

ANALYSES HISTOLOGIQUES DU FOIE DES SOURIS INFECTÉES PAR SCHISTOSOMA MANSONI APRÈS TRAITEMENT PAR OZOROA PULCHERRIMA SCHWEINF

Hermine JATSA BOUKENG ^{1,4,*}, Catherine CANNET ²,
Femoe Membe Ulrich^{1,4}, Nestor FEUSSOM GIPWE ^{1,4},
Paul Désiré DZEUFIET DJOMENI ¹, Louis-Albert TCHUEM TCHUENTÉ ^{3,4}
et Pierre KAMTCHOUING ¹

* mjatsa@yahoo.fr

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

RESUME

Dans l'infection à *Schistosoma mansoni*, la majorité des œufs pondus par les vers femelles sont embolisés dans l'intestin puis le foie où ils déterminent la formation de granulomes évoluant vers le stade fibrotique. L'utilisation intensive du praziquantel, médicament de choix contre la schistosomiase pourrait conduire à une résistance des souches de schistosomes, d'où l'importance de développer une chimiothérapie alternative ou complémentaire. Cette étude histologique a été conduite pour vérifier le potentiel antifibrotique de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique des racines de *Ozoroa pulcherrima* (EAO_p) chez des souris infestées par *S. mansoni*. Un traitement quotidien à EAO_p (100, 200 ou 400 mg/kg) a été réalisé pendant 28 jours à partir du 36^{ème} jour post-infestation. Les souris ont été sacrifiées au 65^{ème} jour post-infection, puis des paramètres parasitologiques et histologiques évalués dans le foie. Des coupes de foie de 5 µm ont été colorées à l'hématoxyline-éosine afin d'évaluer les infiltrations leucocytaires et la réaction granulomateuse. La coloration au picrosirius a été également entreprise pour la mise en évidence du collagène, ainsi que la coloration au Giemsa pour visualiser les œufs du parasite et la larve qu'ils renferment. Le traitement à EAO_p a entraîné une réduction significative des charges parasitaire ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) et ovulaire hépatique ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) à toutes les doses. L'analyse histologique après traitement aussi bien à EAO_p qu'au praziquantel a révélé une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires dans le parenchyme hépatique. De plus, le nombre et la taille des granulomes hépatiques ont été considérablement réduits. L'effet de cette plante a été aussi marqué par la diminution du dépôt de collagène autour des œufs du parasite. Cette étude est une preuve de l'activité antifibrotique de la fraction à l'acétate d'éthyle de *Ozoroa pulcherrima* et confirme ainsi l'utilisation empirique de cette plante dans le traitement des helminthiases intestinales. EAO_p pourrait être considérée comme thérapie alternative ou complémentaire au praziquantel.

MOTS CLES

Schistosoma mansoni*, histologie, foie, hématoxyline et éosine, Picrosirius, Giemsa et *Ozoroa pulcherrima

ABSTRACT

During *Schistosoma mansoni* infection, eggs released by female worms are embolized mostly in the intestine and the liver, where they induce granuloma formation which is sometimes followed by fibrosis. The intensive use of praziquantel for the treatment of schistosomiasis has raised concerns about the possible emergence of drug-resistant schistosomes. The search for alternative drugs has become a priority. The aim of this study was to histologically assess the antifibrotic potential of the ethyl acetate fraction from *Ozoroa pulcherrima* (EAO_p) roots methanolic extract on *S. mansoni*-infected mice. The fraction at 100, 200 and 400 mg/kg was administered orally and daily to infected mice for 28 days, starting from 36th day post-infection. All mice were sacrificed at 65th day post-infection. Parasitological burden and histology of the liver were conducted. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed to evaluate the inflammatory infiltration and the granulomatous reaction. Liver sections were also stained by picrosirius method for collagen evaluation. Giemsa staining method was also performed to visualize parasite eggs and the larvae inside it. The treatment produced significant reduction of the worm burden ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) and the number of eggs accumulated in the liver ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) at all doses. Histological analysis showed that after treatment of *S. mansoni*-infected mice with EAO_p or praziquantel, inflammatory cells infiltration, the number and consistence of liver's granuloma were reduced. This was characterized by an important reduction of collagen deposition around the eggs. This study is a histologically proof of the antifibrotic activity of *Ozoroa pulcherrima* ethyl acetate fraction and also supports the traditional use of this plant for the treatment of intestinal helminthiasis. EAO_p could then be consider as an alternative or complementary therapy to praziquantel.

KEY WORDS

Schistosoma mansoni*, liver, histology, hematoxylin-eosin, Picrosirius, Giemsa, *Ozoroa pulcherrima

INTRODUCTION

La schistosomiase ou bilharziose est une maladie tropicale négligée causée par un ver plat du genre *Schistosoma*. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elle affecte plus de 258 millions de personnes dans le monde dont plus de 90% en Afrique. Elle demeure un réel problème de santé publique car la morbidité et la mortalité liées à cette pathologie restent élevées [1, 2]. La pathologie dans l'infection à *Schistosoma mansoni* est principalement causée par les œufs embolisés dans le foie de l'hôte définitif, où ils déterminent la formation de granulomes et l'initiation de la réponse immunitaire de l'hôte [3]. Le granulome bilharzien peut évoluer et faire place à une fibrose irréversible associée à une accumulation excessive de collagène [4]. La lutte contre la schistosomiase repose principalement sur le traitement de masse par le praziquantel (PZQ), unique médicament actif contre toutes les espèces de schistosomes [5]. Seulement, son utilisation intensive pourrait conduire à un risque de résistance au traitement, une augmentation du niveau de tolérance du parasite vis-à-vis de la molécule et à des probables échecs thérapeutiques [6, 7]. Il s'avère donc important de développer des mesures thérapeutiques alternatives et/ou complémentaires au praziquantel. La phytothérapie étant de nos jours considérée comme une source potentielle de molécules bioactives contre les maladies tropicales négligées, nous nous sommes intéressés à *Ozoroa pulcherrima*, plante de la famille des Anacardiaceées qui est utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des helminthiases

