenté par un segment de couleur rouge sur l'image (pointé par la flèche jaune).*

#### 2.4.4.2. Analyses quantitatives des cartes $T_2$ et $T_2^*$

Les cartes de temps de relaxation ont été calculées en ajustant l'intensité du signal ( $S$ ) à :

$$S(TE) = S_0 \exp\left(-\frac{TE}{T_2^{(*)}}\right)$$

Nous avons utilisé l'algorithme simplex dans ImageJ pour calculer les cartes de temps de relaxation. Ici,  $S_0$  est le signal à l'équilibre thermodynamique, et  $T_2^{(*)}$  le temps de relaxation transverse recherché. Les histogrammes des quantifications  $T_2$  et  $T_2^*$  ont été obtenus à partir d'une grande région d'intérêt (ROI) couvrant le foie mais excluant le hile hépatique et les gros vaisseaux ainsi que la vésicule biliaire, les intestins ou l'estomac lorsqu'ils sont présents dans la coupe (Figure 46). Toutes les zones susceptibles d'être contaminées par des effets de volume partiel ou d'artéfacts de flux ont donc été écartées.

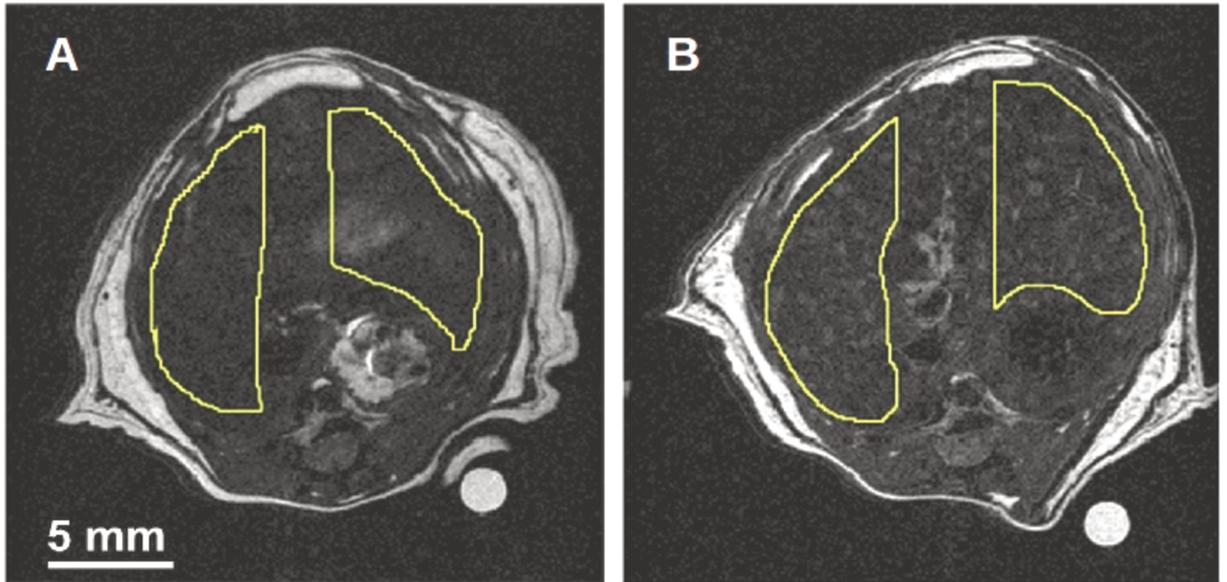


Figure 46 : Régions d'intérêt (ROI) pour l'analyse des cartes  $T_2$  et  $T_2^*$

*Les régions d'intérêt (ROI) sont d'abord dessinées de façon précise sur la coupe anatomique pondérée en  $T_1$ . Le masque des ROIs est ensuite transféré sur les cartes  $T_2$  ou  $T_2^*$  puis corrigé selon les artefacts présent sur chaque carte. Exemple de cartes  $T_2$  avec position des ROIs chez une souris contrôlée (A) et une souris infectée depuis 10 semaines (B).*

## 2.5. Relaxométrie de solutions de collagène

La fibrose hépatique se caractérisant principalement par une accumulation de collagène, nous avons réalisé dans des conditions similaires à celles de l'IRM *in vivo*, la relaxométrie de solutions de collagène de type I. Ces analyses ont été réalisées à 11,75T, sur des solutions de collagène de concentrations variables, proches des concentrations hépatiques rapportées dans la littérature (1,66 g/l, 3,33 g/l, 6,25 g/l et 12,5 g/l), l'eau pure a été utilisée comme référence. Les solutions de collagène ont été préparées avec du collagène de type I provenant de queue de rat (Sigma-Aldrich, France) solubilisé sous agitation magnétique dans de l'acide acétique d'une concentration de 0,1 M à une température de 40 ° C. Les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  ont été mesurés en utilisant une séquence d'écho de gradient en inversion-récupération avec 7 temps d'inversion ( $T_{inv}$  de 15 ms à 15 s) et une séquence d'écho de spin multi-écho de 80 TE (de 10 à 800 ms). Le TR était de 20 s.

## 2.6. Histologie hépatique

Une histologie hépatique a été réalisée afin d'évaluer l'inflammation et la fibrose. Les foies ont été prélevés immédiatement après l'euthanasie des souris par dislocation cervicale sous anesthésie, puis fixés sous hotte chimique dans des tubes Falcon de 15 ml remplis de

formol tamponné à 10% (Sigma-Aldrich, France) pendant au moins 48 heures. Après cette phase de fixation des tissus, caractérisée par une réticulation des protéines, les échantillons ont été déshydratés par immersion dans des bains alcoolisés de degrés croissants, puis immergés dans du xylène, et finalement coulés en paraffine. Les blocs de tissu paraffinés ont ensuite été coupés au microtome (épaisseur 3 µm) (100). Trois colorations ont été utilisées: l'hématoxyline-éosine (HE), le rouge Sirius, et le colorant de Perls.

**La coloration HE** est utilisée en routine en histopathologie sur presque tous les spécimens analysés car elle permet le marquage du noyau et du cytoplasme. L'hématoxyline modifiée selon Harris marque les éléments basophiles (anioniques) du noyau en bleu, par fixation sur les groupements phosphate des acides désoxyribonucléiques de la chromatine. Une coloration moins intense du cytoplasme est observée due à la fixation sur les acides ribonucléiques. L'éosine colore les éléments acidophiles du cytoplasme et les parois cellulaires, essentiellement représentés par les groupements cationiques des protéines, dans des tons variant du rose-orangé au rouge.

**Le Rouge Sirius** est une coloration utilisée pour la détection du collagène de type I, II et III. Cette coloration serait plus précise et plus sensible que le trichrome de Masson. Une de ses principales applications est la détection de la fibrose (101).

**La coloration de Perls** permet de marquer les complexes insolubles de fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) et donc de détecter une accumulation anormale qui peut survenir dans certains processus pathologiques. Le ferrocyanure de potassium contenu dans ce colorant se fixe au fer inorganique et donne une couleur dite bleu de Prusse qui est un bleu-vert.

### 2.6.1 Évaluation de la fibrose

Le classement de l'activité inflammatoire et de la stadification de la fibrose a été réalisé selon le système de score METAVIR, échelle histologique utilisée pour quantifier le degré d'inflammation et de fibrose d'une biopsie hépatique et développée dans le cadre d'hépatites virales C (102). Le score METAVIR est très couramment employé en histologie lors d'études sur la fibrose hépatique et la cirrhose d'origines infectieuse ou causées par la consommation d'alcool et la stéatose non alcoolique. Nous ne connaissons pas d'autres scores utilisés de façon routinière en histologie dans le cadre d'une hépatopathie parasitaire. En l'absence d'un score de fibrose spécifique de la schistosomiase, nous avons utilisé ce système de score METAVIR dans notre travail malgré le fait que les lésions engendrées suite à l'infection par *S. mansoni* diffèrent de celles du virus de l'hépatite C.

Le score METAVIR a été établi sur les coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-

éosine et l'aspect de la fibrose et de l'inflammation avec cette coloration.

"A" désigne l'intensité de la nécrose et de l'inflammation et peut varier de A0 à A3 (A0 = pas d'activité, A1 = activité légère, A2 = activité modérée et A3 = activité sévère).

"F" se réfère à l'étendue de la fibrose et peut varier de F0 à F4 (F0 = pas de fibrose, F1 = fibrose portale sans septa, F2 = fibrose portale avec cloisons rares, F3 = nombreux septa sans cirrhose, et F4 = cirrhose).

Les coupes colorées par le rouge Sirius ont été examinées par morphométrie semi-automatique sur ordinateur en utilisant la caméra NIKON DS-Fi2 et le logiciel d'imagerie NIS Elements (Nikon, Japon). Les analyses morphométriques ont été effectuées sur une section entière de lobe, en mesurant des zones colorées par le rouge Sirius semi-automatiquement délimitées et en soustrayant la zone occupée par les oeufs ou la zone de granulome central non colorée dépourvue de dépôt de collagène (Figure 47). Cette procédure a permis d'obtenir un pourcentage de la surface hépatique marquée par le rouge Sirius. Toutes les analyses ont été effectuées en aveugle par un vétérinaire spécialisé en histologie.

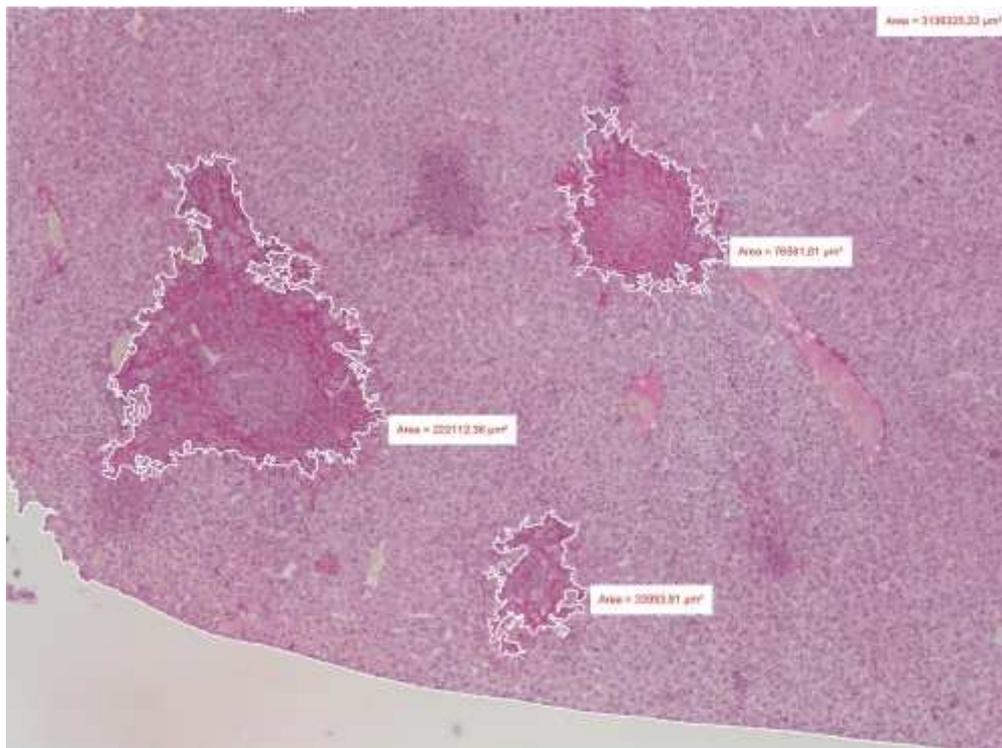


Figure 47 : Délimitation semi-automatique du marquage histologique au rouge Sirius

*Le logiciel permet ici de contourer en blanc les zones qui fixent le rouge Sirius, l'aire de chaque zone et l'aire totale est alors donnée.*

## 2.7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant la version 5.00 de GraphPadPrism (San Diego, CA) ou JMP 9.0 (SAS, Cary, NC). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Une analyse statistique non paramétrique adaptée à des échantillons de petite taille a été utilisée. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les souris non infectées et infectées à chaque temps du suivi. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer le score METAVIR ou le pourcentage de zones colorées au rouge Sirius chez les souris témoins et les souris malades à 6 et 10 semaines après l'infection. Les corrélations entre les valeurs de  $T_2$  et le score METAVIR ou les valeurs de  $T_2$  et la quantification de la fibrose par le rouge Sirius ont été effectuées en utilisant le test de Spearman. Le test de Smirnov a été utilisé pour comparer les distributions de deux échantillons indépendants. Les valeurs de  $P < 0,05$  ont été considérées comme significatives.

# RESULTATS

## 1. Suivi clinique des souris

Tous les animaux de la première cohorte exposés aux cercaires de *S. mansoni* ont été infectés avec succès comme confirmé par IRM et par histologie 6 semaines après l'infection, alors que seulement 4 souris sur les 6 de la deuxième cohorte ont développé une schistosomiase avec signes hépatospléniques à 10 semaines après l'infection comme observés en IRM et en histologie (Figure 48). Les deux souris de la deuxième cohorte chez lesquelles l'infection a échoué ont été écartées des analyses du groupe malade.

Aucun signe d'altération générale tel qu'une perte de poids supérieure à 20%, un état de prostration, des vocalises, une absence de toilettage, des saignements, une altération de la fonction urinaire ou intestinale, ou une altération de la respiration n'a été observé (à 2, 6 et 10 semaines) durant toute la durée du suivi.

Le contrôle du poids effectué avant chaque séance d'IRM n'a montré aucune différence significative entre les groupes infectés et les groupes témoins lors des mesures avec seulement une tendance non significative à des poids plus élevés chez les souris infectées (poids moyen des souris à 2 semaines :  $21,08 \pm 1,43\text{g}$  pour les souris contrôles (CT) *versus*  $22,08 \pm 1,11\text{g}$  pour les souris infectées ; à 6 semaines :  $24,54 \pm 1,20\text{g}$  pour les souris CT *versus*  $25,08 \pm 1,65\text{g}$  pour les souris infectées, et à 10 semaines  $24,43 \pm 3,01\text{g}$  pour les souris CT *versus*  $26,58 \pm 1,33\text{g}$  pour les souris infectées).

En revanche, une augmentation significative du poids a été observée dans les deux groupes entre la deuxième et la sixième semaine, compatible avec la courbe de poids normale de souris jeunes de la souche CBA/J ( $P=0,002$  pour les souris contrôles et  $P=0,005$  pour les souris infectées, test de Mann-Whitney). Aucune différence significative de poids n'a été observée entre les groupes de 6 semaines post infection et 10 semaines post infection chez les contrôles ( $P=0,70$ , Test de Mann-Whitney) et les animaux infectés ( $P=0,07$ , test de Mann-Whitney).

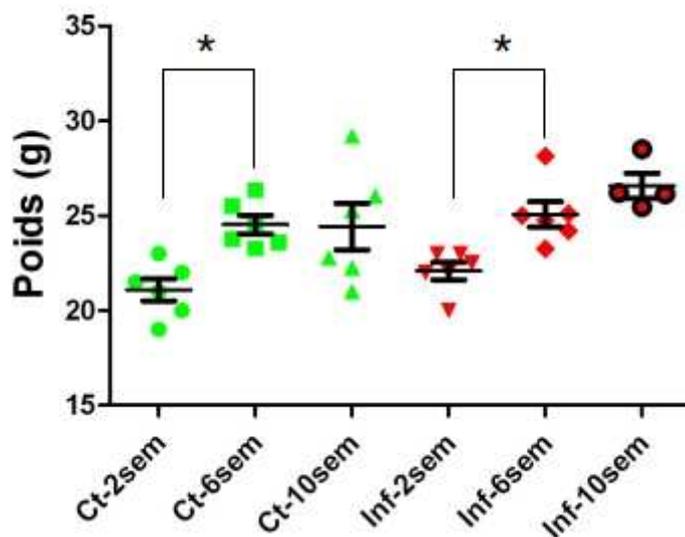


Figure 48 : Évolution du poids chez les souris infestées et les souris contrôles

L'étoile représente des différences significatives entre deux groupes d'animaux ( $P < 0,05$ , test Mann-Whitney).

Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines.

## 2. Imagerie anatomique du foie

### Aspect radiologique

Les foies étaient distinguables avec un bon contraste dans la cavité abdominale des animaux avec les séquences écho de spin multi-coupes. Le contour de l'organe était moins net sur les coupes les plus proches du thorax en raison d'artefacts causés par les mouvements du diaphragme, malgré un ralentissement du rythme respiratoire dû à l'anesthésie et malgré la synchronisation respiratoire avec l'outil PC-SAM. La veine porte (VP), ses ramifications ainsi que les autres gros vaisseaux comme la veine cave étaient bien identifiables sur les coupes acquises (Figure 49).

La principale caractéristique des foies malades était la présence d'hyper-signaux multifocaux (taches blanches punctiformes disséminées) au niveau des images anatomiques pondérées en  $T_1$ , visibles 10 semaines après l'infection. Ces hyper-signaux étaient observables avant l'injection de l'agent de contraste (Gd-DOTA) et étaient rehaussés après injection. Aucun signe évocateur d'ascite n'a été observé chez les animaux malades à quelque stade que ce soit avec 30 cercaires, dans la zone abdominale couverte par les deux séries de coupes anatomiques (2\*20) allant du poumon jusqu'à l'extrémité rostrale de la rate (Figure 49).

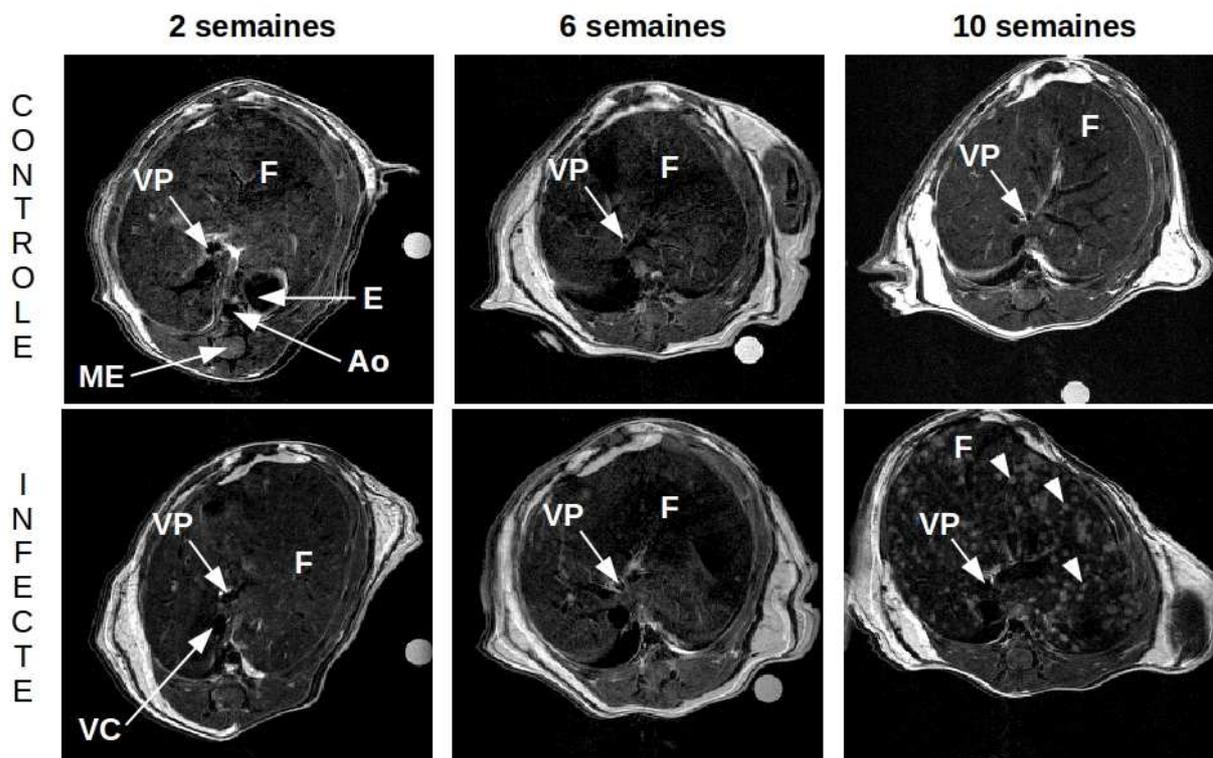


Figure 49 : Images caractéristiques du foie dans la bilharziose murine.

*La première série d'images (rangée horizontale du haut) correspond à des coupes du foie (F) de souris contrôles aux différents temps de l'étude. La série du bas présente des images de foies de souris infectées à 2, 6 et 10 semaines après l'infection. Les têtes de flèches indiquent les hyper-signaux multifocaux. Ao=Aorte, E=Estomac, ME=Moelle Épineière, VC=Veine Cave, VP=Veine Porte.*

## 2.2 Volumétrie

Le volume hépatique moyen des souris contrôles était respectivement de  $901,8 \pm 96,3$  mm<sup>3</sup>,  $917,3 \pm 89,5$  mm<sup>3</sup> et  $1045,3 \pm 129,3$  mm<sup>3</sup> à 2, 6 et 10 semaines. Le volume hépatique moyen des souris infectées était respectivement de  $929,9 \pm 81,6$  mm<sup>3</sup>,  $1087,9 \pm 77,1$  mm<sup>3</sup> et  $1795,0 \pm 165,1$  mm<sup>3</sup> à 2, 6 et 10 semaines post infection. Aucune différence dans la volumétrie des foies n'a été détectée entre les groupes infectés et témoins 2 semaines après l'infection ( $P=0,60$ , test de Mann-Whitney). En revanche, dès 6 semaines une augmentation significative de +19% ( $P = 0,004$ , test de Mann-Whitney) du volume hépatique a été mesurée chez les animaux malades, progressant jusqu'à +72% par rapport aux valeurs des sujets contrôles ( $P = 0,009$ , test de Mann-Whitney) à 10 semaines après l'infection (Figure 50).

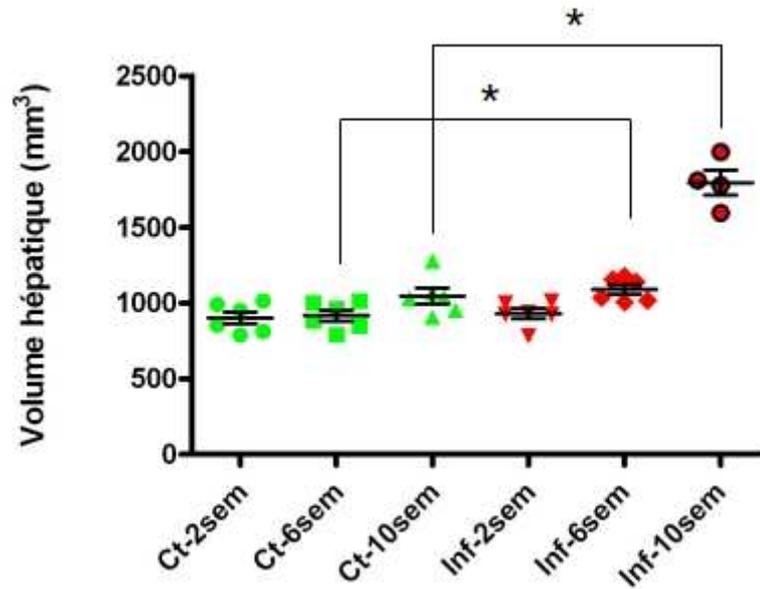


Figure 50 : Comparaison des volumes hépatiques chez les souris atteintes de schistosomiase et les souris contrôles

*L'étoile représente des différences significatives entre deux groupes d'animaux ( $P < 0,05$ , test Mann-Whitney). Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines.*

### 3. Imagerie anatomique de la rate

#### 3.1. Aspect radiologique de la rate

Les rates étaient distinguables avec un bon contraste dans la cavité abdominale des animaux. Le contour de l'organe était moins discernable sur les images acquises sans injection de Gd-DOTA et avec seulement 2 accumulations en comparaison de celles acquises avec 4 accumulations et injection de Gd-DOTA. Les séries de coupes jointives permettaient de couvrir en totalité la rate de chaque animal. Généralement, les rates des animaux infectés présentaient un aspect radiologique granulaire dû à la présence d'hyper-intensités punctiformes sur l'ensemble de l'organe, tandis que les rates des sujets sains présentaient un aspect homogène (Figure 51).

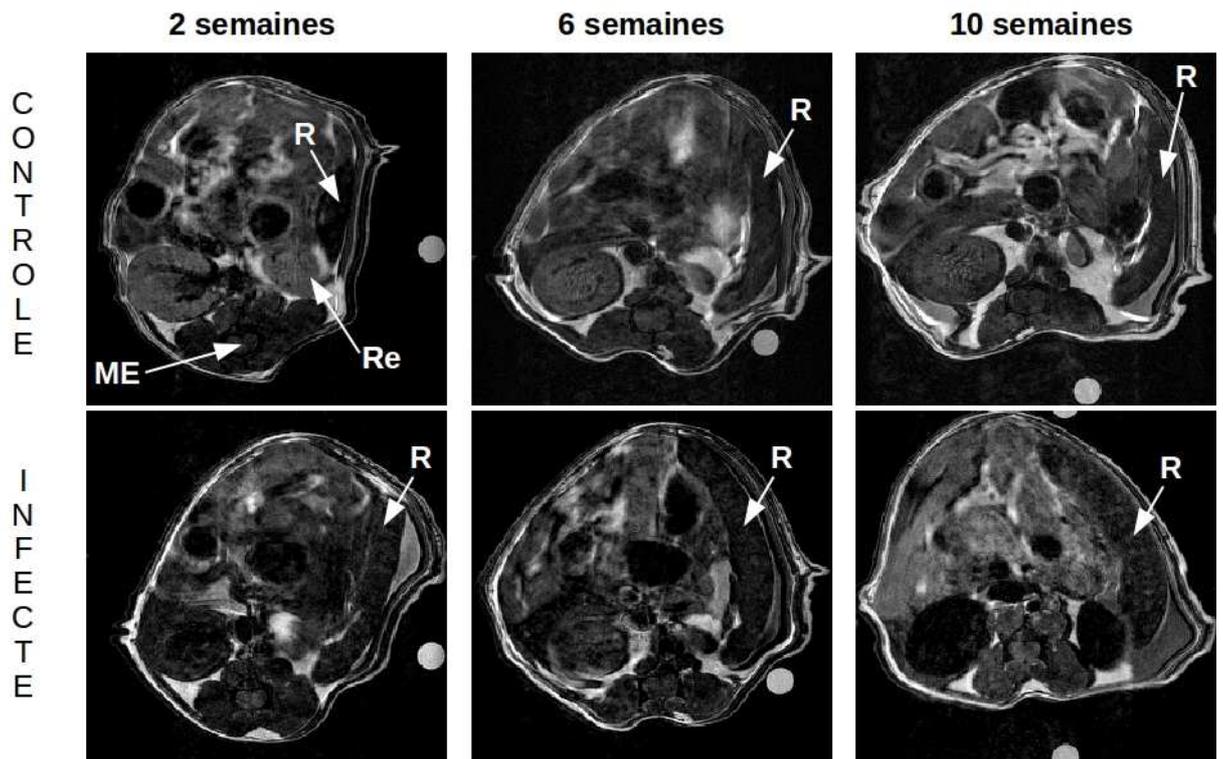


Figure 51 : Images caractéristiques de la rate dans la bilharziose murine

*La première série d'images (rangée horizontale du haut) correspond à des coupes de la rate (R) de souris contrôles aux différents temps de l'étude. La série du bas présente des images de rates de souris infectées à 2, 6 et 10 semaines. L'aspect granulaire de la rate, déjà détectable à 2 semaines est bien visible à 10 semaines.*

*ME=Moelle Épineuse, Re=Rein.*

La veine splénique était bien visible chez deux des 4 animaux infectés explorés à 10 semaines après infection. La largeur de la veine était suffisante pour être identifiée contrairement aux autres souris. Une veine porte très large a pu être observée sur ces mêmes coupes (Figure 52).



Figure 52 : Dilatation de la veine splénique chez une souris infectée

*Les flèches pointent sur une veine dilatée chez une souris infectée depuis 10 semaines. Les images représentent*

des coupes successives de la région où naît la veine splénique (A) qui part de la rate (R) et rejoint la veine porte (B). Ces dilatations ne sont pas visibles chez l'animal sain (C).

### 3.2. Volumétrie de la rate

Le volume splénique moyen des souris contrôles était respectivement de  $68,3 \pm 10,6$  mm<sup>3</sup>,  $63,8 \pm 14,5$  mm<sup>3</sup> et  $67,3 \pm 8,5$  mm<sup>3</sup> à 2, 6 et 10 semaines. Le volume splénique moyen des souris infectées était respectivement de  $63,5 \pm 8,3$  mm<sup>3</sup>,  $96,9 \pm 18,0$  mm<sup>3</sup> et  $181,8 \pm 46,9$  mm<sup>3</sup> à 2, 6 et 10 semaines post infection. Aucune différence volumétrique n'a été détectée entre les groupes infectés et témoins 2 semaines après l'infection en IRM anatomique ( $P=0,40$ , test de Mann-Whitney), en revanche une augmentation du volume de la rate (+52%,  $P = 0,009$ , test de Mann-Whitney) a été mesurée à 6 semaines après l'infection. Cette splénomégalie a progressé jusqu'à +170% de différence par rapport aux contrôles ( $P = 0,009$ , test de Mann-Whitney) à 10 semaines après l'infection (Figure 53).

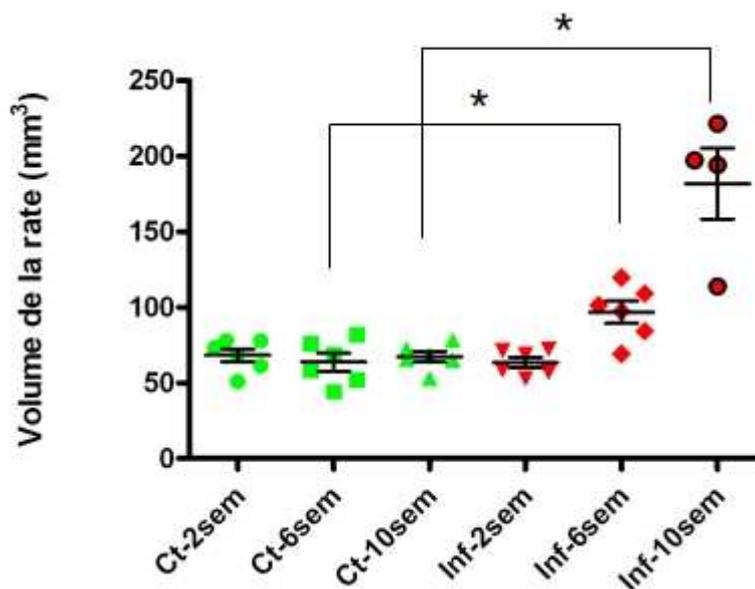


Figure 53 : Comparaison des volumes spléniques mesurés par IRM chez les souris atteintes de schistosomiase digestive et les souris contrôles.

L'étoile représente des différences significatives entre deux groupes d'animaux ( $P < 0,05$ , test Mann-Whitney). Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines.

### 3.3. Analyse du diamètre maximal de la section de la veine porte

Le diamètre moyen de la veine porte des souris contrôles était respectivement de  $1,19 \pm 0,12$  mm,  $1,17 \pm 0,18$  mm et  $1,16 \pm 0,11$  mm à 2, 6 et 10 semaines post infection. Le diamètre moyen de la veine porte des souris infectées était respectivement de  $1,25 \pm 0,13$  mm,  $1,43 \pm 0,15$  mm et  $1,68 \pm 0,15$  mm à 2, 6 et 10 semaines. Aucune différence n'a été détectée entre les groupes infectés et témoins 2 semaines après l'infection en IRM anatomique au niveau du diamètre maximum de la veine porte ( $P=0,39$ , test de Mann-Whitney). Comme dans le cas de l'analyse volumétrique du foie et de la rate, une variation significative du diamètre maximal de la veine porte a été mesurée à 6 semaines après infection consistant en une augmentation de +22% ( $P=0,025$ , test de Mann-Whitney) chez les souris infectées progressant jusqu'à +45% par rapport aux contrôles ( $P=0,009$ ) à 10 semaines après l'infection (Figure 54).

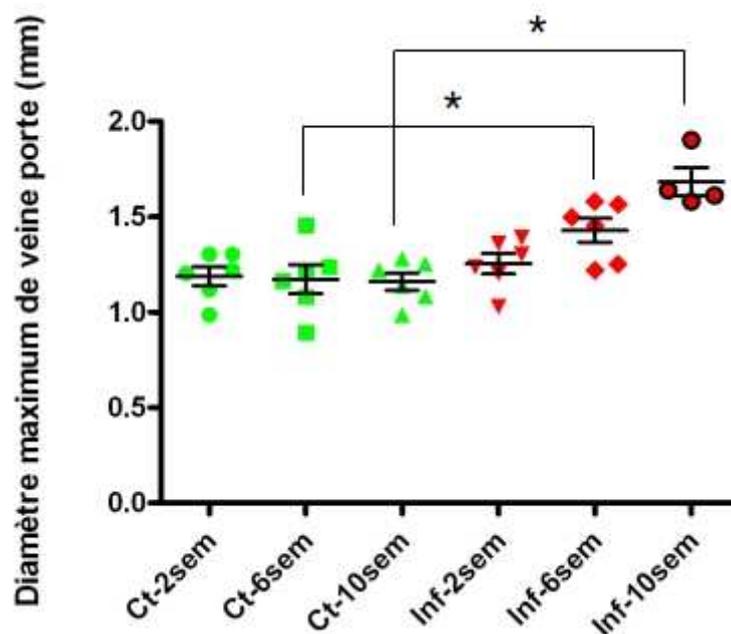


Figure 54 : Diamètre maximum de la veine porte mesuré par IRM dans le modèle de schistosomiase digestive et les souris contrôles

*L'étoile représente des différences significatives entre deux groupes d'animaux ( $P < 0,05$ , test Mann-Whitney). Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines.*

### 3.4. Analyse de l'aire de la section de la veine porte

L'aire de section de la veine porte des souris contrôles était respectivement de  $0,74 \pm 0,12$  mm<sup>2</sup>,  $0,66 \pm 0,17$  mm<sup>2</sup> et  $0,66 \pm 0,12$  mm<sup>2</sup> à 2, 6 et 10 semaines. L'aire de section de la veine

porte des souris infectées était respectivement de  $0,82 \pm 0,19 \text{ mm}^2$ ,  $1,06 \pm 0,20 \text{ mm}^2$  et  $1,57 \pm 0,34 \text{ mm}^2$  à 2, 6 et 10 semaines post infection. Aucune différence n'a été détectée entre les groupes infectés et témoins 2 semaines après l'infection ( $P=0,40$ , test de Mann-Whitney), mais comme dans le cas de l'analyse du diamètre maximal de la veine porte, une augmentation significative de l'aire de section de la veine porte (+61%,  $P = 0,009$ , test de Mann-Whitney) a été mesurée à 6 semaines chez les souris infectées, atteignant +138% de différence par rapport aux contrôles ( $P = 0,01$ , test de Mann-Whitney) à 10 semaines après l'infection (Figure 55).

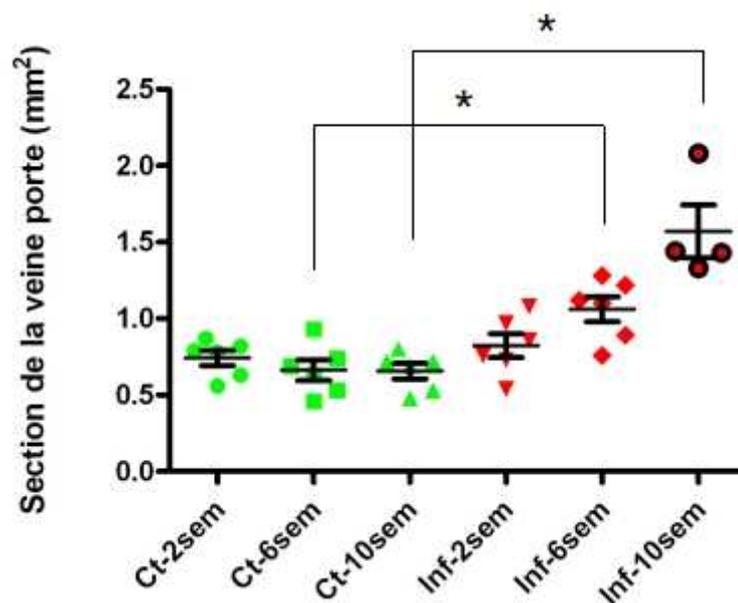


Figure 55 : Aire de la section de la veine porte mesurée par IRM dans les souris atteintes de schistosomiase digestive et chez les souris contrôles

L'étoile représente des différences significatives entre deux groupes d'animaux ( $P < 0,05$ , test Mann-Whitney). Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines.

## 4. Relaxométrie

### 4.1. Cartographie du $T_2$ dans le foie

Le traitement des images de relaxométrie permet d'obtenir une cartographie de la distribution spatiale des valeurs de  $T_2$  dans le foie (à chaque pixel de l'image correspond une valeur de  $T_2$ ). Les cartes  $T_2$  sont représentées avec une échelle colorimétrique correspondant à des valeurs de  $T_2$  allant de 0 ms à 50 ms et permettant une visualisation de la distribution dans

l'espace des pixels présentant des  $T_2$  de valeurs proches (Figure 56). La valeur du  $T_2$  (21 ms) dans la référence est demeurée constante pour toutes les images acquises à tous les temps du suivi (animaux contrôles et infectés). Les valeurs de  $T_2$  mesurées dans les ROIs hépatiques chez les sujets malades à 2, 6 et 10 semaines post infection n'étaient pas significativement différentes de celles mesurées chez les sujets sains (différence maximale mesurée à 10 semaines avec des valeurs de  $12,2 \pm 1,5$  ms pour les souris infectées et  $10,4 \pm 1,3$  ms pour les contrôles ( $P=0,17$ , test de Mann-Whitney). En revanche, l'examen visuel des cartes montre une grande hétérogénéité des valeurs de  $T_2$  chez les sujets malades à 10 semaines alors que les cartes sont homogènes chez les souris saines.

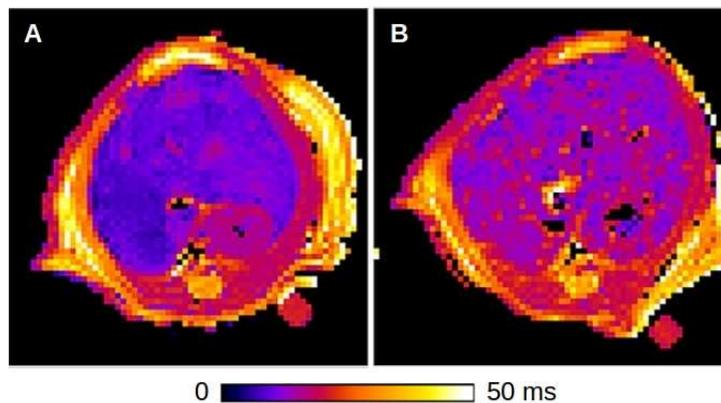


Figure 56 : Comparaison des cartographies du  $T_2$  d'un foie sain et d'un foie bilharzien à 10 semaines d'infection

*L'image contrôle (A) montre un foie dont les valeurs de  $T_2$  homogènes sont aux alentours de 10 ms alors que chez la souris infestée depuis 10 semaines le foie présente des valeurs de  $T_2$  hétérogènes avec des zones aux alentours de 16 ms et d'autres zones aux alentours de 20 ms. Le disque externe apparaissant en rouge correspond à la section du capillaire de référence de  $T_2$  connu ( $T_2=21$  ms). Les pixels noirs dans le foie et le corps des souris présentent des valeurs nulles car leurs valeurs étaient extrêmes, dues à des artefacts donc ils ont été exclus des mesures.*

L'hétérogénéité des valeurs de  $T_2$  sur les cartes de foies de souris malades nous a incité à étudier la distribution des valeurs de ce paramètre (analyse de la fréquence du nombre de pixels associés à une valeur de  $T_2$ ). La représentation en histogrammes (Figure 57) montre une différence de distribution des valeurs de  $T_2$  entre animaux sains et malades à 10 semaines. Les valeurs de  $T_2$  chez les sujets sains excédaient rarement 14 ms, tandis qu'un décalage de la distribution vers des valeurs supérieures à 16 ms était visible chez les souris malades (Figure 57). Nous avons noté qu'en moyenne  $13,4 \pm 3,4$  % des pixels compris dans les ROIs des sujets infectés à 10 semaines présentaient des valeurs de  $T_2$  comprises entre 16 ms et 26 ms

contre  $1,1 \pm 1,0\%$  chez les souris témoins ( $P = 0,0048$ , test de Kruskal-Wallis) (Figure 57).