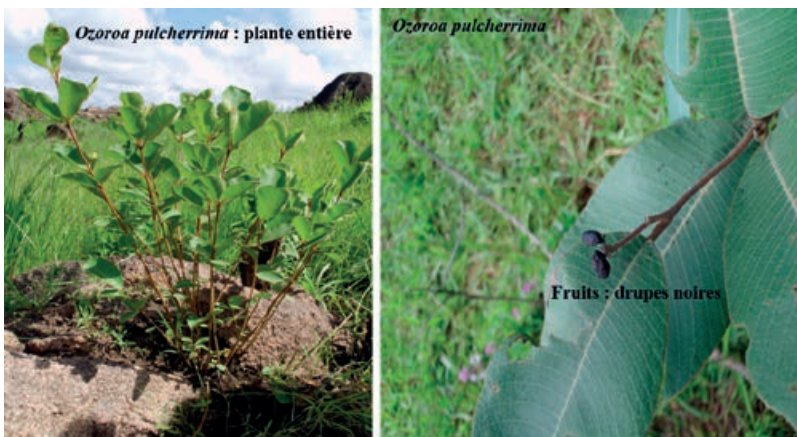


Figure 1 : Photo de *Ozoroa pulcherrima* (prise à Wakwa au Cameroun en juillet 2012).

intestinales. Encore appelée *Heeria pulcherrima*, cet arbuste mesure environ 1 m de haut. Ses feuilles sont verticillées par trois, l'inflorescence est en panicule terminale ou axillaire. La fleur blanc crème a cinq sépales triangulaires et cinq pétales. Le fruit est une drupe noire à maturité. Cette espèce est très répandue du Sénégal au Cameroun (**Figure 1**) [8]. Les résultats des travaux antérieurs entrepris sur cette plante ont montré que l'extrait méthanolique de ses racines était doué de propriétés schistosomicide, antiinflammatoire et antioxydante [9]. En outre, trois acides alkylnacardiques : Ozocardic A, Ozocardic A et Ozocardic B ; ainsi qu'une céramide nommée Ozoromide ont été isolés de *O. pulcherrima* [10, 11, 12]. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'activité schistosomicide et, par des analyses histologiques, le potentiel antifibrotique de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait au méthanol des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur le foie des souris infectées par *Schistosoma mansoni*.

MATERIELS ET METHODES

1. Récolte de la plante et préparation de la fraction à l'acétate d'éthyle

Les racines de *Ozoroa pulcherrima* ont été récoltées dans la localité de Wakwa près de la ville de Ngaoundéré dans la région de l'Adamaoua au Cameroun en juillet 2012. La plante a été identifiée à l'Herbier National du Cameroun par comparaison à l'échantillon N° 13667 SRF/Cam. L'extrait au méthanol a été préparé par macération de 4130 g de poudre dans du méthanol pendant 48 heures. La solution a été filtrée puis le solvant éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif (BUCHI B-480) à 40°C sous pression réduite. L'extrait méthanolique obtenu (rendement d'extraction : 3,34%) a été épuisé successivement à l'hexane, puis à l'acétate d'éthyle. Après évaporation du solvant, nous avons obtenu 38,23g de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait au méthanol des racines de *Ozoroa pulcherrima* (EAOp).

2. Infestation et traitement des animaux

Les animaux utilisés pour notre expérimentation étaient des souris blanches de la souche Balb/c âgées d'environ 60 jours. Elles ont été individuellement infestées

avec 50 cercaires de *S. mansoni* provenant des mollusques hôtes intermédiaires *Biomphalaria pfeifferi*, par la technique d'immersion de la queue et des pattes [13]. A partir du 36^{ème} jour post-infestation, un traitement quotidien pendant 28 jours à EAOp aux doses de 100 (groupe EAOp 100), 200 (groupe EAOp 200) et 400 mg/kg (groupe EAOp 400) a été effectué. Trois groupes témoins ont été constitués : l'un de souris infestées et traitées au praziquantel (Cesol[®], Merck) à la dose de 100 mg/kg pendant 5 jours (PZQ), l'autre de souris infestées et non traitées (IC), ainsi qu'un groupe de souris saines (TS). Après cette période de traitement, les animaux ont été sacrifiés au 65^{ème} jour post-infestation.

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

3. Sacrifice et évaluation des charges parasite et ovulaire hépatique

Après anesthésie par injection de pentobarbital, les souris ont été sacrifiées puis disséquées. Elles ont été perfusées en utilisant la méthode décrite par Duvall et De Witt, 1967 [14] puis modifiée par Lewis et al., 2013 [15]. Les vers logés dans les veines mésentériques et hépatiques ont ainsi été séparément collectés par souris puis comptés au stéréo-microscope.