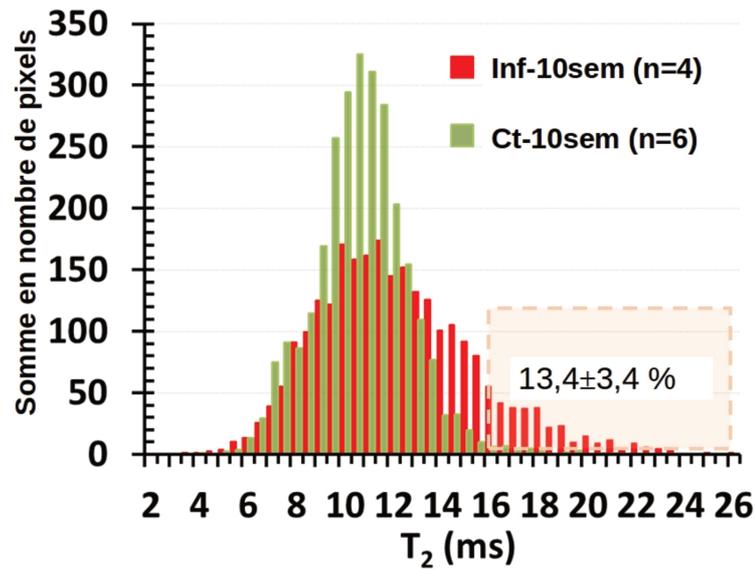


Figure 57 : Comparaison de la distribution des valeurs  $T_2$  des foies sains et des foies bilharziens à 10 semaines après l'infection

*L'encadré présente le nombre moyen de pixels de  $T_2 > 16$  ms chez les souris infectées pendant 10 semaines. Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines.*

De plus, les valeurs  $T_2$  du foie supérieures à 16 ms sur les cartes  $T_2$  étaient co-localisées avec les hyper-intensités sur les images anatomiques correspondant aux granulomes (Figure 58).

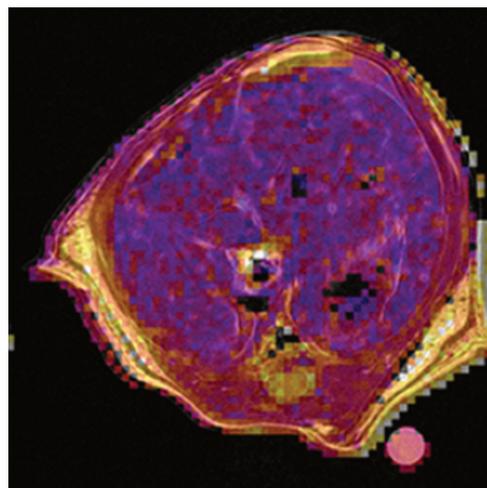


Figure 58 : Co-localisation des pixels correspondant à des valeurs de  $T_2$  supérieures à 16 ms avec les hyper-intensités après injection de Gd-DOTA visibles en imagerie anatomique

*Illustration chez un animal à 10 semaines d'infection.*

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les groupes de souris infectées et contrôles à 2 semaines d'infection ( $P=0,13$ , test de Kruskal-Wallis) concernant le pourcentage de pixels dans les ROIs dont le  $T_2$  était compris entre 16 et 26 ms. Les valeurs moyennes respectives étaient de  $2,61 \pm 3,29\%$  et  $5,72 \pm 3,43\%$ . Nous n'avons par ailleurs observé aucune différence significative entre les groupes de souris infectées et contrôles après 6 semaines d'infection ( $P=0,59$ , test de Kruskal-Wallis) dont les valeurs moyennes respectives étaient de  $2,14 \pm 1,91\%$  et  $1,53 \pm 1,30\%$  (Figure 59).

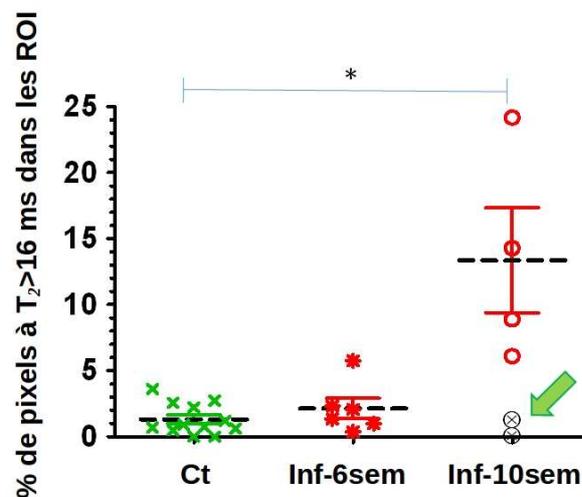


Figure 59 : Comparaison des fractions d'aire hépatique en pourcentages ayant des valeurs de  $T_2$  supérieures à 16 ms

*La fraction de l'aire hépatique correspond au pourcentage de la superficie du foie sur la carte  $T_2$  occupée par des pixels ayant une valeur de  $T_2$  supérieure à 16 ms. Cette valeur est donnée pour chaque animal à tous les temps du suivi. Cette valeur augmente chez les souris infectées explorées à 10 semaines. La flèche verte indique les valeurs calculées pour les animaux chez lesquels l'infection a échoué (exclues de l'analyse de statistique). Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines. L'étoile représente des différences significatives entre deux groupes d'animaux ( $P<0,05$ , Kruskal-Wallis).*

## 4.2. Cartographie du $T_2^*$ dans le foie

Les cartes montrent un artéfact lié à l'inhomogénéité du champ magnétique (problèmes des très hauts champs magnétiques) auxquels le  $T_2^*$  est particulièrement sensible. Par ailleurs, on constate que certains pixels isolés (blancs sur la carte) présentent des valeurs anormalement élevées (environ 20 ms) ce qui semble dénoter un artéfact (Figure 60). Une carte du  $T_2^*$  obtenue à partir d'un animal témoin de la deuxième cohorte présentait des

artéfacts de mouvement et n'a donc pas été incluse dans l'analyse. Le  $T_2^*$  moyen dans chaque ROI était de  $5,8 \pm 1,6$  ms chez les souris témoins et de  $5,4 \pm 1,5$  ms chez les souris infectées explorées à 6 semaines. Il était égal à  $6,1 \pm 1,5$  ms chez les souris témoins et à  $4,6 \pm 1,5$  ms chez les souris infectées explorées à 10 semaines.

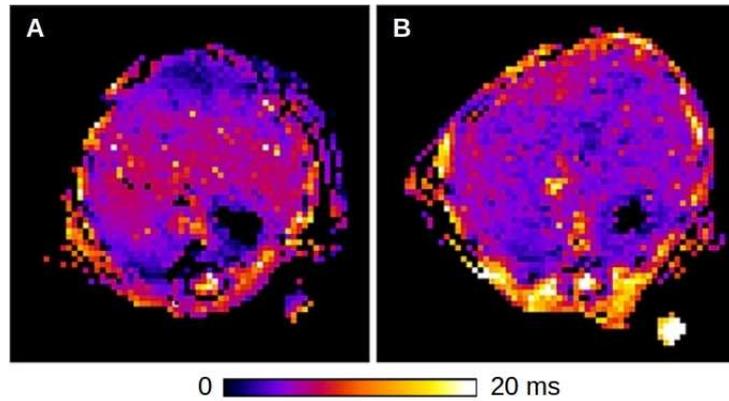


Figure 60 : Comparaison des cartographies du  $T_2^*$  d'un foie sain et d'un foie bilharzien à 10 semaines d'infection

*L'image contrôle (A) montre un foie dont les valeurs de  $T_2^*$  relativement homogènes sont aux alentours de 6 ms alors que chez la souris infestée depuis 10 semaines le foie présente des valeurs de  $T_2^*$  davantage hétérogènes avec des zones aux alentours de 4 ms. Les pixels noirs dans le foie et le corps des souris correspondent à des valeurs nulles. Ils ont été exclus car leurs valeurs étaient extrêmes en raison d'artefacts.*

On observe que la distribution des valeurs de  $T_2^*$  dans les foies des souris infectées est décalée vers des valeurs plus faibles à 10 semaines (différence non significative, test Kruskal-Wallis) (Figure 61).

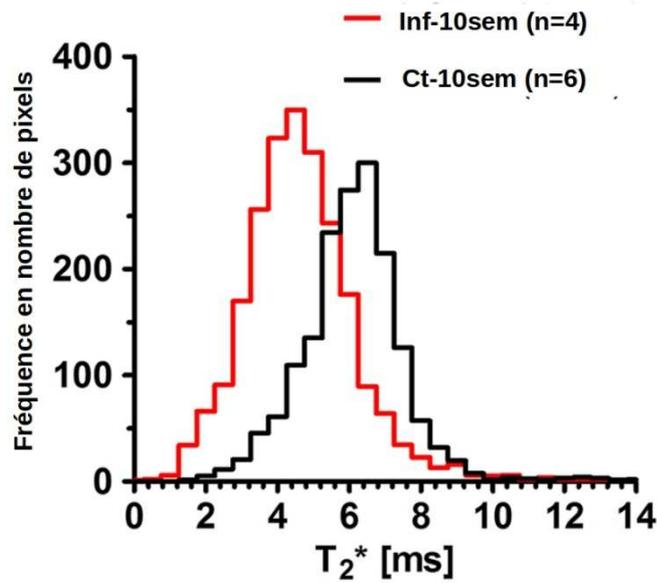


Figure 61 : Distribution des valeurs de  $T_2^*$  du foie dans le modèle murin à 10 semaines après l'infection

*Ct=Contrôles, Inf=Infectés, sem=semaines.*

### 4.3. Relaxométrie *in vitro* de solutions de collagène

Une mesure des temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  a été réalisée sur des solutions modèles contenant des concentrations croissantes de collagène. Ces analyses *in vitro* n'ont révélé aucun changement significatif de ces paramètres quelle que soit la concentration de collagène utilisée (Figure 62). Compte tenu des résultats très variables et de l'absence de différence significative entre les groupes infectés et contrôles en relaxométrie  $T_2^*$  nous n'avons pas effectué de mesures *in vitro* du  $T_2^*$  du collagène.

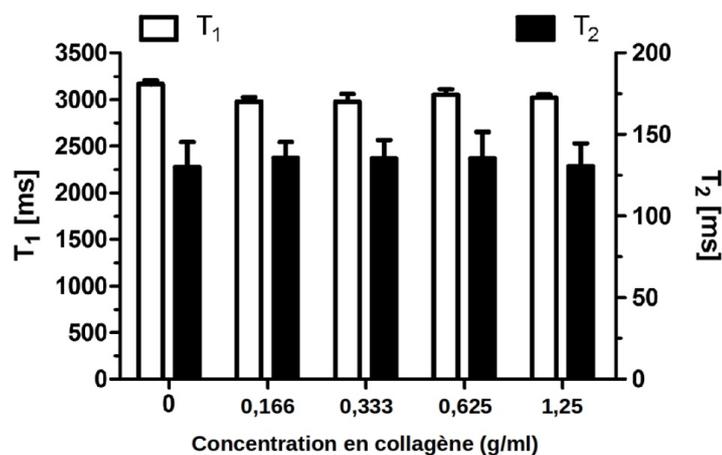


Figure 62 : Mesures *in vitro* des temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$  de solutions de collagène

## 5. Histologie hépatique

### 5.1. Principaux résultats

L'histologie a montré que les parasites adultes et les œufs commençaient à se loger dans le foie avec une inflammation minimale à 6 semaines après l'infection (Figure 63).



Figure 63 : Parasite de *S. mansoni* adulte observé en histologie

*Vers de schistosome (V) au sein de la lumière (L) veineuse porte (HE, X100). Barre d'échelle =100 µm*

Occasionnellement, des granulomes péri-ovulaires isolés ont également été observés chez les animaux les plus malades (n=5), après 10 semaines d'infection (Figure 64), tout comme des foyers de nécrose hépatocytaire (n=4) (Figure 65).

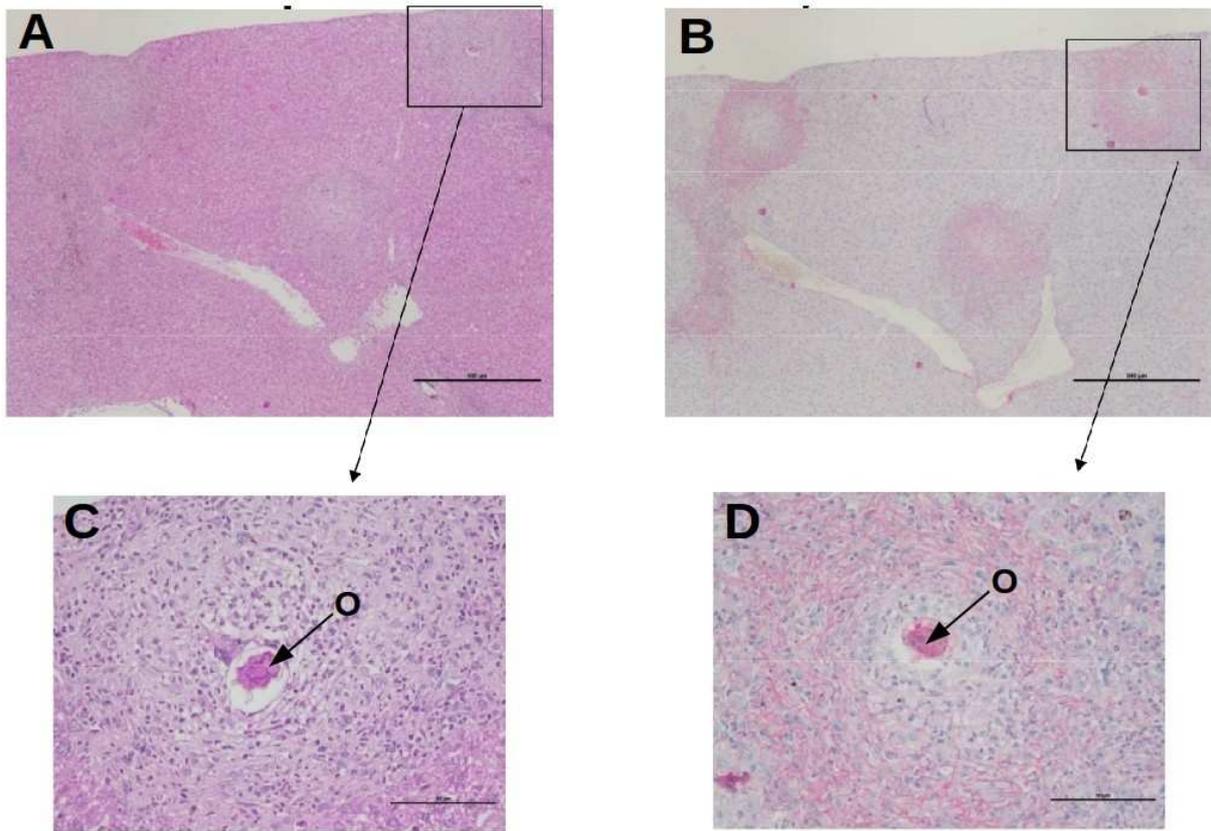


Figure 64 : Granulomes centrés sur des œufs de *S. mansoni* observés en histologie

*Granulomes péri-ovulaires situés au centre des rectangles noirs (X40, Barre d'échelle=500  $\mu$ m), colorés par le mélange hématoxyline/éosine (A) ou le rouge Sirius (B) avec un grossissement (X100, Barre d'échelle=100  $\mu$ m) sur un œuf (O) pour chaque coloration (respectivement C et D).*

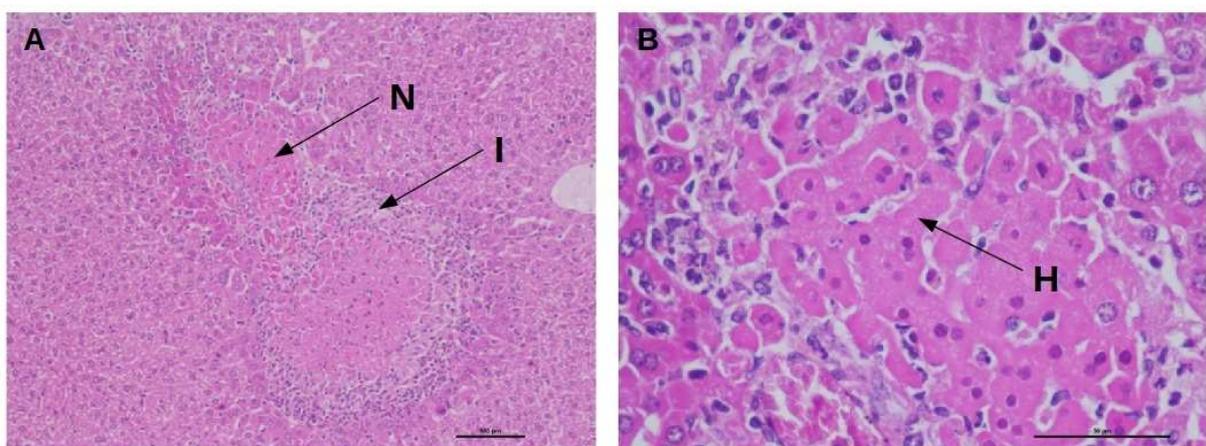


Figure 65 : Nécrose hépatocytaire observée en histologie

*A : Zone de nécrose hépatocytaire (N) entourée par un liseré de cellules inflammatoires dégénérées (I) (X100, Barre d'échelle=100  $\mu$ m). B : Hépatocytes nécrosés (H), hyper-acidophiles aux contours cytoplasmiques détruits (X400, Barre d'échelle=50  $\mu$ m).*

Les œufs étaient entourés d'une population dense de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes et fibroblastes) formant des granulomes ; avec un dépôt plus ou moins intense de matrice extracellulaire conduisant à une fibrose intergranulomateuse et à la fusion de plusieurs granulomes remplaçant certains espaces portaux (Figure 66).

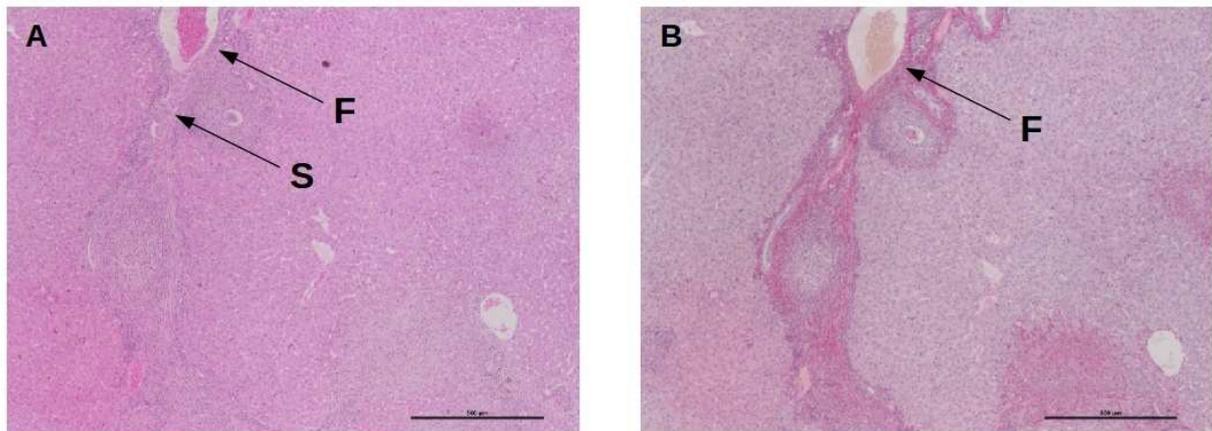


Figure 66 : Fibrose péri-portale inter-granulomateuse observée en histologie

*Fibrose péri-portale (F) marquée avec septas (S) (cloisons séparant deux structures anatomiques) en coloration HE (A). Mise en évidence (X40) de la fibrose péri-portale (F) par coloration au rouge Sirius (B). Barre d'échelle = 500µm.*

L'histologie a confirmé l'absence de parasites, de granulomes, et de lésions chez les deux souris qui avaient subi la procédure d'infection (lot de 10 semaines post infection) et ne présentaient pas de signe de la maladie à l'IRM. Ces souris ont donc été exclues du groupe d'animaux malades dans les analyses statistiques.

Dans un grand nombre de granulomes au stade avancé, une coloration de Perls positive était visible au niveau des macrophages, indiquant une accumulation de pigments ferriques (Figure 67). Ceci est très suggestif de l'hématine, un produit de dégradation de l'hémoglobine excrété par le ver (103).

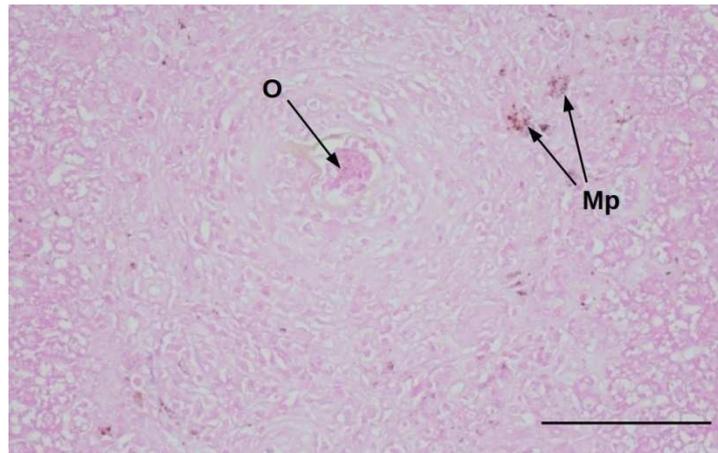


Figure 67 : Pigments observés par histologie par coloration de Perl's dans les macrophages granulomateux

*Les marquages positifs (Mp) en périphérie de l'œuf (O) sont suggestifs de l'hématine. Barre d'échelle =100µm*

## 5.2. Évaluation de la fibrose hépatique

### 5.2.1. Superficie du marquage au rouge Sirius

L'évaluation semi-quantitative de la fibrose sur une coupe de lobe colorée au rouge Sirius à l'aide d'images montrant la totalité de la section (mesure des surfaces riches en collagène donc fibrosées, et calcul du rapport surface hépatique fibrosée/surface hépatique totale). Cette évaluation n'a pas permis d'identifier de zones riches en collagène chez les animaux contrôles ou malades à 2 et 6 semaines. En revanche, à 10 semaines, tous les animaux infectés présentaient une fibrose hépatique. La surface hépatique fibrosée pour ce groupe de souris était de  $10,53 \pm 2,45\%$ .

### 5.2.2. Scores METAVIR

Le score METAVIR (AxFx) est une échelle basée sur les résultats histologique prenant en compte l'inflammation (Ax) et le degré de fibrose (Fx) évalué par HE. Les deux animaux dont l'infection avait échoué ont reçu un score de A0F0 tout comme l'ensemble des animaux contrôles. Tous les animaux infectés présentaient une inflammation péri-portale et portale discrète 6 semaines après l'infection mais un seul d'entre eux était considéré comme A1F0. Le nombre d'œufs piégés dans le tissu hépatique était considérablement augmenté par la suite. A 10 semaines après l'infection, 4 souris présentaient une fibrose portale sévère avec une inflammation chronique granulomateuse correspondant aux scores METAVIR de A1F1 (n=1) à A2F2 (n=3).

### 5.2.3. Corrélation entre composants du score METAVIR et pourcentage de tissu hépatique marqué au rouge Sirius

La recherche de corrélations a été faite sur l'ensemble de la cohorte et aussi en prenant uniquement en compte les groupes contrôles et infectés à 10 semaines.

Sur l'ensemble de la cohorte (n=24), l'analyse de la corrélation entre le grade d'inflammation Ax du score METAVIR et le pourcentage d'aire marquée au rouge Sirius a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,89 et une valeur de P inférieure à 0,0001(Figure 68 A).

En prenant en compte seulement les souris infectées à 10 semaines (n=4) et leurs contrôles (n=6), l'analyse de la corrélation entre le grade d'inflammation Ax du score METAVIR et le pourcentage d'aire marquée au rouge Sirius a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,89 et une valeur de P égale à 0,0005 (Figure 68 B).

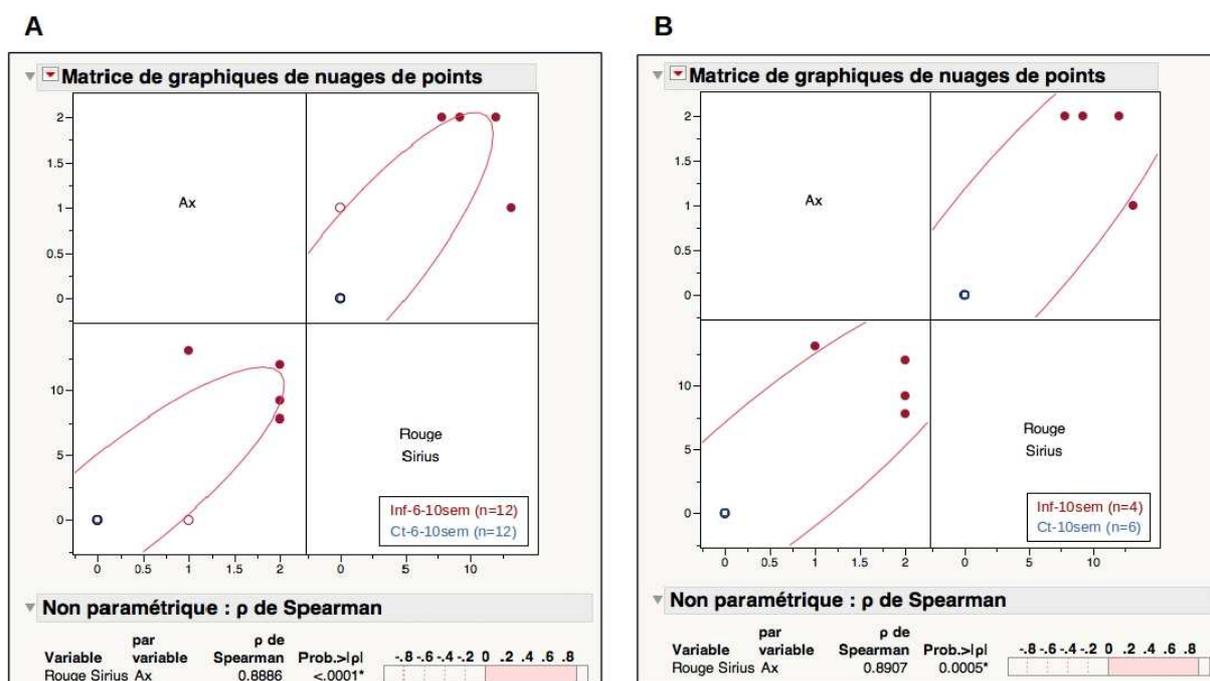


Figure 68 : Corrélation entre le grade d'inflammation Ax du score METAVIR et la surface marquée au rouge de Sirius

*Corrélation entre la valeur x du score Ax des résultats METAVIR et la mesure semi quantitative de la surface hépatique riche en collagène (positive au rouge Sirius) chez toutes les souris (n=24) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.*

Sur l'ensemble de la cohorte (n=24), l'analyse de la corrélation entre le grade d'inflammation Fx du score METAVIR et le pourcentage d'aire marquée au rouge Sirius a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,98 et une valeur de P inférieure à 0,0001 (Figure 69 A).

En prenant en compte seulement les souris infectées à 10 semaines (n=4) et leurs contrôles (n=6), l'analyse de la corrélation entre le grade d'inflammation Fx du score METAVIR et le pourcentage d'aire marquée au rouge Sirius a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,89 et une valeur de P égale à 0,0005 (Figure 69 B).

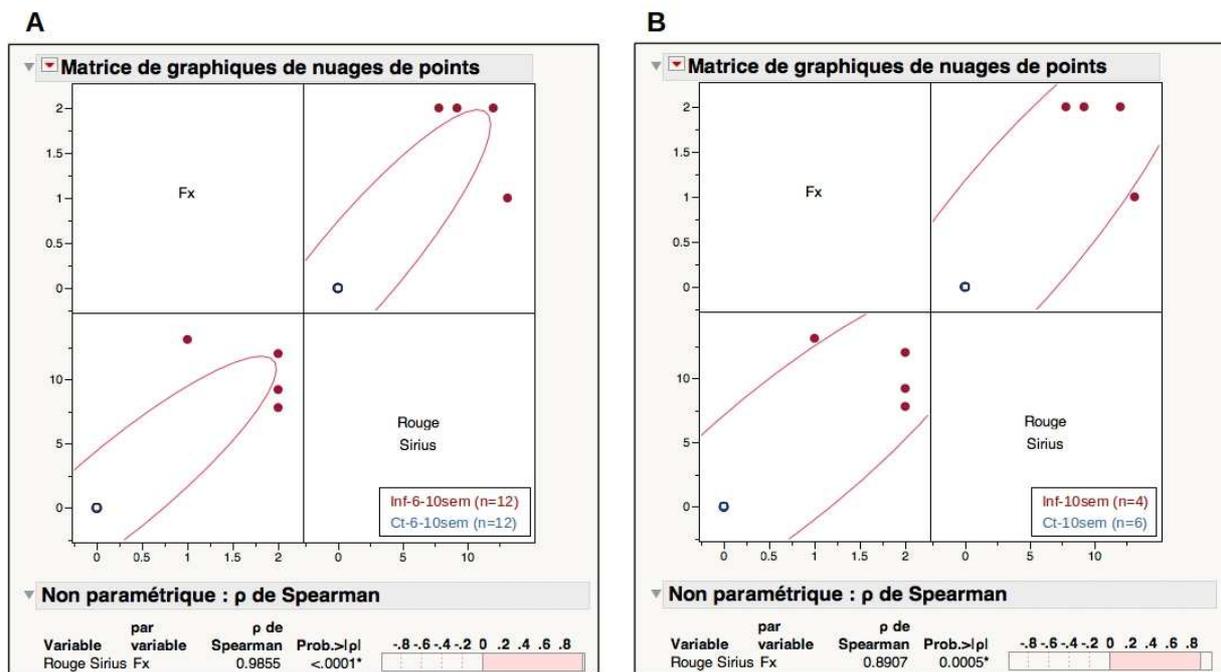


Figure 69 : Corrélation entre le grade de fibrose Fx du score METAVIR et la surface marquée au rouge de Sirius

*Corrélation entre la valeur x du score Fx des résultats METAVIR et la mesure semi quantitative de la surface hépatique riche en collagène (positive au rouge Sirius) chez toutes les souris (n=24) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.*

En prenant le score METAVIR complet, donc les composantes Ax et Fx à la fois, et le pourcentage de surface hépatique marquée positivement au rouge Sirius, les valeurs de la corrélation de Spearman étaient de 0,90 pour le Rs avec  $P < 0,0001$  sur l'ensemble de la cohorte (Figure 70 A) et  $R_s = 0,89$  avec  $P = 0,0005$  sur les groupes infecté et contrôle à 10 semaines (Figure 70 B). Pour les besoins de cette analyse statistique qui s'appuie sur des nombres, nous avons converti le score METAVIR en un code numérique qui hiérarchise l'état des foies de souris (Tableau 11).

Code METAVIR	Code numérique
A0F0	1
A1F0	2
A1F1	3
A2F1	4
A2F2	5

Tableau 11 : Conversion du code METAVIR en un code numérique

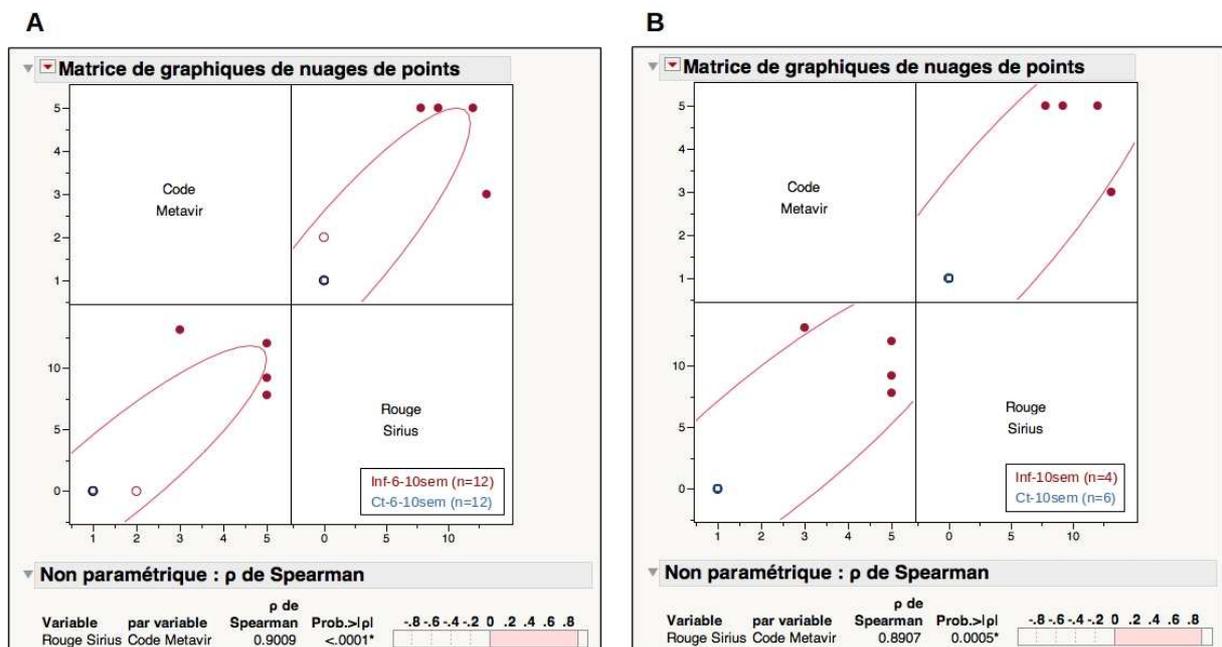


Figure 70 : Corrélation entre le code METAVIR et le pourcentage de surface hépatique marquée au rouge Sirius

Corrélation entre le score METAVIR codé (A0F0  $\leftrightarrow$  1, A1F0  $\leftrightarrow$  2, A1F1  $\leftrightarrow$  3, A2F1  $\leftrightarrow$  4, A2F2  $\leftrightarrow$  5) et la mesure semi quantitative de la surface contenant du collagène coloré par le rouge Sirius chez toutes les souris (n=24) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.

#### 5.2.4. Corrélation entre le nombre de granulomes et le pourcentage de tissu hépatique positif au rouge Sirius

La recherche de corrélations a également été faite sur l'ensemble de la cohorte et en prenant uniquement en compte les groupes contrôles et infectés à 10 semaines.

Sur l'ensemble de la cohorte (n=24), l'analyse de la corrélation entre le nombre de granulomes et le pourcentage d'aire marquée au rouge Sirius a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,90 et une valeur de P inférieure à 0,0001 (Figure 71 A). En prenant en

compte seulement les souris infectées à 10 semaines (n=4) et leurs contrôles (n=6), l'analyse de la corrélation entre le nombre de granulomes et le pourcentage d'aire marquée au rouge Sirius a donné un coefficient rho de Spearman ( $r_S$ ) de 0,86 et une valeur de P égale à 0,001 (Figure 71 B).

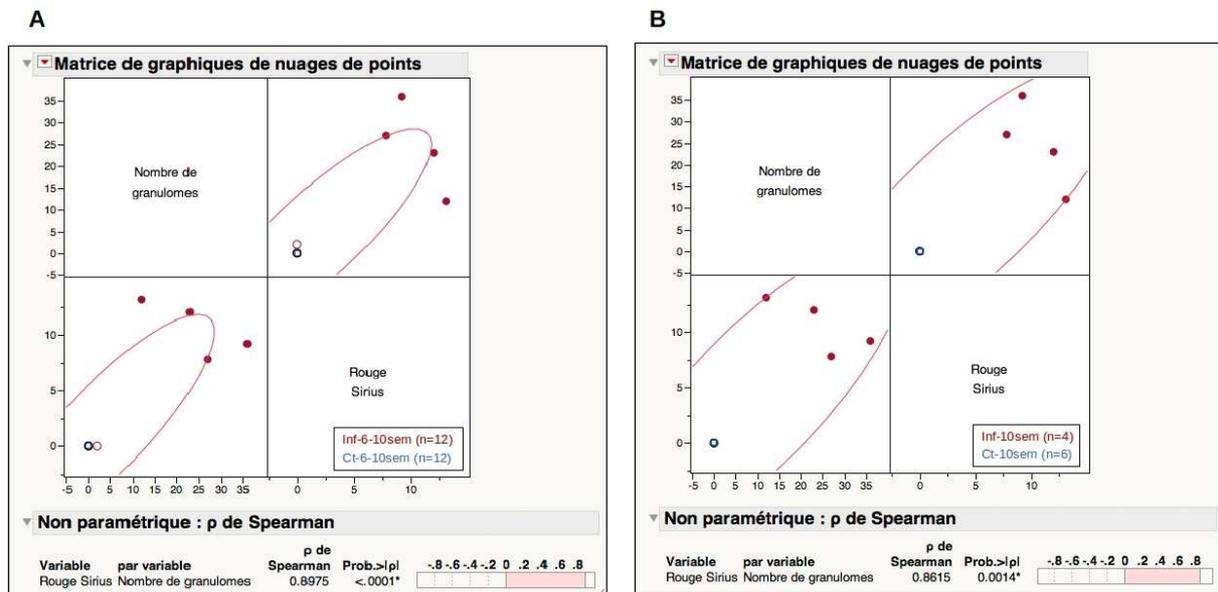


Figure 71 : Corrélation entre le nombre de granulomes et la surface marquée au rouge Sirius

*Corrélation entre le nombre de granulomes et la mesure semi quantitative de la surface hépatique riche en collagène (positive au rouge Sirius) chez toutes les souris (n=24) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.*

## 6. Corrélations entre données de relaxométrie et d'histologie hépatique

Dans cette analyse nous avons généralement utilisé les résultats de toutes les souris (n=24) hormis lorsque le contraire est précisé. Comme les valeurs des contrôles obtenues à 6 et 10 semaines pour le score METAVIR ou en exploitant la coloration rouge Sirius étaient identiques (A0F0, ou 0% de surface respectivement), elles ont été regroupées dans les analyses statistiques. Compte tenu de l'absence de différence significative entre les groupes infectés et contrôles en relaxométrie  $T_2^*$  nous n'avons pas effectué d'analyses de corrélation avec les données histologiques. Nous nous sommes donc focalisés sur les données de relaxométrie  $T_2$ .

## 6.1. Corrélation entre le paramètre T<sub>2</sub> et le nombre de granulomes

Sur l'ensemble de la cohorte (n=24), l'analyse de la corrélation entre le nombre de granulomes et le paramètre T<sub>2</sub> (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de T<sub>2</sub> comprises entre 16 ms et 26 ms) a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,61 et une valeur de P égale à 0,0016 (Figure 72 A). En prenant en compte seulement les souris infectées à 10 semaines (n=4) et leurs contrôles (n=6), l'analyse de la corrélation entre le nombre de granulomes et le paramètre T<sub>2</sub> a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,85 et une valeur de P égale à 0,002 (Figure 72 B).

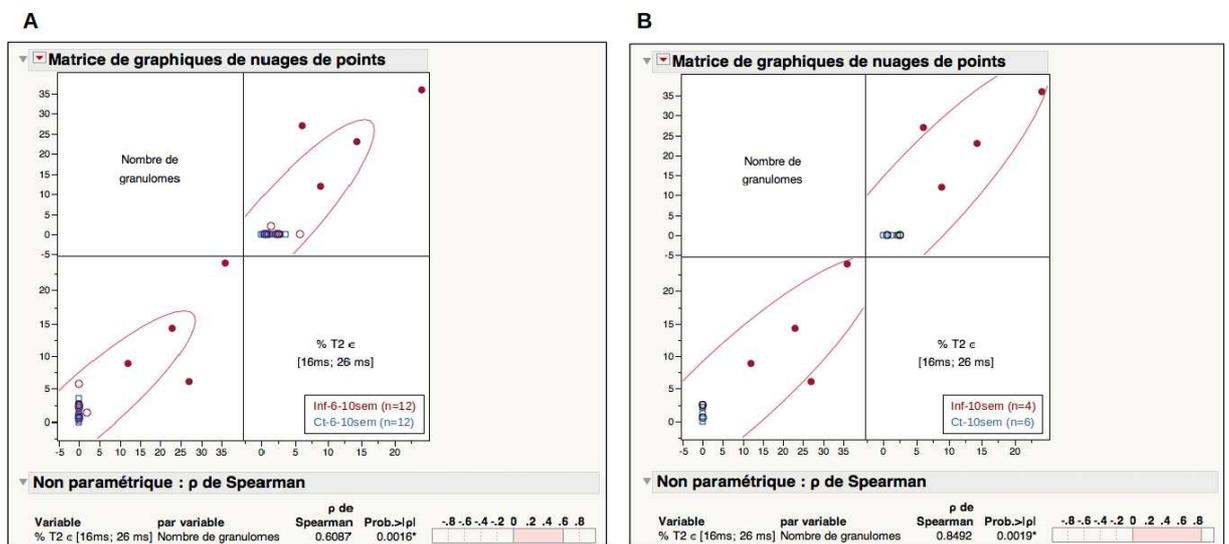


Figure 72 : Corrélation entre le nombre de granulomes et le T<sub>2</sub>

*Corrélation entre le nombre de granulomes et le paramètre T<sub>2</sub> (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de T<sub>2</sub> comprises entre 16 ms et 26 ms) chez toutes les souris (n=24) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.*

## 6.2. Corrélation entre le paramètre T<sub>2</sub> et le score d'inflammation

Sur l'ensemble de la cohorte (n=24), l'analyse de la corrélation entre le score d'inflammation (valeur Ax dans le score METAVIR AxFx) obtenu en histologie et le paramètre T<sub>2</sub> (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de T<sub>2</sub> comprises entre 16 ms et 26 ms) a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,60 et une valeur de P égale à 0,0018 (Figure 73 A). En prenant en compte seulement les souris infectées à 10 semaines (n=4) et leurs contrôles (n=6), l'analyse de la corrélation entre le score d'inflammation Ax et

le paramètre T<sub>2</sub> a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,85 et une valeur de P égale à 0,002 (Figure 73 B).