L'évaluation de la charge ovulaire hépatique de chaque souris a été effectuée selon le protocole décrit par Cheever et al., 1968 [16]. Le lobe gauche du foie a ainsi été dilacéré dans une solution de KOH 4% à 37°C pendant 6h. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot suspendu dans du NaCl 9%. Une série de 3 lavages (centrifugation - élimination du surnageant - suspension du culot dans le liquide physiologique) a été effectuée et le culot renfermant les œufs de *S. mansoni* utilisé pour le comptage au microscope optique (objectif x10) de marque LEICA. Deux aliquots de 100 µL ont été montés sur des lames et recouverts de papier cellophane préalablement imbibé de solution de Kato-Katz. Les œufs ont été comptés par souris et leur nombre par gramme de foie évalué.

4. Analyses histologiques

Le lobe carré du foie a été prélevé puis fixé dans du formol à 10% tamponné, pH 7,2 pendant 4 semaines. A l'issue de la fixation, les tissus ont été déshydratés dans des bains d'éthanol de degré croissant (70% à 100%), éclaircis dans du xylène et inclus en paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Reichert-Jung 2030, Germany). Les sections obtenues ont été dépliées dans un bain marie à 40°C et placées sur des lames porte-objet. Trois jeux de lames ont été préparés par animal, puis les lames ont été séchées dans une étuve (Memmert, Germany) à 45°C pendant 24 heures. Après séchage, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains de xylène par séjour de 5 min/bain. Elles ont ensuite été réhydratées par passages successifs dans une série de trois bains d'éthanol 100° (10 min/bain), puis un bain d'éthanol 95° (5 min) et enfin un bain d'éthanol 70° (5 min). Les lames ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis les colorations à l'hématoxyline-éosine (H&E), au Picrosirius (PS) et au Giemsa réalisées.

4.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine

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

4.2. Coloration au picrosirius

Cette coloration a été entreprise pour mettre en évidence la fibrose et typer le collagène au niveau des foyers granulomateux hépatiques. Le Sirius F3BA, entrant dans la composition du picrosirius est un colorant spécifique du collagène qui

permet de différencier les collagènes I et III lorsqu'il est observé en lumière polarisée [18, 19]. La préparation des colorants est décrite ci-après.

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

Les lames déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans la solution d'hématoxyline de Weigert pendant 12 min, puis rincées à l'eau courante du robinet pendant 10 min et à l'eau distillée pendant 3 min. Après ce lavage, les lames ont été introduites dans la solution de Picrosirius pendant 1 heure et différenciées dans deux bains d'eau acétifiée à 0,5% (20 à 30 secondes/bain). À l'issue de cette étape de différenciation, les lames ont été égouttées pendant deux minutes, puis déshydratées dans deux bains d'éthanol 100% (5 min/bain), éclaircies dans du xylène (3x5 min) et enfin montées sous résine Pertex® (Histolab).

4.3. Coloration au Giemsa

Cette coloration a été réalisée afin de mettre clairement en évidence les œufs du parasite ainsi que la larve (miracidium) qu'ils renferment.

Les lames déparaffinées et réhydratées ont été plongées dans une solution de tampon phosphate pH 6,8 (Référence 95411, Sigma-Aldrich) pendant 5 min puis mises une nuit à 37°C, dans une solution de travail de Giemsa préparée à partir d'une solution mère (Référence 320300, RAL) diluée à 4% dans du tampon phosphate pH 6,8. Après refroidissement de la solution les coupes ont été différenciées sous microscope dans de l'acide acétique à 0,5% jusqu'à obtention d'un fond de coupe rose. Les lames ont ensuite été égouttées pendant deux minutes, puis déshydratées dans deux bains d'éthanol à 100% (2 min/bain), éclaircies dans du xylène (3x3 min) et montées sous résine Pertex® (Histolab).

4.4. Analyses microscopiques

Après quelques heures de séchage à l'air, toutes les lames ont été observées au microscope optique (Axioscope A1, Zeiss®) connecté à une caméra digitale 3CCD 2 millions de pixels (Jai200Ge, JAI). Les images ont été capturées et analysées à l'aide des logiciels Archimed® et Histolab®, (Microvision Instruments).

RESULTATS

Le traitement à la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait au méthanol des racines de *Ozoroa pulcherrima* (EAOp) a entraîné une réduction significative de la charge parasitaire de 57,85% ($p < 0,01$) et 76,42% ($p < 0,001$) aux doses de 200 et 400 mg/kg respectivement par rapport à celle des animaux infestés et non traités. Ce traitement a également entraîné une diminution significative et dose-dépendante de la charge ovulaire hépatique de 49,52% ($p < 0,01$), 69,27% ($p < 0,01$) et 79,98% ($p < 0,001$) aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg respectivement (**Figure 2**).

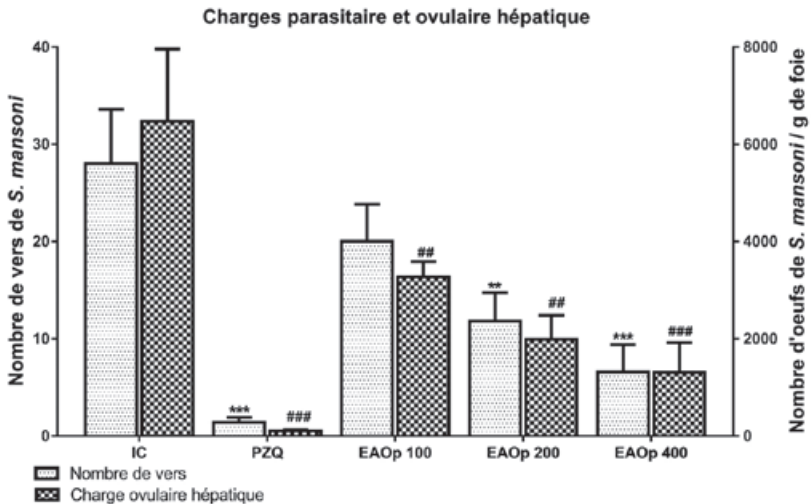


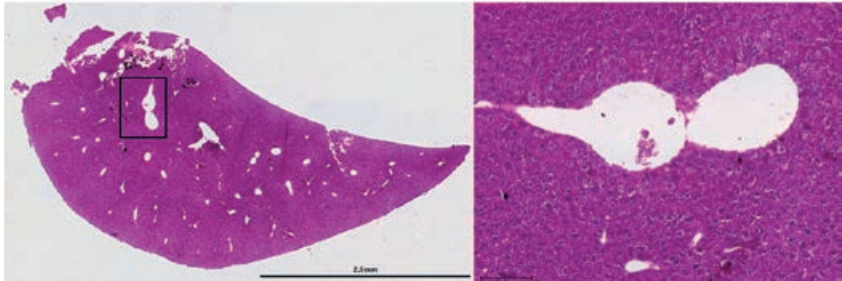
Figure 2 : Effets de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* sur la charge parasitaire et la charge ovulaire hépatique. Chaque barre représente la moyenne \pm ESM ($n = 5$).

*,# $p < 0,05$; **,## $p < 0,01$; ***,### $p < 0,001$: différences significatives entre les groupes tests (EAOp) et le groupe témoin (IC). IC (témoin négatif): souris infestées et non traitées; PZQ (témoin positif): souris infestées et traitées au praziquantel à 100 mg/kg; EAOp 100, EAOp 200 et EAOp 400 (groupes essais): souris infestées et traitées à la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima* aux doses respectives de 100, 200 et 400 mg/kg.

La coloration H&E des coupes de foie des souris saines (TS) montre une structure hépatique normale avec des lobules hépatiques, unités structurelles et fonctionnelles du foie. Chaque lobule est composé de travées d'hépatocytes irriguées par un réseau de capillaires sinusoides qui confluent dans la veine centrolobulaire. Au carrefour de plusieurs lobules, se trouve l'espace porte de Kiernan formé d'une triade constituée par une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et le canalicule biliaire (**Figure 3a**). Chez les souris infestées par *S.mansoni* et non traitées (IC), de nombreux et volumineux granulomes bilharziens associés à une intense infiltration leucocytaire sont visibles sur les coupes de foie colorées à H&E (**Figure 3b**). De l'observation des coupes de foie de souris infestées à *S. mansoni* puis traitées à EAOp (EAOp100 et EAOp400), il ressort que ce traitement entraîne une réduction tant du nombre que du volume des granulomes bilharziens (**Figures 3c et 3d**). Chez les souris infestées puis traitées au praziquantel (PZQ), les granulomes bilharziens sont pratiquement inexistantes sur les coupes de foie ; seules quelques cellules inflammatoires sont visibles (**Figure 3e**).

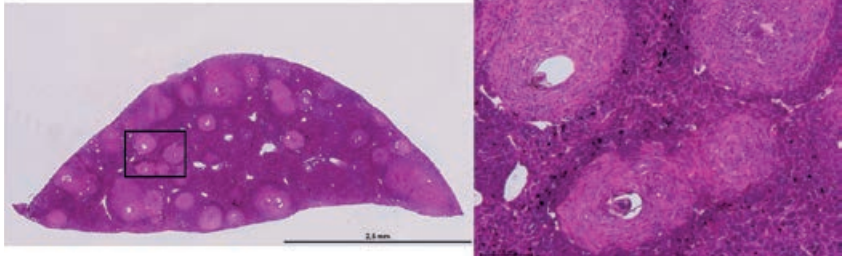
3a.

TS

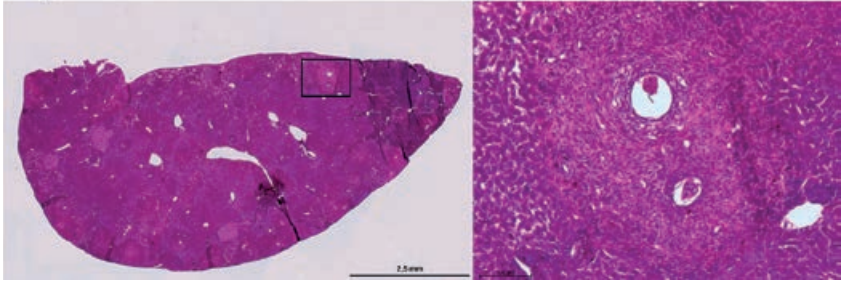


3b.