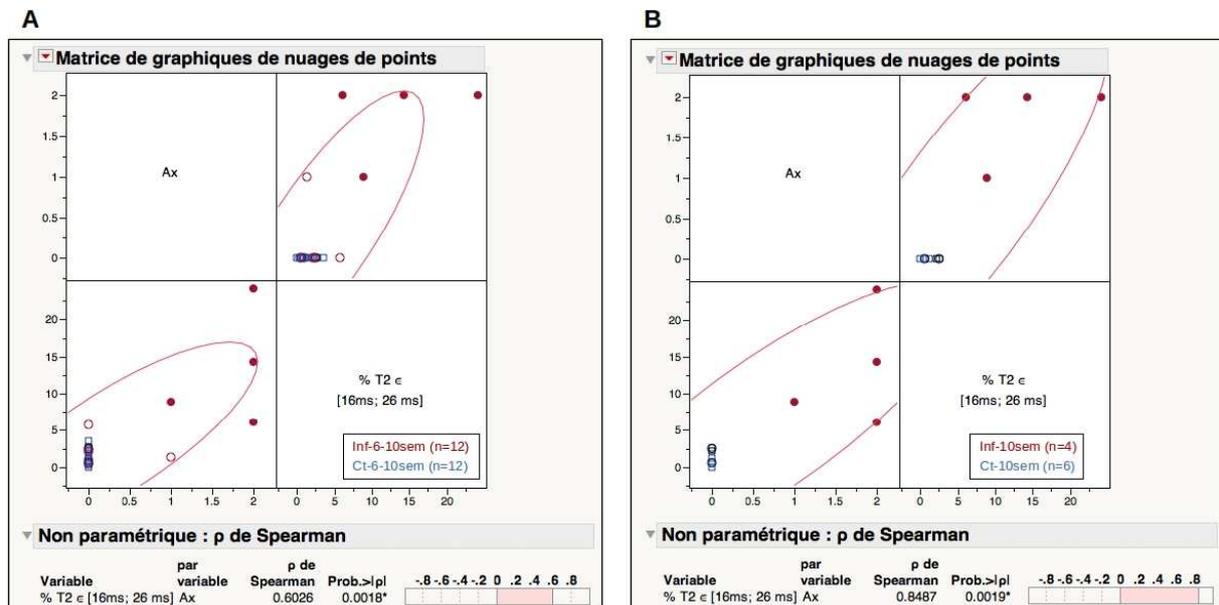


Figure 73 : Analyse de la corrélation entre le score d'inflammation et le T<sub>2</sub>

*Corrélation entre le score d'inflammation (Ax) et le paramètre T<sub>2</sub> (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de T<sub>2</sub> comprises entre 16 ms et 26 ms) chez toutes les souris (n=24) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.*

### 6.3. Corrélation entre le paramètre T<sub>2</sub> et le score de fibrose

Sur l'ensemble de la cohorte (n=24), l'analyse de la corrélation entre le score de fibrose (valeur x de Fx dans le score METAVIR AxFx) obtenu en histologie et le paramètre T<sub>2</sub> (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de T<sub>2</sub> comprises entre 16 ms et 26 ms) a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,65 et une valeur de P égale à 0,0007 (Figure 74 A). En prenant en compte seulement les souris infectées à 10 semaines (n=4) et leurs contrôles (n=6), l'analyse de la corrélation entre le score de fibrose Fx et le paramètre T<sub>2</sub> a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,85 et une valeur de P égale à 0,002 (Figure 74 B).

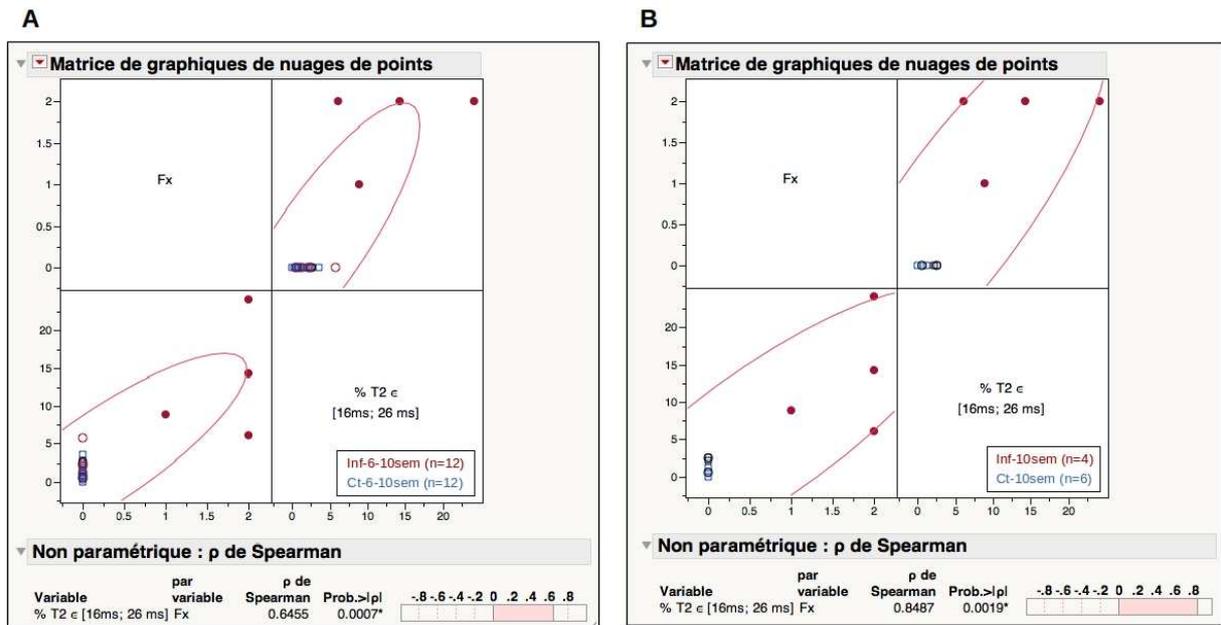


Figure 74 : Analyse de la corrélation entre le score de fibrose et le  $T_2$

Corrélation entre le score de fibrose (Fx) et le paramètre  $T_2$  (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de  $T_2$  comprises entre 16 ms et 26 ms) chez toutes les souris ( $n=24$ ) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.

## 6.4. Corrélation entre le paramètre $T_2$ et le score METAVIR

En prenant le score METAVIR complet, donc les composantes Ax et Fx à la fois, et le paramètre  $T_2$  (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de  $T_2$  comprises entre 16 ms et 26 ms), les valeurs de la corrélation de Spearman étaient de 0,61 pour le Rs avec  $P=0,0016$  sur l'ensemble de la cohorte (Figure 75 A) et  $R_s=0,85$  avec  $P=0,002$  sur les groupes infecté et contrôle à 10 semaines (Figure 75 B).

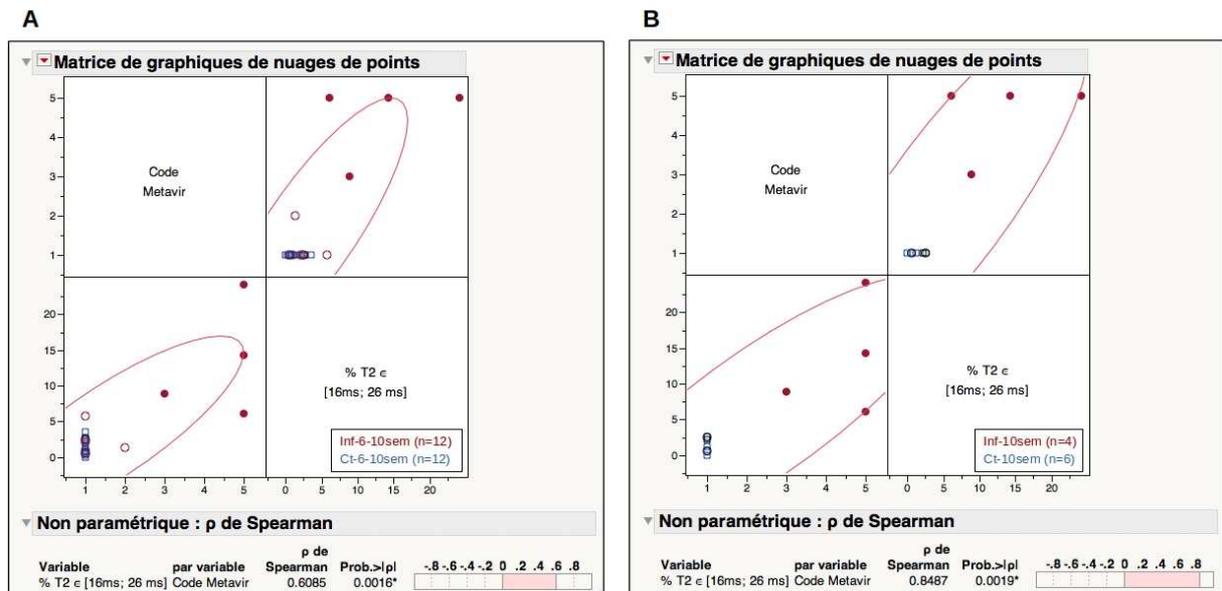


Figure 75 : Analyse de la corrélation entre le score METAVIR et le paramètre T<sub>2</sub>

Corrélation entre le score METAVIR codé (A0F0 ⇔ 1, A1F0 ⇔ 2, A1F1 ⇔ 3, A2F1 ⇔ 4, A2F2 ⇔ 5) et le paramètre T<sub>2</sub> (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de T<sub>2</sub> comprises entre 16 ms et 26 ms) chez toutes les souris (n=24) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.

## 6.5. Corrélation entre le paramètre T<sub>2</sub> et le pourcentage de l'aire marquée au rouge Sirius

Sur l'ensemble de la cohorte (n=24), l'analyse de la corrélation entre le pourcentage de l'aire marquée au rouge Sirius obtenu en histologie et le paramètre T<sub>2</sub> (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de T<sub>2</sub> comprises entre 16 ms et 26 ms) a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,64 et une valeur de P égale à 0,0007 (Figure 76 A). En prenant en compte seulement les souris infectées à 10 semaines (n=4) et leurs contrôles (n=6), l'analyse de la corrélation entre le score de fibrose Fx et le paramètre T<sub>2</sub>a donné un coefficient rho de Spearman (rS) de 0,83 et une valeur de P égale à 0,003 (Figure 76 B).

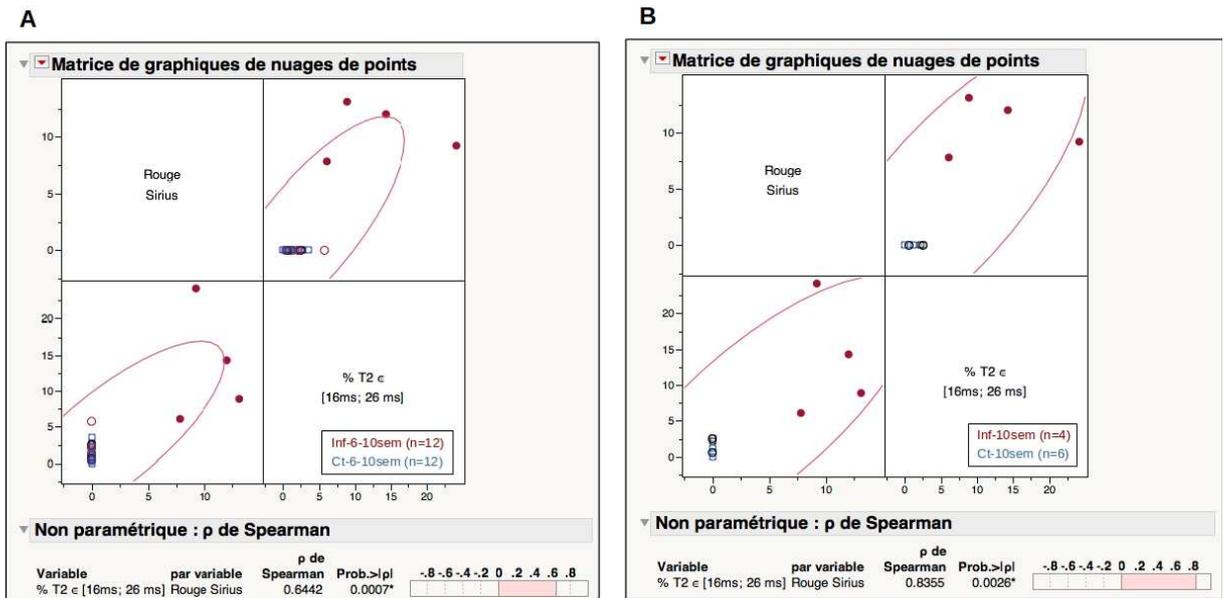


Figure 76 : Corrélation entre la fibrose marquée au rouge Sirius et le signal  $T_2$

*Corrélation entre le pourcentage de l'étendue de la fibrose obtenue en histologie par mesure semi-quantitative du marquage au rouge Sirius et le paramètre  $T_2$  (pourcentage de pixels correspondant à des valeurs de  $T_2$  comprises entre 16 ms et 26 ms) chez toutes les souris ( $n=24$ ) (A) ou seulement les souris infectées et contrôles à 10 semaines (B). Ct=Contrôle, Inf=Infecté, sem=semaines.*

## 7. Synthèse des corrélations

Le paramètre T<sub>2</sub> est corrélé avec toutes les composants du score METAVIR et le marquage au rouge Sirius (Tableau 12) bien qu'il n'est pas spécifique du collagène comme l'ont montré les expériences de RMN sur les solutions de collagène.

Paramètres	% surface marquée au rouge Sirius		% de pixels de T <sub>2</sub> €[16 ; 26] ms	
	Tous les animaux	Groupes 10 semaines post infection	Tous les animaux	Groupes 10 semaines post infection
<b>Ax</b>	<b>Rs=0,89 ; P&lt;0,0001</b>	<b>Rs=0,89 ; P=0,0005</b>	Rs=0,60 ; P=0,0018	<b>Rs=0,85 ; P=0,002</b>
<b>Fx</b>	<b>Rs=0,98 ; P&lt;0,0001</b>	<b>Rs=0,89 ; P=0,0005</b>	<b>Rs=0,65 ; P=0,0007</b>	<b>Rs=0,85 ; P=0,002</b>
<b>METAVIR</b>	<b>Rs=0,90 ; P&lt;0,0001</b>	<b>Rs=0,89 ; P=0,0005</b>	Rs=0,61 ; P=0,0016	<b>Rs=0,85 ; P=0,002</b>
<b>Nombre de Granulomes</b>	<b>Rs=0,90 ; P&lt;0,0001</b>	Rs=0,86 ; P=0,001	Rs=0,61 ; P=0,0016	<b>Rs=0,85 ; P=0,002</b>
<b>% de pixels de T<sub>2</sub>€[16 ; 26] ms</b>	Rs=0,64 ; P=0,0007	<b>Rs=0,83 ; P=0,003</b>		
<b>% surface marquée au rouge Sirius</b>			Rs=0,64 ; P=0,0007	<b>Rs=0,83 ; P=0,003</b>

Tableau 12: Synthèse des corrélations de Spearman de l'étude

*Les corrélations de Rs>0,8 ont été indiquées en rouge et les corrélations les plus fortes de chaque colonne ont été indiquées en gras afin de faciliter la lecture du tableau.*



# DISCUSSION

## 1. Apport des résultats

À notre connaissance, c'est la première fois qu'un modèle murin de la schistosomiase est évalué par IRM quantitative. L'évolution des animaux au cours du suivi longitudinal de 10 semaines par IRM n'a pas nécessité le recours à l'euthanasie, les animaux n'ayant pas atteint de point limite. De plus, la courbe de poids des animaux infectés n'était pas différente de celle des animaux contrôles. Ce résultat indique que les animaux bien que malades, n'étaient pas en état de délabrement. Par ailleurs, les contrôles sanitaires effectués durant l'étude n'ont révélé la présence d'aucun pathogène spécifique ou opportuniste sur les animaux sentinelles (liste FELASA), ce qui signifie que les résultats obtenus sur les animaux atteints de schistosomiase n'étaient entachés d'aucun biais, pouvant résulter d'une contamination accidentelle. Les études histologiques ont confirmé le bon développement de la schistosomiase chez les souris infectées, puisque la présence de parasites adultes et d'œufs a été détectée.

### 1.1. Evaluation de l'organomégalie hépatosplénique du modèle bilharzien

Les séquences d'imagerie anatomique utilisées permettaient une bonne identification des organes d'intérêt avec un bon contraste, et ont permis une segmentation précise du foie, de la rate et de la section de la veine porte. Des IRM anatomiques de foie de souris infectées par *S. mansoni* avaient déjà été publiées, mais aucun suivi au cours du développement de la maladie n'avait été rapporté (104). Les zones d'hyper-intensité sur les coupes anatomiques pondérées en T<sub>1</sub> dénotant un aspect moucheté des foies bilharziens semblaient être en relation avec l'apparition des granulomes hépatiques entre la 6<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine. Les images obtenues dans l'étude précédemment citée avaient été obtenues à partir d'une souris infectée par injection sous-cutanée de 150 cercaires, alors que notre modèle repose sur l'administration percutanée de seulement 30 cercaires afin de se rapprocher de la charge parasitaire infectante chez l'homme. De plus, l'administration percutanée réplique la voie naturelle d'infection, et ces conditions permettent d'obtenir le développement de la complication hépatosplénique. Nous avons montré que l'IRM anatomique avec synchronisation respiratoire permet d'obtenir

des images d'une qualité suffisante pour une segmentation fiable des images en vue de l'analyse volumétrique de l'hépatosplénomégalie bilharzienne.

L'étude volumétrique des foies par IRM a montré une hausse du volume hépatique de souris atteintes de schistosomiase dès 6 semaines après l'infection par les cercaires. Cette hépatomégalie bien connue dans la pathologie humaine est un marqueur important d'évolution de la maladie.

L'analyse volumétrique des rates des animaux a montré une augmentation de la taille de ces organes dans le modèle dès 6 semaines d'infection, accentuée à 10 semaines après l'infection. Cette splénomégalie est également une des conséquences décrites de la bilharziose hépatosplénique qui peut résulter de l'inflammation chronique, ou de l'hypertension portale. Nos résultats anatomiques mettent en lumière les ressemblances du modèle murin avec la maladie humaine, ce qui a parfois été contesté dans certaines études. L'analyse volumétrique démontre donc l'existence d'une hépatosplénomégalie évolutive dans le modèle expérimental, ce qui constitue un point commun important avec la maladie humaine.

## **1.2. Détection de l'inflammation granulomateuse par imagerie anatomique**

L'imagerie anatomique a montré la présence de nombreuses tâches focales punctiformes dans le parenchyme hépatique à 10 semaines après l'infection avec les cercaires. Ces tâches étaient réhaussées par l'injection de Gd-DOTA, ce qui suggère une activité inflammatoire. Ces résultats suggèrent que ces tâches reflètent la présence de granulomes, ce qui a été confirmé à l'histologie.

## **1.3. Détection de signes d'hypertension portale dans le modèle bilharzien par IRM**

Des signes d'hypertension portale à 6 et 10 semaines après l'infection ont été détectés par imagerie anatomique multi-coups avec la séquence RARE. Une aggravation de la maladie hépatosplénique sur le plan hémodynamique a pu être détectée entre 6 et 10 semaines d'infection. Il a en effet été possible de mesurer une augmentation du diamètre maximum de la section de la veine porte ainsi que de l'aire de cette section. Nous avons aussi pu observer de manière épisodique chez des animaux infectés depuis au moins 10 semaines d'autres manifestations de l'hypertension portale en observant plus en amont, au niveau de la veine

splénique, un gros diamètre des vaisseaux indiquant une dilatation causée par une hypertension importante. A ce stade, la présence de varices dans le modèle s'avère fort probable. Des techniques de veinographie par IRM auraient été nécessaires pour vérifier ce point.

Il est peu probable que les signes observés à 6 semaines soient la conséquence d'une fibrose hépatique indétectable 6 semaines après l'infection, mais plutôt d'une atteinte vasculaire et d'une obstruction causée par les œufs des schistosomes (25, 105). En effet, le temps du suivi à 6 semaines coïncide chez *S. mansoni* avec la maturation sexuelle des vers, le début de la ponte des œufs, et donc le début de l'inflammation granulomateuse. En revanche, les résultats obtenus à 10 semaines sont probablement liés au développement de la fibrose hépatique. Il faut noter, que nous avons pu observer dans notre étude pilote (infection à 150 cercaires) avec la séquence RARE un liquide évocateur d'une ascite, qui est décrit dans les stades avancés de schistosomiase hépatosplénique humaine comme complication de l'hypertension portale sévère.

## 1.4. Evaluation de la fibrose hépatique bilharzienne par IRM quantitative de relaxométrie

### Cartographie du T<sub>2</sub>

L'analyse des données de cartographies T<sub>2</sub> a montré une variation significative des valeurs de T<sub>2</sub> dans les ROIs analysés à 10 semaines d'infection. En accord avec d'autres études *in vivo* par IRM sur des modèles animaux de fibrose hépatique (80, 81) et chez l'homme (106), nous avons observé 10 semaines après l'infection par les cercaires une variation du paramètre T<sub>2</sub> dans les foies malades par rapport au tissu hépatique normal. Nous avons pu montrer une augmentation des valeurs de T<sub>2</sub>, notamment du pourcentage de pixels ayant des valeurs du T<sub>2</sub> comprises entre 16 et 26 ms. Cette augmentation du T<sub>2</sub> était concomitante du dépôt de collagène dans le tissu hépatique détecté à l'histologie (marquage au rouge Sirius) et de l'augmentation du score METAVIR correspondant à des stades de fibrose. Par ailleurs, les pixels à haute valeur de T<sub>2</sub> étaient co-localisés avec les hyperintensités observées en imagerie anatomique pondérée en T<sub>1</sub>, zones à haut potentiel de présence de fibrose autour des œufs dans les granulomes. Cette mesure quantitative du paramètre T<sub>2</sub> pourrait donc être un marqueur de la gravité de la maladie.

### Cartographie du T<sub>2</sub>\*

La cartographie du  $T_2^*$  a montré une diminution du  $T_2^*$  ce qui pourrait traduire la présence d'un agent paramagnétique tel que le fer. En effet, il est connu que les complexes du fer entraînent un déphasage plus rapide de l'aimantation transverse ce qui a pour effet de raccourcir les temps de relaxation  $T_2$  et  $T_2^*$ . L'accumulation de fer a été détectée 10 semaines après l'infection en histologie (marquage au colorant Perls), et par IRM grâce à la variation de  $T_2^*$ . La coloration de Perls positive 10 semaines après infection est très suggestive de la présence d'hématine, un produit de dégradation de l'hémoglobine excrété par le ver ressemblant au pigment hémozoïque de la malaria (103). Dans notre étude, la présence de dépôt de fer n'a pas entraîné de diminution remarquable du  $T_2$ . On peut supposer que le développement de la fibrose a un effet inverse et plus intense sur ce paramètre que l'accumulation de dépôts de fer.

Les résultats histologiques obtenus dans ce modèle sont en accord avec les caractéristiques connues de la maladie humaine : ils confirment le dépôt de collagène et le développement d'une fibrose hépatique, ainsi que la présence de dépôts de fer dans le parenchyme. L'ensemble de ces résultats conforte la pertinence de ce modèle pour l'étude de la schistosomiase digestive. On observe une excellente corrélation entre les résultats du score METAVIR et l'analyse de la fibrose par la détection du collagène avec la coloration au rouge Sirius.

Nous avons pu observer une corrélation statistiquement significative entre les pourcentages de pixels hépatiques supposés révéler la fibrose ( $16 \text{ ms} < T_2 < 26 \text{ ms}$ ) et le nombre de granulomes centrés sur les œufs des parasites observés en histologie. Le test de corrélation avec le score METAVIR nous conforte également dans le fait que le paramètre  $T_2$  est révélateur de la fibrose dans le foie compte tenu d'une meilleure corrélation du pourcentage de pixel  $16 \text{ ms} < T_2 < 26 \text{ ms}$  avec  $F_x$  que  $A_x$  qui représente l'inflammation. Ces résultats nous permettent de valider cette mesure comme un nouveau marqueur de l'hépatopathie bilharzienne et fort probablement de la fibrose hépatique dans cette infection.

Bien que l'augmentation du  $T_2$  puisse être liée à l'inflammation et à l'œdème, on remarque cependant que les valeurs de  $T_2$  hépatiques ne sont pas encore augmentées à 6 semaines après l'infection ( $10,4 \pm 2,4$  chez les souris infectées contre  $10,7 \pm 2,5$  ms chez les témoins), alors que cette période coïncide avec le début de la ponte par les vers adultes et le début de l'inflammation granulomateuse (réponse Th1 et Th2) les œufs étant pondus entre la 4<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine (1). L'histologie révèle une réaction inflammatoire portale légère (A0-A1) à ce stade de la maladie sans aucun signe de fibrose.

Contrairement aux travaux antérieurs évaluant l'altération de la valeur moyenne de  $T_2$  en présence de fibrose hépatique (79-81), nous avons analysé la distribution des valeurs de  $T_2$  en fonction du nombre de pixels, et montré que les valeurs anormalement élevées étaient associées sur les cartes  $T_2$  du tissu hépatique à la présence des granulomes. Ce type d'analyse n'avait pas été réalisée dans des études antérieures, malgré une distribution non uniforme de la fibrose dans la plupart des cas. Notre approche tente de corrélérer les paramètres d'IRM quantitatifs à la fraction de surface de la fibrose observée en histologie. Nos résultats démontrent que malgré le manque de spécificité du temps de relaxation  $T_2$ , la fraction de surface de  $T_2$  augmentée dans le foie est significativement corrélée avec la fraction de surface affectée par la fibrose. La fraction de surface de  $T_2$  augmentée nous a permis de différencier les stades de fibrose précoce et intermédiaire (c'est-à-dire les stades inférieurs ou égaux à F2).

D'un point de vue technique, le protocole IRM multiparamétrique utilisé dans cette étude était suffisamment sensible pour surveiller la sévérité de la maladie et identifier l'échec de l'infection chez deux des 6 souris. En particulier, la corrélation avec la fraction surfacique du collagène colorée au rouge Sirius sur les coupes histologiques de foies montre que le temps de relaxation transverse  $T_2$  pourrait être utilisé comme biomarqueur quantitatif non invasif de la fibrose hépatique dans le cadre de ce modèle.

Peu de techniques sont sensibles aux stades précoces potentiellement réversibles de la fibrose hépatique. Toutes les approches d'imagerie existantes reposent sur la mesure de paramètres indirects de la fibrose hépatique (rigidité tissulaire, diffusion restreinte de l'eau). De même, les constantes de temps de relaxation dépendent des propriétés physicochimiques qui sont altérées pendant la fibrogénèse. Dans des études *ex vivo*, la corrélation entre les temps de relaxation transverse et la fibrose a été controversée. Par exemple, à 11,75T, une diminution de  $T_2$  a été observée dans un modèle souris de fibrose hépatique induite par la 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (82). Mais une autre étude rapporte qu'à 9,4T, une corrélation positive entre le  $T_2$  du foie et le degré de fibrose a été observée dans un modèle de cirrhose du foie induit par le thioacétamide (79). On sait que le  $T_2$  est un paramètre plutôt non spécifique, influencé par l'inflammation (79, 107), l'œdème, les changements de perfusion ou la stéatose (108). En effet, l'eau libre est caractérisée par un  $T_2$  long (des centaines de ms) alors que les lipides ont des  $T_2$  beaucoup plus faibles (des dizaines de ms). Dans la grande majorité des cas, la fibrose hépatique sévère de la schistosomiase humaine n'est pas associée à une stéatose détectable par échographie (pattern Y de la classification de Niamey), à savoir l'accumulation de triglycérides dans les hépatocytes, sauf chez les patients souffrant d'obésité ou de diabète. La plupart des sujets atteints d'une maladie grave souffrent plutôt d'insuffisance

pondérale. Bien que les lipides aient un temps de relaxation  $T_2$  très court (entre 20 et 40 ms, la valeur dépendant du champ magnétique) une accumulation pourrait conduire en théorie à une augmentation du  $T_2$  global (109). Mais le profil métabolique du foie par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire protonique a révélé des niveaux réduits de lipides chez les souris infectées par *S. mansoni* (110). En accord avec les résultats précédents (111), nos expériences *in vitro* montrent que le collagène à des concentrations allant jusqu'à 12,5 g/l ne modifie pas significativement les temps de relaxation. La gamme des concentrations de collagène testées dans nos études de fantômes correspond à celles mesurées par des techniques biochimiques dans des extraits de foie entier de souris infectées par *S. mansoni* à 8 semaines après infection par 50 cercaires (souris infectées par *S. mansoni*:  $10,3 \pm 1,60$  mg / g de foie humide, souris témoins:  $0,591 \pm 1,144$  mg / g de foie humide) (112). Il apparaît donc que la variation du  $T_2$  ne serait pas directement liée au collagène, mais à une autre composante de la fibrose. En effet, le dépôt de collagène (figure 4D) dans la matrice extracellulaire s'accompagne de dépôts d'autres molécules (hyaluronanes, protéoglycanes, fibronectine, laminine, etc.), de dérégulations du remodelage de la matrice extracellulaire par les MMP et les TIMP. Par ailleurs, l'activation des cellules hépatiques étoilées en myofibroblastes se traduit par la perte des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques stockant la vitamine A (113-115). Nous faisons l'hypothèse que l'ensemble de ces processus a un effet mesurable sur les temps de relaxation (54). Nous ne pouvons pas rejeter la possibilité que d'autres composants de la matrice extracellulaire, qui s'accumulent au cours de la fibrogénèse (fibronectine, élastine, protéoglycane, hyaluronane, etc.) puissent contribuer aux changements de  $T_2$ , même si ces protéines présentent généralement un  $T_2$  court du même ordre de grandeur que les lipides. Notre hypothèse est que le paramètre  $T_2$  est sensible à la réduction du contenu lipidique des cellules étoilées lors de leur activation (ces cellules stockent jusqu'à 80% des réserves en vitamine A du corps). Cette hypothèse pourrait être corroborée par le fait que les patients atteints de fibrose hépatique présentent souvent un déficit en vitamine A (114), et par la diminution de la teneur en lipides hépatiques observée dans le foie des souris infectées par *S. mansoni* (110).

Pour la surveillance de la maladie et l'évaluation du traitement chez le modèle animal, la cartographie du  $T_2$  est facile à mettre en œuvre et moins difficile que l'élastographie transitoire ou l'ERM. En effet, cette technique ne nécessite pas l'utilisation d'équipements supplémentaires tels que des vibrateurs et les séquences de relaxométrie sont facilement disponibles sur les systèmes d'IRM précliniques standards. Cette relative accessibilité à l'outil est donc un atout pour la méthode que nous avons développée pour le suivi du modèle murin

de schistosomiase.

La relaxométrie par résonance magnétique a l'avantage d'être quantitative sans aucune injection d'agent de contraste qui pourrait interférer avec les paramètres biologiques et modifier le développement de la maladie bien qu'aucune étude n'ait prouvé cela à notre connaissance. Cependant, l'administration d'un agent de contraste extracellulaire non spécifique disponible dans le commerce tel que le Gd-DOTA a amélioré la détection des lésions, démontrant une perméabilité accrue des vaisseaux. Les cartes quantitatives  $T_2$  et  $T_2^*$  effectuées dans cette étude permettent d'optimiser davantage les paramètres de pondération d'images anatomiques pour de futures études sur la schistosomiase.

La cartographie  $T_2$  est un marqueur quantitatif et non invasif de la fibrose hépatique non stéatosique avec une sensibilité proche de celle de l'histologie même au stade précoce. Cette approche IRM multiparamétrique et quantitative permet de suivre la progression de la maladie hépatique et splénique et d'évaluer la fibrose hépatique de manière non invasive. Dans les études précliniques et dans les milieux où des installations d'IRM sont facilement disponibles, ce biomarqueur pourrait être utilisé pour suivre la réponse au traitement dans les maladies impliquant une fibrose hépatique.

C'est la première fois qu'une étude tente de suivre *in vivo* la fibrose hépatique dans un modèle d'infection à *S. mansoni* à l'aide d'un biomarqueur d'imagerie par résonance magnétique. Nos résultats confortent l'intérêt de l'approche IRM pour étudier la pathologie hépatosplénique et suggère que d'autres méthodes de RMN pourraient également être employées dans ce but comme l'imagerie de diffusion pour des analyses complémentaires de la microstructure du parenchyme hépatique, l'imagerie de susceptibilité magnétique pour la détection des dépôts de fer, et la spectroscopie de résonance magnétique (SRM) pour le suivi des lipides hépatiques.

## 2. Limites de l'étude

### 2.1. Nombre d'animaux, groupes, temps d'infection et modèle retenu

Une limite majeure de notre étude est le faible nombre d'animaux infectés pendant 10 semaines en raison de l'échec d'une infection chez deux des 6 animaux soit plus de 33% des

effectifs initialement prévus ce qui réduit la puissance statistique de l'analyse. Ce résultat montre une part d'échec non négligeable de la méthode per-cutanée, qui doit être prise en compte pour le calcul de la taille des effectifs.

Il serait utile de pouvoir vérifier de façon précoce que l'infection a bien fonctionné. Des vérifications parasitologiques (comptage des œufs dans les selles, PCR ou test ELISA) pourraient être envisagées. Une alternative serait de procéder à une infection intrapéritonéale. Cette technique permettrait d'infecter les souris avec moins de cercaires. Il serait également intéressant de réduire encore la charge parasitaire au moment de l'infection, afin de se rapprocher encore plus des conditions de l'infection humaine, en injectant seulement deux couples d'adultes matures comme cela nous a été suggéré (116), en vérifiant les sexes des parasites utilisés afin d'être certain d'avoir une reproduction sexuée dans l'hôte. La difficulté expérimentale étant très importante, nous ne pensons pas qu'un tel modèle doit être utilisé dans une phase de développement méthodologique comme celle dans laquelle s'est inscrit ce travail, mais plus en aval lorsque les protocoles d'imagerie sont validés par des méthodes complémentaires et que l'on souhaite étudier des aspects spécifiques de la maladie.

Une autre limite concerne la durée du suivi qui a été restreint à 10 semaines. Des temps plus tardifs permettraient d'obtenir des stades plus avancés de la maladie et de suivre la variation des paramètres  $T_2$  et  $T_2^*$  avec la sévérité de la fibrose, des marquages au rouge Sirius, et du score METAVIR. Selon Lambertucci *et al* dans leur commentaire de nos travaux (116) nous aurions caractérisé uniquement la phase aiguë de la maladie dans le modèle. Toutefois, Lambertucci *et al* estiment que la phase aiguë s'étendrait de 6 à 9 semaines post infection. Or, nos données histologiques indiquent par la présence des granulomes mais aussi de la fibrose, que les animaux souffraient d'une schistosomiase hépatosplénique bien que la fibrose de type Simmer's pipe autour des branches de la veine porte n'était pas certaine.

Selon Lambertucci *et al*, une autre méthode d'infection consisterait à utiliser un couple de cercaires et attendre au-delà de 16 à 20 semaines pour explorer les souris infectées (117, 118). L'objectif de notre travail était de vérifier la pertinence des marqueurs IRM sur un modèle produisant rapidement une fibrose intense.

Il serait intéressant d'étudier le modèle murin de schistosomiase après traitement au praziquantel. Ainsi, il serait possible d'arrêter la ponte continue d'œufs, et d'enrayer l'inflammation chronique. Seule la cicatrice fibrosée serait présente après un certain temps, ce qui permettrait d'étudier les caractéristiques relaxométriques de la fibrose en l'absence de la composante inflammatoire.

Cette étude exploratoire sur un petit nombre d'animaux visait à développer une

approche IRM non invasive pour l'évaluation de la progression de la schistosomiase digestive et de la fibrose hépatique qu'elle induit. Une limitation de cette étude est que différents groupes d'animaux ont été utilisés aux deux derniers temps d'imagerie (à 6 et 10 semaines après infection), en raison du fait qu'une validation par histologie était obligatoire à ces deux temps, un seul groupe d'animaux ne pouvait donc pas être utilisé de 2 à 10 semaines après l'infection. L'utilisation du modèle murin avec des animaux de souche identique diminue cette limite de l'étude car toutes nos souris ont été infectées au même moment (cercaires provenant du même cycle) et qu'elles ont un fond génétique commun.

## 2.2. Précision des paramètres utilisés pour l'imagerie anatomique

L'imagerie anatomique employée pour la détection de l'organomégalie et de l'inflammation granulomateuse n'était pas adaptée à l'étude des vaisseaux de petits diamètres et à la détection des varices systémiques. Il serait intéressant de réaliser dans ce modèle une veinographie par IRM comme cela a déjà été décrit chez le rongeur au niveau cérébral.

## 2.3. Cartographie T<sub>2</sub> et histologie du foie non exhaustives de l'organe

Nous n'avons pas étudié le foie dans sa totalité car une seule coupe de relaxométrie T<sub>2</sub> ou T<sub>2</sub>\* était utilisée. Même si nous avons cherché à explorer une région hépatique la plus vaste possible celle-ci ne représente pas l'hétérogénéité de la fibrose dans l'organe entier. Généralement chez l'homme c'est plutôt le foie gauche qui est touché avant le droit, chez la souris les lobes pourraient être différemment touchés et donc un marquage sur le volume global ou bien plusieurs coupes serait à étudier dans un prochain protocole.

## 2.4. Adaptation de méthodes histologiques non spécifiques de la bilharziose

Il est à noter que l'échelle METAVIR que nous avons utilisée dans cette étude n'avait pas été évaluée dans cette maladie parasitaire avant notre travail.

Une critique qui a été faite sur notre travail, dans le commentaire de Lambertucci *et al* paru dans la revue *Trends in Parasitology* est que le score METAVIR utilisé dans notre étude, a été originellement développé pour l'hépatite virale et non la schistosomiase hépatosplénique

(116). Cette méthode, parmi les plus utilisées au monde pour le diagnostic histologique de la fibrose hépatique, semblait transférable à la bilharziose. Nous avons montré que les résultats obtenus par cette méthode divergeaient peu de ceux obtenus par le marquage au rouge Sirius. Ces résultats ont été obtenus sur un petit nombre d'animaux, mais nous avons pu confirmer l'intérêt du score METAVIR pour l'évaluation de la fibrose dans la schistosomiase sur un groupe de 9 (autres) souris atteintes de schistosomiase (résultats concernant une partie confidentielle de la thèse).

Les limites actuelles de nos travaux que nous venons d'évoquer ouvrent plusieurs pistes pour la poursuite de la caractérisation de la maladie hépatosplénique et de la fibrose associée, par des techniques d'IRM quantitative. Les nouvelles informations qui pourraient être apportées par ces études sont susceptibles d'améliorer notre compréhension de la physiopathologie de la bilharziose, mais aussi de fournir un modèle expérimental mieux caractérisé pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## **3. Perspectives**

### **3.1. Poursuite de travaux avec la méthodologie développée**

Ce travail essentiellement méthodologique devra être répété afin de confirmer nos résultats sur un nombre plus important d'animaux à des stades plus avancés de la maladie. Nous avons choisi d'explorer les animaux à 6 et 10 semaines après l'infection par les cercaires, car ceux-ci coïncidaient avec l'apparition de l'inflammation granulomateuse suite à la ponte des œufs pour le temps de 6 semaines, et à l'apparition de la fibrose après destruction des premiers œufs à 10 semaines. Une étude à 8 semaines, 12 et 16 semaines post infection permettrait d'améliorer le suivi temporel et quantitatif par l'étude de stades de fibrose plus avancés. Il serait intéressant de valider ces résultats sur différents fonds génétiques de souris et sur une autre souche de schistosome induisant également une schistosomiase hépatosplénique.

Une étude des atteintes vasculaires avec des méthodes IRM dédiées pourraient également contribuer à mieux caractériser l'hypertension portale dans le modèle murin de schistosomiase hépatosplénique. Des séquences angiographiques, veinographiques avec ou sans injection d'agent de contraste, mais également de perfusion seraient intéressantes afin d'étudier les varices, l'impact de l'HTP, les mécanismes de compensation sur le système

vasculaire hépatique, la perfusion du foie, mais aussi la néoangiogénèse qui se développerait dans cette maladie.