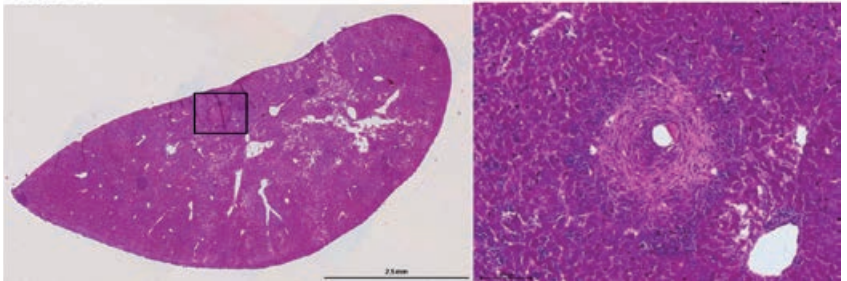
IC



3c. EAOp 100



3d. EAOp 400



3e. PZQ

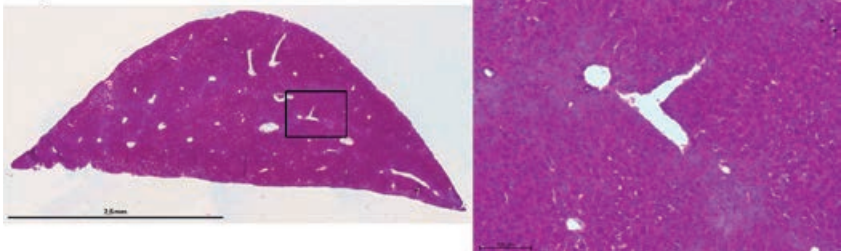


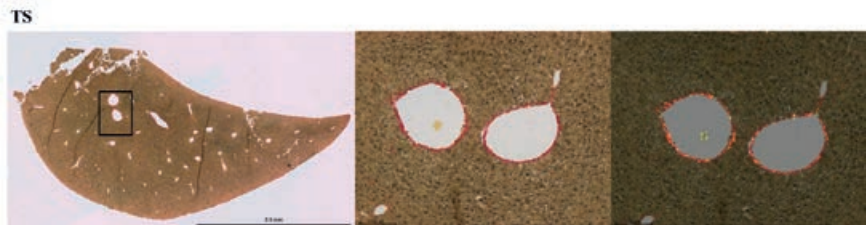
Figure 3 : Coupes histologiques du foie de souris colorées à l'hématoxyline-éosine

- TS : souris saines non traitées
- IC : souris infestées par *Schistosoma mansoni* et non traitées
- PZQ : souris infestées puis traitées au praziquantel à la dose de 100 mg/kg
- EAOp 100 : souris infestées puis traitées à la dose de 100 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*
- EAOp 400 : souris infestées puis traitées à la dose de 400 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*

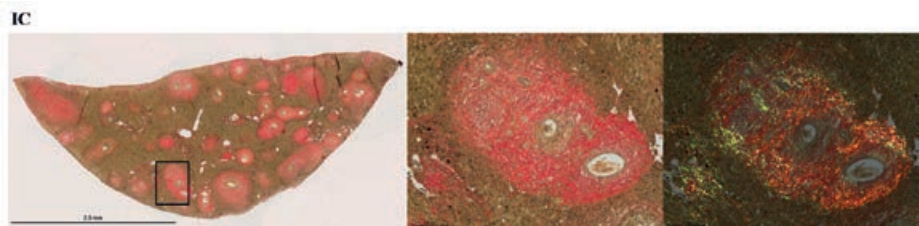
L'infection à *S. mansoni* (groupe IC) entraîne une réponse granulomateuse intense qui est réduite après traitement à EAOp à la dose de 100 ou de 400 mg/kg (groupes EAOp 100 et EAOp 400) ou disparaît quasiment après traitement au praziquantel (groupe PZQ).

Sur des coupes de foie de souris saines (TS), la coloration au picosirius a permis de visualiser le collagène sous-endothélial coloré en rouge au niveau de la veine centrolobulaire. En polarisation, ce collagène apparaît en rouge-orangé, ce qui atteste que c'est du collagène de type I (**Figure 4a**). D'intenses foyers fibrotiques caractérisés par des dépôts importants de collagène de type 1 sont visibles sur les coupes du foie des souris infestées et non traitées (IC). La polarisation rouge-orangé du collagène au niveau des granulomes bilharziens indique que ces nodules parasitaires sont « anciens », c'est-à-dire résultent d'une infection chronique dans le temps (**Figure 4b**). Après traitement à EAOp (EAOp100 et EAOp400), il se produit une diminution des nodules parasitaires fibrotiques ; le collagène étant moins dense (**Figures 4c et 4d**). Les fibres de collagène sont absentes sur le parenchyme hépatique de souris infestées puis traitées au praziquantel (**Figure 4e**).

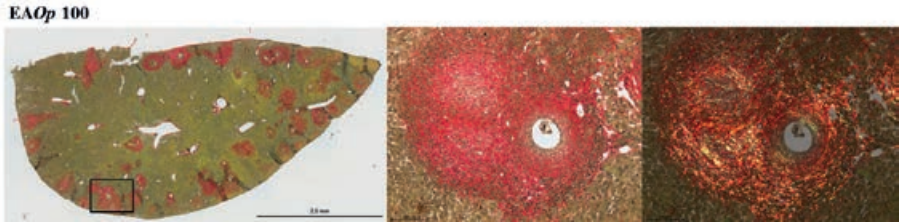
4a.



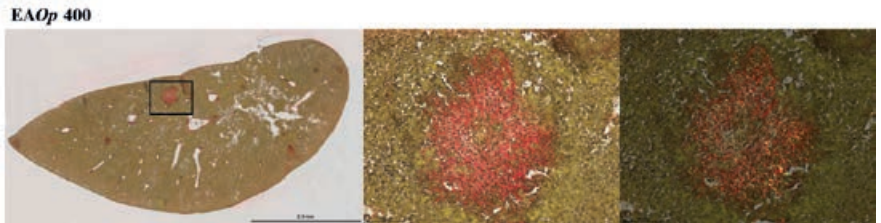
4b.