Des études par spectroscopie du proton permettraient de mieux caractériser les altérations métaboliques liées au développement de la schistosomiase, et de vérifier la diminution du contenu lipidique du foie, qu'il s'agisse de triglycérides ou des formes de stockage de la vitamine A dans les cellules étoilées qui disparaissent lors de la transdifférenciation des cellules étoilées en myofibroblastes activés au début de de la fibrogénèse.

Concernant la caractérisation de la fibrose par relaxométrie, il est important de pouvoir s'affranchir de la composante inflammatoire, afin de ne s'intéresser qu'au tissu surchargé de matrice extracellulaire. Dans ce but, un traitement au praziquantel institué après la fin de l'inflammation granulomateuse, permettrait de tuer les vers, d'arrêter la production continue d'œufs, et donc d'arrêter le cycle de l'inflammation granulomateuse chronique. Ainsi, il serait possible de caractériser la signature relaxométrique de la cicatrice fibrosants seule.

Les résultats de notre travail permettent d'envisager des études *in vivo* sur l'effet au cours du temps de nouvelles molécules contre la Bilharziose hépatosplénique. En effet, la recherche de nouveaux traitements anti-parasitaires pourrait impliquer une étude de la régression de la maladie hépatosplénique et de la fibrose associée. Une autre application majeure réside bien entendu dans l'évaluation des traitements anti-fibrosants, qui font l'objet d'importantes recherches. Les stratégies actuelles concernent notamment la modulation de l'inflammation chronique, le ciblage des cellules étoilées impliquées dans la production de la matrice extracellulaire, ou de la machinerie enzymatique régulant la production de la matrice extracellulaire, en particulier les métalloprotéases de la matrice (MMPs) et les inhibiteurs tissulaires de la matrice (TIMPs) (29, 33, 34, 119, 120).

Par exemple, des essais avec des interleukines comme l'IL22 qui pourrait jouer un rôle protecteur contre la fibrose (121), ou bien des antibiotiques et des probiotiques pour étudier le potentiel rôle du microbiote intestinal sur la fibrose bilharzienne lors de la création de brèches par les œufs au travers de la paroi intestinale (donnant un accès au lipo-polysaccharide et divers autres composants bactériens qui peuvent activer la voie de la fibrose), ou encore des combinaisons de traitements prometteuses comme par exemple le Sorafenib couplé au praziquantel (122) pourraient être suivis avec notre approche.

### 3.2. Combiner les approches IRM avec des méthodes élastométriques

Nous avons constaté qu'aucune étude d'élastométrie n'avait été publiée dans le modèle murin de bilharziose digestive à ce jour. Or, il existe des modules permettant d'effectuer ces mesures ainsi qu'une modalité de cartographie associée à l'échographie utilisable en recherche pré-clinique. Cet appareil de nouvelle génération (Aixplorer, SupersonicImagine, France), pourrait être testé dans le cadre du modèle murin de schistosomiase hépatosplénique mais également chez l'Homme car différentes zones du foie pourraient être étudiées à l'inverse de ce qui est fait avec le Fibroscan qui ne permet pas autant de précision dans la région anatomique ciblée ni d'explorer un grand volume. L'élastométrie couplée à l'IRM serait une piste potentielle d'étude de la fibrose du foie dans cette infection.

### 3.3. Transfert du marqueur relaxométrique de fibrose à l'Homme

La caractérisation par les méthodes IRM du modèle murin s'inscrit aussi dans une optique translationnelle, du modèle animal jusqu'à l'homme, car elle est susceptible de fournir des marqueurs de fibrose pour la recherche clinique sur la schistosomiase. Les équipements IRM sont rarement disponibles dans les zones les plus pauvres, mais seraient utilisables dans des plus développés comme le Brésil.

# CONCLUSION

Notre travail est précurseur dans le domaine de l'imagerie du modèle murin de schistosomiase hépatosplénique par l'infection à *S. mansoni*. A ce jour, il n'y a pas eu d'autre étude ayant investigué les manifestations hépatospléniques de la maladie (organomégalie, fibrose, dilatation de la veine porte) par IRM anatomique avec analyse volumétrique et organométrique, ou ayant développé une approche relaxométrique en vue d'une analyse semi-quantitative de la fibrose.

Nos résultats confirment la pertinence du modèle expérimental avec infection percutanée par un nombre réduit de cercaires dans l'étude de la schistosomiase hépatosplénique. Ils attestent du développement d'une maladie hépatosplénique avec fibrose et hypertension portale, comme dans la maladie humaine. Ils démontrent pour la première fois que le score METAVIR pour l'évaluation histologique de la fibrose, initialement développé pour l'hépatite, est transférable à l'étude de la schistosomiase hépatosplénique.

Nos résultats démontrent l'intérêt de l'IRM *in vivo* (IRM anatomique et relaxométrique) pour le suivi de l'évolution de la maladie et tout particulièrement du temps de relaxation  $T_2$  comme marqueur de la fibrose dans cette maladie infectieuse. Nous avons montré l'hétérogénéité de la fibrose hépatique par l'analyse de la distribution des valeurs de  $T_2$ , et mis en évidence une augmentation des valeurs de  $T_2$  comprises entre 16 ms et 26 ms dans le parenchyme hépatique fibrosé. Notre hypothèse est que la variation du  $T_2$  dans le foie reflète la perte des réserves en esters de rétinyl et en triglycérides des cellules étoilées du foie, au moment de leur transdifférenciation en myofibroblastes au début du processus fibrogénique. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer définitivement cette hypothèse.

Nos résultats suggèrent que les méthodes d'imagerie *in vivo* utilisées dans cette étude préclinique pour le suivi de la schistosomiase hépatosplénique, de la phase initiale (inflammation granulomateuse) jusqu'à un stade avancé avec hypertension portale, pourraient être transférées en recherche pharmacologique et en clinique pour le suivi longitudinal de la schistosomiase digestive. Le temps de relaxation  $T_2$  apparaît comme un marqueur pertinent de la fibrose hépatique dans la schistosomiase, et pourrait être utilisé dans l'évaluation pré-clinique de traitements anti parasitaires et anti-fibrosants



# PUBLICATIONS

Au cours de mon doctorat nous avons pu présenter nos travaux auprès de la communauté scientifique en diverses occasions.

Nous avons publié un article dans le journal *Plos Neglected Tropical Disease* en nous appuyant sur les résultats contenus dans ce manuscrit ainsi que deux résumés de présentation à des congrès : un poster à la Société Française de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (SFRMBM) et une présentation orale à l'International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) en 2015, respectivement aux congrès de Grenoble et de Toronto.

Ce travail nous a valu un commentaire (« Spot Light ») publié dans *Cell Trends in Parasitology* par Lambertucci *et al.* Malgré les limites qu'a pu présenter notre étude, cette critique littéraire rédigée par un spécialiste de l'OMS de la Bilharziose a mis en avant notre travail et encourage les recherches allant dans notre sens.

Nous avons finalement aussi rédigé une revue de littérature qui sera soumise prochainement pour publication. Afin de faire une mise au point de l'état de l'art, nous avons étudié les dernières découvertes, les challenges et les perspectives que propose l'imagerie médicale clinique et préclinique dans la schistosomiase hepato-splénique. Cet article en cours de finalisation regroupera des informations que nous aurions aimé trouver lors de nos recherches bibliographiques initiales et nous espérons qu'il sera utile à d'autres chercheurs des communautés de parasitologues et d'imagerie médicale.

L'ensemble de ces documents est disponible en annexes à la fin du manuscrit.



# BIBLIOGRAPHIE

1. Weerakoon KG, Gobert GN, Cai P, McManus DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis 10.1128/CMR.00137-14. Clin Microbiol Rev 2015;28(4):939-67.
2. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2013. Wkly Epidemiol Rec 2015;90(5):25-32.
3. King CH. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis S0001-706X(09)00371-4 [pii] 10.1016/j.actatropica.2009.11.012. Acta Trop 2010;113(2):95-104.
4. Hotez PJ, Fenwick A. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade 10.1371/journal.pntd.0000485. PLoS Negl Trop Dis 2009;3(9):e485.
5. King CH, Dangerfield-Cha M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis 10.1177/1742395307084407. Chronic Illn 2008;4(1):65-79.
6. Lingscheid T, Kurth F, Clerinx J, et al. Schistosomiasis in European Travelers and Migrants: Analysis of 14 Years TropNet Surveillance Data 10.4269/ajtmh.17-0034. Am J Trop Med Hyg 2017;97(2):567-74.
7. Beaussac M. La bilharziose, problème de santé publique sous-évalué chez les militaires français ? In: Santi VPD, ed.: Médecine et armées; April 2018:45-52.
8. Boissier J, Moné H, Mitta G, Bargues MD, Molyneux D, Mas-Coma S. Schistosomiasis reaches Europe 10.1016/S1473-3099(15)00084-5. Lancet Infect Dis 2015;15(7):757-8.
9. Ramalli L, Mulero S, Noël H, et al. Persistence of schistosomal transmission linked to the Cavu river in southern Corsica since 2013 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.4.18-00017. Euro Surveill 2018;23(4).
10. Macpherson C.N.L. CPS. Animal reservoirs of schistosomiasis [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3054-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3054-7_8). In: Springer, Dordrecht ed; 1991.
11. Coelho P, Caldeira RL. Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil 10.1186/s40249-016-0153-6. Infect Dis Poverty 2016;5(1):57.
12. Barbosa FS, Olivier L. Studies on the snail vectors of bilharziasis mansoni in North-eastern Brazil. Bull World Health Organ 1958;18(5-6):895-908.
13. Modena CM, dos Santos Lima W, Coelho PM. Wild and domesticated animals as reservoirs of Schistosomiasis mansoni in Brazil 10.1016/j.actatropica.2008.07.004. Acta Trop 2008;108(2-3):242-4.
14. Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis 10.1016/S0140-6736(13)61949-2. Lancet 2014;383(9936):2253-64.
15. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis 10.1016/S0140-6736(06)69440-3. Lancet 2006;368(9541):1106-18.
16. Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC, et al. Schistosomiasis 10.1056/NEJMra012396. N Engl J Med 2002;346(16):1212-20.
17. Leclercq A. Histophysiology du foie [http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1976\(18\)54296-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1155-1976(18)54296-0). In: Sempoux C, ed.; 2018.

18. Ozougwu JC. Physiology of the liver. In: International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences; 2017.
19. Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome 10.1016/s1473-3099(07)70053-1. *Lancet Infect Dis* 2007;7(3):218-24.
20. Lambertucci JR. Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014;47(2):130-6.
21. Delvoux M. Bilharzioses [http://dx.doi.org/10.1016/S1166-8598\(15\)54698-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1166-8598(15)54698-X). In. EMC ed; 2015.
22. Boros DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(3):250-69.
23. Manzella A, Ohtomo K, Monzawa S, Lim JH. Schistosomiasis of the liver 10.1007/s00261-007-9329-7. *Abdom Imaging* 2008;33(2):144-50.
24. Olveda DU, Olveda RM, McManus DP, et al. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis 10.1016/j.ijid.2014.07.009. *Int J Infect Dis* 2014;28:193-203.
25. Andrade ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis 10.1111/j.1365-3024.2009.01157.x. *Parasite Immunol* 2009;31(11):656-63.
26. Dessein AJ, Hillaire D, Elwali NE, et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene 10.1086/302526. *Am J Hum Genet* 1999;65(3):709-21.
27. Badawi AF, Michael MS. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Egypt: the role of hepatitis-B viral infection and schistosomiasis. *Anticancer Res* 1999;19(5C):4565-9.
28. Olveda DU, Olveda RM, McManus DP, et al. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis S1201-9712(14)01594-X [pii] 10.1016/j.ijid.2014.07.009. *Int J Infect Dis* 2014;28:193-203.
29. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis 10.1172/jci24282. *J Clin Invest* 2005;115(2):209-18.
30. D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, Berk PD, Rippe RA, Blaner WS. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage 10.1371/journal.pone.0024993 PONE-D-11-10810 [pii]. *PLoS One* 2011;6(9):e24993.
31. Hams E, Aviello G, Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? 10.3389/fimmu.2013.00089. *Front Immunol* 2013;4:89.
32. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis 10.1016/j.matbio.2017.11.011. *Matrix Biol* 2018;68-69:452-62.
33. Anthony BJ, Ramm GA, McManus DP. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis 10.1016/j.pt.2012.09.005. *Trends Parasitol* 2012;28(12):572-9.
34. Carson JP, Ramm GA, Robinson MW, McManus DP, Gobert GN. Schistosome-Induced Fibrotic Disease: The Role of Hepatic Stellate Cells 10.1016/j.pt.2018.02.005. *Trends Parasitol* 2018;34(6):524-40.
35. Senoo H, Mezaki Y, Fujiwara M. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system) 10.1007/s12565-017-0395-9. *Anat Sci Int* 2017;92(4):387-455.
36. Mycologie AFadEdPe. Bilharzioses. In: ANOFEL; 2014.

37. PELLEGRINO J. The intradermal test in the diagnosis of bilharziasis. *Bull World Health Organ* 1958;18(5-6):945-61.
38. Naveau S, Gaudé G, Asnacios A, et al. Diagnostic and prognostic values of noninvasive biomarkers of fibrosis in patients with alcoholic liver disease 10.1002/hep.22576. *Hepatology* 2009;49(1):97-105.
39. de Franchis R. Updating consensus in portal hypertension: report of the Baveno III Consensus Workshop on definitions, methodology and therapeutic strategies in portal hypertension. *J Hepatol* 2000;33(5):846-52.
40. Garcia-Tsao G, Groszmann RJ, Fisher RL, Conn HO, Atterbury CE, Glickman M. Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding. *Hepatology* 1985;5(3):419-24.
41. Bosch J, Mastai R, Kravetz D, Navasa M, Rodés J. Hemodynamic evaluation of the patient with portal hypertension 10.1055/s-2008-1040613. *Semin Liver Dis* 1986;6(4):309-17.
42. Lebrech D, De Fleury P, Rueff B, Nahum H, Benhamou JP. Portal hypertension, size of esophageal varices, and risk of gastrointestinal bleeding in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1980;79(6):1139-44.
43. Viallet A, Marleau D, Huet M, et al. Hemodynamic evaluation of patients with intrahepatic portal hypertension. Relationship between bleeding varices and the portohepatic gradient. *Gastroenterology* 1975;69(6):1297-300.
44. Le Moine O, Hadengue A, Moreau R, et al. Relationship between portal pressure, esophageal varices, and variceal bleeding on the basis of the stage and cause of cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(7):731-5.
45. Rigau J, Bosch J, Bordas JM, et al. Endoscopic measurement of variceal pressure in cirrhosis: correlation with portal pressure and variceal hemorrhage. *Gastroenterology* 1989;96(3):873-80.
46. Dib N. Hypertension portale : physiopathologie, diagnostic et étiologies. In: A. Sawadogo FO, P. Calès, ed.: *Encyclopédie Médico Chirurgicale*.
47. McManus DP, Loukas A. Current status of vaccines for schistosomiasis 10.1128/CMR.00046-07. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(1):225-42.
48. Siddiqui AA, Siddiqui BA, Ganley-Leal L. Schistosomiasis vaccines 10.4161/hv.7.11.17017. *Hum Vaccin* 2011;7(11):1192-7.
49. Famakinde DO. Treading the Path towards Genetic Control of Snail Resistance to Schistosome Infection 10.3390/tropicalmed3030086. *Trop Med Infect Dis* 2018;3(3).
50. ORGANIZATION WH. WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Parasitic Diseases. In; 1995.
51. da Silva VBR, Campos BRKL, de Oliveira JF, Decout JL, do Carmo Alves de Lima M. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine 10.1016/j.bmc.2017.04.031. *Bioorg Med Chem* 2017;25(13):3259-77.
52. Osakunor DNM, Woolhouse MEJ, Mutapi F. Paediatric schistosomiasis: What we know and what we need to know 10.1371/journal.pntd.0006144. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(2):e0006144.
53. Pariente A. Hypertension portale : faut-il abandonner le propranolol pour le carvedilol ? doi:10.1684/hpg.2013.0867. In: *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive*; mai 2013.
54. Lambertucci JR, dos Santos Silva LC, Andrade LM, et al. Imaging techniques in the evaluation of morbidity in schistosomiasis mansoni 10.1016/j.actatropica.2008.07.009. *Acta Trop* 2008;108(2-3):209-17.

55. Dragoteanu M, Balea IA, Dina LA, et al. Staging of portal hypertension and portosystemic shunts using dynamic nuclear medicine investigations. *World J Gastroenterol* 2008;14(24):3841-8.
56. Boynard M. Bases physiques et technologiques de l'échographie ultrasonore [http://dx.doi.org/10.1016/S1879-8497\(15\)67130-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1879-8497(15)67130-8). In: EMC; 2015.
57. Skelly PJ. The use of imaging to detect schistosomes and diagnose schistosomiasis [10.1111/pim.12040](https://doi.org/10.1111/pim.12040). *Parasite Immunol* 2013;35(9-10):295-301.
58. Olveda DU, Olveda RM, Lam AK, et al. Utility of Diagnostic Imaging in the Diagnosis and Management of Schistosomiasis [10.4172/2327-5073.1000142](https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000142). *Clin Microbiol* 2014;3(2).
59. Richter J, Campagne G, Hatz C, Jenkins J, Bergquist NR. A Practical Guide to the Standardized Use of Ultrasonography for the Assessment of Schistosomiasis-related Morbidity. In: *ULTRASOUND IN SCHISTOSOMIASIS- Second International Workshop*. Niamey, Niger; 1996.
60. Pinto-Silva RA, Queiroz LC, Azeredo LM, Silva LC, Lambertucci JR. Ultrasound in schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105(4):479-84.
61. Martinez SM, Crespo G, Navasa M, Fornis X. Noninvasive assessment of liver fibrosis [10.1002/hep.24013](https://doi.org/10.1002/hep.24013). *Hepatology* 2011;53(1):325-35.
62. Lothar S, Schiff SJ, Neuberger T, Jakob PM, Fidler F. Design of a mobile, homogeneous, and efficient electromagnet with a large field of view for neonatal low-field MRI [10.1007/s10334-016-0525-8](https://doi.org/10.1007/s10334-016-0525-8). *MAGMA* 2016;29(4):691-8.
63. Lambertucci JR, Silva LC, Andrade LM, de Queiroz LC, Pinto-Silva RA. Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni /S0037-86822004000400009 S0037-86822004000400009 [pii]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;37(4):333-7.
64. de Carvalho BT, Coutinho Domingues AL, de Almeida Lopes EP, Brandao SC. Increased Hepatic Arterial Blood Flow Measured by Hepatic Perfusion Index in Hepatosplenic Schistosomiasis: New Concepts for an Old Disease [10.1007/s10620-016-4080-y](https://doi.org/10.1007/s10620-016-4080-y) [10.1007/s10620-016-4080-y](https://doi.org/10.1007/s10620-016-4080-y) [pii]. *Dig Dis Sci* 2016;61(7):2118-26.
65. Ye S, Wang WL, Zhao K. F-18 FDG hypermetabolism in mass-forming focal pancreatitis and old hepatic schistosomiasis with granulomatous inflammation misdiagnosed by PET/CT imaging. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(9):6339-44.
66. Razzak MA. The Use of Radioactive Isotopes to Study the Hemodynamic Pattern, Function and Morphology of the Liver in Hepato-Splenic Bilharziasis (Schistosomiasis). *J Nucl Med* 1964;5:125-33.
67. Mustafa AG, Razzak MA, Mahfouz M, Guirgis B. Radioisotope photoscanning of the liver in bilharzial hepatic fibrosis. *J Nucl Med* 1966;7(12):909-16.
68. Iio M, Iuchi M, Kitani K, Yamada H, Ishiwa M. Scintigraphic evaluation of the liver with schistosomiasis japonica. *J Nucl Med* 1971;12(10):655-9.
69. Esmat G, Elsharkawy A, El Akel W, et al. Fibroscan of chronic HCV patients coinfecting with schistosomiasis [10.1016/j.ajg.2013.07.001](https://doi.org/10.1016/j.ajg.2013.07.001). *Arab J Gastroenterol* 2013;14(3):109-12.
70. Bastard C, Bosisio MR, Chabert M, et al. Transient micro-elastography: A novel non-invasive approach to measure liver stiffness in mice [10.3748/wjg.v17.i8.968](https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i8.968). *World J Gastroenterol* 2011;17(8):968-75.
71. Huwart L, Peeters F, Sinkus R, et al. Liver fibrosis: non-invasive assessment with MR elastography [10.1002/nbm.1030](https://doi.org/10.1002/nbm.1030). *NMR Biomed* 2006;19(2):173-9.

72. Yin M, Woollard J, Wang X, et al. Quantitative assessment of hepatic fibrosis in an animal model with magnetic resonance elastography  
10.1002/mrm.21286. *Magn Reson Med* 2007;58(2):346-53.
73. Ichikawa S, Motosugi U, Morisaka H, et al. Comparison of the diagnostic accuracies of magnetic resonance elastography and transient elastography for hepatic fibrosis  
10.1016/j.mri.2014.10.003. *Magn Reson Imaging* 2015;33(1):26-30.
74. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, Ehman RL. Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography  
10.1148/radiol.11101942. *Radiology* 2011;259(3):749-56.
75. Roderfeld M, Padem S, Lichtenberger J, et al. Schistosoma mansoni egg secreted antigens activate HCC-associated transcription factors c-Jun and STAT3 in hamster and human hepatocytes  
10.1002/hep.30192. *Hepatology* 2018.
76. Abdul-Ghani RA. Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies  
DOI 10.1007/s00436-010-1855-5. In: Hassan AA, ed.: *Parasitology Research*; June 2010.
77. Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. Experimental models of Schistosoma mansoni infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97(7):917-40.
78. Dunn MA, Rojkind M, Warren KS, Hait PK, Rifas L, Seifter S. Liver collagen synthesis in murine schistosomiasis  
10.1172/JCI108685. *J Clin Invest* 1977;59(4):666-74.
79. Kreft B, Dombrowski F, Block W, Bachmann R, Pfeifer U, Schild H. Evaluation of different models of experimentally induced liver cirrhosis for MRI research with correlation to histopathologic findings. *Invest Radiol* 1999;34(5):360-6.
80. Aubé C, Moal F, Oberti F, et al. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats  
10.1007/s10620-006-9143-z. *Dig Dis Sci* 2007;52(10):2601-9.
81. Chow AM, Gao DS, Fan SJ, et al. Measurement of liver T<sub>1</sub>, and T<sub>2</sub>, relaxation times in an experimental mouse model of liver fibrosis  
10.1002/jmri.23606. *J Magn Reson Imaging* 2012;36(1):152-8.
82. Anderson SW, Jara H, Ozonoff A, O'Brien M, Hamilton JA, Soto JA. Effect of disease progression on liver apparent diffusion coefficient and T<sub>2</sub> values in a murine model of hepatic fibrosis at 11.7 Tesla MRI  
10.1002/jmri.22807. *J Magn Reson Imaging* 2012;35(1):140-6.
83. Engelhardt R, Langkowski JH, Fischer R, et al. Liver iron quantification: studies in aqueous iron solutions, iron overloaded rats, and patients with hereditary hemochromatosis. *Magn Reson Imaging* 1994;12(7):999-1007.
84. Anderson LJ, Holden S, Davis B, et al. Cardiovascular T<sub>2</sub>-star (T<sub>2</sub><sup>\*</sup>) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 2001;22(23):2171-9.
85. Annet L, Peeters F, Abarca-Quinones J, Leclercq I, Moulin P, Van Beers BE. Assessment of diffusion-weighted MR imaging in liver fibrosis  
10.1002/jmri.20771. *J Magn Reson Imaging* 2007;25(1):122-8.
86. Sandrasegaran K, Akisik FM, Lin C, et al. Value of diffusion-weighted MRI for assessing liver fibrosis and cirrhosis  
10.2214/AJR.09.2436. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193(6):1556-60.
87. Do RK, Chandarana H, Chandanara H, et al. Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis with diffusion-weighted imaging: value of normalized apparent diffusion coefficient using the spleen as reference organ  
10.2214/AJR.09.3448. *AJR Am J Roentgenol* 2010;195(3):671-6.

88. Le Bihan D, Turner R. Intravoxel incoherent motion imaging using spin echoes. *Magn Reson Med* 1991;19(2):221-7.
89. Yoon JH, Lee JM, Baek JH, et al. Evaluation of hepatic fibrosis using intravoxel incoherent motion in diffusion-weighted liver MRI 10.1097/RCT.0b013e3182a589be. *J Comput Assist Tomogr* 2014;38(1):110-6.
90. Hu G, Chan Q, Quan X, et al. Intravoxel incoherent motion MRI evaluation for the staging of liver fibrosis in a rat model 10.1002/jmri.24796. *J Magn Reson Imaging* 2015;42(2):331-9.
91. Ichikawa S, Motosugi U, Morisaka H, et al. MRI-based staging of hepatic fibrosis: Comparison of intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging with magnetic resonance elastography 10.1002/jmri.24760. *J Magn Reson Imaging* 2015;42(1):204-10.
92. Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB. Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging 10.1148/radiol.2392050505. *Radiology* 2006;239(2):425-37.
93. Polasek M, Fuchs BC, Uppal R, et al. Molecular MR imaging of liver fibrosis: a feasibility study using rat and mouse models 10.1016/j.jhep.2012.04.035. *J Hepatol* 2012;57(3):549-55.
94. Fuchs BC, Wang H, Yang Y, et al. Molecular MRI of collagen to diagnose and stage liver fibrosis 10.1016/j.jhep.2013.06.026. *J Hepatol* 2013;59(5):992-8.
95. Manivannan B, Rawson P, Jordan TW, Secor WE, La Flamme AC. Differential patterns of liver proteins in experimental murine hepatosplenic schistosomiasis 10.1128/IAI.00647-09. *Infect Immun* 2010;78(2):618-28.
96. Lewis F. Schistosomiasis 10.1002/0471142735.im1901s28. *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 19:Unit 19.1.
97. Hennig J, Nauerth A, Friedburg H. RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med* 1986;3(6):823-33.
98. Abramoff. Image processing with ImageJ. In: Magalhães PJ, Ram SJ, eds.: *Biophotonics international*; 2004.
99. Collignon A, Perles-Barbacaru AT, Robert S, et al. A pancreatic tumor-specific biomarker characterized in humans and mice as an immunogenic onco-glycoprotein is efficient in dendritic cell vaccination 10.18632/oncotarget.4359. *Oncotarget* 2015;6(27):23462-79.
100. Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol* 2003;55(2-3):91-106.
101. Huang Y, de Boer WB, Adams LA, et al. Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome 10.1111/liv.12184. *Liver Int* 2013;33(8):1249-56.
102. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group 10.1002/hep.510240201. *Hepatology* 1996;24(2):289-93.
103. Truscott M, Evans DA, Gunn M, Hoffmann KF. *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion 10.1128/IAI.00701-12. *Infect Immun* 2013;81(1):133-42.
104. Kosaka M, Owatari N, Seo Y, et al. In vivo NMR micro-imaging of kidney and liver of mouse at 9.4 T. *Jpn J Physiol* 2000;50(4):463-7.

105. Voieta I, de Queiroz LC, Andrade LM, et al. Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni in Brazil: a comparative study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105(4):414-21.
106. Siqueira L CM, Hahn PF, Boland G, White LT, et al. T2 relaxation time as a surrogate marker of liver fibrosis. In. Stockholm, Sweden; 2010.
107. Maillard SM, Jones R, Owens C, et al. Quantitative assessment of MRI T2 relaxation time of thigh muscles in juvenile dermatomyositis  
10.1093/rheumatology/keh130. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43(5):603-8.
108. Cheng HL, Stikov N, Ghugre NR, Wright GA. Practical medical applications of quantitative MR relaxometry  
10.1002/jmri.23718. *J Magn Reson Imaging* 2012;36(4):805-24.
109. Song KH, Lee MY, Yoo CH, Lim SI, Choe BY. Improved quantitative fatty acid values with correction of T2 relaxation time in terminal methyl group: In vivo proton magnetic resonance spectroscopy at ultra high field in hepatic steatosis  
10.1016/j.chemphyslip.2018.01.004. *Chem Phys Lipids* 2018;212:35-43.
110. Li JV, Holmes E, Saric J, et al. Metabolic profiling of a *Schistosoma mansoni* infection in mouse tissues using magic angle spinning-nuclear magnetic resonance spectroscopy  
10.1016/j.ijpara.2008.10.010. *Int J Parasitol* 2009;39(5):547-58.
111. Takeuchi M, Sekino M, Iriguchi N, Ueno S. Dependence of the spin-spin relaxation time of water in collagen gels on collagen fiber directions. *Magn Reson Med Sci* 2004;3(4):153-7.
112. Wu CH, Giambrone MA, Howard DJ, Rojkind M, Wu GY. The nature of the collagen in hepatic fibrosis in advanced murine schistosomiasis. *Hepatology* 1982;2(3):366-71.
113. Blaner WS, O'Byrne SM, Wongsiriroj N, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage  
10.1016/j.bbali.2008.11.001. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(6):467-73.
114. D'Ambrosio DN, Walewski JL, Clugston RD, Berk PD, Rippe RA, Blaner WS. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage  
10.1371/journal.pone.0024993. *PLoS One* 2011;6(9):e24993.
115. Bobowski-Gerard M, Zummo FP, Staels B, Lefebvre P, Eeckhoutte J. Retinoids Issued from Hepatic Stellate Cell Lipid Droplet Loss as Potential Signaling Molecules Orchestrating a Multicellular Liver Injury Response  
10.3390/cells7090137. *Cells* 2018;7(9).
116. Lambertucci JR, Mamede M, Pereira TA. In Vivo MRI Assessment of Experimental Schistosomiasis  
10.1016/j.pt.2015.11.003. *Trends Parasitol* 2016;32(1):3-5.
117. Lambertucci JR, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, et al. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop* 2000;77(1):101-9.
118. Andrade ZA, Silva LM, de Souza MM. An experimental approach to the pathogenesis of "pipestem" fibrosis (Symmers' fibrosis of the liver). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92(5):699-706.
119. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis S0945-053X(17)30350-5 [pii] 10.1016/j.matbio.2017.11.011. *Matrix Biol* 2018;68-69:452-62.
120. Senoo H, Mezaki Y, Fujiwara M. The stellate cell system (vitamin A-storing cell system)

10.1007/s12565-017-0395-9 10.1007/s12565-017-0395-9 [pii]. *Anat Sci Int* 2017;92(4):387-455.

121. Sertorio M, Hou X, Carmo RF, et al. IL-22 and IL-22 binding protein (IL-22BP) regulate fibrosis and cirrhosis in hepatitis C virus and schistosome infections 10.1002/hep.27629. *Hepatology* 2015;61(4):1321-31.

122. Ma Z, Liu X, Dong H, et al. Sorafenib and praziquantel synergistically attenuate *Schistosoma japonicum*-induced liver fibrosis in mice 10.1007/s00436-018-5972-x. *Parasitol Res* 2018;117(9):2831-9.

# **ANNEXES**

## **1. Publications des résultats**



# 1 Résumé du poster au congrès de la SFRMBM (2015, Grenoble)

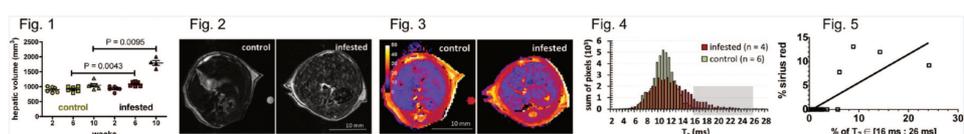
## Evaluation par IRM *in vivo* de la maladie hépatosplénique chez un modèle murin de schistosomiase

B. Masi<sup>1,2</sup>, A. Perles-Barbacaru<sup>3,4</sup>, C. Laprie<sup>5</sup>, H. Dessein<sup>1,2</sup>, M. Bernard<sup>3,4</sup>, A. Dessein<sup>1,2</sup> et A. Viola<sup>3,4</sup>  
1-INSERM U906, Marseille, France. 2-GIMP UMR-S 906, Aix-Marseille Université, Marseille, France. 3-CRMBM UMR CNRS 7339, Marseille, France. 4-Aix-Marseille Université, Marseille, France.

**But de l'étude:** la schistosomiase, une maladie tropicale chronique, affecte plus de 240 millions de personnes. Causée par des trématodes du genre *Schistosoma*, elle est associée à une morbidité sévère résultant notamment de la migration des schistosomes dans le foie et du développement d'une fibrose hépatique responsable de la formation de varices et d'une hypertension portale potentiellement mortelle. La gravité de la maladie est souvent difficile à estimer, des marqueurs non-invasifs d'évolution sont donc nécessaires pour le suivi de cette pathologie. Dans cette étude, nous avons caractérisé par IRM *in vivo* la maladie hépatosplénique chez un modèle murin de la maladie et évalué le temps de relaxation  $T_2$  comme possible marqueur de fibrose.

**Matériels et Méthodes:** 12 souris CBA/J saines (contrôles) et 12 souris CBA/J infestées par 30 cercaires de *Schistosoma mansoni* ont été imagées sous anesthésie (isoflurane) dans un spectromètre vertical (Bruker AVANCE 500 WB) opérant à 11,75T. Six souris contrôles et 6 infestées ont été examinées 2 et 6 semaines après infestation (groupe 1), 6 autres contrôles et 6 autres infestées à 10 semaines (groupe 2). Des images transversales (champ de vue : 24x24 mm<sup>2</sup>; épaisseur de coupe : 0,5 mm) ont été acquises avec synchronisation respiratoire. Une carte  $T_2$  (TR  $\geq$  9 s; 12 échos également espacés de TE = 7,5 à 120 ms; matrice : 64x64, 2 accumulations) correspondant à une coupe située à 0,5 mm caudalement de la bifurcation de la veine porte a été acquise. Des images anatomiques (écho de spin 2D; TR  $\geq$  448 ms; TE = 14 ms; matrice : 240x240; 4 accumulations) ont été acquises 15 min après injection ip de 50  $\mu$ l de DOTAREM® 0,5 M (Guerbet). Quarante à 60 coupes contiguës ont été nécessaires pour couvrir totalement le foie et la rate (soit 2 ou 3 acquisitions successives de 20 coupes). Le diamètre de la veine porte a été mesuré à 0,5 mm caudalement de la bifurcation afin d'évaluer l'hypertension portale. En fin de protocole (semaine 6/groupe 1, semaine 10/groupe 2), les foies ont été prélevés pour histologie. Les coupes colorées à l'hématoxyline/éosine ont servi à la recherche d'œufs, de granulomes, de nécrose, et d'infiltrats inflammatoires au niveau portal. Le rouge Sirius a permis la visualisation des fibres de collagène et l'estimation du pourcentage de fibrose. Le test de Mann-Whitney a été employé dans les études volumétriques et le test de Spearman pour analyser la corrélation entre  $T_2$  et pourcentage histologique de fibrose (significativité : P<0,05).

**Résultats:** une hépatomégalie, une splénomégalie et une augmentation du diamètre de la veine porte étaient les premiers signes de la maladie détectables à l'IRM, tous significatifs dès 6 semaines (Fig. 1). Des hyperintensités multifocales du foie sont apparues plus tard à l'IRM chez 4 souris 10 semaines après infestation (Fig. 2). Ces lésions présentaient un  $T_2$  >16 ms alors que le parenchyme hépatique avait un  $T_2$  <14 ms (Fig. 3-4). Ces lésions correspondraient histologiquement aux granulomes, à la nécrose hépatocellulaire, aux infiltrats inflammatoires, et à la fibrose. La fibrose était indétectable au rouge Sirius à 6 semaines, tandis qu'à 10 semaines des régions riches en collagène étaient décelées dans les foies infectés. Une corrélation a été établie entre la fraction de  $T_2$  comprise entre 16 et 26 ms et le pourcentage de fibrose obtenu en histologie (Fig. 5).



**Discussion:** Nos résultats sont en accord avec les caractéristiques connues de la maladie humaine (organomégalie, hypertension portale et fibrose).<sup>1</sup> Des altérations de la structure hépatique évocatrices d'une fibrose apparue tardivement au cours du suivi étaient détectables en IRM et histologie. Ces lésions formaient des tâches sur les cartes  $T_2$  caractérisées par des valeurs de  $T_2$  augmentées de 14%. Bien qu'une étude *ex vivo* à 11,75T ait décrit une diminution du  $T_2$  dans un modèle murin de fibrose hépatique,<sup>2</sup> une autre étude *in vivo* à 7T a rapporté une augmentation du  $T_2$  comprise entre 17 et 22%. Cette élévation du  $T_2$  pourrait découler de l'inflammation et d'un œdème tissulaire. Bien que le nombre d'animaux dans notre étude soit limité, l'augmentation du  $T_2$  apparaît significativement corrélée au pourcentage histologique de fibrose. Ce résultat suggère que la cartographie du  $T_2$  serait un marqueur non invasif fiable de la maladie, susceptible de détecter la fibrose hépatique avec une sensibilité similaire à celle de l'histologie.

Références: 1. World Health Organization record: Schistosomiasis. Geneva, Switzerland; 2013. 2. Anderson SW et al. J Magn Reson Imaging. 2012;35(1):140-6. 3. Chow AM et al. J Magn Reson Imaging. 2012;36(1):152-8.



# 2 Résumé de la présentation orale au congrès de l'ISMRM (2015, Toronto)

383

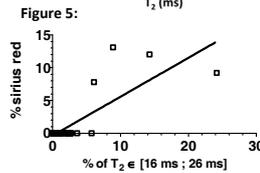
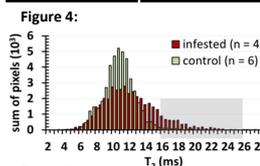
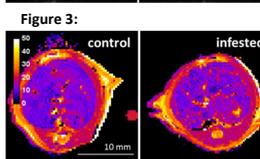
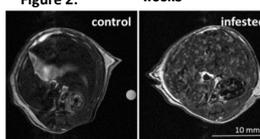
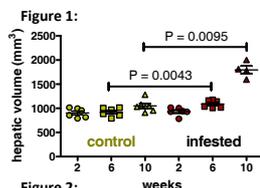
## In vivo MRI assessment of hepato-splenic disease in a murine model of schistosomiasis

Brice Masi<sup>1,2</sup>, Teodora-Adriana Perles-Barbacaru<sup>3,4</sup>, Caroline Laprie<sup>5</sup>, Helia Dessein<sup>1,2</sup>, Monique Bernard<sup>3,4</sup>, Alain Dessein<sup>1,2</sup>, and Angèle Viola<sup>3,4</sup>  
<sup>1</sup>INSERM U906, Marseille, France, <sup>2</sup>GIMP UMR\_S 906, Aix-Marseille Université, Marseille, France, <sup>3</sup>CRMBM UMR CNRS 7339, Marseille, France, <sup>4</sup>Aix-Marseille Université, Marseille, France, <sup>5</sup>Laboratoire VET-HISTO, Marseille, France

**Target audience:** basic scientists, physicians, pharmaceutical companies

**Purpose:** Schistosomiasis or bilharzia, a chronic tropical helminthic disease affecting more than 240 million people,<sup>1</sup> is still far from eradication. The hepatosplenic form of the disease caused by infection with trematodes of the *Schistosoma* genus (ie *Schistosoma mansoni*) is associated with severe morbidity due to schistosoma migration into the liver and development of progressive liver fibrosis. Hepatic fibrosis may eventually lead to esophageal varices and portal hypertension that can be lethal. Disease burden is often difficult to assess, therefore non-invasive markers for the diagnosis and the follow-up of schistosomiasis-related morbidity are needed. In this study, we characterized the hepatosplenic disease in a mouse model of schistosomiasis by *in vivo* MRI and investigated the role of the transverse relaxation time ( $T_2$ ) to assess liver fibrosis.

**Methods:** Seven-week old female CBA/J mice (n=12) were infested percutaneously with 30 cercariae of the venezuelan strain of *S. mansoni* maintained in their intermediate host (the snail) whereas 12 non-infested mice were used as controls. Mice were imaged at 11.75T (Bruker AVANCE 500 WB, Germany) under isoflurane anesthesia. A first group of animals (controls n=6, infested mice n=6) was examined 2 and 6 weeks after infection with *S. mansoni*, while a second group (controls n=6, infested mice n=6) was imaged 10 weeks after infection. Transverse MR images (FOV 24 x 24 mm<sup>2</sup>, slice thickness 0.5 mm) were acquired using prospective respiratory gating (PC-SAM, Small Animal Instruments Inc., NY).  $T_2$  maps (TR  $\geq$  9 s; 12 equally spaced echoes at TE = 7.5 to 120 ms; matrix 64 x 64, 2 accumulations, acquisition time 20 minutes) were acquired in a single slice 0.5 mm caudal of the portal vein bifurcation. Contrast enhanced anatomical imaging (2D spin-echo sequence, TR  $\geq$  448 ms; TE = 14 ms, matrix 240 x 240, 4 accumulations, acquisition time < 20 minutes) was started 15 minutes after ip injection of 50  $\mu$ l of 0.5 M gadoteric acid (DOTAREM®, Guerbet, France). The number of contiguous slices varied from 40 to 60 (2 to 3 repeated acquisitions with different slice position) to entirely cover the liver and spleen in diseased animals. The cross-section of the portal vein 0.5 mm caudal of the level of bifurcation was measured to assess portal hypertension. After MRI examination at 6 (first group) and 10 weeks (second group of mice), livers were stained with hematoxylin eosin to assess egg load, granuloma formation, necrosis and portal inflammatory infiltrates, and sirius red to visualize collagen fibers and thus evaluate the percentage of fibrotic tissue. Mann-Whitney test was used to compare control and infested animals in volumetric studies (significance set to P<0.05). Spearman test was used for correlation between  $T_2$  and the percentage of fibrosis obtained with sirius red staining.