4c.



4d.



4e.

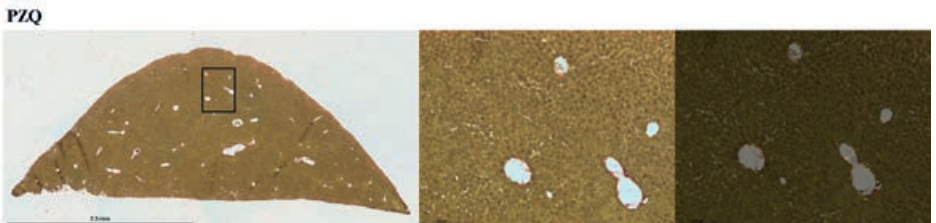


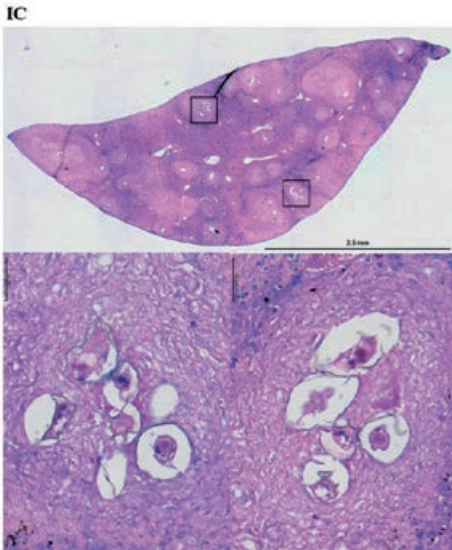
Figure 4 : Coupes histologiques du foie de souris colorées au Picrosirius

- TS : souris saines non traitées
- IC : souris infestées par *Schistosoma mansoni* et non traitées
- PZQ : souris infestées puis traitées au praziquantel à la dose de 100 mg/kg
- EAOp 100 : souris infestées puis traitées à la dose de 100 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*
- EAOp 400 : souris infestées puis traitées à la dose de 400 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*

Les coupes de foie des souris infestées par *S. mansoni* montrent d'intenses foyers fibrotiques qui diminuent considérablement après traitement par EAOp. Le traitement au praziquantel entraîne une quasi-disparition des fibres de collagène.

La coloration au Giemsa a permis de mettre en évidence sur des coupes de foie de souris infestées et non traitées (IC) des nodules parasitaires contenant de nombreux œufs du parasite renfermant la larve (miracidium) (**Figure 5a**). Une diminution du nombre d'œufs du parasite est observée chez les souris traitées à EAOp (**Figure 5b**).

5a.



5b.

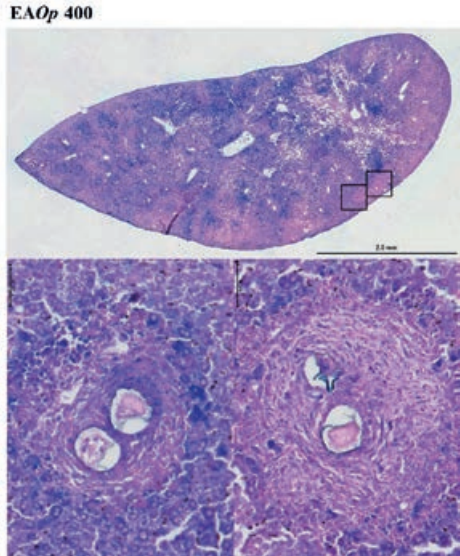


Figure 5 : Coupes histologiques du foie de souris colorées au Giemsa

- IC : souris infestées par *Schistosoma mansoni* et non traitées
- EAOp 400 : souris infestées puis traitées à la dose de 400 mg/kg de la fraction à l'acétate d'éthyle des racines de *Ozoroa pulcherrima*

Des nodules parasitaires renfermant de nombreux œufs de *S. mansoni* sont visibles sur les coupes de foie des souris du groupe IC tandis que chez les souris traitées à EAOp, le nombre d'œufs de parasite diminue.

DISCUSSION

Le phénomène classique associé à l'infection à *S. mansoni* est une réaction inflammatoire granulomateuse multicellulaire autour des œufs du parasite piégés dans les tissus [3, 20]. Dans le parenchyme hépatique, cette réaction inflammatoire périovulaire est mise en place pour protéger les hépatocytes contre les antigènes hépatotoxiques et cytolytiques sécrétés par le miracidium retrouvé à l'intérieur de

l'œuf du parasite. Ces antigènes entraînent en fait la lyse des cellules environnantes. La réaction inflammatoire est caractérisée par un recrutement intense de leucocytes, principalement les lymphocytes T CD4⁺ [20]. On y retrouve également les lymphocytes B et T CD8⁺, les macrophages de type M2 et les polynucléaires éosinophiles et neutrophiles [21, 22]. Simultanément, le granulome s'enrichit en fibroblastes, en fibres réticulaires, en cellules plasmiques et en fibres de collagène qui forment une architecture concentrique à l'origine d'une fibrose [21, 23]. La fibrose résulte ainsi d'un déséquilibre entre la fibrogénèse, processus actif de synthèse et de dépôt des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) et la fibrolyse, processus de dégradation de ces constituants par les métalloprotéinases matricielles [24, 25]. Parmi les constituants de la matrice extracellulaire, les collagènes I et III sont les constituants majeurs, car représentant 95% de la MEC d'un foie fibrotique [25, 26]. A côté de la détermination des concentrations sériques des différents types de collagène, l'analyse histologique du foie constitue la méthode directe de diagnostic de la fibrose [24].