**Results:** Organomegaly and alteration of the portal vein section were the first signs of the disease visible on MRI. Indeed, hepatomegaly (Figure 1), splenomegaly and portal hypertension as assessed by MRI were significant at 6 weeks (+19%, +52% and +60%, respectively) and 10 weeks post infestation (+72%, +170% and +139%, respectively). Multifocal contrast enhancement of the liver appeared later and was clearly visible on MRI in 4 mice at 10 weeks post infestation (Figure 2). These lesions were also characterized by a  $T_2 > 16$  ms while liver parenchyma has  $T_2$  values well below 14 ms (Figures 3 and 4). According to histology they correspond to granulomatous reactions to eggs, hepatocellular necrosis, inflammatory infiltration, and fibrosis. Histology confirmed the absence of lesions in the two remaining mice sacrificed at 10 weeks in which the infestation had failed (no parasite detected in the liver). Sirius red staining was negative at 6 weeks after infestation, whereas at 10 weeks collagen rich areas could be visualized in infested livers. The liver fraction with 16 ms <  $T_2$  < 26 ms (Figure 4) correlated with area fraction of fibrosis stained with sirius red (Figure 5).

**Discussion:** The MRI results on this animal model are in accordance with the known features of the human disease (hepato-splenomegaly, portal hypertension and liver fibrosis).<sup>1</sup> Structural changes suggestive of liver fibrosis appeared at a late time-point of the follow-up (10 weeks after infestation) and were detectable by both MRI and histology. Lesions were also easily distinguishable on  $T_2$  maps as spots with a  $T_2$  increase of > 14%. Although *ex vivo* studies at 11.75T describe a  $T_2$  decrease in a mouse model of hepatic fibrosis,<sup>3</sup> a  $T_2$  increase of 17 - 22% with increasing fibrosis has previously been observed *in vivo* at 7T.<sup>2</sup> The  $T_2$  increase might be explained by inflammatory activity accompanied by edema, but in our exploratory study, despite the small number of animals, the area fraction of increased  $T_2$  in the liver was significantly correlated with the area fraction affected by fibrosis. This result suggests that  $T_2$  mapping is a reliable non-invasive marker for disease monitoring.

**Conclusion:** This multimodal MRI approach can monitor hepatosplenic disease progression and assess liver fibrosis non-invasively even at early stages with a sensitivity similar to that of histology. These findings could be useful in preclinical studies to evaluate novel therapeutics for the treatment of schistosomiasis disease.

### References:

1. World Health Organization record: Schistosomiasis. Geneva, Switzerland; 2013.
2. Chow AM, Gao DS, Fan SJ, et al. Measurement of liver  $T_1$  and  $T_2$  relaxation times in an experimental mouse model of liver fibrosis. J Magn Reson Imaging. 2012 Jul;36(1):152-8.
3. Anderson SW, Jara H, Ozonoff A, O'Brien M, Hamilton JA, Soto JA. Effect of disease progression on liver apparent diffusion coefficient and  $T_2$  values in a murine model of hepatic fibrosis at 11.7 Tesla MRI. J Magn Reson Imaging. 2012 Jan;35(1):140-6.



## RESEARCH ARTICLE

## *In Vivo* MRI Assessment of Hepatic and Splenic Disease in a Murine Model of Schistosomiasis

Brice Masi<sup>1,2</sup>, Teodora-Adriana Perles-Barbacaru<sup>3,4</sup>, Caroline Laprie<sup>5</sup>, Helia Dessein<sup>1,2</sup>, Monique Bernard<sup>3,4</sup>, Alain Dessein<sup>1,2,6</sup>, Angèle Viola<sup>3,4</sup>

**1** Génétique et Immunologie des Maladies Parasitaires-Unité Mixte de Recherche S\_906, Aix-Marseille Université, Marseille, France, **2** Unité 906, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Marseille, France, **3** Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale-Unité Mixte de Recherche 7339, Aix-Marseille Université, Marseille, France, **4** Unité Mixte de Recherche 7339, Centre National de la Recherche Scientifique, Marseille, France, **5** Laboratoire VET-HISTO, Marseille, France, **6** Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire Timone, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

 These authors contributed equally to this work.

 These authors jointly directed this work.

\* [angele.viola@univ-amu.fr](mailto:angele.viola@univ-amu.fr)



### Abstract

 OPEN ACCESS

**Citation:** Masi B, Perles-Barbacaru T-A, Laprie C, Dessein H, Bernard M, Dessein A, et al. (2015) *In Vivo* MRI Assessment of Hepatic and Splenic Disease in a Murine Model of Schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0004036. doi:10.1371/journal.pntd.0004036

**Editor:** Stephen John Davies, Uniformed Services University, UNITED STATES

**Received:** April 23, 2015

**Accepted:** August 4, 2015

**Published:** September 22, 2015

**Copyright:** © 2015 Masi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

### Background

Schistosomiasis (or bilharzia), a major parasitic disease, affects more than 260 million people worldwide. In chronic cases of intestinal schistosomiasis caused by trematodes of the *Schistosoma* genus, hepatic fibrosis develops as a host immune response to the helminth eggs, followed by potentially lethal portal hypertension. In this study, we characterized hepatic and splenic features of a murine model of intestinal schistosomiasis using *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) and evaluated the transverse relaxation time  $T_2$  as a non-invasive imaging biomarker for monitoring hepatic fibrogenesis.

### Methodology/Principal Findings

CBA/J mice were imaged at 11.75T two, six and ten weeks after percutaneous infection with *Schistosoma mansoni*. *In vivo* imaging studies were completed with histology at the last two time points. Anatomical MRI allowed detection of typical manifestations of the intestinal disease such as significant hepato- and splenomegaly, and dilation of the portal vein as early as six weeks, with further aggravation at 10 weeks after infection. Liver multifocal lesions observed by MRI in infected animals at 10 weeks post infection corresponded to granulomatous inflammation and intergranulomatous fibrosis with METAVIR scores up to A2F2. While most healthy hepatic tissue showed  $T_2$  values below 14 ms, these lesions were characterized by a  $T_2$  greater than 16 ms. The area fraction of increased  $T_2$  correlated ( $r_s = 0.83$ ) with the area fraction of Sirius Red stained collagen in histological sections. A continuous liver  $T_2^*$  decrease was also measured while brown pigments in macrophages

were detected at histology. These findings suggest accumulation of hematin in infected livers.

### Conclusions/Significance

Our multiparametric MRI approach confirms that this murine model replicates hepatic and splenic manifestations of human intestinal schistosomiasis. Quantitative  $T_2$  mapping proved sensitive to assess liver fibrogenesis non-invasively and may therefore constitute an objective imaging biomarker for treatment monitoring in diseases involving hepatic fibrosis.

### Author Summary

Schistosomiasis (or bilharzia), a major helminth disease, affects more than 260 million people worldwide. While the adult worms survive for years within veins of the gastrointestinal system, symptoms are due to inflammatory reactions to their eggs in several organs. Hepatic fibrosis may develop in chronic cases of infection with *Schistosoma mansoni* and lead to portal hypertension with potentially lethal complications. In this study, we aimed at establishing a non-invasive quantitative and readily available magnetic resonance imaging (MRI) technique to monitor *in vivo* the development of hepatic fibrosis and portal hypertension in *Schistosoma mansoni* infected mice. We evaluated the transverse relaxation time  $T_2$ , an easily measurable MRI parameter, as an early and quantitative imaging biomarker for hepatic fibrogenesis and validated it with histological techniques for fibrosis detection and quantification. In addition, we confirmed that this mouse model of schistosomiasis replicates the human pathology closely. The quantitative imaging biomarkers validated in this study will aid in the preclinical and clinical evaluation of new therapeutic strategies against hepatic fibrogenesis.

### Introduction

Present in many tropical and subtropical countries, schistosomiasis (or bilharzia), the second most prevalent parasitic disease in the world after malaria, affects more than 260 million people and leads to 200 000 deaths per year [1]. This helminthic disease is caused by trematodes of the *Schistosoma* genus. *S. haematobium*, *S. mansoni*, and *S. japonicum* are the main species infecting humans. These parasites have aquatic gastropods as intermediate hosts and a final vertebrate host. *S. mansoni* is the principal agent of digestive forms of the human disease. The gastropod is infected with *miracidia* released from the *S. mansoni* eggs that transform into sporocysts. These sporocysts shed *cercariae* in the water that can penetrate the skin of the mammalian hosts. After maturation, male and female worms reproduce in the mesenteric venous plexus and produce eggs that are discharged with the stool into the environment [2,3,4].

However, many eggs are not eliminated and disseminate in the intestines and the liver where they obstruct presinusoidal capillary venules [2,4,5]. The host immune response elicited by these eggs leads to the formation of periovular granulomas and tissue damage. An imbalance between scarring and regeneration causes an accumulation of extracellular matrix rich in collagen (particularly types I and III) leading to hepatic fibrosis [6]. Hepatomegaly occurs early in the disease as a consequence of the granulomatous inflammation [2,3]. In *ca* 10% of patients, 5–20 years after infection, serious complications occur such as splenomegaly, pulmonary arterial hypertension accompanied by right heart failure, periportal fibrosis resulting in portal

hypertension and esophageal varices, that can lead to ascites and gastrointestinal bleeding with high mortality [3,4,5,7,8]. Chronic schistosomiasis is also associated with an increased incidence of hepatocellular carcinoma [4,9]. The standard treatment is the trematocide Praziquantel, which kills adult worms, but is ineffective on juvenile mammalian-stage schistosomes. The mechanism of action and molecular targets of Praziquantel are unknown. However many studies have reported vacuolation and blebbing of worm teguments and suggested a direct disruptive effect on  $Ca^{2+}$  channels, whereas a recent work has described distinct effects on male and female worms [10,11]. Although effective even at a single dose, reinfection is frequent and in 2013 only 13% of people necessitating treatment could benefit from it [1]. Despite extensive research, an anti-schistosomiasis vaccine is not yet available [12,13].

The mouse model of schistosomiasis is well suited for pharmaceutical and basic research purposes since mice are infected with the parasite species that are pathogenic for humans, and are therefore expected to accurately recapitulate the pathological features of the human disease. The objective of this study was to provide the first characterization of hepatic and splenic features of murine intestinal schistosomiasis using *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI). Another aim was to search for non-invasive biomarkers allowing future evaluation of new therapeutic strategies against the intestinal form of the disease in murine models.

Ultrasound is the leading medical imaging examination for the diagnosis of human intestinal schistosomiasis, and allows the assessment of liver involvement and portal hypertension [14,15]. Liver fibrosis can be monitored using ultrasound transient elastography (FibroScan), a technique allowing the assessment of liver stiffness [16]. Elastography is based on the measurement of tissue elasticity following the propagation of a mechanical shear wave through the liver. However, ultrasound transient elastography has the disadvantage of being highly operator dependent, less reliable for deep organs and not readily available for the exploration of rodent models [17]. Analysis of texture features from computed tomography (CT) images enables staging of fibrosis throughout the liver, but is less accurate in case of heterogeneous fibrosis distribution and is considered inferior to ultrasound transient elastography [18]. Whole abdominal coverage can also be achieved with MRI. In addition to the detection of morphological indicators of liver fibrosis such as splenomegaly and portal hypertension on conventional images [19], various MRI methods can be used for the study of (schistosomiasis-induced) liver disease. Magnetic resonance elastography (MRE) measures viscoelastic properties of the liver tissue, namely its capacity to return with time to its original shape after the application of deforming forces, by quantifying the propagation of the shear waves. This technique can be implemented on standard MRI systems but requires a mechanical vibrator device for the generation of shear waves. Liver stiffness has been shown to correlate with fibrosis stage in patients [20] and animal models [21]. A recent study suggests that MRE more accurately discriminates between early fibrosis stages than ultrasound transient elastography [22]. However, increased liver stiffness is not specific for fibrosis [23], and MRE can be hampered in subjects with severe iron overload [22]. Qualitative and quantitative scores of liver texture features on double contrast-enhanced MRI, an MRI technique based on the injection of two different types of contrast agents (super paramagnetic iron oxides and gadolinium chelates) have been shown to distinguish between mild and severe fibrosis [24]. In rodent models, MRI using a collagen type I targeted gadolinium-based contrast agent has shown differential uptake and washout in fibrotic livers with a good correlation to histological quantification of collagen [25,26]. Diffusion-weighted MRI, a technique sensitive to water diffusivity generally used to study tissue microstructure, has also been performed since fibrosis is expected to restrict water motion [27]. However, due to lack of standardization and confounding factors such as altered perfusion or accompanying inflammation this technique is not sensitive to mild stages of liver fibrosis [28,29]. Another MRI technique, known as intravoxel incoherent motion imaging [30] can

distinguish between microscopic motion of water molecules in intra- and extracellular compartments and the microcirculation of blood. Consequently, the derived parameters correlate better with fibrosis stage than conventional diffusion-weighted imaging in patients [31] and animal models [32]. However, this technique has not proved superior to MRE in distinguishing mild to intermediate fibrosis stages in patients [33]. Relaxometry has been proposed for the staging of hepatic fibrosis and evaluated in a number of studies. Relaxometry studies magnetic relaxation, a process by which magnetization of magnetic nuclei returns to its equilibrium state (parallel to the static magnetic field,  $B_0$ ) after it was disturbed from equilibrium and tipped into the plane orthogonal to  $B_0$  (transverse plane) by a radiofrequency pulse. Two relaxation time constants can be measured: the longitudinal relaxation time-constant  $T_1$  corresponding to the recovery of the magnetization along  $B_0$ , and the transverse relaxation time-constant  $T_2$  describing the decay of the magnetization in the transverse plane. Another relaxation time, called  $T_2^*$ , is a measure of  $T_2$  taking into account the effects of static magnetic field inhomogeneities on relaxation. Relaxation time constants depend on tissue structure and composition, which may vary with physiological or pathological processes, and strongly influence contrast in MRI. Maps derived from MRI images representing a spatial distribution of quantitative values of a selected relaxation time-constant ( $T_2$ ,  $T_2^*$  or  $T_1$ ) can be generated. Although relaxation time-constant values may vary with magnetic field strength, the tendency to increase or decrease upon a physiological or pathological process is independent of the magnetic field strength. An increase of the longitudinal relaxation time  $T_1$  has been observed with increasing severity of hepatic fibrosis. However, alterations of the transverse relaxation time  $T_2$  during the process of hepatic fibrogenesis were generally more sensitive [34,35,36]. In particular, in pre-clinical MRI studies using MRI systems equipped with high or ultra high magnetic field strength ( $3T < B_0 < 21T$ ) to increase the spatial resolution or the signal-to-noise ratio,  $T_1$  relaxation times tend to differ less between tissues than transverse relaxation times. In addition,  $T_2$  mapping is less challenging than  $T_1$  mapping in conjunction with respiratory gating (synchronization of MRI sequences with respiration) since all echoes required for  $T_2$  analysis are acquired within a few hundred milliseconds, while  $T_1$  mapping requires repeated sampling over a couple of seconds. The  $T_2$  and  $T_2^*$  relaxation times are also sensitive markers of iron deposition and hemorrhage [37,38].

In this study, multiparametric MRI including quantitative  $T_2$  and  $T_2^*$  mapping was performed in an attempt to establish a quantitative measure of the liver damage and related complications caused by schistosomiasis, and in particular to assess early stages of liver fibrosis. A mouse model of the intestinal form of the disease obtained with *S. mansoni* was explored. *In vivo* anatomical and relaxometry findings were compared to histological staging of liver disease and fibrosis progression.

## Materials and Methods

### Ethics statement

Animal studies were in agreement with the French guidelines for animal care from the French Ministry for Agriculture (Animal Rights Division), the directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010, and approved by our institutional committee on Ethics in animal research (Comité d’Ethique de Marseille n°14, project authorization n°: 02157.02).

### Animals and schistosomiasis induction

Twenty-four female CBA/J mice (6-week old) from Charles River Laboratories (l’Arbresle, France) were used. Mice were maintained at 22.5°C with a 12h light/12h dark cycle in an

enriched environment with free access to food and water. Twelve mice were infected percutaneously at the age of seven weeks with 30 cercariae of the Venezuelan strain of *S. mansoni* under intraperitoneal anesthesia (ketamine 100 mg/kg, xylazine 4 mg/kg). Cercariae, which are maintained in our laboratory by passage through *Biomphalaria glabrata* snails, were counted under binocular microscope, diluted in 500  $\mu$ l of water, and placed for 60 minutes on the sheared abdomen of mice to replicate the natural route of infection.

Mice were weighed before each MRI session. *In vivo* MRI was performed on two animal cohorts. The first cohort included a group of 6 infected mice and a group of 6 uninfected mice, which were both imaged at 2 weeks and 6 weeks post infection. MRI at 6 weeks was followed by histology. The second cohort consisting of a group of 6 infected mice and a group of 6 uninfected mice was explored only once at 10 weeks post infection and the animals were sacrificed after MRI for histology.

### *In vivo* MRI protocol

MRI experiments were performed on a Bruker AVANCE 500 WB MR system (Bruker, Ettlingen, Germany) operating at very high magnetic field (11.75 T), equipped with actively shielded gradients (1 T/m maximum gradient strength and 9 kT/m/s maximum slew rate) and a 30 mm-diameter transmitter/receiver volume birdcage coil. A catheter was inserted into the intraperitoneal cavity of the mice for contrast agent delivery. The animals were positioned in a cradle, and a pneumatic pressure probe was placed under their chest for respiration monitoring. Anesthesia was maintained with isoflurane in air using 1.3–1.8% *via* a face mask and body temperature was maintained using the water circulation of the gradient cooling system set to 42°C.

All sequences were prospectively gated with respiration using an MRI compatible monitoring and gating system (PC-SAM, Small Animal Instruments Inc., Stony Brook, NY). Images were acquired in the transverse plane with a field of view of 24×24 mm<sup>2</sup> and a slice thickness of 0.5 mm. Structural imaging at high in plane resolution (matrix 240×240, in-plane resolution 100  $\mu$ m) was performed using a 2D spin-echo sequence (repetition time TR  $\geq$  448 ms; echo time TE = 14 ms) with 20 contiguous slices and repeated on adjacent 20 slices to cover the liver and spleen entirely. Images were acquired before and 15 minutes after intraperitoneal injection of a paramagnetic contrast agent (50  $\mu$ l of 0.5 M gadoteric acid, DOTAREM, Guerbet, Villepinte, France) (number of accumulations for each acquisition: 2 and 4 respectively). Prior to contrast agent injection, T<sub>2</sub> and T<sub>2</sub><sup>\*</sup> maps (TR  $\geq$  9 s; matrix 64×64, 2 accumulations) were acquired in a single slice positioned 0.5 mm caudal of the bifurcation of the portal vein, using a multi-spin echo sequence (12 equally spaced echoes at TE = 7.5 to 120 ms) and a multi-gradient echo sequence (8 equally spaced echoes at TE = 1.6 to 13.5 ms), respectively. Using the bifurcation of the portal vein as landmark this axial slice position was reproducible between animals and covered sufficient liver tissue. Respiratory rate was kept between 60 and 70 breaths per minute by adjusting the isoflurane percentage leading to a total acquisition time of approximately 15 min for the anatomical imaging and 20 min for each map. For quality control, an external reference with a known T<sub>2</sub> of ca 21 ms, consisting of a capillary filled with the paramagnetic contrast agent diluted in saline was placed in the image field of view.

### MRI relaxometry of collagen solutions

Relaxometry studies were performed at 11.75T on water and solutions of collagen at four different concentrations (1.66 g/L, 3.33 g/L, 6.25 g/L and 12.5 g/L). Collagen solutions were prepared with Type I collagen from rat tail (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) solubilized under magnetic stirring in 0.1 M acetic acid at 40°C. T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> relaxation times

were measured using an inversion recovery gradient echo sequence with 7 inversion times ( $T_{inv}$  15 ms to 15 s) and a multi-spin echo sequence with 80 TE (10 to 800 ms). TR was 20 s.

### MRI processing

Images were analyzed under ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2014, last access January 2015) for liver and spleen volumetry, portal vein diameter, and  $T_2$ -map generation.

Liver and spleen were delineated on each slice ( $i$ ) to measure the cross-section ( $A_i$ ) of the organ and estimate its volume in  $\text{mm}^3$  by  $V = 0.5 \sum_i A_i$ . To assess portal hypertension, the portal vein cross-section was measured 0.5 mm caudal of the portal bifurcation, and its diameter was estimated as the Feret's diameter. The Feret's diameter is the maximum caliper length namely the longest distance between any two points along the section boundary. Relaxation time maps were computed by fitting the signal intensity  $S$  to  $S(TE) = S_0 \exp(TE/T_2^{(*)})$  or  $S(T_{inv}) = S_0 |1 - 2E \exp(-T_{inv}/T_1)|$  using the simplex algorithm in ImageJ. Here,  $S_0$  is the signal at thermal equilibrium, and  $E$  the efficiency of the inversion pulse. Histograms of quantitative  $T_2$  and  $T_2^*$  were obtained from a large region of interest (ROI) covering the liver but excluding the hepatic hilus and large vessels as well as the gall bladder, bowels or stomach when present in the slice.

### Histology

After euthanasia, livers were fixed in 10% buffered formalin for a minimum of 48 hours, sampled according to standardized procedures [39], paraffin-embedded and routinely processed for histology. Three 3- $\mu\text{m}$  paraffin serial sections per mouse were stained with Hematoxylin-Eosin (HE), with Sirius Red for collagen, and Perls' stain for iron. Grading of inflammatory activity and staging of fibrosis was performed according to the METAVIR scoring system, a histological scale used to quantify the degree of inflammation and fibrosis of a liver biopsy. "A" refers to the intensity of necrosis and inflammation and may vary from A0 to A3 (A0 = no activity, A1 = mild activity, A2 = moderate activity, and A3 = severe activity). "F" refers to the extent of fibrosis and may vary from F0 to F4 (F0 = no fibrosis, F1 = portal fibrosis without septa, F2 = portal fibrosis with rare septa, F3 = numerous septa without cirrhosis, and F4 = cirrhosis) [40]. Sirius Red stained sections were examined by semiautomatic computer-based morphometry using the NIKON DS-Fi2 camera and NIS Elements imaging software (Nikon, Japan). Morphometric analysis was made on one entire lobe section, measuring semi-automatically delineated Sirius Red stained zones (S1A Fig) and subtracting when present the egg area or unstained central granuloma area deprived of collagen deposition. All analyses were performed in a blinded manner.

### Statistics

Statistical analyses were performed using either GraphPad Prism version 5.00 (San Diego, CA) or JMP 9.0 (SAS, Cary, NC). Values are reported as means  $\pm$  standard deviation. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare uninfected and infected mice at each time point. The Kruskal-Wallis test was used to compare the METAVIR score or the percentage of Sirius Red stained zones among controls and diseased mice at 6 and 10 weeks after infection. Correlations between  $T_2$  values and METAVIR score or  $T_2$  values and fibrosis quantification by Sirius Red were performed using the Spearman test. The Smirnov test was used to compare distributions from two independent samples [41]. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

## Results

### Clinical follow-up

Weight control performed before each MRI session showed a continuous increase without significant difference between infected and control groups at any time point. No signs of general health alteration, such as cachexia, reduced mobility or behavioral changes were observed, suggesting animals were in good health condition during the study. All the animals of the first cohort exposed to the cercariae of *S. mansoni* were successfully infected as confirmed by MRI and histology at 6 weeks after infection, whereas only 4 out of 6 mice of the second cohort were successfully infected and developed hepatosplenic signs as shown by MRI and histology at 10 weeks after infection.

### *In vivo* MRI

All the images acquired were of good quality, except one  $T_2^*$  map obtained from a control animal of the second cohort, which showed motion artefacts and therefore was not included in the analysis. The two mice of the second cohort in which the infection had failed were also discarded from the analysis.

While no differences were detected between infected and control groups at 2 weeks post infection by anatomical MRI (Fig 1A) and relaxometry, anatomical MRI was able to detect signs related to murine schistosomiasis (Fig 1B–1D) as early as 6 weeks post infection. Indeed, hepatomegaly (Fig 1B), splenomegaly (Fig 1C), and portal hypertension (Fig 1D) as assessed by MRI were significant at 6 weeks: +19% ( $P = 0.0043$ ), +52% ( $P = 0.0087$ ) and +60% ( $P = 0.0087$ ) and progressed to +72% ( $P = 0.0095$ ), +170% ( $P = 0.0095$ ) and +139% ( $P = 0.0139$ ) 10 weeks post infection, respectively. The evolution of the portal vein diameter was similar to that of the cross-section (control:  $1.19 \pm 0.12$  mm, infected:  $1.25 \pm 0.13$  mm,  $P = 0.393$  at 2 weeks, control:  $1.17 \pm 0.19$  mm, infected:  $1.43 \pm 0.16$  mm,  $P = 0.027$  at 6 weeks, and control:  $1.16 \pm 0.10$  mm, infected:  $1.68 \pm 0.13$  mm,  $P = 0.004$  at 10 weeks). However, the most remarkable findings were multifocal hyperintensities (disseminated “white spots”) of the liver in 4 infected mice at 10 weeks post infection (Fig 1A). These hyperintensities were visible before contrast agent injection (Fig 2A), and were contrast-enhanced after injection.

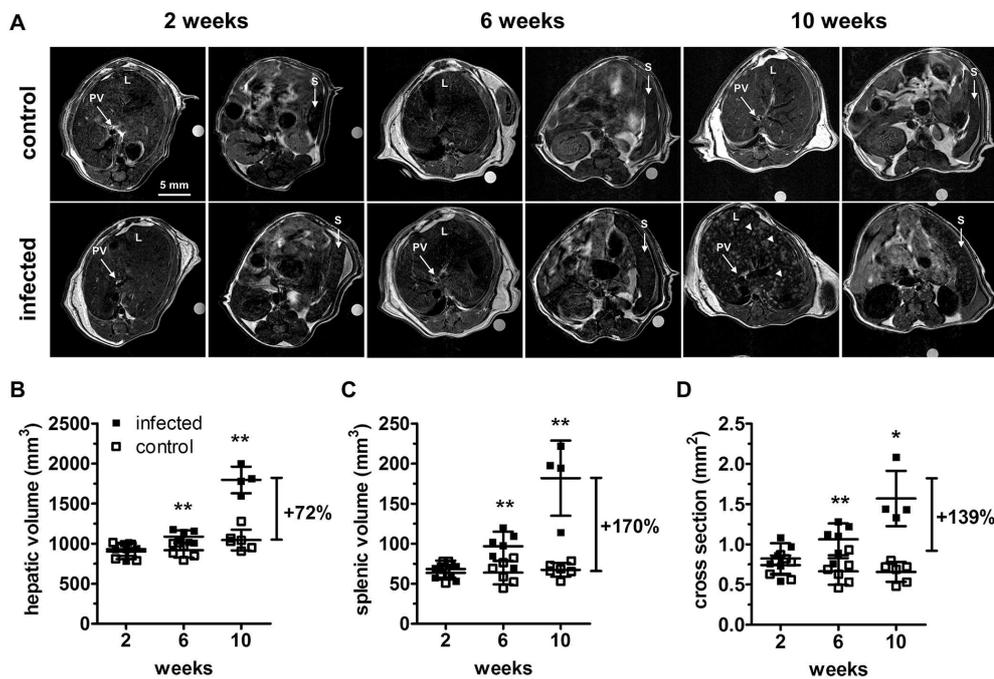
The average  $T_2$  value in hepatic ROIs (Fig 2A) at 10 weeks post infection was not significantly increased compared to the average  $T_2$  value in control livers (control:  $10.4 \pm 1.3$  ms, infected:  $12.2 \pm 1.5$  ms,  $P = 0.1714$ ). However, the distributions of hepatic  $T_2$  values in infected and control mice were different (Fig 2B). The area fraction with  $16 \text{ ms} < T_2 < 26 \text{ ms}$  was  $13.4 \pm 6.9\%$  in infected animals at 10 weeks, while it was  $1.1 \pm 1.0\%$  in control mice (Kruskal-Wallis test  $P = 0.0048$ ) (Fig 2C). Liver  $T_2$  values  $> 16$  ms on the  $T_2$  maps were co-localized with the hyperintensities on anatomical images (Fig 2D). The distributions of  $T_2^*$  values in the livers of infected mice were shifted to lower values at 6 weeks (average  $T_2^* = 5.4 \pm 1.5$  ms in infected mice versus  $T_2^* = 5.8 \pm 1.6$  ms in control mice) and at 10 weeks (average  $T_2^* = 4.6 \pm 1.5$  ms in infected mice versus  $T_2^* = 6.1 \pm 1.5$  ms in control mice) post infection (Fig 2E).

### Relaxometry of MRI solutions of collagen

Relaxometry studies performed on collagen solutions did not reveal any significant change of either  $T_1$  or  $T_2$  relaxation time with increasing collagen concentration (Fig 3).

### Histology

Histology showed that adult parasites (Fig 4A) and eggs began to lodge in the liver with minimal inflammation and occasionally with isolated periovular granulomas (S1B Fig) by 6 weeks



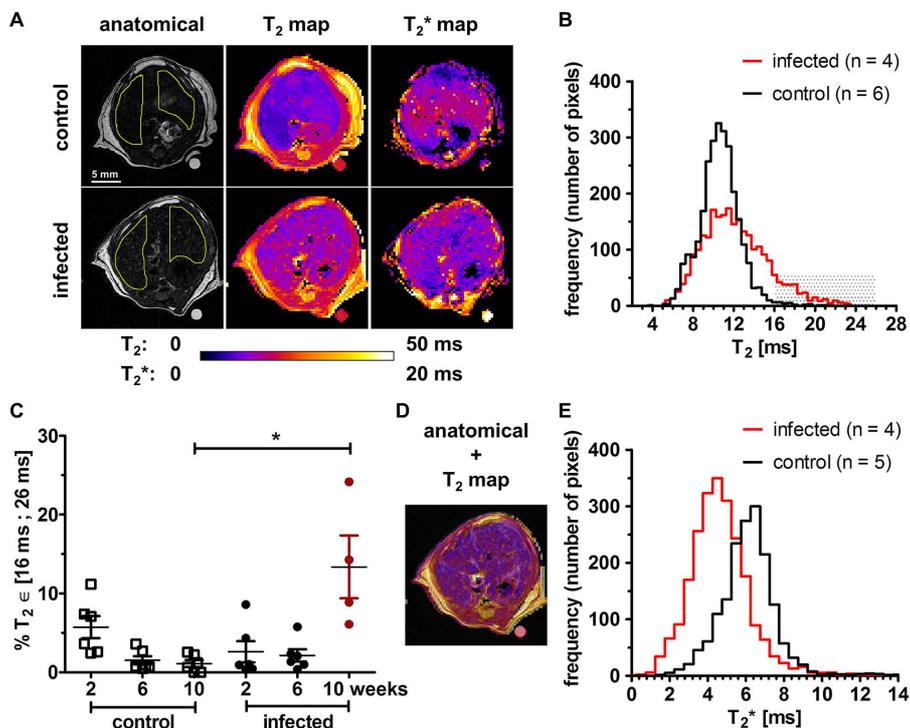
**Fig 1. MRI signs of organomegaly and portal hypertension.** (A) Comparison of contrast-enhanced anatomical MRI covering liver and spleen in a representative infected and a control mouse at 2, 6, and 10 weeks post infection. Two images are shown for each mouse, one centered on the liver and the portal vein (left image for each couple of images), and another one showing the spleen (right image). A multifocal liver and spleen damage is observable at 10 weeks. Spleen (vertical arrows), portal vein (oblique arrows), liver multifocal hyperintensities (arrowheads). The circular object is the external reference tube. Progressive increases in hepatic volume (B), spleen volume (C) and portal vein cross section (D) are detected from week 6 to 10 after infection. (\*P<0.05, \*\*P<0.01), filled squares = infected animals, empty squares = control animals. Abbreviations: L = liver, PV = portal vein, S = spleen.

doi:10.1371/journal.pntd.0004036.g001

post infection, corresponding to METAVIR scores  $\leq$  A1F0. All infected animals showed discrete periportal and portal inflammation at 6 weeks post infection but only one of them was considered A1F0. The number of eggs trapped in liver tissue dramatically increased thereafter. By 10 weeks post infection, 4 mice presented with severe portal fibrosis with granulomatous chronic inflammation, corresponding to METAVIR scores of A1F1 to A2F2 (Fig 4B–4H). Eggs were surrounded by a dense population of immune cells, with mild to marked extracellular matrix deposition leading to intergranulomatous fibrosis and fusion of several granulomas replacing some portal spaces (Fig 4E–4H).

In a large number of advanced stage granulomas, pigment accumulation in macrophages (S1C Fig), which appeared negative on the Perls' stain (S1D Fig), was present. This is highly suggestive of hemozoin, a degradation product of hemoglobin excreted by the worm [42]. Histology confirmed the absence of lesions in the two remaining mice in which the infection had failed; consequently these mice were excluded from analysis.

METAVIR score and area fraction of fibrosis stained with Sirius Red increased simultaneously from 6 weeks post infection on (Fig 5A and 5B) and were both significantly correlated



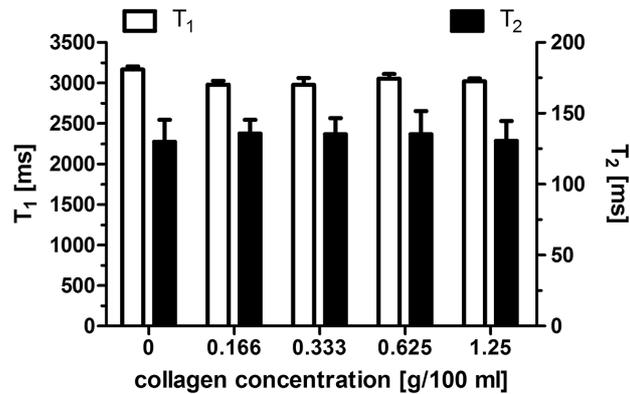
**Fig 2. Quantitative  $T_2$  and  $T_2^*$  mapping at 10 weeks post infection.** (A) Non contrast-enhanced anatomical,  $T_2$  and  $T_2^*$  maps for two representative mice from the control and the schistosomiasis group (color bar range: 0 to 50 ms for  $T_2$  maps, 0 to 20 ms for  $T_2^*$  maps). Spatial patterns of increased  $T_2$  and decreased  $T_2^*$  can be observed in the infected mouse. The external reference has an average  $T_2$  of  $21.55 \pm 0.25$  ms (2 weeks:  $21.74 \pm 0.22$  ms, 6 weeks  $21.64 \pm 0.65$  ms, 10 weeks:  $21.26 \pm 0.60$  ms,  $P = 0.1139$ ). Regions of interest (ROI) in the liver used for analysis are shown on the anatomical acquisitions. (B) At 10 weeks post infection the  $T_2$  distribution is enlarged ( $P < 0.01$ ) in infected ( $n = 4$ ) compared to control livers ( $n = 6$ ) with a fraction of values exceeding 16 ms. (C) The area fraction with  $T_2 \in [16 \text{ ms}; 26 \text{ ms}]$  is significantly increased at 10 weeks post infection compared with control mice (Dunn's Multiple Comparison Test  $P < 0.05$ ). The overlay (D) shows that hepatic regions with increased  $T_2$  co-localize with hyperintensities seen in the anatomical images prior to Gd-DOTA injection. These hyperintense lesions further enhance after Gd-DOTA injection, but organ displacement prevents pixelwise comparison with  $T_2$  maps. (E) Distributions of hepatic  $T_2^*$  values at 10 weeks post infection showing decreased  $T_2^*$  values ( $P < 0.01$ ) in the infected mice ( $n = 4$ ) compared to controls ( $n = 5$ ).

doi:10.1371/journal.pntd.0004036.g002

with the area fraction of  $T_2$  values comprised between 16 and 26 ms (Fig 5C and 5D) at 10 weeks after infection. Since control values obtained at 6 and 10 weeks for the METAVIR score or the Sirius Red staining were identical (A0F0, or 0% respectively), they were pooled in the statistical analysis (Fig 5A and 5B). The correlations obtained for the values measured at 6 and 10 weeks are shown in S2A and S2B Fig.

### Discussion

To our knowledge, this is the first time a murine model of schistosomiasis is evaluated by quantitative MRI. Anatomical MR images of *S. mansoni* infected mouse liver had already been published, but a systematic follow-up during disease development was not reported [43]. These



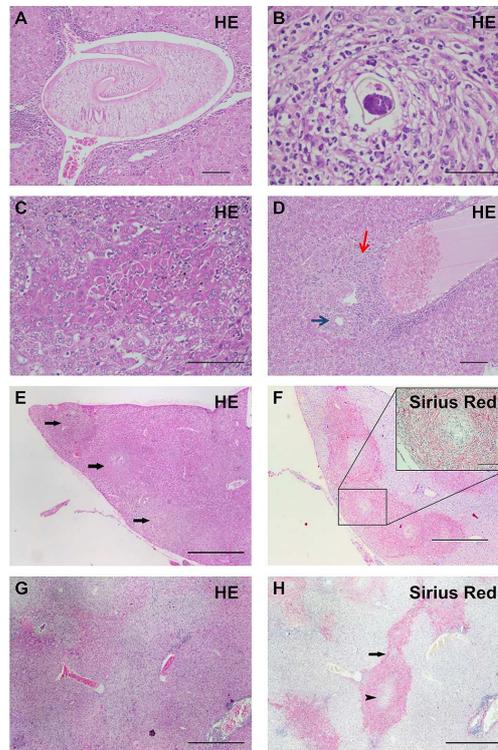
**Fig 3. Relaxometry of collagen solutions.** This figure shows the absence of significant variation of relaxation time-constants with collagen concentration.

doi:10.1371/journal.pntd.0004036.g003

images were obtained from a mouse infected with subcutaneous injection of 150 *cercariae*, while our model relies on the percutaneous administration of only 30 *cercariae*, replicating the natural route of infection and leading to a similar disease burden obtained with the injection of 150 *cercariae*. The pathological findings obtained with *in vivo* MRI in this model are in accordance with known features of the human disease, confirming its relevance to human disease. Volumetric analyses revealed hepato- and splenomegaly as well as portal vein cross section increase as early as 6 weeks post infection, and reliably detected aggravation of these signs during disease progression. These symptoms are unlikely to be a consequence of hepatic fibrosis, which was undetectable at 6 weeks post infection, but rather of vascular damage and obstruction caused by the schistosome eggs [7,44]. Hepatic tissue alteration and iron accumulation were detected 10 weeks post infection by MRI as T<sub>2</sub> and T<sub>2</sub><sup>\*</sup> changes, respectively, and were confirmed by histology.

From a technical point of view, the multiparametric MRI protocol used in this study was sensitive enough to monitor disease severity and identify infection failure in two out of 6 mice. In particular, the correlation with the area fraction of collagen stained with Sirius Red in liver histology shows that the transverse relaxation time T<sub>2</sub> can be used as a quantitative non-invasive biomarker of hepatic fibrosis.

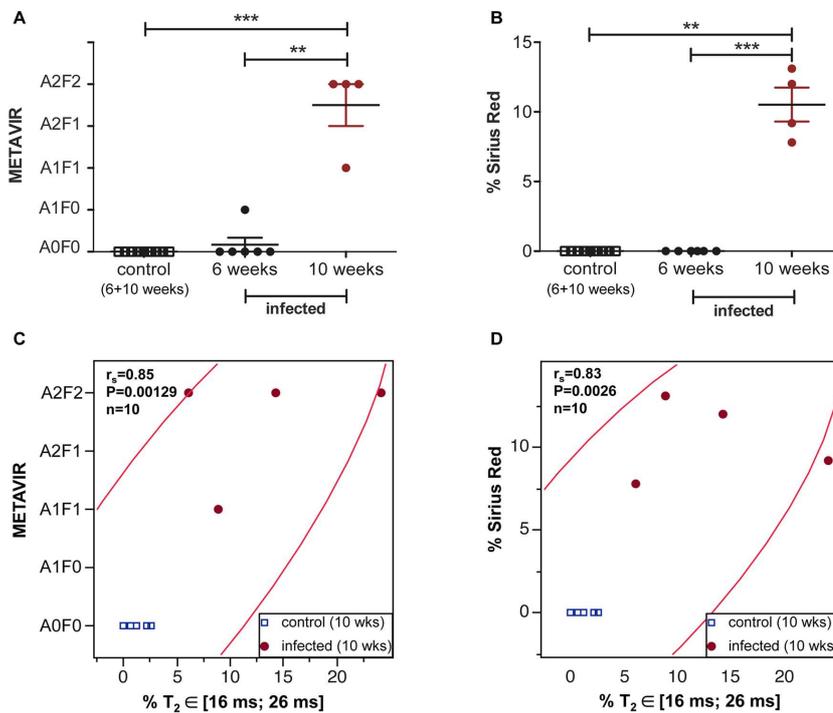
Few techniques are sensitive to potentially reversible early stages of liver fibrosis. All existing imaging approaches rely on the measurement of parameters that are only indirectly related to liver fibrosis (tissue stiffness, restricted water diffusion). Likewise, relaxation time constants depend on physicochemical properties that are altered during fibrogenesis. In *ex vivo* studies, correlation between transverse relaxation times and fibrosis has been controversial. For example, at 11.75T a T<sub>2</sub> decrease has been observed in a 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine induced mouse model of hepatic fibrosis [45]. But in another study at 0.94T a positive correlation between liver T<sub>2</sub> and degree of fibrosis was observed in a thioacetamide induced mouse model of liver cirrhosis [34]. It is known that the T<sub>2</sub> is a rather unspecific parameter, influenced by inflammation [34,46], edema, perfusion changes or steatosis [47]. Indeed, free water is characterized by a long T<sub>2</sub> (hundreds of ms) whereas lipids have much shorter T<sub>2</sub> values (tens of ms). In the vast majority of cases, severe hepatic fibrosis in human schistosomiasis is not



**Fig 4. Liver granulomatous pathology and fibrosis.** (A) Intravascular adult parasite at 6 weeks post infection (HE, scale bar 100  $\mu$ m). (B) to (H): 10 weeks post infection. (B) Granuloma centred on one egg (HE, scale bar 50  $\mu$ m). (C) Focal hepatocellular necrosis (HE, scale bar 100  $\mu$ m). (D) Periportal eosinophilic inflammation (red arrow) around a bile duct (blue arrow) (HE, scale bar 100  $\mu$ m). (E) and (F) Liver lobe allowing assessment of the extent of granulomatous chronic inflammation and hepatitis (arrows pointing at granulomas) in HE staining (E) and portal fibrosis with collagen deposition assessed with Sirius Red staining (F) (bar 500  $\mu$ m). Sirius Red facilitates quantification of extracellular matrix deposition of collagen within granulomas (zoom in F, bar 100  $\mu$ m). (G) and (H) Intergranulomatous fibrosis in HE staining (G) and Sirius Red staining (H) (arrowhead pointing at granuloma and arrow at intergranulomatous fibrosis) (scale bar 500  $\mu$ m). HE = Hematoxylin-Eosin.

doi:10.1371/journal.pntd.0004036.g004

associated with ultrasound detectable steatosis namely the accumulation of triglycerides in hepatocytes, except in patients with obesity or diabetes. Most subjects with severe disease are rather underweight. Moreover, liver metabolic profiling by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy revealed reduced levels of lipids in *S. mansoni* infected mice [48]. In agreement with previous results [49], our *in vitro* experiments show that collagen at concentrations up to 12.5 g/L does not significantly modify the relaxation times. The range of collagen concentrations tested in our phantom studies corresponds to those measured by biochemical techniques in whole-liver extracts of *S. mansoni*-infected mice at 8 weeks after infection with 50 cercariae (*S. mansoni* infected mice:  $10.3 \pm 1.60$  mg/g of wet liver, control mice:  $0.591 \pm 1.144$  mg/g of wet



**Fig 5. Correlation between relaxometric and histological markers of disease severity.** Disease severity as assessed by the METAVIR score (A) and the area fraction stained with Sirius Red for collagen (B) increases mainly 6 weeks after infection. The area fraction of liver  $T_2$  values between 16 and 26 ms obtained at 10 weeks after infection correlates with the METAVIR grading (C) and fibrosis quantification with Sirius Red staining (D). A 95% bivariate normal density ellipse is represented on each scatterplot. (The correlations obtained for the values measured at 6 and 10 weeks are shown in S2A and S2B Fig).

doi:10.1371/journal.pntd.0004036.g005

liver) [50]. However, deposition of collagen (Fig 4D) in the extracellular matrix in living tissue is accompanied by pathophysiological reactions that have a measurable effect on relaxation times [19]. We cannot discard the possibility that other components of the extra-cellular matrix, which accumulate during fibrogenesis, (fibronectin, elastin, proteoglycan, hyaluronan etc. . .) may contribute to  $T_2$  changes. Along the same line, it is not excluded that the observed  $T_2$  increase in the liver of *S. mansoni* infected mice is due to the decreased content of hepatic lipids [48], but further investigations are required.

In agreement with other *in vivo* MRI studies in animal models of hepatic fibrosis [35,36] and in humans [51], at 10 weeks post infection we observed a  $T_2$  increase superior to 14% compared to normal liver tissue. Although the  $T_2$  increase might be related to inflammation and edema, the hepatic  $T_2$  values were not yet increased 6 weeks after infection ( $10.4 \pm 2.4$  versus  $10.7 \pm 2.5$  ms in infected versus control mice) although histology revealed a discrete (A0–A1) portal inflammatory reaction at this stage of the disease, without any sign of fibrosis.

In contrast to previous works that assessed the alteration of the average  $T_2$  value in the presence of liver fibrosis [34,35,36,45], we quantified the area fraction of altered  $T_2$  on  $T_2$  maps of liver tissue. This measure was not performed in previous studies, despite a non-uniform

distribution of fibrosis in most cases and attempts to correlate quantitative MRI parameters to the area fraction of fibrosis observed in histology. Our results demonstrate that despite the lack of specificity of the  $T_2$  relaxation time, the area fraction of increased  $T_2$  in the liver is significantly correlated with the area fraction affected by fibrosis. The area fraction of increased  $T_2$  enabled us to differentiate between early and intermediate fibrosis stages (i.e. stages  $\leq$  F2).

### Study limitations

This exploratory study on a small number of animals aimed at evaluating a non-invasive MRI method for the assessment of liver fibrosis progression. A limitation of this study is that different animal groups were used at the last two imaging time points, due to the fact that a validation by histology was mandatory. A longitudinal study on the same group of animals up to a time point beyond 10 weeks post infection would be desirable.

### Advantages

For disease monitoring and treatment evaluation in small animals  $T_2$  mapping is easy to implement and less challenging than transient elastography or MRE. Indeed, this technique does not require the use of additional equipment such as vibrators and sequences for relaxometry are readily available on standard pre-clinical MRI systems.

Magnetic resonance relaxometry has the advantage of being quantitative without any contrast agent injection that could interfere with biological parameters and alter disease development. However, administration of a commercially available nonspecific extracellular contrast agent such as Gd-DOTA enhanced the lesions, demonstrating increased vessel permeability.

The quantitative  $T_2$  and  $T_2^*$  maps performed in this study allow further optimization of image weighting parameters for future studies on schistosomiasis.

### Conclusion

$T_2$  mapping is a quantitative and non-invasive marker of non-steatotic liver fibrosis with sensitivity close to that of histology even at early stages.

This multiparametric and quantitative MRI approach can monitor hepatic and splenic disease progression and assess liver fibrosis non-invasively. In preclinical studies and in settings where MRI facilities are readily available, this objective quantitative imaging biomarker may be used to monitor response to therapy in diseases involving hepatic fibrosis.

### Supporting Information

**S1 Fig. Liver granulomatous pathology and fibrosis.** **A:** Morphometrical analysis of fibrosis (Sirius Red, scale bar 500  $\mu$ m). **B:** Periovascular granuloma with eosinophilic and lymphoplasmocytic infiltration without collagen deposition 6 weeks post infection (HE, scale bar 50  $\mu$ m). **C:** Granuloma with multinucleate giant cells (arrows) containing brown pigment 10 weeks post infection (HE, scale bar 50  $\mu$ m). **D:** Negative Perls' reaction confirms Hematin deposits within a granuloma (Perls' stain, scale bar 100  $\mu$ m). HE = Hematoxylin-Eosin. (TIF)

**S2 Fig. Correlation between relaxometric and histological markers of disease severity for values obtained at 6 weeks and 10 weeks after infection.** The area fraction of liver  $T_2$  values between 16 and 26 ms obtained at 6 and 10 weeks after infection correlates with the METAVIR grading (A) and fibrosis quantification with Sirius Red staining (B). A 95% bivariate normal density ellipse is represented on each scatterplot. (TIF)

## Acknowledgments

We thank Sandrine Cabantous for technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AV TAPB AD MB. Performed the experiments: BM TAPB AV CL HD. Analyzed the data: BM TAPB CL. Contributed reagents/materials/analysis tools: AD MB AV TAPB. Wrote the paper: TAPB AV BM AD.

## References

- [Internet] WHO (2015) Weekly Epidemiological Record, 30 January 2015, vol. 90, 5 (pp. 25–32). Geneva, Switzerland: World Health Organization. PMID: [25638822](#)
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L (2006) Human schistosomiasis. *Lancet* 368: 1106–1118. PMID: [16997665](#)
- Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, et al. (2002) Schistosomiasis. *N Engl J Med* 346: 1212–1220. PMID: [11961151](#)
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH (2014) Human schistosomiasis. *Lancet* 383: 2253–2264. doi: [10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](#) PMID: [24698483](#)
- Boros DL (1989) Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microbiol Rev* 2: 250–269. PMID: [2504481](#)
- Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134: 1655–1669. doi: [10.1053/j.gastro.2008.03.003](#) PMID: [18471545](#)
- Andrade ZA (2009) Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol* 31: 656–663. doi: [10.1111/j.1365-3024.2009.01157.x](#) PMID: [19825105](#)
- Dessein AJ, Hillaire D, Elwali NE, Marquet S, Mohamed-Ali Q, et al. (1999) Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. *Am J Hum Genet* 65: 709–721. PMID: [10441577](#)
- Badawi AF, Michael MS (1999) Risk factors for hepatocellular carcinoma in Egypt: the role of hepatitis B viral infection and schistosomiasis. *Anticancer Res* 19: 4565–4569. PMID: [10650811](#)
- Salvador-Recatala V, Greenberg RM (2012) Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 1: 85–93. PMID: [22347719](#)
- Ferreira MS, de Oliveira RN, de Oliveira DN, Esteves CZ, Allegretti SM, et al. (2015) Revealing praziquantel molecular targets using mass spectrometry imaging: an expeditious approach applied to *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 45: 385–391. doi: [10.1016/j.ijpara.2014.12.008](#) PMID: [25812833](#)
- McManus DP, Loukas A (2008) Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 21: 225–242. doi: [10.1128/CMR.00046-07](#) PMID: [18202444](#)
- Siddiqui AA, Siddiqui BA, Ganley-Leal L (2011) Schistosomiasis vaccines. *Hum Vaccin* 7: 1192–1197. doi: [10.4161/hv.7.11.17017](#) PMID: [22048120](#)
- Skelly PJ (2013) The use of imaging to detect schistosomes and diagnose schistosomiasis. *Parasite Immunol* 35: 295–301. doi: [10.1111/pim.12040](#) PMID: [23647173](#)
- Olveda DU, Olveda RM, Lam AK, Chau TN, Li Y, et al. (2014) Utility of Diagnostic Imaging in the Diagnosis and Management of Schistosomiasis. *Clin Microbiol* 3. PMID: [25110719](#)
- Esmat G, Elsharkawy A, El Akel W, Fouad A, Helal K, et al. (2013) Fibroscan of chronic HCV patients coinfecting with schistosomiasis. *Arab J Gastroenterol* 14: 109–112. doi: [10.1016/j.ajg.2013.07.001](#) PMID: [24206738](#)
- Bastard C, Bosisio MR, Chabert M, Kalopissis AD, Mahrouf-Yorgov M, et al. (2011) Transient micro-elasticity: A novel non-invasive approach to measure liver stiffness in mice. *World J Gastroenterol* 17: 968–975. doi: [10.3748/wjg.v17.i8.968](#) PMID: [21448348](#)
- Martinez SM, Crespo G, Navasa M, Forns X (2011) Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 53: 325–335. doi: [10.1002/hep.24013](#) PMID: [21254180](#)
- Lambertucci JR, dos Santos Silva LC, Andrade LM, de Queiroz LC, Carvalho VT, et al. (2008) Imaging techniques in the evaluation of morbidity in schistosomiasis mansoni. *Acta Trop* 108: 209–217. doi: [10.1016/j.actatropica.2008.07.009](#) PMID: [18760990](#)
- Huwart L, Peeters F, Sinkus R, Annet L, Salameh N, et al. (2006) Liver fibrosis: non-invasive assessment with MR elastography. *NMR Biomed* 19: 173–179. PMID: [16521091](#)

21. Yin M, Woollard J, Wang X, Torres VE, Harris PC, et al. (2007) Quantitative assessment of hepatic fibrosis in an animal model with magnetic resonance elastography. *Magn Reson Med* 58: 346–353. PMID: [17654577](#)
22. Ichikawa S, Motosugi U, Morisaka H, Sano K, Ichikawa T, et al. (2015) Comparison of the diagnostic accuracies of magnetic resonance elastography and transient elastography for hepatic fibrosis. *Magn Reson Imaging* 33: 26–30. doi: [10.1016/j.mri.2014.10.003](#) PMID: [25308096](#)
23. Chen J, Talwalkar JA, Yin M, Glaser KJ, Sanderson SO, et al. (2011) Early detection of nonalcoholic steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease by using MR elastography. *Radiology* 259: 749–756. doi: [10.1148/radiol.11101942](#) PMID: [21460032](#)
24. Aguirre DA, Behling CA, Alpert E, Hassanein TI, Sirlin CB (2006) Liver fibrosis: noninvasive diagnosis with double contrast material-enhanced MR imaging. *Radiology* 239: 425–437. PMID: [16641352](#)
25. Polasek M, Fuchs BC, Uppal R, Schuhle DT, Alford JK, et al. (2012) Molecular MR imaging of liver fibrosis: a feasibility study using rat and mouse models. *J Hepatol* 57: 549–555. doi: [10.1016/j.jhep.2012.04.035](#) PMID: [22634342](#)
26. Fuchs BC, Wang H, Yang Y, Wei L, Polasek M, et al. (2013) Molecular MRI of collagen to diagnose and stage liver fibrosis. *J Hepatol* 59: 992–998. doi: [10.1016/j.jhep.2013.06.026](#) PMID: [23838178](#)
27. Annet L, Peeters F, Abarca-Quinones J, Leclercq I, Moulin P, et al. (2007) Assessment of diffusion-weighted MR imaging in liver fibrosis. *J Magn Reson Imaging* 25: 122–128. PMID: [17154179](#)
28. Sandrasegaran K, Akisik FM, Lin C, Tahir B, Rajan J, et al. (2009) Value of diffusion-weighted MRI for assessing liver fibrosis and cirrhosis. *AJR Am J Roentgenol* 193: 1556–1560. doi: [10.2214/AJR.09.2436](#) PMID: [19933647](#)
29. Do RK, Chandarana H, Felker E, Hajdu CH, Babb JS, et al. (2010) Diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis with diffusion-weighted imaging: value of normalized apparent diffusion coefficient using the spleen as reference organ. *AJR Am J Roentgenol* 195: 671–676. doi: [10.2214/AJR.09.3448](#) PMID: [20729445](#)
30. Le Bihan D, Turner R (1991) Intravoxel incoherent motion imaging using spin echoes. *Magn Reson Med* 19: 221–227. PMID: [1881307](#)
31. Yoon JH, Lee JM, Baek JH, Shin CI, Kiefer B, et al. (2014) Evaluation of hepatic fibrosis using intravoxel incoherent motion in diffusion-weighted liver MRI. *J Comput Assist Tomogr* 38: 110–116. doi: [10.1097/RCT.0b013e3182a589be](#) PMID: [24378888](#)
32. Hu G, Chan Q, Quan X, Zhang X, Li Y, et al. (2014) Intravoxel incoherent motion MRI evaluation for the staging of liver fibrosis in a rat model. *J Magn Reson Imaging*.
33. Ichikawa S, Motosugi U, Morisaka H, Sano K, Ichikawa T, et al. (2014) MRI-based staging of hepatic fibrosis: Comparison of intravoxel incoherent motion diffusion-weighted imaging with magnetic resonance elastography. *J Magn Reson Imaging*.
34. Kreft B, Dombrowski F, Block W, Bachmann R, Pfeifer U, et al. (1999) Evaluation of different models of experimentally induced liver cirrhosis for MRI research with correlation to histopathologic findings. *Invest Radiol* 34: 360–366. PMID: [10226849](#)
35. Aube C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, et al. (2007) Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci* 52: 2601–2609. PMID: [17429735](#)
36. Chow AM, Gao DS, Fan SJ, Qiao Z, Lee FY, et al. (2012) Measurement of liver T(1) and T(2) relaxation times in an experimental mouse model of liver fibrosis. *J Magn Reson Imaging* 36: 152–158. doi: [10.1002/jmri.23606](#) PMID: [22334510](#)
37. Engelhardt R, Langkowski JH, Fischer R, Nielsen P, Kooijman H, et al. (1994) Liver iron quantification: studies in aqueous iron solutions, iron overloaded rats, and patients with hereditary hemochromatosis. *Magn Reson Imaging* 12: 999–1007. PMID: [7997105](#)
38. Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, et al. (2001) Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur Heart J* 22: 2171–2179. PMID: [11913479](#)
39. Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, Deslex P, Keenan C, et al. (2003) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—part 1. *Exp Toxicol Pathol* 55: 91–106. PMID: [14620530](#)
40. Bedossa P, Poynard T (1996) An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The META-VIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 24: 289–293. PMID: [8690394](#)
41. Smirnov NV (1939) Estimate of deviation between empirical distribution functions in two independent samples. *Bulletin Moscow University* 2: 3–16.
42. Truscott M, Evans DA, Gunn M, Hoffmann KF (2013) *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion. *Infect Immun* 81: 133–142. doi: [10.1128/IAI.00701-12](#) PMID: [23090958](#)

43. Kosaka M, Owatari N, Seo Y, Kawakubo H, Harada S, et al. (2000) In vivo NMR micro-imaging of kidney and liver of mouse at 9.4 T. *Jpn J Physiol* 50: 463–467. PMID: [11082546](#)
44. Voieta I, de Queiroz LC, Andrade LM, Silva LC, Fontes VF, et al. (2010) Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni in Brazil: a comparative study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 414–421. PMID: [20721484](#)
45. Anderson SW, Jara H, Ozonoff A, O'Brien M, Hamilton JA, et al. (2012) Effect of disease progression on liver apparent diffusion coefficient and T2 values in a murine model of hepatic fibrosis at 11.7 Tesla MRI. *J Magn Reson Imaging* 35: 140–146. doi: [10.1002/jmri.22807](#) PMID: [21990020](#)
46. Maillard SM, Jones R, Owens C, Pilkington C, Woo P, et al. (2004) Quantitative assessment of MRI T2 relaxation time of thigh muscles in juvenile dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 43: 603–608.
47. Cheng HL, Stikov N, Ghugre NR, Wright GA (2012) Practical medical applications of quantitative MR relaxometry. *J Magn Reson Imaging* 36: 805–824. doi: [10.1002/jmri.23718](#) PMID: [22987758](#)
48. Li JV, Holmes E, Saric J, Keiser J, Dirnhofer S, et al. (2009) Metabolic profiling of a *Schistosoma mansoni* infection in mouse tissues using magic angle spinning-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Int J Parasitol* 39: 547–558. doi: [10.1016/j.ijpara.2008.10.010](#) PMID: [19068218](#)
49. Takeuchi M, Sekino M, Iriguchi N, Ueno S (2004) Dependence of the spin-spin relaxation time of water in collagen gels on collagen fiber directions. *Magn Reson Med Sci* 3: 153–157. PMID: [16093633](#)
50. Wu CH, Giambone MA, Howard DJ, Rojkind M, Wu GY (1982) The nature of the collagen in hepatic fibrosis in advanced murine schistosomiasis. *Hepatology* 2: 366–371. PMID: [7076120](#)
51. Siqueira L, Chew M, Hahn PF, Boland G, White LT, et al. T2 relaxation time as a surrogate marker of liver fibrosis; 2010; Stockholm, Sweden.

## 2. Commentaire sur notre article de recherche

The question then becomes how can malaria be reimagined and what are the benefits once it is? The methodology of photovoice is one such approach that can help broaden both our imagination of and ways of dealing with different versions of malaria that exist in local contexts [5]. Photovoice involves participants taking photos of aspects of their lives or social realities. They then select, reflect on, and discuss images in groups to raise emergent issues, themes, and theories and use their findings to make individual or community level changes [9–11]. For example, a study conducted with school-going students in a malaria-endemic area of the Philippines showed how photovoice can successfully be used to depict different local malaras and guide the development of equally varied, community-driven and locally relevant responses [5]. Participants from the Palawan community made no reference to parasites and instead took pictures that reflected local understandings of causes of malaria as well as locally relevant practices that they felt could potentially help alleviate it.

In addition to providing a useful way to depict malaria realities and associated practices, photovoice also had a potentially transformative effect [5]. The process of making and sharing photographs seemed to change the role of young people in promoting not only their own health but also that of their families. Photovoice is considered to be such an effective method for initiating change because of its ability to empower individuals [9–11]. What is crucial here is that photography transfers some power to participants who are able to capture different types of contextual malaria and then use images to create outputs such as posters and exhibitions that facilitate them to reimagine malaria for themselves, in ways that fit their particular context.

There is no doubt that biomedicine has made an enormous and important contribution to reducing malaria. However, the biomedical understanding of the parasite

and its associated images represent only one version of malaria; one that has developed in a specific temporal and spatial milieu and has been propagated through mechanisms of power. Rather than starting with this conception and trying to understand how contextual factors affect it (as background shapers, determinants, factors, etc.), it may be prudent to begin with the contextual factors themselves to gain a better understanding of how different settings create different conceptions. Ethnographic research provides a useful means to start with and understand context. It can be particularly powerful when it is participatory in nature and involves including local communities as active researchers as photovoice does.

The benefits of integrating such methods and understandings early on in research are that they can yield important insights regarding whether or not and in what ways biomedical understandings and techniques align with, and can potentially be better integrated into, existing local realities. By loosening the reins of power, other images, understandings, and approaches can be brought into the picture that potentially help to more effectively address malaria in all its guises.

### Acknowledgments

This research was supported by the UK Economic and Social Research Council through a Doctoral Training Grant. The project was also supported by grants from the Parkes Foundation, Biosocial Society, Photovoice UK, and the University of Durham Student Projects and Initiatives Scheme.

<sup>1</sup>Department of Anthropology, Durham University, Durham, UK

\*Correspondence: Dalia.Iskander@durham.ac.uk (D. Iskander).  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.002>

### References

1. Jones, C.O.H. and Williams, H.A. (2004) The social burden of malaria: what are we measuring? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 156–161
2. Mol, A. (2002) *The Body Multiple: Ontology in Medical Practice*. Duke University Press
3. Kelly, A.H. and Beisel, U. (2011) Neglected malaras: the frontlines and back alleys of global health. *Biosocieties* 6, 71–87

4. Hausmann-Muela, S. and Eckl, J. (2015) Re-imagining malaria – a platform for reflections to widen horizons in malaria control. *Malar. J.* 14, 180
5. Iskander, D. (2015) Re-imagining malaria in the Philippines: how photovoice can help to re-imagine malaria. *Malar. J.* 14, 257
6. World Health Organization (2014) *World Malaria Report 2014*. World Health Organization
7. Starr, P. (1982) *The Social Transformation of Medicine*. Basic Books
8. Rose, N. (2006) *The Politics of Life Itself: Biomedicine, Power, and Subjectivity in the Twenty-First Century*. Princeton University Press
9. Wang, C. (1999) Photovoice: a participatory action research strategy applied to women's health. *J. Womens Health* 8, 185–192
10. Wang, C. and Burris, M. (1997) Photovoice: concept, methodology, and use for participatory needs assessment. *Health Educ. Behav.* 24, 369–387
11. Wang, C. et al. (1998) Photovoice as a participatory health promotion strategy. *Health Promot. Int.* 13, 75–86

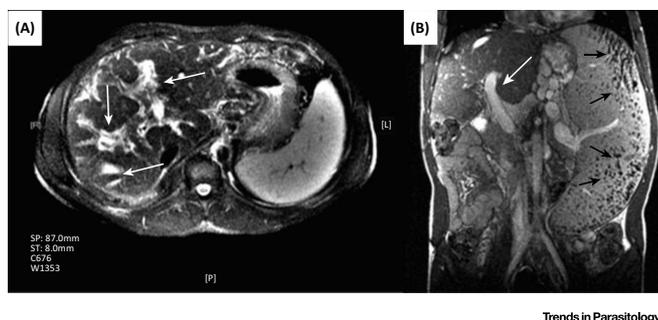
### Spotlight

#### *In Vivo* MRI Assessment of Experimental Schistosomiasis

José Roberto Lambertucci,<sup>1,\*</sup> Marcelo Mamede,<sup>2</sup> and Thiago A. Pereira<sup>1</sup>

**A new study using magnetic resonance imaging (MRI) evaluated successfully the transverse relaxation time T2 as a non-invasive imaging biomarker for monitoring hepatic fibrogenesis in schistosomiasis. However, there are some drawbacks that need special attention. This preliminary data opens new opportunities to understand and monitor liver fibrosis in schistosomiasis and other fibrogenic diseases.**

Magnetic resonance imaging (MRI) is a noninvasive medical imaging technique used in radiology to visualize detailed internal structures of the human body. MRI provides a much greater contrast between different soft tissue structures



**Figure 1. Magnetic Resonance Imaging (MRI) Images of Two Cases of Hepatosplenic Schistosomiasis Mansoni.** (A) Hepatosplenic schistosomiasis in a 37-year-old man. Axial T2 showing periportal alterations indicative of periportal fibrosis with enhancement after intravenous contrast injection (white arrows). (B) Hepatosplenic schistosomiasis in a 42-year-old male, T2 weighted image in the coronal plane showing splenomegaly and Gamma-Gandy bodies (black arrows) that appeared as foci of low signal intensity or signal void. The portal vein was seen to be patent (white arrow).

of the body than computed tomography (CT). In contrast to CT scans, which uses ionizing radiation to generate images, MRI employs radio-frequency waves and strong magnetic fields to excite atoms in different organs, which is thought to be harmless to the patient. Contrast agents may be injected intravenously to enhance the appearance of blood vessels, tumors or inflammation. The MRI relaxometry methodology used by Mais *et al.* [1] has been applied in humans with promising results [2]. This methodology can estimate proton density fat fraction of the entire liver and correlates with measurements done with MRI spectroscopy (used only in a small region of interest). In addition, this methodology can be applied on a clinical MRI workstation, whereas MRI spectroscopy requires expensive devices for use. Another important application of MRI, the magnetic resonance angiography (MRA) has been used to create a clear picture of the vessels, which may help the surgeon to plan in advance the best surgical approach to portal hypertension in schistosomiasis.

Of note, MRI reproduces the pathological findings of Symmers' fibrosis in humans

more clearly than other imaging techniques and is naturally less invasive and time-consuming than histology (Figure 1) [3]. The MRI images are similar to those described by a pathologist when the liver is transversally cut during autopsy. In addition, it is superior in the identification of portal vessels and collaterals, the biliary tract, and portal vein thrombosis. Patients with advanced hepatosplenic schistosomiasis usually present severe portal hypertension, gastroesophageal varices, hypersplenism, pulmonary hypertension, and glomerulonephritis. The presence of micronodules in the acute phase of the disease is also noteworthy [4].

Three well-defined syndromes caused by schistosomiasis mansoni have been described: acute, intestinal and hepatosplenic [4,5]. The disease is mostly due to deposited eggs in host tissue by the adult female worms, which induce inflammatory and fibrotic lesions in host organs. Acute schistosomiasis is a serum sickness-like syndrome that occurs 3–9 weeks after infection. This period coincides with the onset of egg production. After 9 weeks, the intestinal syndrome is dominated by inflammation and fibrosis in the intestines,

liver, lungs and other organs. The acute granuloma is large and diffuse, whereas the chronic granuloma is smaller and better circumscribed and surrounded by macrophages, lymphocytes, fibrosis and multinucleated giant cells. Clinically acute and intestinal syndromes are latent and infected patients are usually asymptomatic. Up to 10% of the infected patients in endemic areas develop the hepatosplenic form. In this syndrome, the main pathological findings are fibrosis in the portal tracts of the liver with pylephlebitis and peripylephlebitis caused by schistosoma ova [6]. Symmers' pipe-stem fibrosis is a periportal fibrosis without bridging, nodular formation, or significant hepatocellular destruction. Granulomas around ova can be seen in abundance in the portal spaces and are much smaller than in the early stages. After cessation of parasitic activity they may disappear completely but fibrosis persists [4,5].

In schistosomiasis mansoni, the intensity of liver fibrosis, evaluated by MRI and liver histology, does not always follow the severity of portal hypertension. In few cases we have found slight liver fibrosis and severe portal hypertension. It has been speculated that liver fibrosis may decrease with aging; there is also destruction of collagen in particular cases (e.g., use of anti-fibrosis drugs). In an excellent recent review, Bosh *et al.* [7] showed that portal hypertension is not a phenomenon caused only by vessel obstruction but also by many other mediators (vasodilatory substances deficiency or vasoconstrictors excess, deficiency of nitric oxide availability, endothelial dysfunction, contraction of activated hepatic pericyte-like stellate and the implication of prostanoids). These mediators could produce and maintain portal hypertension even after decreasing liver fibrosis.

The superiority of MRI in diagnosing hepatosplenic schistosomiasis compared with other imaging techniques is self-evident and a few studies have compared the findings using ultrasound, histology and

computerized tomography [3]. The time has come for the World Health Organization (WHO) to reevaluate the whole of MRI in schistosomiasis, because WHO still considers ultrasound the gold standard imaging procedure to diagnose and classify hepatosplenic schistosomiasis.

In regard to the report of murine schistosomiasis recently published [1], the authors are to be congratulated for the attempt to reproduce the disease in animals. However, there are some drawbacks that need special attention. The work raises a series of questions: (1) conclusions based on small sample size of infected animals and which survived; (2) short time-point for sacrifice (10 weeks after infection it is not enough for the disease to develop liver alterations similar to those described in humans with Symmer's fibrosis); (3) the definition of hepatosplenic schistosomiasis in this murine model (hepatosplenomegaly is common in animals in the acute phase of the disease even with dilation of portal vein; thus, infection after 10 weeks cannot define those findings as hepatosplenic schistosomiasis – referred occasionally in the paper); (4) it is not certain whether the collagen types developed at the early stage of the infection in mice are equivalent to fibrosis described in humans; and (5) the use of METAVIR to measure fibrosis in murine schistosomiasis does not seem appropriate in this case. METAVIR is a score to grade fibrosis and inflammation in humans and used for evaluating chronic hepatitis C [8]. The major features to grade activity are the presence of piecemeal necrosis and lobular necrosis and this is not a find in schistosomiasis [5,8]. A revalidation of METAVIR for animals is paramount and this was not discussed by the authors [1].

It has been estimated that after schistosomal infection it takes 5–10 years for a patient to develop hepatosplenic schistosomiasis. Likewise, to our knowledge, it

takes many weeks (16–20) to mice infected by *Schistosoma mansoni* with a single couple of worms to develop a picture equivalent to hepatosplenic schistosomiasis described in humans [9,10].

The pursuit of this line of research is welcome. The objective of using the relaxation time T2 as a non-invasive imaging biomarker for monitoring hepatic fibrogenesis is an important contribution. Even if the mouse model of schistosomiasis *mansoni* used in [1] has, in our opinion, clear limitations, the authors brought new ideas to the study of experimental imaging techniques in mice with liver fibrosis.

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Department of Anatomy and Imaging, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

\*Correspondence: jr Lambertucci (J.R. Lambertucci).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.003>

#### References

- Mais, B. et al. (2015) *In vivo* MRI assessment of hepatic and splenic disease in a murine model of schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 22, e0004036
- Noureddin, M. et al. (2013) Utility of magnetic resonance imaging versus histology for quantifying changes in liver fat in nonalcoholic fatty liver disease trials. *Hepatology* 58, 1930–1940
- Voleta, I. et al. (2010) Imaging techniques and histology in the evaluation of liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis *mansoni* in Brazil: a comparative study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 414–421
- Lambertucci, J.R. (2010) Acute schistosomiasis *mansoni*: revisited and reconsidered. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 422–435
- Lambertucci, J.R. (1993) *Schistosoma mansoni*: pathological and clinical aspects. In *Schistosoma mansoni: pathological and clinical aspects* (Jordan, P., Webbe, F. and Sturrock, R.F., eds), pp. 196–235. Wallingford Oxon UK, Cab International
- Symmers, W.S.C. (1904) Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. *Pathol. Bacteriol.* 9, 237–239
- Bosch, J. et al. (2015) Evolution in the understanding of the pathophysiological basis of portal hypertension: how changes in paradigm are leading to successful new treatments. *J. Pathol.* 62, S121–S130
- Bedossa, P. et al. (1996) An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology* 24, 289–293
- Lambertucci, J.R. et al. (2000) *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Tropica* 77, 101–109
- Andrade, Z.A. et al. (1997) An experimental approach to the pathogenesis of "pipestem" fibrosis (Symmer's fibrosis of the liver). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 699–706

## Spotlight Glycophorins, Blood Groups, and Protection from Severe Malaria

Samuel C. Wassmer<sup>1,\*</sup> and  
Jane M. Carlton<sup>2</sup>

**In Malawi, *Malungo alibe odi* is a saying that translates as: 'Malaria does not ask permission before coming in'. The recent finding of a new severe malaria resistance locus next to a cluster of glycophorin genes involved in *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion seems to suggest otherwise: that evolutionary pressure is enabling erythrocytes to lock the door to keep malaria out.**

Human glycophorins and their effect on resistance to malaria has been a focus of attention for several years. Glycophorins are erythrocyte membrane proteins rich in sialic acids that carry blood group antigenic determinants, but also act as receptors for various intracellular pathogens. During the *Plasmodium* intra-erythrocytic cycle, the invasive merozoite stage of the parasite uses several glycophorins to penetrate erythrocytes. The glycophorin A (GYPA) and glycophorin B (GYPB) receptors are recognized by *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding antigen 175 (EBA-175) and erythrocyte-binding ligand 1 (EBL-1), respectively; amino acid variation in GYPA and GYPB determines the MN and Ss blood groups. By contrast, glycophorin C (not homologous to GYPA and GYPB) codes for the Gerbich (Ge) blood group antigens, and also acts as a receptor for *P. falciparum* invasion, recognizing EBA-140 on the surface of merozoites (Figure 1A).



### **3. Revue de littérature à soumettre**

#### **Hepatosplenic Schistosomiasis Imaging: Advances, Challenges and Perspectives**

Brice Masi<sup>1,2</sup>, Teodora-Adriana Perles-Barbacaru<sup>1,2</sup>, Monique Bernard<sup>1,2</sup>, and Angèle Viola<sup>1,2\*</sup>

1-Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale-Unité Mixte de Recherche 7339, Aix-Marseille Université, Marseille, France.

2-Unité Mixte de Recherche 7339, Centre National de la Recherche Scientifique, Marseille, France.

\*Corresponding author

E-mail: [angele.viola@univ-amu.fr](mailto:angele.viola@univ-amu.fr)

## **List of abbreviations:**

ADC: apparent diffusion coefficient  
ARFI: acoustic radiation force impulse elastography  
ASL: arterial spin labelling  
BLI: bioluminescence imaging  
CA: contrast agent  
CCD: charge-coupled device  
CEUS: contrast-enhanced ultrasonography  
CT: computed tomography  
DWI: diffusion-weighted imaging (MRI technique)  
ECM: Extracellular matrix  
(<sup>18</sup>F)FDG: deoxy-2-(<sup>18</sup>F)fluoro-D-glucose  
FMT: Fluorescence molecular tomography  
HCV: hepatitis C virus  
HSC: hepatic stellate cell  
HVPG: hepatic venous pressure gradient  
LSM: liver stiffness measurement  
USG: ultrasonography  
MMP: matrix metalloproteinase  
MR: magnetic resonance  
MRA: magnetic resonance angiography  
MRE: magnetic resonance elastography  
MRS: magnetic resonance spectroscopy  
PET: positron emission tomography  
PV: portal vein  
RF: radiofrequency  
RN: radionuclide  
SPECT: single-photon emission computed tomography  
TIMP: tissue inhibitor of metalloprotease

## **Abstract:**

Schistosomiasis, a helminthic disease, is the second neglected tropical disease in the world and a major cause of chronic morbidity, disability, and premature death. The hepatosplenic form of the disease is characterized by hepatosplenomegaly, liver fibrosis, periportal hypertension and oesophageal varices, whose rupture may cause bleeding and death. In this review, we describe the imaging modalities currently available for the diagnosis and follow-up of hepatosplenic schistosomiasis and summarize their advantages and weaknesses for the assessment of liver fibrosis and portal hypertension. We give an overview of new imaging methods used in the clinical research setting that could potentially be used for assessing hepatosplenic schistosomiasis. We provide a comprehensive view of preclinical imaging studies of experimental schistosomiasis and explain how they could contribute to a better recognition of hepatosplenic schistosomiasis and assessment of new therapeutic strategies targeting fibrosis.

## Introduction

Schistosomiasis, a neglected tropical disease is present in Africa, South America, South East Asia, and Middle East. Furthermore, a rise in imported cases in Europe due to travellers and immigrants and an outbreak of schistosomiasis in France<sup>1</sup> have recently been reported. This helminthic disease is a major cause of chronic morbidity, disability, and premature death. Sub-saharan Africa has the highest endemicity and the heaviest disease burden. Young children are particularly vulnerable to schistosomiasis, which causes growth retardation and cognitive impairment. In 2016, the World Health Organization estimated that at least 206 million people, half of whom were children, needed anti-helminthic chemotherapy. The number of schistosomiasis cases, often underdiagnosed, could be over 400 million<sup>2</sup>. The annual death toll is uncertain and could vary from 24000 to 200000 (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>).

Schistosomiasis is a waterborne helminthic disease caused by trematodes of the *Schistosoma* genus. Among all the schistosome species infecting humans, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma japonicum* are the main causes of morbidity and death. Schistosomes require an aquatic gastropod as obligate intermediate host for their lifecycle, such as *Biomphalaria* species in the case of *S. mansoni*, the main causative agents of intestinal schistosomiasis. The disease is linked to poverty and develops in regions lacking access to sanitation services, safe drinking water, and having freshwater bodies providing snail habitat and favourable conditions for schistosome survival. Schistosome eggs eliminated with mammalian excreta hatch in water and release miracidia that infect the gastropods. After transformation into sporocyst and asexual multiplication, the parasite is discharged by the host snail in its free-swimming larval form, the cercaria that penetrates the skin of the mammalian host exposed to infested water. The cercariae transform into schistosomulae, which migrate to the venous circulation, the lungs, the heart, and the liver.

They differentiate to sexually mature worms and mate <sup>24</sup>. The eggs laid by the female worms residing in the mesenteric vessels (*S. mansoni*, *S. japonicum*) or in the bladder venous plexus (*S. haematobium*)<sup>5</sup> migrate to the gastrointestinal tract and the liver or the urogenital system. The antigens of eggs stimulate a host immune response leading to egg encapsulation within granuloma. The formation of periovular granuloma, consisting of layers of immune cells embedded in extracellular matrix (ECM), would protect hepatocytes from toxic antigens and facilitate the passage of eggs into the intestinal lumen or urinary tract and elimination in excreta <sup>6</sup>. Granuloma formation is a cause of chronic inflammation and fibrosis when eggs are permanently trapped in the host tissue (**Figure 1**) (eg the hepatic presinusoidal venules and intestine wall in the case of *S. mansoni*, or the genitourinary tract in the case of *S. haematobium*)<sup>6, 6</sup> and morbidity is directly related to egg burden. Although chronic intestinal schistosomiasis may be asymptomatic for a long time, it can evolve into a severe clinical form called hepatosplenic schistosomiasis, which is characterized by hepatosplenomegaly, liver fibrosis, portal hypertension and oesophageal varices, whose rupture may cause bleeding and death. The main antischistosomal treatment is praziquantel, a tetracyclic tetrahydroisoquinolone derivative with multi-target activities<sup>7</sup>, which kills adult worms of all schistosome species but is inefficient against schistosomulae. Repeated cycles of treatment are often necessary because of praziquantel's short half-life and frequent re-infection<sup>8</sup>, but are suspected to induce drug resistance<sup>8, 9</sup>. Despite praziquantel mass treatment campaigns, the human and geographical coverage are insufficient in many endemic countries to achieve disease control<sup>10-12</sup>.