Les granulomes bilharziens sont parfaitement identifiés sur des coupes histologiques de foie colorées à l'hématoxyline-éosine où les différents types de cellules inflammatoires sont bien visibles. La coloration au picosirius quant à elle, permet de mettre en évidence la fibrose et de typer le collagène au niveau des foyers granulomateux hépatiques. En effet, le Sirius F3BA qui entre dans la composition du picosirius est un colorant spécifique du collagène qui permet de différencier les collagènes I et III lorsqu'il est observé en lumière polarisée [18, 19]. Des données de la littérature ont révélé que chez des personnes souffrant de schistosomiase hépatosplénique (*Schistosoma mansoni*) ou urinaire (*Schistosoma haematobium*), tout comme dans le modèle murin de schistosomiase à *Schistosoma mansoni* ou à *Schistosoma japonicum*, les collagènes I et III sont présents sur les coupes histologiques de foie fibrotique [24, 25, 26]. Une augmentation des concentrations sériques de procollagène III marque cependant une activité fibrogénique intense (24). Au cours de l'évolution du granulome hépatique dans l'infection à *Schistosoma mansoni* chez des souris, deux types de collagène apparaissent successivement : d'abord le collagène de type III contenant des fibres réticulaires qui est par la suite remplacé par le collagène de type I contenant des fibres de collagène [27]. La fibrose hépatique peut cependant être réversible en cas de traitement au cours de la phase aigüe de l'infection. En effet, dans le modèle murin de la schistosomiase, plusieurs auteurs ont rapporté une régression de la fibrose après traitement durant

la phase aigüe de l'infection de souris infestées au praziquantel, à la pentoxifylline ou par la plante médicinale *Sida pilosa* [25, 26, 28]. Sur les coupes histologiques de foie de souris infestées puis traitées en phase aigüe de l'infection (7^{ème} semaine post-infection) au praziquantel, le collagène de type III est complètement absent, tandis que le collagène de type I diminue considérablement [26]. Au cours de notre étude, il ressort de l'observation des coupes histologiques de foie des souris infestées à *S. mansoni* puis traitées à la fraction à l'acétate d'éthyle de *O. pulcherrima* (EAOp) que non seulement les granulomes hépatiques sont réduits en nombre et en taille, mais également, le collagène III est absent et le collagène I est diminué de ces granulomes. Nos résultats corroborent ceux de El-Badrawy et al., 1991 [26] et ceux de Xiong et al., 2003 [25] qui ont aussi observé une diminution du collagène I des granulomes hépatiques. Dans cette étude, la réduction du nombre et de la taille des granulomes bilharziens après traitement des souris infestées par EAOp serait la conséquence de la diminution de la charge ovulaire hépatique consécutive à la diminution de la charge parasitaire. En effet, la diminution de la charge parasitaire et de la charge ovulaire hépatique des souris infestées après traitement par EAOp aux doses de 100 et 400 mg/kg semblent proportionnelles à la réduction du nombre et de la taille des foyers fibrotiques. La dose de 400 mg/kg apparaît comme étant plus efficace que celle de 100 mg/kg. La régression de la fibrose après le traitement à EAOp pourrait également faire suite à une diminution considérable de la synthèse du collagène et/ou à une augmentation de sa dégradation. EAOp pourrait ainsi inhiber la fibrogénèse et activer la régénération cellulaire [29, 30].

CONCLUSION

Cette étude a permis de prouver l'activité anti-helminthiase de *Ozoroa pulcherrima* ainsi que son potentiel antifibrotique dans l'infection à *Schistosoma mansoni* et confirme ainsi l'utilisation empirique de cette plante. Cette plante constituerait un bon candidat pour la mise sur pied d'un médicament schistosomicide.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'association Pathologie, Cytologie et développement (PCD) pour la réalisation de l'étude histologique ainsi que la Fondation Internationale pour la Science (FIS) pour son appui technique dans la réalisation de la partie expérimentale de ce travail à travers le financement F / 3622-2F octroyé au Dr Jatsa Boukeng Hermine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SARVEL AK, OLIVEIRA AA, SILVA AR, LIMA AC, KATZ N: Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS. Negl. Trop.Dis.* 2011, **5**, e990.
2. WHO. Schistosomiasis. Fact sheet N°115, World Health Organization, Geneva, 2017.
3. LAMBERTUCCI JR, COTA GF, PINTO-SILVA RA, SERUFO JC, GERSPACHER-LARA R, DRUMMOND S: Hepatosplenic schistosomiasis in field-based studies: a combined clinical and sonographic definition. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*, 2001, **96**, 147-150.
4. VAN DER KLEIJ D, LATZ E, BROUWERS JF, KRUIZE YC, SCHMITZ M, KURT-JONES EA: A novel host parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 48122–48129.
5. WHO. Schistosomiasis: Progress report 2001–2011 and strategic plan 2012–2020. World Health Organization, Geneva, 2013.
6. SILVA LM, MENEZES RM, DE OLIVEIRA SA, ANDRADE Z A: Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and reinfection of mice. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2003, **36**, 335-341.
7. TAMER E, GAMAL E: Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *J. Adv. Res.*, 2013, **4**, 445-452.
8. ADJANOHOUN JE, ABOUBAKAR N, DRAMANE K, EBOT ME, EKPERE JA, ENOW-OROCK EG, FOCHO D, GBILE ZO, KAMANYI A, KAMSU KOM J, KEITA A, MBENKUM T, MBI CN, MBIELE AL, MBOME IL, MUBIRU NK, NANCY WL, NKONGMENECK B, SATABIE B, SOFOWORA A, TAMZE V. & WIRMUM CK. Traditional medicine and pharmacopoeia: contribution to ethnobotanical and floristic studies in Cameroon. CSTR/OUA, CNPMS, Porto-Novo, 1996.

9. JATSA HB, FEUSSOM NG, NKONDO ET, KENFACK CM, SIMO DN, FASSI JBK, FEMOE UM, MOABOULOU C, TSAGUE CD, DONGO E, KAMTCHOUING P, TCHUEM TCHUENTE L-A: Efficacy of *Ozoroa pulcherrima* Schweinf methanolic extract against *Schistosoma mansoni*-induced liver injury in mice. *J. Trad. Complement. Med.*, 2017, in press
10. TSAGUE DC, HUSSAIN H, DONGO E, JATSA-MEGAPTCHE BH, AHMED I, KROHN K: A new alkylnacardic acid from *Ozoroa pulcherrima*. *J. Asian. Nat. Prod. Res.*, 2011a, **13**, 84-87.
11. TSAGUE DC, HUSSAIN H, DONGO E, JATSA-MEGAPTCHE BH, AHMED I. KROHN K: Two new alkylnacardic acids, Ozocardic A and B, from *Ozoroa pulcherrima*. *Nat. Prod. Commun.*, 2011b, **6**, 1133-1134.
12. TSAGUE DC, HUSSAIN H, JATSA-MEGAPTCHE HB, SALEEM M, ABBAS G, FAROOQ M, WADAAN MAM, DONGO E, AL-HARRASI A: Ozoromide: a new ceramide from the stem bark of *Ozoroa pulcherrima*. *Chem. Nat Comp.*, 2017, **53**, 923-925.
13. SMITHERS SE, TERRY RJ: The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and recovery of worms. *J. Parasitol.*, 1965, **55**, 695-700.
14. DUWALL RH, DEWITT WB: An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Parasitol.*, 1967, **7**, 293-297.
15. LEWIS FA, FRIETAS TC, TUCKER MS, KARUNARATNE LB, LIANG Y-S: Schistosomiasis. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2013, **19**, 1-19.
16. CHEEVER AW: Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull. World Health Org.*, 1968, **39**, 328-331.
17. MAYER P: Uber schleimfärbung. *Mitt. Zool. Stn. Neapel.*, 1896, **12**, 303.
18. PUCHTLER H, WALDROP FS, VALENTINE LS: Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr. Pathol.*, 1973, **150**, 174-187.
19. JUNQUEIRA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR: Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, 1979, **11**, 447-455.
20. HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG: The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front. Immunol.*, 2013, **4**, 1-8.
21. LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, ROMANHA SW, PACHECO GR, MARIANO M, LENZI AJ: Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biochemical approaches. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 1998, **93**, 141-151.

22. HERBERT DR, HOLSCHER C, MOHRS M, ARENDSE B, SCHWEGMANN A, RADWANSKA M: Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immun.*, 2004, **20**, 623-635.
23. ANDRADE Z: Schistosomiasis and liver fibrosis. *Para. Immunol.*, 2009, **31**, 656–663
24. SHAHIN M, SCHUPPAN D, WALDHERR R, RISTELI J, RISTELI L, RAZEK SMM, EL RUBY O, KOCH A, SEITZ HK: Serum procollagen peptides and collagen type VI for the assessment of activity and degree of hepatic fibrosis in schistosomiasis and alcoholic liver disease. *Hepatology*, 1992, **15**, 637-644.
25. XIONG L-J, ZHU J-F, LUO D-D, ZEN L-L, CAI S-Q: Effects of pentoxifylline on the hepatic content of TGF- β 1 and collagen in *Schistosomiasis japonica* mice with liver fibrosis. *World. J. Gastroenterol.*, 2003, **9**, 152-154.
26. EL-BADRAWY NM, ABDEL HADI AM, VOSS B, METWALLY AA, F. EBEID F: Effect of praziquantel on the distribution of interstitial collagen types I and III and basement membrane collagen types IV and V in murine hepatic schistosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1991, **85**, 752-755.
27. LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, VALE BS, PANASCO MS, LENZI JA: Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1999, **32**, 639-643.
28. JATSA HB, RUSSO RC, PEREIRA CAJ, AGUILAR AC, GARCIA CC, ARAÚJO ES, OLIVEIRA JLR, RODRIGUES VF, DE OLIVEIRA VG, ALVAREZ-LEITE JI, BRAGA FC, TCHUEM TCHUENTE L-A, KAMTCHOUING P, NEGRÃO-CORRÊA DA, TEIXEIRA MM: Improvement of the liver pathology by the aqueous extract and the *n*-butanol fraction of *Sida pilosa* Retz in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2016, **180**, 114-123.
29. ANDRADE Z: Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Act. Trop.*, 2008, **108** 79–82.
30. RAJENDRAN R, HEMALATHA S, AKASAKALAI KM, ADKUKRISHRA CH, SOHIL B, SUNDARAM RM: Hepatoprotective activity of *Mimosa pudica* leaves against carbon tetrachloride induced toxicity. *J. Natur. Prod.*, 2009, **2**, 116-122.