In this review, we will focus on hepatosplenic schistosomiasis, a major cause of morbidity and mortality in schistosome infection. We will present the different imaging methods currently available for abdominal imaging in the clinical setting. We will describe their principle, advantages, limitations, and utility in the diagnosis and follow-up of the

hepatosplenic disease, and the challenges for new imaging methods. We will describe preclinical imaging methods used for the study of experimental models of schistosomiasis and explain how they can contribute to a better understanding of physiopathology, identification of disease hallmarks and assessment of new therapeutic strategies.

## **Human hepatosplenic schistosomiasis**

### **Clinical features**

A skin rash at the site of cercaria penetration may develop within few hours or days following infection. Acute schistosomiasis also called Katayama fever may occur in the first days or weeks after infection. This acute syndrome characterized by fever, myalgia, bloody diarrhea, pain and fatigue<sup>4,13</sup> affects more frequently travellers infected for the first time, than chronically infected endemic populations<sup>2,12,13</sup>. A pneumonitis caused by the juvenile forms of the parasite in the lungs can also develop within few days after infection<sup>14</sup>. An intestinal disease may ensue, whose initial phase may be asymptomatic. The host immune response elicited by tissue-trapped eggs leads to the formation of pro-fibrotic periovular granulomas. Eggs are mainly found in the intestine wall and the liver where they obstruct presinusoidal venules<sup>2,3,15</sup>. The disease may progress toward a chronic form of intestinal schistosomiasis consisting of colitis, ulceration and polyp formation as a consequence of granuloma presence in the intestine wall<sup>16</sup>. The main clinical signs associated with chronic intestinal schistosomiasis are abdominal pain and bloody diarrhea<sup>2,17</sup>.

The hepatosplenic complication occurs in less than 10% of patients, 5–20 years after infection<sup>18,19</sup>, as a consequence of chronic presinusoidal granuloma inflammation leading to severe fibrosis of the portal system called Symmers' pipestem fibrosis (**Figure 2**). This chronic inflammation results from a continuous deposition of ECM components, predominantly fibrillar collagen type I and III, in the fluidic space between hepatocytes and

sinusoid endothelial cells called the space of Disse<sup>20,21</sup>. Fibrosis usually occurs with no or little hepatocellular damage or dysfunction, which allows differentiating the hepatosplenic form of schistosomiasis from cirrhosis. However, schistosomiasis-related fibrosis is associated with thrombosis and severe vascular damage<sup>16, 19</sup>. Although hepatomegaly may be an early consequence of the granulomatous inflammation<sup>3,4</sup>, it is generally observed several years after the infection concomitant with splenomegaly, when the disease has evolved toward the hepatosplenic form. Severe complications associated with liver fibrosis consist in portal hypertension, splenomegaly and varices (esophageal, gastric, splenorenal, pancreaticoduodenal, periumbilical veins etc). The rupture of varices leads to potentially fatal gastrointestinal bleeding (hematemesis and melane)<sup>2, 4, 15, 19, 22, 23</sup>. Other severe complications may occur including pulmonary arterial hypertension accompanied by right heart failure, nephritic glomerulopathy, anemia and thrombocytopenia<sup>2,4, 15, 19, 22, 23</sup>. When comorbidities are present, such as hepatitis or alcoholic steatosis, severe liver damage and dysfunction are generally detected<sup>9</sup>. Liver decompensation can be observed at the final stage of the disease, but could be linked to comorbidities. Chronic schistosomiasis has been associated with a higher incidence of hepatocellular carcinoma<sup>2,24</sup>.

### **Liver fibrosis**

Fibrosis, a wound-healing process activated by an inflammatory trigger, is a common finding in chronic inflammatory liver diseases. It is characterized by excessive accumulation of ECM components (fibrillar collagens, fibronectin, undulin, elastin, laminin, hyaluronan, proteoglycans<sup>25</sup>), which may lead to permanent scars and tissue distortion. Fibrosis affects tissue architecture and mechanical properties and is usually associated with increased stiffness and reduced elasticity. In schistosomiasis, fibrosis is related to the host immune response against tissue-trapped eggs (**Figure 1**). During the initial stage of granuloma formation, a

moderate type 1 helper T cell (Th1) pro-inflammatory response occurs elicited by the presence of juvenile and adult worms. This response is shifted to a strong Th2 response when eggs are laid in the host tissues. During granulomatous inflammation, the eggs become surrounded by an infiltrate of macrophages, eosinophils and/or neutrophils depending on the schistosome species. The Th2 cytokine response induced by egg antigens is characterized by the production of IL4 and IL13 that activate Kupffer cells (resident macrophages) in M2 macrophages. Although M2 macrophages can produce collagen from proline and contribute to collagen deposition, it is believed that they could actually reduce fibrosis<sup>6</sup>. IL13 is a central cytokine to fibrogenesis and stimulates hepatic stellate cells (HSCs), which are the major ECM-producing cells. HSCs are located within the space of Disse. They are involved in ECM turnover regulation and serve as vitamin A reservoirs with retinoids being stored in cytoplasmic lipid droplets. Upon IL13 activation, HSCs transdifferentiate into activated myofibroblasts with contractile properties. These activated cells lose their lipid droplets, which often results in vitamin A deficiency, and secrete ECM components (mainly fibrous collagens, fibronectin and proteoglycans)<sup>26, 27</sup>. They also secrete enzymes controlling ECM turnover and remodelling such as matrix metalloproteinases (MMP) degrading ECM, and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) regulating MMP proteolytic activities<sup>25, 28</sup>. An imbalance between excessive ECM synthesis and reduced matrix proteolysis results in accumulation of fibrillar connective tissue and persistent scarring<sup>28-31</sup>. Activated HSCs are usually found in the periphery of the granuloma. The last stage of the granulomatous response modulation involves antibody production. At the end of this process, the eggs are destructed, and the granuloma replaced by a persistent fibrous scar.

## **Portal hypertension**

Portal hypertension is a clinical syndrome defined by an elevation of the hepatic venous pressure gradient (HVPG) above 5 mmHg<sup>32-34</sup>. A value of 10 mmHg is indicative of clinically patent portal hypertension with a high risk of developing varices<sup>32-34</sup>. In hepatosplenic schistosomiasis, periportal fibrosis and granulomatous thrombophlebitis result in progressive presinusoidal obstruction of blood flow and increased hepatic resistance leading to portal hypertension generally complicated by congestive splenomegaly, varice formation, destruction of the main portal vein branches, ascites, and variceal bleeding. Although, the development of portosystemic collateral blood flow may partly decompress the portal system<sup>35</sup>, life-threatening hemorrhages from varices remain the major complication. Gastrointestinal bleeding is often the first clinical sign of portal hypertension. The variceal origin of the bleeding must be determined to confirm portal hypertension and select appropriate treatment. Portal hypertension is generally diagnosed using Doppler USG. Endoscopy is used in the context of acute variceal bleeding. Magnetic resonance angiography (MRA) and computed tomography (CT) angiographic methods are also used when available in the clinical setting<sup>36</sup>. The management of this syndrome may be pharmacological with the prophylactic administration of  $\beta$ -blocker propranolol, surgical with portacaval shunt, varice devascularization and splenectomy, distal splenorenal shunt, or with endoscopic sclerotherapy or ligation<sup>32,36</sup>.

## **Diagnostic tools**

***Diagnosis of parasite infection:*** The most widely used parasitological diagnostic, the Kato-Katz technique, is based on fecal egg count and consists in the analysis of thick stool smears under the microscope. However, this method cannot detect schistosomiasis in the first weeks of infection, when only juvenile forms of the parasite are present. The Kato-Katz

technique requires sexually mature worms shedding eggs and shows a lack of sensitivity in the case of light infections<sup>37</sup>. Immunological and molecular diagnostic assays have been developed for the identification of the parasite at different life-cycle stages. The immunological tests target antischistosomal antibodies or parasite antigens, whereas PCR-based assays allow detection of schistosomal DNA or RNA<sup>17, 38</sup>. Laboratory findings such as eosinophilia, thrombocytopenia and anemia are non-specific. Rectal mucosa biopsy is performed for the identification and quantification of eggs if the result of the Kato-Katz is negative and the schistosomal infection highly probable.

***Diagnosis of hepatosplenic schistosomiasis:*** changes in size and consistency of the liver and the spleen can be detected at palpation and percussion, but physical examination shows a lack of accuracy and cannot precisely determine organ dimensions. The best-standard technique to diagnose liver fibrosis is biopsy, but it is highly invasive. Collagen detection with specific stains (Red Sirius, Masson's trichome etc) allows fibrosis evaluation, however tissue sampling may not be adequate to cover liver fibrosis heterogeneity. Histological analysis of hepatic tissue also permits the detection of lipid deposition and signs of co-infection (eg viral hepatitis B or C). Serum analysis may assist in the recognition of liver fibrosis, several biochemical markers have been proposed such as collagen III, hyaluronic acid, Laminin (glycoprotein), and Chitinase-3-like protein (YKL-40, glycoprotein)<sup>16</sup>. Ultrasonography (USG) is the most widely used imaging technique to detect organomegaly and altered texture due to fibrosis. CT and magnetic resonance imaging (MRI) provide accurate quantitative results but are not always available in endemic countries.

## **Current clinical methods for abdominal imaging and applications to hepatosplenic schistosomiasis**

### **Ultrasonography (USG)**

**Principle:** USG is based on the transmission of pulses of acoustic waves and their reflection at tissue interfaces with differing acoustic impedances. The reflected echo is analysed for intensity and depth information and can be converted into a brightness image (B-mode). **Advantages:** Non-invasiveness, safety, bedside availability, portability, practicality, cost-effectiveness, high spatial and temporal resolution, and good soft tissue contrast are the main advantages of this technique. There is virtually no contraindication or harmful side effect of diagnostic USG. Real time imaging allows fast clinical exploration, although a complete abdominal ultrasonographic examination can take about 20 minutes.

**General abdominal applications:** USG is the leading medical imaging examination for the exploration of human gastrointestinal diseases regardless of etiology and allows the assessment of focal or diffuse liver lesions and portal hypertension (**Table 1**)<sup>39, 40</sup>. Both anatomical and functional images can be obtained in any required plane. Regular B mode is used to assess echogenicity and texture of liver parenchyma. Vascular imaging can be performed using Power Doppler (B-flow) sonography, which helps detect anomalies such as vessel stenosis, atherosclerosis, vessel diameter enlargement and varice formation. Hemodynamic information can be obtained with the Doppler effect. Blood velocity and direction is color-encoded (Color Doppler mode) and can be combined with the B mode (Duplex USG). Contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) can be performed with reticuloendothelial agents (taken up by macrophages) or blood pool agents. CEUS is used for detection and characterization of contrast-enhanced lesions, assessment of diffuse liver disease such as cirrhosis, vascular imaging, and for measurement of vascular transit times and liver perfusion<sup>41-43</sup>. Most ultrasonographic images are planar, but three-dimensional images can

be produced with the newest systems using 3D ultrasound imaging. USG is also used to guide liver biopsies, injections, percutaneous drainage and radiofrequency ablation of some abdominal cancers such as hepatocellular carcinoma.

**Limitations:** The main limitations of USG are the dependency of the results/diagnosis on the technical expertise of the sonographer, the limited field of view, the absence of a set of reference images for localizing the level of the views such as the scout images routinely performed at the beginning of each CT or MRI examination, the possible blockade of ultrasonic waves by intestinal gas, the compromise between depth penetration and spatial resolution (determined by the frequency), and the qualitative nature of the signal yielding only relative echogenicity. When performing CEUS, another potential problem is the possible destruction of microbubbles during scanning time. Although bubble sonolysis is required for drug delivery in theranostics applications, accidental ultrasound-mediated bubble destruction can lead to contrast loss and lesion mischaracterization in non-theranostics applications of CEUS<sup>42</sup>.

**Applications in schistosomiasis:** USG is still the most-widely used radiologic method to explore hepatosplenic schistosomiasis, although operator-dependency of results has been reported <sup>44</sup> (**Table 2**). In *S. japonicum* infection, a specific pattern of liver fibrosis has been reported, consisting in echogenic septa producing a mosaic pattern<sup>45-47</sup>. Hepatosplenic schistosomiasis caused by *S. mansoni* infection has a different aspect at USG with complex patterns. The Niamey protocol established in 1996 aimed at providing guidelines for standardizing the use of USG methods for the assessment of mansonian hepatosplenic schistosomiasis <sup>48</sup>. This protocol includes scores for liver image patterns, periportal fibrosis and portal hypertension. Granulomatous inflammation is described as Niamey pattern B also called “starry sky” (**Figure 3**). Normal liver parenchyma is homogenous but in pattern B little echogenic spots are visible in the parenchyma. Fibrosis along portal sub-branches is described

in Niamey pattern C as “rings” and “pipestems” depending on the viewing angle. Periportal fibrosis shows a typical “bull’s eye” pattern on cross-section with an anechogenic portal vein surrounded by echogenic fibrous tissue. Fibrosis can also be localized around the portal vein bifurcation as “ruff” (Niamey pattern D). USG permits to measure fibrosis thickness of second order branches, of the gall bladder as well as ruff thickness (**Figure 3**). In advanced disease forms, pattern E and F are described in Niamey classification with patches around the hepatic portal vessels for pattern E and patches extending to the liver periphery as “Bird’s claw” for pattern F. Combinations of patterns are possible like Db, Dc, Ec, etc. Portal hypertension is evaluated by measuring portal vein diameter (oblique view), second order branch dilation, splenic vein diameter and by detecting varices. USG imaging may be used to evaluate hepatomegaly, but although volumetric analysis is possible with new systems it is not commonly performed. Spleen enlargement, a consequence of chronic inflammation and/or hypertension can be evaluated as well as its aspect (homogenous or granular). Ascites, masses such as cancers (Z pattern) or haemangioma and advanced cirrhosis can also be detected by USG, but the differential diagnosis with schistosomiasis is complicated by the presence of intraparenchymal fat (*eg* alcoholic and non-alcoholic fatty liver diseases) resulting in hyperechogenic image of the parenchyma. In this case a Niamey pattern Y is assigned. Finally, Doppler sonography is used to analyze blood flow and search for systemic varices and portal thrombosis.

### ***Computed Tomography (CT)***

CT scan is another fast imaging modality widely used to explore diffuse or focal digestive diseases (cirrhosis, cancer...) (**Table 1**). This imaging modality is often used in combination with positron emission tomography (PET) for the purpose of spatial localization of radionuclides.

**Principle:** This external irradiating method is based on X ray photon transmission through the body to obtain anatomical images based on the attenuation coefficients of the tissues. **Advantages:** Whole abdominal coverage can be achieved in a scanning time of two minutes. Image reconstruction is fast and produces axial views with a high in-plane spatial resolution (below 0.1 mm) or orthogonal reconstructions with somewhat lower spatial resolution. Compared to other imaging modalities, only moderate soft tissue contrast can be achieved. Contrast agents (CA), mainly tri-iodinated benzene ring-containing agents, can be used to enhance contrast based on tissue perfusion and CA uptake.

**General abdominal applications:** There are few studies reporting on the use of CT to screen liver fibrosis<sup>49</sup>. Analysis of texture features from CT images enables staging of fibrosis throughout the liver, but is less accurate in case of heterogeneous fibrosis distribution and is considered inferior to ultrasound transient elastography<sup>50</sup>. Portal hypertension can be detected using CT. Contrast-agent injection allows identification of arterial, venous and perfusion phases. Portal vein and mesenteric vein dilation can be visualized. Varices can be diagnosed with a single rapid scan, which is an advantage of this method. Hepatomegaly and splenomegaly can be evaluated with CT.

**Limitations:** CT requires expensive non-portable equipment. Moreover, repeated exposure to X rays is not recommended because of a risk of radiation-induced cancer. Another important limitation is the frequent (up to 0.7 percent) acute adverse events to CT CA<sup>51</sup>.

**Applications in schistosomiasis:** Most CT studies report on the genitourinary disease or on the cerebral complication of schistosomiasis. There are surprisingly few published studies on hepatosplenic schistosomiasis exploration with CT<sup>45, 46, 52-56</sup>. Interestingly, a CT study has revealed unexpected hepatic and pancreatic lesions<sup>53</sup> associated with hepatomegaly and splenomegaly in *S. mansoni* infection during the acute phase of the disease (**Table 2**). In

hepatosplenic disease caused by *S. mansoni*, the main features of the fibrotic liver on CT scan consist of round low-density periportal zones enhancing after CA administration. In longitudinal sections of portal veins, linear bands were observed<sup>52</sup>. Hepatosplenic schistosomiasis resulting from *S. Japonicum* infection is characterized by capsular and septal calcifications responsible for a “turtle back” appearance of the liver in non-enhanced CT, and enhancement of fibrous septa after CA injection<sup>45-47,54,56</sup>.

### ***Magnetic Resonance Imaging (MRI)***

***Principle:*** MRI is a non-invasive imaging modality, which exploits the magnetic spin of some atomic nuclei, most often water’s protons in biological tissues. This modality requires equipment generating a static magnetic field ( $B_0$ ), time-varying magnetic field gradients, and radiofrequency (RF) electromagnetic waves to interact with the magnetic moments of the tissue.

***Advantages:*** MRI is a non-ionizing technique. High magnetic static fields ( $B_0$ ) and RF magnetic fields ( $B_1$ ) can be used safely if appropriate precautions are taken to avoid exposure of non-compatible implanted medical devices to strong magnetic fields, and to minimise RF power deposition (RF-induced heating effect) in tissues. Whole abdominal coverage can be achieved with excellent soft tissue contrast. 2D or 3D images can be acquired with 0.5 to 2 mm spatial resolution depending on scanning time (**Table 1**).

***General abdominal applications:*** A wide range of MR methods are available for the assessment of anatomy, microstructure (relaxometry, diffusion-weighted MRI, magnetization transfer ratio imaging, susceptibility-weighted imaging for the detection of iron deposits...), vasculature (angiography for arteries or veins)<sup>57</sup>, physiology (perfusion imaging, dynamic contrast-enhanced imaging for measurement of blood flow, blood volume and perfusion), metabolism (single voxel spectroscopy and magnetic resonance spectroscopy (MRS)

imaging). Gadolinium chelates can be used as CAs for the detection of inflammatory processes, with rather rare adverse reactions (< 0.01 %) but a risk of nephrogenic systemic fibrosis in case of renal dysfunction<sup>58</sup>. In the portal venous phase and the delayed venous phase, they also enhance fibrous tissue, and improve texture analysis of hepatic tissue<sup>59</sup>. Hepatocyte-specific CAs are taken up by functioning hepatocytes only. They are used for the assessment of liver fibrosis<sup>60,63</sup> and are clinically approved because they help distinguish between malignant and benign lesions. Other CAs such as manganese-containing Mangafodipir trisodium (hepatocyte-specific) and superparamagnetic particles of iron oxide (SPIO, targeting the Kupffer cells of the reticulo-endothelial system) have been developed for liver imaging, but are no longer approved for clinical applications.

**Limitations:** The main drawback of MRI is the cost of the equipment, which is highly dependent on magnetic field strength. Compared to CT and USG, MRI acquisition times are longer. MRI can be contraindicated in patients with unremovable medical devices.

**Applications in schistosomiasis:** According to Lambertucci et al, MRI would provide more precise information than USG regarding periportal fibrosis, gallbladder fibrosis, and alterations of the abdominal venous system in schistosomiasis (**Table 2**)<sup>18, 64</sup>. In addition to the detection of morphological indicators of liver fibrosis such as splenomegaly and portal hypertension on conventional images (large portal vein diameter, varices, ascites...)<sup>18</sup>, various MRI methods can be used for the study of more subtle changes in liver microstructure<sup>65</sup>. Relaxation time constants depend on tissue structure and composition, which may vary with physiological or pathological processes, and strongly influence contrast in MRI. Relaxometric studies aiming at quantifying the longitudinal ( $T_1$ ) and transverse ( $T_2$ ) relaxation time constants have been evaluated as potential markers of fibrosis and inflammation in various organs. The parasite cannot be visualized using MRI, but granulomatous inflammation and liver fibrosis are enhanced by CAs (**Table 2**).

### ***Scintigraphy and Positron Emission Tomography (PET)***

***Principle:*** These irradiating and invasive techniques involve the injection of radioactive radionuclide tracers. They use gamma ray detectors to produce functional, physiologic and metabolic imaging (**Table 1**). While scintigraphy uses gamma photon emitting radionuclides, PET relies on the gamma photon pair created in the annihilation process of a positron emitted by the radiotracer with an electron of the tissue. Scintigraphy procedure duration is about 4 hours and scanning time about 30 min to detect Technetium 99m (<sup>99m</sup>Tc) labelled molecules (most-widely used radiotracer) in target cells with low spatial resolution (2D or 3D images with Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT). PET scanning time is about 20 min but a radionuclide emitting positron (generally deoxy-2-(<sup>18</sup>F)fluoro-D-glucose or [<sup>18</sup>F]FDG) has to be injected 1 hour before imaging.

***Advantages:*** Molecular or metabolic information can be obtained with high sensitivity.

***General abdominal applications:*** As conventional radiologic modalities, nuclear medicine techniques can help explore digestive diseases such as schistosomiasis even though most of their applications are in oncology (**Table 1**). Theranostic intervention is also possible as in the case of hepatic tumours using selective internal radiotherapy with Yttrium-90 (<sup>90</sup>Y) microspheres <sup>66</sup>. Scintigraphy can be used to stage portal hypertension and portosystemic shunts in chronic liver disease <sup>67</sup>.

***Limitations:*** Scintigraphy and PET require expensive equipment. PET has the lowest spatial resolution to date. Therefore, two-dimensional and 3D images obtained by PET require co-registration to CT or MRI images for better anatomical localization of radiotracers.

***Applications in schistosomiasis:*** Blood flow can be measured by scintigraphy. Hepatic perfusion scintigraphy (angioscintigraphy) with <sup>99m</sup>Tc labelled sulphur colloid particles has been used to study hemodynamic changes in patients with hepatosplenic schistosomiasis. This

method revealed unexpectedly increased hepatic perfusion index, which was correlated to spleen size and oesophageal varices<sup>68</sup>. This finding would be linked to increased perfusion through the hepatic artery<sup>68</sup> as demonstrated in murine schistosomiasis<sup>69</sup> (**Table 2**). Scintigraphy with <sup>99m</sup>Tc-macroaggregated albumin (<sup>99m</sup>Tc-MAA) has also been used to assess intrapulmonary vascular dilations secondary to hepatosplenic schistosomiasis and portal hypertension<sup>70</sup>. Hepatomegaly and splenomegaly can be evaluated with lower accuracy than other imaging techniques because of its intrinsically low spatial resolution<sup>71</sup>. Differentiation between cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension is possible with <sup>99m</sup>Tc labelled sulphur colloid particles but specific fibrosis pattern pathognomonic for schistosomiasis are not discernible by nuclear medicine imaging techniques. Scintigraphy has been used in the post-operative follow-up of patients who underwent splenectomy to decompress portal hypertension followed by auto-implantation of spleen tissue in the omentum<sup>72,73</sup>. Only one case report has described hypermetabolic lesions in hepatosplenic schistosomiasis unexpectedly found in the pancreas with [<sup>18</sup>F]FDG<sup>74</sup>.

### ***Endoscopy***

***Principle:*** Endoscopy is an optical imaging method delivering endoluminal images of internal hollow organs and cavities. This method requires the use of an endoscope, a tube equipped with lenses and light sources. Fiber-endoscopes use glass fibre bundles to carry white light for organ illumination, and fibres or lenses to send the image from the distal part of the endoscope to the eyepiece for direct view. Video-endoscopes are equipped with miniaturised charge-coupled device (CCD) chips at the tip of the distal part of the tube for transmission of the images to a video processor. The images are viewed through a video monitor.

**Advantages:** Two- and three-dimensional images can be obtained. Movies can be recorded with video-endoscopes. Because the endoscope is equipped with a channel allowing surgical instrument manipulation, image-guided interventions can be performed during the endoscopic procedure.

**Limitations:** Endoscopic imaging is limited to the internal surface of the organs of cavities. This invasive technique is performed under sedation or anaesthesia with surgical conditions, since it is necessary to insert an endoscope into the gastrointestinal tract or the peritoneal cavity. The main risks of the procedure are linked to the insertion of the endoscope in the body (perforation, hemorrhage, infection ...).

**General abdominal applications:** Endoscopy can be used for diagnostic, biopsying, surveillance, and therapeutic purposes (eg laparoscopic surgery).

**Applications in schistosomiasis:** Hepatosplenic schistosomiasis can be explored by endoscopy, (**Table 1**). The cost and risk of infection linked to the invasiveness of the technique are limitations to the use of endoscopy in the poorest endemic countries (Table 1). USG can be combined with endoscopy to gain complementary information. Endoscopy is a gold-standard technique to guide ligation or sclerotherapy treatment of oesophageal varices caused by portal hypertension in schistosomiasis. Endoscopy permits to view and treat collaterals, to identify ascites, portal hypertension, hepatomegaly, splenomegaly and granulomatous inflammation in liver (**Table 2**). Non-invasive capsule endoscopy involving transit of an ingestible wireless camera across the digestive tract can be performed to visualize the entire small bowel when simultaneous therapeutic intervention or tissue sampling is not required. Capsule endoscopy has been used in a pilot study to detect oesophageal varices and identify small bowel lesions in portal hypertension due to schistosomiasis <sup>75</sup>. The main findings consisted of varices, edema, erosions and scarred mucosa <sup>75</sup>.

## Emerging methods in human schistosomiasis assessment?

Elastography has become the most widely used method to detect liver fibrosis and cirrhosis consecutive to alcoholic or non-alcoholic fatty liver disease or viral hepatitis. Elastography methods can be combined to an imaging modality such as USG or MRI. Elastography allows the assessment of tissue stiffness following the propagation of a mechanical strain or shear wave through the liver and allows the assessment of liver stiffness. There are currently two main techniques of sonographic elastography available: tissue excitation is either induced by acoustic radiation force impulse (ARFI) or using a mechanical vibrating device for transient elastography<sup>76</sup>. The latter being the most-widely used method. In sonographic elastography pulse-echo acquisitions are performed to measure the velocity of the shear-wave, which informs about the elastic shear modulus. Only few studies using sonographic elastography in *S. mansoni* or *S. japonicum* infected patients have been published<sup>77,78</sup>. Only two studies were performed on patients without co-infection with hepatitis C virus (HCV) (**Table 3**). The studies by Esmat et al<sup>50</sup> and Ramzy et al<sup>52</sup> reported discrepancies between liver biopsy and sonographic transient elastography (fibroscan) results in patients with HCV and schistosomiasis co-infection. The disagreement between histological and elastographic data could be linked to the fact that liver biopsy may not cover the heterogeneity of liver fibrosis. A limitation of the study by Esmat et al is the lack of fibrosis pattern analysis according to the Niamey protocol<sup>76</sup>. According to Ramzy et al, fibroscan would be reliable for staging hepatic fibrosis<sup>79</sup>. In patients with no comorbidities, liver stiffness measurement (LSM) yielded increased values in *S. mansoni* hepatosplenic disease compared to controls, and to cirrhotic patients. Moreover, a correlation was found between LSM and USG parameters related to portal hypertension (portal vein diameter and splenomegaly)<sup>80</sup>. In their study on *S. japonicum* schistosomiasis, Wu et al did not find any correlation between LSM and USG signs of portal hypertension, although they had a good

correlation with histological results<sup>77</sup>. Together, these studies suggest that LSM could be a marker for liver fibrosis in schistosomiasis, but further studies on larger cohorts are needed for validation. However, ultrasound transient elastography has several limitations, including a lack of reproducibility in case of steatosis or light fibrosis. Moreover, increased liver stiffness is not specific for fibrosis and could be affected (or caused?) by inflammation and iron overload<sup>81,82</sup>.

Elastography can also be performed using MRI and a mechanical vibrator device for the generation of shear waves. In magnetic resonance elastography (MRE), the detection of shear waves propagating through the liver is performed using a phase-contrast gradient-echo sequence with motion-encoding gradients detecting through-plane motion<sup>83</sup>. This technique can be implemented on standard MRI systems. MRE-derived liver stiffness has been shown to correlate with fibrosis stage in patients<sup>84</sup> and animal models<sup>85</sup>. A recent study suggests that MRE is more accurate and reliable than ultrasound transient elastography to discriminate between early fibrosis stages<sup>81</sup>. MRE has not yet been used on human or experimental schistosomiasis to evaluate fibrosis.

Elastography and diffusion MRI with ADC mapping of the spleen<sup>80, 86-88</sup> as well as susceptibility-weighted imaging (SWI)<sup>89,90</sup> have been used in the evaluation of splenic signs of portal hypertension. Although splenic siderotic nodules are a frequent sign (> 65%) of portal hypertension in hepatosplenic schistosomiasis<sup>91, 92</sup>, SWI has never been applied in schistosomiasis patients nor in preclinical models of the disease, although it is sensitive to diamagnetic calcifications, which are frequent in *S. japonicum* and *haematobium* infections, to paramagnetic haemorrhages, and has even been evaluated for the grading of liver fibrosis<sup>90, 93</sup>.

Advanced microstructural MRI methods, such as apparent diffusion coefficient (ADC) mapping derived from diffusion-weighted images or diffusion kurtosis imaging have been

tested to assess fibrosis in pre-cirrhotic liver with similar performance<sup>94, 95</sup>. Double contrast-enhanced MRI using both gadolinium-based CA and SPIO with or without texture analysis has been used to detect and differentiate early liver fibrosis from advanced disease with excellent results<sup>59, 96, 97</sup>. Collagen-targeted MRI CAs have been developed and their hepatic accumulation has been shown to correlate with histological fibrosis scores<sup>98</sup>. Relaxometric studies aiming at measuring the longitudinal  $T_1$  relaxation time constant which is affected by changes in tissue microstructure have also been performed showing a good correlation with liver fibrosis, although this parameter is not specific of fibrosis<sup>99, 100</sup>. So far, none of these methods has been evaluated in the clinical research setting.

Several methods can be used for the assessment of hemodynamic changes in liver pathologies, including cirrhotic or non-cirrhotic portal hypertension. Among them, dynamic contrast-enhanced (DCE) MRI allows quantitative assessment of liver perfusion and separation of arterial and portal-venous phases, but requires the injection of a contrast agent (eg gadolinium chelates). Newly developed arterial spin labelling (CASL) techniques are non-invasive methods using an endogenous tracer, magnetically labelled (“tagged”) arterial blood water, for quantitatively measuring tissue perfusion. These techniques initially developed for the heart, kidney and brain have recently been applied to the assessment of liver perfusion in healthy subjects, and in patients with cirrhosis<sup>101-104</sup>. In cirrhotic patients, a significant decrease in liver and spleen perfusion could be measured with ASL techniques<sup>103, 104</sup>. Although, these techniques have not yet been implemented in the clinical abdominal MRI routine, they could represent an alternative to standard DCE methods, when repeated measures are required or when contrast agent injection is contraindicated.

## **Pre-clinical imaging studies of animal models of schistosomiasis**

### ***Animal models***

Several animal models of digestive schistosomiasis have been developed to study fundamental mechanisms of disease physiopathology and for the preclinical evaluation of new therapeutic strategies. These experimental models of schistosomiasis are well suited for pharmaceutical and basic research purposes since the animals are infected with the parasite species that are pathogenic for humans. Rodent models share several pathologic features with the human disease such as granulomatous inflammation, collagen deposition, fibrosis and portal hypertension<sup>69</sup>. The purpose of preclinical imaging studies is to develop methods allowing a) direct visualization and quantification of parasites within host tissue, b) detection, staging and quantification of liver fibrosis and c) identification of markers that could help assess the efficiency of anti-parasitic or anti-fibrotic drugs. Very few pre-clinical studies on experimental schistosomiasis have been published so far, but a great variety of imaging modalities including optical methods, USG, PET and MRI have been employed (**Table 4**).

### ***Imaging parasites within host tissues.***

*In vivo* visualisation of schistosome in infected mice was achieved using optical methods such as fluorescence molecular tomography (FMT), but also by microPET and USG. FMT is an optical-based modality requiring the injection of a fluorescent dye and subsequent irradiation with an excitation laser to generate light emission. The fluorescence photons emitted by the excited dye reaching the surface can be detected by optical fibres or CCD camera and the 3D-spatial distribution of the dye reconstructed<sup>105</sup>. FMT is a whole-animal imaging method that has been used to visualize and quantify adult schistosome worms of different species (*S. mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*) in infected mice<sup>106</sup> and to monitor the effects of praziquantel and other anti-parasitic drugs on schistosome population.

FMT has also been used in combination with microPET and 7T MRI<sup>107</sup>. Using microPET with [<sup>18</sup>F]FDG, a classical radiopharmaceutical in the clinical setting, the authors showed that [<sup>18</sup>F]FDG was taken up by *S. mansoni* worms in infected mice. This technique could be used to quantify worm burden, detect ectopic localization (eg central nervous system), and assess anti-parasitic efficiency (Table 4). Confocal Laser Scanning Microscopy combined with a lens system integrated in a rigid endoscope was tested for the visualisation of eggs within the gut mucosa of mice 20 weeks after infection with *S. mansoni*<sup>108</sup>. Identification of schistosoma species and differentiation between viable and dead eggs was achieved in real time during endoscopy. Although this study was performed on euthanized animals, this technique is a potential substitute for invasive tissue sampling when stool specimens are negative in early infection or due to treatment. The technique was applied shortly after to detect eggs in the bladder mucosa of a *S. hematobium* infected patient<sup>109</sup>.

#### ***Monitoring host immune response to the schistosomal infection***

Most of the preclinical studies reporting on immunological reactions to the schistosomal infection used *in vivo* bioluminescence imaging (BLI), whole-animal imaging method allowing direct visualization of gene expression through chemically induced light emission (chemiluminescence). BLI requires the introduction of a bioluminescent reporter gene (often firefly luciferase (Fluc) or Renilla luciferase (Rluc) genes) fused to a gene of interest into mice. This genetic construct is usually inserted by transgenesis into mice. When the luciferase substrate is injected to the animals (luciferin or coelentraine in the case of fluc or rluc respectively), its oxidation catalysed by luciferase in presence of oxygen results into a weak light emission, which is detected by a highly sensitive CCD camera<sup>110-112</sup>. This imaging method is often used to study the host immune response to a pathogen<sup>113</sup>.

Regarding murine schistosomiasis, a study aiming at detecting eosinophilia and eosinopoiesis, an early event in granulomatous inflammation, used BLI of transgenic mice expressing a genetically encoded luciferase reporter driven by an eosinophil peroxidase promoter to follow up eosinophils during a period of nearly 3 months following *S. mansoni* infection <sup>114</sup>. In a recent study, the dynamic of collagen deposition in the periphery of granuloma in *S. japonicum* infection was studied in transgenic mice expressing luciferin under a collagen promoter<sup>115</sup>. Newly formed collagen was assessed using BLI in infected mice and in diseased animals treated with praziquantel after granuloma formation<sup>115</sup>.

Another study using micro SPECT/CT with injection of a glyco derivative compound labelled with Rhenium-188 (<sup>188</sup>Re-OCTAM) provided information on inflammation of the liver in mice infected by *S. mansoni* <sup>116</sup>. The follow-up of the animals extended to 18 weeks after cercarial infection and allowed the detection of various levels of remnant liver function.

### ***Characterization of the hepatosplenic disease (organomegaly, vascular changes, liver fibrosis)***

The study of the liver and spleen damage in experimental hepatosplenic schistosomiasis has been performed with different imaging modalities, mainly PET, MRI, and USG (Table 4). The study using micro SPECT/CT with <sup>188</sup>Re-OCTAM could detect hepatic necrosis and fibrosis in mice infected by *S. mansoni* with various levels of remnant liver function<sup>116</sup>. The first preclinical MRI study on *S. mansoni* infected mice was obtained at 9.4T. In these animals infected with 150 cercariae <sup>117</sup>, a patchy pattern of the liver was detected on T<sub>2</sub>-weighted MRI at 6 weeks of infection, which was identified as fibrosis after histological analysis of liver samples. Recently, an MRI study on the mouse model of *S. mansoni* hepatosplenic schistosomiasis (30 cercariae) provided the first longitudinal assessment of organomegaly and portal hypertension and demonstrated that relaxometry of the T<sub>2</sub> transverse relaxation time

constant, correlated with liver fibrosis <sup>118</sup> (**Table 4**). The increase in the T<sub>2</sub> value with fibrosis development could reflect lipid loss occurring when hepatic stellate cells transdifferentiate into activated myofibroblasts. A high resolution USG (30 μm by 50 MHz probe) study of a murine model of *S. japonicum* infection reported on increased portal vein diameter, changes in spleen and liver morphometry, observation of parenchymal patterns, and measurement of intestinal wall thickening. However, no fibrosis quantification was obtained with this method.

## Perspectives

There is a need for methods allowing to detect and efficiently score fibrosis that could be used to assess fibrosis regression with antifibrotic treatments. MRE, which has proved accurate and reliable in the assessment of human liver fibrosis, would be worth trying in clinical settings where MRI systems are available. Some imaging techniques developed in the pre-clinical setting could be easily transferred in clinical research for validation, provided the imaging systems are available. This is the case of PET with [<sup>18</sup>F]FDG or T<sub>2</sub> relaxometry. Other advanced methods require validation in pre-clinical studies of experimental schistosomiasis (e.g. double-contrast enhanced MRI with super paramagnetic iron oxides and gadolinium chelates, perfusion MRI to assess hemodynamic changes with the development of portal hypertension, magnetic resonance spectroscopy for the identification of fibrosis induced metabolic changes). Some of them could be of interest when comorbidity is present and a differential diagnosis is needed. “Omics” studies require thousands of samples for New Generation Sequencing (NGS) methods in order to classify patients using machine learning or deep learning approach. Liver images of patients could be implemented in these algorithms to improve patient phenotyping and generate accurate classification.

## Legends to the figures

### **Figure 1. Liver fibrogenesis in hepatosplenic schistosomiasis**

Liver fibrosis results from a cascade of events starting with *Schistosoma* eggs trapped in the liver, which elicit a strong immune response involving innate immune cells, natural killer (NK) cells, Kupffer cells and T cells. This host inflammatory reaction may lead to low level of hepatocyte injury and an excessive accumulation of neo Extra Cellular Matrix (ECM) as a consequence of chronic scarring process. After granuloma maturation, stellate cells become activated and produce molecules and enzymes involved in fibrogenesis. Metalloproteases (MMPs), which are regulated by Tissue Inhibitors of Metallo Proteases (TIMPs), lyse ECM in a first step and favour pro-collagen transformation into collagen thereafter.

### **Figure 2. Schematic representations of typical ultrasound images of human liver fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis and corresponding patterns based on Niamey classification.**

**A**-Temporal progression of hepatosplenic schistosomiasis. **B**-Illustration of the different stages of hepatosplenic schistosomiasis with Niamey classifications patterns (top row) and corresponding schematic representations of ultrasound images (bottom row). The right oblique view for ultrasound probe orientation allows visualization of the hepatic hilar area with the portal vein (PV) and vessels around. This view allows detection of periportal fibrosis when present (pattern D to Ec) and measurement of PV diameter as well as evaluation of hypertension (dashed line in D, E and F patterns). Pattern B (p. B) also named “Starry sky” corresponds to echogenic spots in liver parenchyma caused by inflammation and fibrosis around granuloma. Pattern C (p. C) shows echogenic signals around portal branches and represents a moderate stage of fibrosis. Acute or/and asymptomatic phases are associated to B

and C patterns. Large fibrosis area in parenchyma, described as “patches”, are associated with E pattern. Fibrosis extension to the liver periphery from patches was described as “Bird’s claw” and associated to F pattern. C, Dc and EC are examples of combined patterns. D. Right echographic oblique view presented in Fig 1.B. USG=Ultra Sono Graphy.

**Figure 3. Vascular dysfunction and portal hypertension in hepatosplenic schistosomiasis**

Severe liver fibrosis is responsible of an increase in blood pressure in the portal vein and afferent venous vessels. The hepatic venous pressure gradient (HVPG), the gradient between portal vein and intra-abdominal vena cava pressure, is below 5 mmHg in healthy subjects. An increase of HVPG above 5 mmHg is indicative of hypertension development, whereas a value above 10 mmHg is the sign of clinical hypertension evolving toward varices formation and liver decompensation. Vessel diameter can enlarge when the pressure is too high causing varice formation (esophageal, gastric, splenorenal, pancreaticoduodenal, periumbilical varices).

## BIBLIOGRAPHY

1. Boissier, J., *et al.* (2015) Schistosomiasis reaches Europe. *Lancet Infect Dis* 15, 757-758
2. Colley, D.G., *et al.* (2014) Human schistosomiasis 10.1016/S0140-6736(13)61949-2. *Lancet* 383, 2253-2264
3. Gryseels, B., *et al.* (2006) Human schistosomiasis 10.1016/S0140-6736(06)69440-3. *Lancet* 368, 1106-1118
4. Ross, A.G., *et al.* (2002) Schistosomiasis 10.1056/NEJMra012396. *N Engl J Med* 346, 1212-1220
5. Doughty, B.L. (1996) Schistosomes and Other Trematodes.
6. Hams, E., *et al.* (2013) The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol* 4, 89
7. Chan, J.D., *et al.* (2017) The anthelmintic praziquantel is a human serotonergic G-protein-coupled receptor ligand. *Nat Commun* 8, 1910
8. da Silva, V.B.R., *et al.* (2017) Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorg Med Chem* 25, 3259-3277
9. Mader, P., *et al.* (2018) Chemotherapy for Fighting Schistosomiasis: Past, Present and Future. *ChemMedChem*
10. WHO (2017) Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2016. *Wkly Epidemiol Rec* 92, 749-760
11. Tchuem Tchuente, L.A., *et al.* (2017) Moving from control to elimination of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: time to change and adapt strategies. *Infect Dis Poverty* 6, 42
12. Osakunor, D.N.M., *et al.* (2018) Paediatric schistosomiasis: What we know and what we need to know. *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006144
13. Ross, A.G., *et al.* (2007) Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis* 7, 218-224
14. Bica, I., *et al.* (2000) Hepatic schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am* 14, 583-604, viii
15. Boros, D.L. (1989) Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clin Microbiol Rev* 2, 250-269
16. Olveda, D.U., *et al.* (2014) The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. *Int J Infect Dis* 28, 193-203
17. Elbaz, T., and Esmat, G. (2013) Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. *J Adv Res* 4, 445-452
18. Lambertucci, J.R., *et al.* (2008) Imaging techniques in the evaluation of morbidity in schistosomiasis mansoni 10.1016/j.actatropica.2008.07.009. *Acta Trop* 108, 209-217
19. Lambertucci, J.R. (2014) Revisiting the concept of hepatosplenic schistosomiasis and its challenges using traditional and new tools. *Rev Soc Bras Med Trop* 47, 130-136
20. Higashi, T., *et al.* (2017) Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 121, 27-42
21. Friedman, S.L. (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis 10.1053/j.gastro.2008.03.003. *Gastroenterology* 134, 1655-1669
22. Andrade, Z.A. (2009) Schistosomiasis and liver fibrosis 10.1111/j.1365-3024.2009.01157.x. *Parasite Immunol* 31, 656-663
23. Dessein, A.J., *et al.* (1999) Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene 10.1086/302526. *Am J Hum Genet* 65, 709-721

24. Badawi, A.F., and Michael, M.S. (1999) Risk factors for hepatocellular carcinoma in Egypt: the role of hepatitis-B viral infection and schistosomiasis. *Anticancer Res* 19, 4565-4569
25. Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115, 209-218
26. Blaner, W.S., et al. (2009) Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 1791, 467-473
27. D'Ambrosio, D.N., et al. (2011) Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. *PLoS One* 6, e24993
28. Roderfeld, M. (2018) Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biol* 68-69, 452-462
29. Anthony, B.J., et al. (2012) Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. *Trends Parasitol* 28, 572-579
30. Carson, J.P., et al. (2018) Schistosome-Induced Fibrotic Disease: The Role of Hepatic Stellate Cells. *Trends Parasitol* 34, 524-540
31. Senoo, H., et al. (2017) The stellate cell system (vitamin A-storing cell system). *Anat Sci Int* 92, 387-455
32. Khanna, R., and Sarin, S.K. (2014) Non-cirrhotic portal hypertension - diagnosis and management. *J Hepatol* 60, 421-441
33. Al-Busafi, S.A., et al. (2012) Clinical manifestations of portal hypertension. *Int J Hepatol* 2012, 203794
34. Suk, K.T. (2014) Hepatic venous pressure gradient: clinical use in chronic liver disease. *Clin Mol Hepatol* 20, 6-14
35. de Cleva, R., et al. (2007) Pre- and postoperative systemic hemodynamic evaluation in patients subjected to esophagogastric devascularization plus splenectomy and distal splenorenal shunt: a comparative study in schistosomal portal hypertension. *World J Gastroenterol* 13, 5471-5475
36. De Cock, K.M. (1986) Hepatosplenic schistosomiasis: a clinical review. *Gut* 27, 734-745
37. Gray, D.J., et al. (2011) Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ* 342, d2651
38. Weerakoon, K.G., et al. (2015) Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis 10.1128/CMR.00137-14. *Clin Microbiol Rev* 28, 939-967
39. Skelly, P.J. (2013) The use of imaging to detect schistosomes and diagnose schistosomiasis 10.1111/pim.12040. *Parasite Immunol* 35, 295-301
40. Olveda, D.U., et al. (2014) Utility of Diagnostic Imaging in the Diagnosis and Management of Schistosomiasis 10.4172/2327-5073.1000142. *Clin Microbiol* 3
41. Albrecht, T., et al. (1999) Non-invasive diagnosis of hepatic cirrhosis by transit-time analysis of an ultrasound contrast agent. *Lancet* 353, 1579-1583
42. Dietrich, C.F., et al. (2018) How to perform Contrast-Enhanced Ultrasound (CEUS). *Ultrasound Int Open* 4, E2-E15
43. Voigt, J.U. (2009) Ultrasound molecular imaging. *Methods* 48, 92-97
44. Doehring-Schwerdtfeger, E., et al. (1992) Inter-observer variance in ultrasonographical assessment of *Schistosoma mansoni*-related morbidity in young schoolchildren. *Acta Trop* 51, 85-88
45. Cheung, H., et al. (1996) The imaging diagnosis of hepatic schistosomiasis japonicum sequelae. *Clin Radiol* 51, 51-55
46. Fung, H.S., et al. (2009) Hepatic schistosomiasis. *Hong Kong Med J* 15, 75-76

47. Goldwire, F.W., *et al.* (2012) A case of turtleback liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10, A24
48. Richter, J., *et al.* (1996) A Practical Guide to the Standardized Use of Ultrasonography for the Assessment of Schistosomiasis-related Morbidity. In *ULTRASOUND IN SCHISTOSOMIASIS- Second International Workshop*
49. Huber, A., *et al.* (2015) State-of-the-art imaging of liver fibrosis and cirrhosis: A comprehensive review of current applications and future perspectives. *Eur J Radiol Open* 2, 90-100
50. MartÃ-nez, S.M., *et al.* (2011) Noninvasive assessment of liver fibrosis 10.1002/hep.24013. *Hepatology* 53, 325-335
51. Wang, C.L., *et al.* (2008) Frequency, outcome, and appropriateness of treatment of nonionic iodinated contrast media reactions. *AJR Am J Roentgenol* 191, 409-415
52. Fataar, S., *et al.* (1985) CT of hepatic schistosomiasis mansoni. *AJR Am J Roentgenol* 145, 63-66
53. Passos, M.C., *et al.* (2009) Ultrasound and CT findings in hepatic and pancreatic parenchyma in acute schistosomiasis. *Br J Radiol* 82, e145-147
54. Manzella, A., *et al.* (2008) Schistosomiasis of the liver. *Abdom Imaging* 33, 144-150
55. Bilgin, S.S., *et al.* (2016) Imaging findings of hepatosplenic schistosomiasis: a case report 10.1016/j.radcr.2016.05.003. *Radiol Case Rep* 11, 152-156
56. Monzawa, S., *et al.* (1993) Schistosomiasis japonica of the liver: contrast-enhanced CT findings in 113 patients. *AJR Am J Roentgenol* 161, 323-327
57. Johnson, C.D., *et al.* (1991) MR angiography in portal hypertension: detection of varices and imaging techniques. *J Comput Assist Tomogr* 15, 578-584
58. Prince, M.R., *et al.* (2011) Incidence of immediate gadolinium contrast media reactions. *AJR Am J Roentgenol* 196, W138-143
59. Yokoo, T., *et al.* (2015) Evaluation of Liver Fibrosis Using Texture Analysis on Combined-Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Images at 3.0T. *Biomed Res Int* 2015, 387653
60. Feier, D., *et al.* (2013) Liver fibrosis: histopathologic and biochemical influences on diagnostic efficacy of hepatobiliary contrast-enhanced MR imaging in staging. *Radiology* 269, 460-468
61. Ding, Y., *et al.* (2015) Liver fibrosis staging using T1 mapping on gadoxetic acid-enhanced MRI compared with DW imaging. *Clin Radiol* 70, 1096-1103
62. Saito, K., *et al.* (2013) Assessing liver function using dynamic Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI with a standard 5-phase imaging protocol. *J Magn Reson Imaging* 37, 1109-1114
63. Juluru, K., *et al.* (2017) Diagnostic accuracy of intracellular uptake rates calculated using dynamic Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI for hepatic fibrosis stage. *J Magn Reson Imaging* 45, 1177-1185
64. Lambertucci, J.R., *et al.* (2004) Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop* 37, 333-337
65. Feier, D., *et al.* (2016) The diagnostic efficacy of quantitative liver MR imaging with diffusion-weighted, SWI, and hepato-specific contrast-enhanced sequences in staging liver fibrosis--a multiparametric approach. *Eur Radiol* 26, 539-546
66. Murthy, R., *et al.* (2005) Yttrium-90 microsphere therapy for hepatic malignancy: devices, indications, technical considerations, and potential complications. *Radiographics* 25 Suppl 1, S41-55

67. Dragoteanu, M., *et al.* (2008) Staging of portal hypertension and portosystemic shunts using dynamic nuclear medicine investigations. *World J Gastroenterol* 14, 3841-3848
68. de Carvalho, B.T., *et al.* (2016) Increased Hepatic Arterial Blood Flow Measured by Hepatic Perfusion Index in Hepatosplenic Schistosomiasis: New Concepts for an Old Disease. *Dig Dis Sci* 61, 2118-2126
69. Sarin, S.K., *et al.* (1991) Hyperdynamic circulation in a chronic murine schistosomiasis model of portal hypertension. *Hepatology* 13, 581-584
70. de Queiros, A.S., *et al.* (2015) Evaluation of normality and reproducibility parameters of scintigraphy with (99m)Tc-MAA in the diagnosis of intrapulmonary vascular dilatations. *Ann Nucl Med* 29, 46-51
71. Orduna, E., and Silva, F. (1995) Scintigraphic findings in schistosomiasis. *P R Health Sci J* 14, 251-257
72. Petroianu, A., *et al.* (2006) Late follow-up of patients submitted to subtotal splenectomy. *Int J Surg* 4, 172-178
73. Brandt, C.T., *et al.* (2012) Splenosis after splenectomy and spleen tissue autoimplantation: Late followup study. *J Indian Assoc Pediatr Surg* 17, 104-106
74. Ye, S., *et al.* (2014) F-18 FDG hypermetabolism in mass-forming focal pancreatitis and old hepatic schistosomiasis with granulomatous inflammation misdiagnosed by PET/CT imaging. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 6339-6344
75. Ganc, R.L., *et al.* (2010) Small-bowel lesions caused by portal hypertension of schistosomal origin: a capsule endoscopy pilot study. *Gastrointest Endosc* 71, 861-866
76. Esmat, G., *et al.* (2013) Fibroscan of chronic HCV patients coinfectd with schistosomiasis 10.1016/j.ajg.2013.07.001. *Arab J Gastroenterol* 14, 109-112
77. Wu, S., *et al.* (2018) Evaluation of transient elastography in assessing liver fibrosis in patients with advanced schistosomiasis japonica 10.1016/j.parint.2018.01.004. *Parasitol Int* 67, 302-308
78. Parris, V., *et al.* (2014) Schistosomiasis japonicum diagnosed on liver biopsy in a patient with hepatitis B co-infection: a case report. *J Med Case Rep* 8, 45
79. Ramzy, I., *et al.* (2017) Impact of old Schistosomiasis infection on the use of transient elastography (Fibroscan) for staging of fibrosis in chronic HCV patients 10.1016/j.actatropica.2017.08.019. *Acta Trop* 176, 283-287
80. Veiga, Z.S.T., *et al.* (2017) Transient elastography evaluation of hepatic and spleen stiffness in patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 29, 730-735
81. Ichikawa, S., *et al.* (2015) Comparison of the diagnostic accuracies of magnetic resonance elastography and transient elastography for hepatic fibrosis 10.1016/j.mri.2014.10.003. *Magn Reson Imaging* 33, 26-30
82. Yoshioka, K., *et al.* (2008) Transient elastography: Applications and limitations. *Hepatol Res* 38, 1063-1068
83. Muthupillai, R., *et al.* (1995) Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science* 269, 1854-1857
84. Huwart, L., *et al.* (2006) Liver fibrosis: non-invasive assessment with MR elastography 10.1002/nbm.1030. *NMR Biomed* 19, 173-179
85. Yin, M., *et al.* (2007) Quantitative assessment of hepatic fibrosis in an animal model with magnetic resonance elastography 10.1002/mrm.21286. *Magn Reson Med* 58, 346-353
86. Ma, X., *et al.* (2016) Spleen Stiffness Is Superior to Liver Stiffness for Predicting Esophageal Varices in Chronic Liver Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One* 11, e0165786

87. Buechter, M., *et al.* (2016) Spleen and Liver Stiffness Is Positively Correlated with the Risk of Esophageal Variceal Bleeding. *Digestion* 94, 138-144
88. Razek, A.A., *et al.* (2015) Prediction of esophageal varices in cirrhotic patients with apparent diffusion coefficient of the spleen. *Abdom Imaging* 40, 1465-1469
89. Zhang, J., *et al.* (2013) Gamna-Gandy bodies of the spleen detected with susceptibility weighted imaging: maybe a new potential non-invasive marker of esophageal varices. *PLoS One* 8, e55626
90. Li, C., *et al.* (2013) Magnetic resonance susceptibility-weighted imaging versus other imaging modalities in detecting splenic siderotic lesions. *PLoS One* 8, e73626
91. Bezerra, A.S., *et al.* (2007) Chronic hepatosplenic schistosomiasis mansoni: magnetic resonance imaging and magnetic resonance angiography findings. *Acta Radiol* 48, 125-134
92. Bezerra, A.S., *et al.* (2008) Differentiating cirrhosis and chronic hepatosplenic schistosomiasis using MRI 10.2214/AJR.07.2639. *AJR Am J Roentgenol* 190, W201-207
93. Balassy, C., *et al.* (2014) Susceptibility-weighted MR imaging in the grading of liver fibrosis: a feasibility study. *Radiology* 270, 149-158
94. Taouli, B., *et al.* (2007) Diffusion-weighted MRI for quantification of liver fibrosis: preliminary experience. *AJR Am J Roentgenol* 189, 799-806
95. Yang, L., *et al.* (2018) Staging liver fibrosis with DWI: is there an added value for diffusion kurtosis imaging? *Eur Radiol* 28, 3041-3049
96. Yu, J.S., *et al.* (2010) Double contrast-enhanced MRI of viral hepatitis-induced cirrhosis: correlation of gross morphological signs with hepatic fibrosis. *Br J Radiol* 83, 212-217
97. Bahl, G., *et al.* (2012) Noninvasive classification of hepatic fibrosis based on texture parameters from double contrast-enhanced magnetic resonance images. *J Magn Reson Imaging* 36, 1154-1161
98. Polasek, M., *et al.* (2012) Molecular MR imaging of liver fibrosis: a feasibility study using rat and mouse models 10.1016/j.jhep.2012.04.035. *J Hepatol* 57, 549-555
99. Hoad, C.L., *et al.* (2015) A study of T(1) relaxation time as a measure of liver fibrosis and the influence of confounding histological factors. *NMR Biomed* 28, 706-714
100. Banerjee, R., *et al.* (2014) Multiparametric magnetic resonance for the non-invasive diagnosis of liver disease. *J Hepatol* 60, 69-77
101. Martirosian, P., *et al.* (2018) Spatial-temporal perfusion patterns of the human liver assessed by pseudo-continuous arterial spin labeling MRI. *Z Med Phys*
102. Cox, E.F., *et al.* (2018) Using MRI to study the alterations in liver blood flow, perfusion, and oxygenation in response to physiological stress challenges: Meal, hyperoxia, and hypercapnia. *J Magn Reson Imaging*
103. Palaniyappan, N., *et al.* (2016) Non-invasive assessment of portal hypertension using quantitative magnetic resonance imaging. *J Hepatol* 65, 1131-1139
104. Bradley, C.R., *et al.* (2018) Multi-organ assessment of compensated cirrhosis patients using quantitative magnetic resonance imaging. *J Hepatol* 69, 1015-1024
105. Stuker, F., *et al.* (2011) Fluorescence molecular tomography: principles and potential for pharmaceutical research. *Pharmaceutics* 3, 229-274
106. Krautz-Peterson, G., *et al.* (2009) Imaging schistosomes in vivo. *FASEB J* 23, 2673-2680
107. Salem, N., *et al.* (2010) In vivo imaging of schistosomes to assess disease burden using positron emission tomography (PET). *PLoS Negl Trop Dis* 4

108. Holtfreter, M.C., *et al.* (2011) Confocal laser scanning microscopy for detection of *Schistosoma mansoni* eggs in the gut of mice. *PLoS One* 6, e18799
109. Fritzsche, C., *et al.* (2012) Confocal laser scanning microscopy, a new in vivo diagnostic tool for schistosomiasis. *PLoS One* 7, e34869
110. Contag, C.H., and Bachmann, M.H. (2002) Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng* 4, 235-260
111. Gheysens, O., and Mottaghy, F.M. (2009) Method of bioluminescence imaging for molecular imaging of physiological and pathological processes. *Methods* 48, 139-145
112. Mezzanotte, L., *et al.* (2017) In Vivo Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications. *Trends Biotechnol* 35, 640-652
113. Suff, N., and Waddington, S.N. (2017) The power of bioluminescence imaging in understanding host-pathogen interactions. *Methods* 127, 69-78
114. Davies, S.J., *et al.* (2005) In vivo imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs. *Int J Parasitol* 35, 851-859
115. Harvie, M.C.G., *et al.* (2019) Live imaging of collagen deposition during experimental hepatic schistosomiasis and recovery: a view on a dynamic process. *Lab Invest* 99, 231-243
116. Cheng, P.C., *et al.* (2013) Evaluating the potential of a new isotope-labelled glyco-ligand for estimating the remnant liver function of schistosoma-infected mice. *Parasite Immunol* 35, 129-139
117. Kosaka, M., *et al.* (2000) In vivo NMR micro-imaging of kidney and liver of mouse at 9.4 T. *Jpn J Physiol* 50, 463-467
118. Masi, B., *et al.* (2015) In Vivo MRI Assessment of Hepatic and Splenic Disease in a Murine Model of Schistosomiasis [corrected]. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0004036

Figure 1

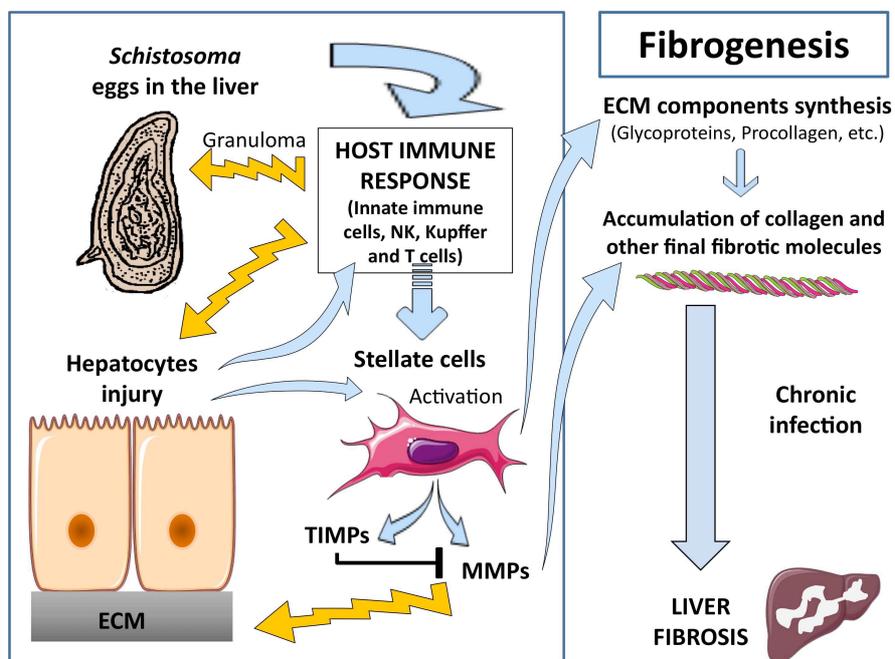


Figure 2

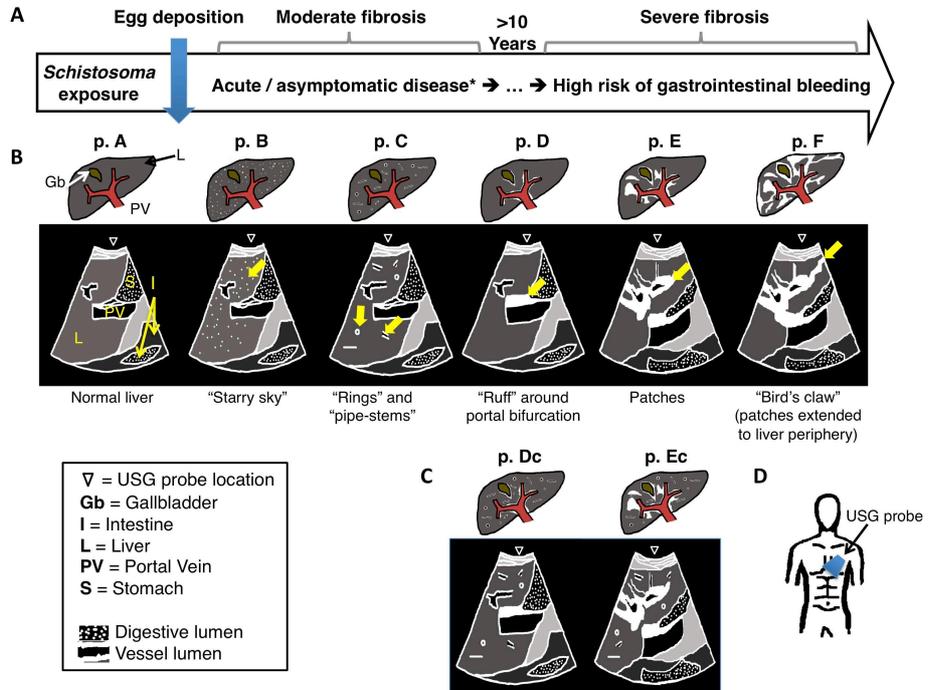
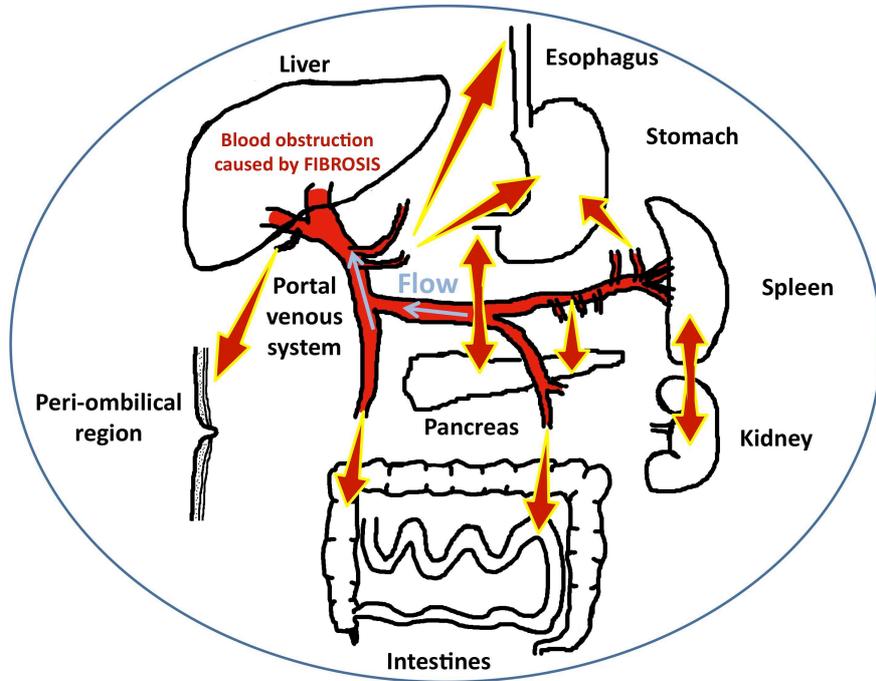


Figure 3



**Table 1: General features of abdominal medical imaging modalities**

Advantages/Drawbacks	USG	CT	MRI	Scintigraphy+ SPECT	PET	Endoscopy
<b>Portability</b>	yes	no	no	no	no	no
<b>Cost of equipment</b>	Low (about 30k \$)	≈ 1M \$	>1M \$	≈ 500000 \$ (scintigraphy gamma camera only)	PET+CT≈ 2M \$	< 25000 \$
<b>Invasiveness</b>	no*	no*	no*	yes	yes	yes-anaesthesia required
<b>Scanning time / imaging procedure duration</b>	Real-time imaging / 5min	30s / 10 min**	5 / 30 min**	30 min / 4 hours	20 min, but a radionuclide is injected 1 h before PET imaging	Real time imaging but 1-2 h required due to preparation time
<b>Basic principle /type of radiation-tissue interaction</b>	Propagation and reflection of ultra-high frequency (1 to 20 MHz) acoustic waves (ultrasound)	Attenuation of transmitted X-rays	Absorption and reemission of radiofrequency electromagnetic waves by nuclear magnetic resonance of tissue hydrogen	Detection of $\gamma$ -ray photons emitted by labelled biomolecules (radiopharmaceutics) injected to the patient	Detection of $\gamma$ -ray annihilation photons emitted by positron interaction from $^{18}\text{F}$ and electron from tissue	Introduction of an endoscope conducting visible light <i>via</i> optic fibres in the gastrointestinal tract
<b>Principal imaging applications</b>	Anatomical Imaging Functional Imaging	Anatomical imaging	Anatomical Imaging Functional/physiologic Imaging Metabolic Imaging	Functional/ physiologic Imaging Metabolic Imaging	Functional/ physiological Imaging Metabolic Imaging	Anatomical Imaging
<b>Use of contrast agents (CA) or radionuclide tracer (RN)</b>	CA: Micro bubbles	CA: mainly Iodine - containing CA	CA: Gadolinium chelates manganese chelates	RN : Technetium 99m labelled molecules most widely used	RN: Main radionuclides: $^{18}\text{F}$ , $^{15}\text{O}$ , $^{13}\text{N}$ , $^{11}\text{C}$ labelled molecules (ie: $^{18}\text{F}$ 2-Desoxy Glucose)	no
<b>Ionizing radiation</b>	no	Yes, external	no	Yes, internal (radionuclides)	Yes, internal (radionuclides) plus external if combined with CT	no
<b>Spatial resolution (range)</b>	0.3 to 1.5 mm depending on frequency	0.3 to 1 mm depending on X-ray tube dimensions and detector size	0.5 to 3 mm depending on acquisition time, magnetic field strength and gradient coils	5 to 12 mm depending on collimator and detector system	4 to 10 mm depending on detector size	< 0.1 mm depending on camera matrix
<b>Penetration depth</b>	1 to 30 cm depending on frequency	Limitless	Limitless	Limitless	Limitless	Superficial

Soft tissue contrast	Good	Medium	Excellent	na	na	Visual contrast
<b>Vascular imaging</b> <b>-Anatomy of vessels (AV)</b> <b>-Hemodynamics (HD)</b>	AV: 2D, angiography, venography. HD: blood flow, blood volume, velocity, using Doppler or CA injection	AV: 2D and 3D angiography, venography. HD: blood flow, blood volume, velocity, arterial, vein and perfusion phases, using CA injection	AV: 2D and 3D, angiography, venography. HD: blood flow, blood volume, velocity, perfusion. CA injection not necessary	HD : Blood Flow	HD: blood flow	AV limited superficial mucosal vessels improved with narrow band imaging (higher relative intensity of blue light)
<b>2D or 3D whole organ imaging</b>	2D imaging, volumetric analysis with 3D option	2D and 3D imaging	2D and 3D imaging	2D and 3D imaging	3D whole body imaging but requires CT or MRI for anatomical location	2D and 3D images, videos
<b>Splenic siderotic nodules</b>	Hyperechogenic parenchymal foci, acoustic shadowing if calcified	Attenuation dependent on calcification, hypodense on contrast enhanced CT	Hypointense lesion on T <sub>1</sub> w, T <sub>2</sub> w, SWI, even after CA administration	no	no	no
<b>Image-guided intervention / Theranostic</b>	Use of radiofrequencies for abdominal cancer treatment by HiFu and liver biopsies	Not for abdominal diseases	No (HiFu in clinical research)	Yttrium for liver cancers	No (theranostics application for other infectious diseases)	Yes, endoscopic variceal ligation or sclerotherapy
<b>Limitations</b>	Operator dependant, only small number of images are usually saved, presence of gas filled hollow organs stops signal	Allergic risk to Iodine-based CA, repeated exposure to ionising radiations not recommended	Long scan times, absolute contraindications exist	Repetitive exposure to ionizing radiations not recommended and main application in oncology	Few scanners available, repetitive exposure to ionizing radiations not recommended and main application in oncology	Sedation or anaesthesia required, surgical team needed, infectious risk

\*: non-invasive technique in the absence of contrast agent injection

\*\* : depending on protocols

**Abbreviations:** CT= computed tomography, **HiFu**= High intensity Focused ultrasound **MRI**= magnetic resonance imaging, **PET**= positron emission tomography, **PV**=portal vein, T<sub>1</sub>-W= T<sub>1</sub>-weighted MRI, T<sub>2</sub>-W= T<sub>2</sub>-weighted imaging, SWI= susceptibility weighted imaging, **USG**= Ultrasonography,

**Table 2: Particular interests of abdominal imaging modalities for the assessment of human gastrointestinal schistosomiasis**

	USG	CT	MRI	Scintigraphy+ SPECT	PET	Endoscopy
<b>Imaging findings in gastro-intestinal schistosomiasis</b>						
Schistosome	In combination with endoscopy	No	No	No	No	no
Granulomatous inflammation	Yes echogenic signal	With and without CA	Anatomical MRI	yes	Yes	Yes (celioscopy)
Liver fibrosis (Symmers pipestem fibrosis)	Yes, standard patterns, measurement of portal vein, gall bladder and second order branches fibrosis	Yes	Yes,	No	No	No
Portal hypertension	Portal vein diameter, blood flow and velocity Doppler USG	Portal phase after CA injection, detection of vessel dilation	Anatomical MRI	Yes	No	Yes, qualitative (celioscopy)
Hepatomegaly	Qualitative evaluation and organ axis measurements, no volumetric analysis without 3D option	Yes, volumetric analysis	Yes, volumetric analysis	Morphological evaluation	No	Yes, qualitative (celioscopy)
Splenomegaly	Qualitative evaluation and organ main axis measurement, no volumetric analysis without 3D option	Yes, volumetric analysis	Yes, volumetric analysis	Yes	No	Yes, qualitative (celioscopy)
Gall bladder abnormalities	Yes, wall thickness measurement	Yes, gall bladder wall thickening and inflammation visible by CT	Yes	No	No	No
Esophageal varicoses	Yes with special probe	Yes, venography	Yes, venography	No	No	Yes, gold standard
Visceral collaterals	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes, qualitative (celioscopy)
Ascites	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes, qualitative (celioscopy)

**Abbreviations:** CT= computed tomography, MRI= magnetic resonance imaging, PET= positron emission tomography, PV=portal vein, USG= Ultrasonography

**Table 3: Elastography-based techniques to assess liver fibrosis in hepatosplenic Schistosomiasis**

References	Schistosomiasis without comorbidities	Parasite strain	Population characteristics	Elastographic method	Imaging modalitie(s) combined to elastography	Main findings	Limitations
Wu et al, Parasitology International, 2018	No	<i>S. japonicum</i>	106 chinese patients with advanced schistosomiasis and no current infection, 80 patients without other liver disease, 73 patients with full information and measurements (METAVIR Score: 3 F0, 11 F1, 22 F2, 24 F3, 13 F4)	Transient elastography, FibroScan	USG used to classify into 5 grades, Doppler USG, histology	No correlation between Liver Stiffness Measurement (LSM) and USG grading but good correlation with histology. LSM is a reliable parameter for prediction of significant/advanced liver fibrosis and cirrhosis in patients with advanced schistosomiasis japonica.	Small number of subgroups
Veiga et al, Eur J Gastroenterol Hepatol, 2017	No	<i>S. mansoni</i>	77 brazilian patients: 30 hepatosplenic schistosomiasis (24% Niamey B patern, 28% Niamey C patern, 48% Niamey D patern), 30 HCV with cirrhosis and 17 controls.	Transient elastography, FibroScan	USG with doppler-fluxometry, ultrasound color Doppler with convex 3,5 MHz transducer	Schistosomiasis increases LSM values compared to controls.	Small number of subgroups. No analysis including only patients with advanced Schistosomiasis like D patern and no strong paterns (E or F). Differentiation of Schistosomiasis patient to cirrhosis by LSM is a biased.
Ramzy et al, Acta Tropica 2, 2017	HCV	Unknown, <i>S. mansoni</i> most likely*	352 egyptian patients with chronic HCV hepatitis (no decompensated cirrhosis, no HCC): 122 controls,	Transient elastography, FibroScan	USG	Schistosomal antigens, anti-schistosomal antibodies and periportal tract	Analysis does not include thickness of second order branches,

			122 with positive antischistosomal antibodies and without periportal tract thickening, 108 with positive antischistosomal antibodies and periportal tract thickening.			thickening did not have significant impact on agreement between biopsy and fibroscan. Only higher antischistosomal antibody titres effected the correlation	gallbladder. Lack of multivariate analysis including USG patterns.
Bonnard et al, Journal of viral hepatitis, 2015	HCV	Unknown, <i>S. mansoni</i> most likely	4 patients with hepatic schistosomiasis detected on liver biopsy out of a group of 500 egyptian patients with CHC of HCV genotype 4	Transient elastography, FibroScan	No	No influence on elastography results of positive schistosomiasis serology	Very small number of patients with schistosomiasis histological lesions and no follow up.
Esmat et al, Arab Journal of Gastroenterology, 2013	HCV	Unknown, <i>S. mansoni</i> most likely	67 patients presenting positive schistosomal serology out of a group 231 chronic HCV Egyptian patients (31 F0-F1, 13 F2, 14 F3 and 9 F4)	Transient elastography, FibroScan	No	Positive schistosomal serology status disagrees with the hepatitis results of liver biopsy and fibroscan. More obvious in F2 and F3 stages.	Small number of patients by subgroups. No other techniques USG to determine fibrosis pattern. Lack of information about current or past infection.

**HCC**= Hepatocellular Carcinoma, **HCV**=Hepatitis C Virus, **CHC**=Chronic Hepatitis C, **LSM**=Liver Stiffness Measurement

**Table 4: Preclinical imaging studies of experimental hepatosplenic schistosomiasis**

References	Imaging modalities and methods	Animal model and groups	Parasite, number and mode of infestation	Observation period	Assessment of pathogenic features	Main findings	Potential applications
Harvie et al, Labo Invest	Bioluminescence imaging, endogenous expression of luciferase under a collagen promotor	Male and female B6.Coll 1A-luc+ mice (C57BL6/J background) SjC mice (n=12), SjP mice (n=14) SjC mice treated with PZQ (n=10), SjP mice treated with PZQ (n=10) Control group (n=5)	<i>S. Japonicum</i> (SjC, Chinese origin, 35 cercariae) and <i>SjP</i> (Philippines origin, 14 cercariae)	From weeks 4 to 10 after infection for SjC mice, and from weeks 4 to 11 for SjP.	Dynamic assessment of collagen deposition	Dynamic assessment of collagen deposition	Assessment of antifibrotic drug effects in infected mice and
Maezawa K et al. Tropical Medicine and Health, 2018	Ultrasound Imaging, classic (18–4 MHz human probe) and High-Resolution (50 MHz probe, resolution 30 µm)	5-week old BALB/C female mice (infected mice: n=22) and controls (number unknown)	<i>S. Japonicum</i> (Yamanashi strain), 25 cercariae (n=12) and 10 cercariae (n=10), percutaneous route.	Up to 13 weeks (n=12) and one year (n=10) post infection	Morphometry of spleen and liver, signs of portal hypertension, intestinal wall thickening, echogenic patterns of liver fibrosis	Visualisation of live worms in portal vein. Real-time evaluation of schistosomiasis impact on digestive organs.	Studies of new anti-parasitic drugs on worms, longitudinal preclinical studies (therapy, molecular mechanisms of disease, transfer to the clinical setting)
Masi et al, PloS Negl Trop Dis, 2015	Vertical MRI system @11.75T, 2D anatomical MRI with and without Gd-DOTA injection Relaxometric studies (T <sub>2</sub> mapping, T <sub>2</sub> * mapping)	6-week old CBA/J female mice, infested mice (n=12) and controls (n=12)	<i>S. Mansoni</i> , 30 cercariae, percutaneous route	2, 6 and 10 weeks post infection, comparison with histology	Liver and spleen volumetry, and portal hypertension assessment with anatomical MRI. Fibrosis assessment with relaxometry.	Detection of indirect signs of portal hypertension. Quantification of splenomegaly and hepatomegaly. Identification of T <sub>2</sub> relaxation time as a marker for liver fibrosis.	Longitudinal studies of antifibrotic drug effects, mechanistic studies on genes or immune molecules involved on fibrosis. Transfer to the clinical setting.

Cheng et al, Parasite Immunol, 2013	MicroSPECT/CT with injection of 188Re-OCTAM	6 to 8-week old BALB/C male mice, divided in 3 groups of infected mice and one control group (n=7-10 per group)	<i>S. Mansoni</i> (Puerto Rican strain), 100 cercariae, percutaneous route.	Imaging at 1, 4, 24 and 48h post injection of 18Re-OCTAM, 9, 12 and 18 weeks post infection	Liver inflammation, necrosis and fibrosis	188Re-OCTAM identify various levels of remnant liver function in different stages of the disease	Longitudinal studies of antifibrotic drug effects, mechanistic studies on genes or immune molecules involved on fibrosis.
Salem N et al, PLoS Negl Trop Dis, 2010	micoPET using <sup>18</sup> F-DG + FMT with near-infrared imaging agent MRI system @7T for MSME T <sub>2</sub> -weighted images with contrast agent	6-week old female nude mice (nu/nu) Infected mice (n=35) and controls (n=4). Six mice treated with praziquantel	<i>S. Mansoni</i> , number of cercariae unknown, percutaneous route.	5-6 weeks of infection until imaging, comparison with histology	Localization and quantification of schistosome worms	<sup>18</sup> F-DG fixed by <i>S mansoni</i> worms. PET with <sup>18</sup> F-DG may allow in vivo quantification of the worm burden.	Studies of new anti-parasitic drug effects on worms. <i>In vivo</i> parasite detection in humans.
Krautz-Peterson et al, Faseb J, 2009.	FMT with near-infrared imaging agent	6 to 8-week old female BALB/c (exact number unknown)	<i>S. Mansoni</i> (Puerto Rican strain), 100 or 50 cercariae per mouse, <i>S. Hematobium</i> , 25 cercariae per mouse and <i>S. Japonicum</i> , 25 cercariae per mouse. Percutaneous route.	5 weeks ( <i>S. Mansoni</i> ), 8 weeks ( <i>S. Hematobium</i> ) and 6 weeks ( <i>S. Japonicum</i> ) after infection	Localization and quantification of schistosome worms	New method to detect, quantify and localize worms. May allow evaluation of antiparasitic drugs.	Studies of new anti-parasitic drugs effects on worms.
Davies S et al. Int J Parasitol, 2005	Bioluminescence imaging, genetically encoded luciferase (luc) reporter driven by an eosinophil peroxidase (EPX) promoter, intraperitoneal injection of luciferase substrate luciferin	EPX334-luc or EPX339-luc mice and EPX-luc hemizygous mice as controls (age and exact number unknown)	<i>S. mansoni</i> , 50 cercariae, subcutaneous route.	Over 12 week period post infection	Eosinophilia and eosinopoiesis	Detection and quantification of eosinophilia and eosinopoiesis in schistosomiasis. First <i>in vivo</i> description of eosinopoietic response to schistosomes.	Study of molecules modulating eosinophilia and eosinopoiesis in schistosomiasis.
Kosaka et al. Jpn J Physiol, 2000	Vertical MRI system @9.4T, anatomical T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub> , T <sub>2</sub> *-weighted MRI, no contrast agent	10 to 20-week old BALB/C infected mice and controls (exact number unknown)	<i>S. mansoni</i> , 150 cercariae, subcutaneous route.	Followed for 13 weeks post infection	Assessment of liver disease and involvement of intrahepatic bile ducts	Detection of a patchy pattern in the liver after 6 weeks of infection related to fibrosis.	Anatomical MRI for the assessment of liver disease in preclinical studies

**Abbreviations:** CT= computed tomography, LSM= Liver Stiffness Measurement, MRI= magnetic resonance imaging, FMT= Fluorescence ,molecular tomography, PET= positron emission tomography, PZQ= praziquantel, SPECT= Single-photon emission computed tomography, USG = Ultrasonography