

Voie d'entrée de la bactérie

S. flexneri dans le côlon

Les bactéries pénètrent dans le tissu par l'épithélium au niveau des cryptes. En bleu, le noyau cellulaire ; en rouge : actine ; en vert : *S. flexneri* (20).

L'imagerie *in vivo* en infectiologie

Les maladies infectieuses sont responsables d'environ 17 millions de morts chaque année et d'un quart des décès chez les hommes et les femmes de moins de 60 ans. Elles impactent tout particulièrement les plus jeunes, dont les défenses immunitaires ne sont pas encore matures, et les plus âgés, chez lesquels le système immunitaire devient moins efficace. En 2014, l'Organisation mondiale de la santé estimait que près des deux tiers de la mortalité des enfants de moins de cinq ans étaient directement liés aux infections responsables d'atteintes respiratoires et intestinales, ainsi qu'au paludisme ou au sida (1).

© E.A. ARENA & J.-Y. TINEVEZ/INSTITUT PASTEUR

Les auteurs

Régis Tournebise¹,
Angèle Viola²,
Catherine Chapon³,
et Roger Legrand³,

¹ UTechS Imagerie BioPhotonique,
Inserm U1202, Institut Pasteur,
Paris

² Aix-Marseille Université, CNRS,
UMR 7339 Centre de Résonance
Magnétique Biologique et Médicale,
Marseille

³ CEA, Université Paris Sud, Inserm U1184,
département IDMIT,
Institut de Biologie François Jacob,
Fontenay-aux-Roses

Les infections, notamment par les vaccins, et leur traitement, nécessitent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'invasion et la dissémination des micro-organismes pathogènes, de la mise en place des défenses de l'hôte et de la progression de la maladie, mais aussi l'amélioration des outils diagnostiques et d'évaluation de l'efficacité des traitements.

Lors d'une maladie infectieuse, les interactions entre l'agent pathogène et l'organisme hôte sont très dynamiques, se situent souvent dans des environnements divers et complexes (tissus, organes...) et peuvent évoluer dans le temps. Les innovations récentes dans les technologies d'imagerie, appliquées à l'échelle moléculaire, microscopique ou de l'organisme entier, sont particulièrement puissantes pour capter ces interactions dans le temps et dans l'espace.

La microscopie est sans aucun doute la technologie qui a, depuis Louis Pasteur et Alexander Flemming, le plus contribué à la microbiologie et à l'étude des mécanismes infectieux. Elle a été longtemps appliquée à des virus, des bactéries et des parasites isolés en culture ou dans des tissus sortis de leur contexte ou inertes. Les nouvelles technologies permettent dorénavant d'envisager l'étude approfondie des micro-organismes dans des tissus vivants, jusqu'à visualiser la complexité des

phénomènes dans un organisme entier et vivant. Elles permettent d'accroître la précision des observations et la caractérisation des éléments visualisés au point qu'il est envisageable, par exemple, d'identifier un micro-organisme pathogène spécifique dans les tissus profonds d'un patient. La recherche préclinique en infectiologie s'intéresse principalement à la détection des agents pathogènes, à leur dissémination dans l'organisme hôte, aux mécanismes pathogéniques associés, à la mise au point d'agents de contraste spécifiques permettant éventuellement une imagerie multimodale, ainsi qu'au développement de nouvelles thérapies ciblées, voire d'agents théranostiques (2,3). Ces études font appel à un large éventail de techniques – IRM, TEP, tomographie par émission de simple photon (TEMP), tomodensitométrie (TDM), échographie, imagerie de luminescence et de fluorescence. Cependant, ces approches utilisant l'imagerie *in vivo* ne sont pas encore très répandues de par l'accès limité à des structures et des équipements adaptés au petit et au gros animal en laboratoire de confinement biologique pour les agents pathogènes humains. Il a néanmoins été démontré, par une équipe de l'Université Emory, aux États-Unis, qu'il est possible d'observer directement les micro-organismes pathogènes au sein de

leur hôte, par immunoTEP, une technique associant l'injection d'anticorps marqués avec un isotope radioactif du cuivre (4).

DANS LA PRATIQUE

En clinique, de nombreuses pathologies infectieuses nécessitent des techniques d'imagerie pour visualiser la localisation des foyers infectieux et la persistance ou l'éradication des agents pathogènes. Des méthodes d'imagerie anatomiques telles que l'IRM permettent de visualiser des abcès ou des œdèmes qui peuvent être indicatifs de foyers infectieux localisés. La réponse inflammatoire est aussi classiquement détectée par l'injection de fluoro-déoxy-glucose (¹⁸F-FDG), un marqueur radioactif de l'activité métabolique glycolytique des cellules utilisé en TEP. Cependant, ces méthodes ne permettent pas d'observer directement les agents pathogènes vivants, ce qui est particulièrement gênant dans les formes osseuses de tuberculose ou lors d'infections pulmonaires causées par les champignons du genre *Aspergillus* par exemple. La réaction inflammatoire ou les altérations structurelles des tissus consécutives à l'infection peuvent, en effet, perdurer longtemps après l'élimination par l'organisme de l'agent pathogène. Dans le cas de ces infections de longue durée, la visualisation

directe du micro-organisme pathogène permettrait de mieux ajuster la durée du traitement et de diminuer sa toxicité. Or aucun agent d'imagerie ne permet aujourd'hui de faire cela en clinique.

Il est donc envisageable et nécessaire de développer de nouvelles sondes d'imagerie spécifiques qui permettront de détecter et d'identifier directement et spécifiquement les agents pathogènes vivants dans les tissus profonds d'un patient à l'aide d'instruments comme l'IRM ou la TEP couplée à un scanner. De nombreuses recherches sont en cours dans ce domaine, ciblant par des approches variées des virus (VIH), des bactéries (Gram-, staphylocoque) ou des champignons (*Aspergillus*). La détection des agents infectieux, et particulièrement des bactéries, semble néanmoins envisageable. Ainsi a-t-il été possible d'identifier des foyers bactériens lors d'essais cliniques par TEP couplée à la TDM, au moyen de peptides antibactériens ou d'antibiotiques marqués au technetium (UBI29-41, ^{99m}Tc-ciprofloxacine...) ou avec l'imagerie TEP et l'utilisation d'antibiotiques ou de substrats d'enzymes bactériennes marqués au fluor 18 (¹⁸F-ciprofloxacine et 1-(29-déoxy-29-fluoro--D-arabino-furanosyl)-5-iodouracile) (5,6).

Les travaux les plus avancés portent sur l'utilisation de sorbitol radioactif (¹⁸F-FDG) pour la détection par TEP d'entérobactéries, lesquelles comptent parmi les bactéries les plus résistantes aux antibiotiques (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*...), sans détecter d'autres bactéries pathogènes à Gram+ (pneumocoques, staphylocoques...) ou les cellules humaines (7). Des essais cliniques sont en cours pour tester ce nouvel agent d'imagerie moléculaire.

De nombreux examens cliniques font appel à des analyses histologiques pour visualiser et caractériser les multiples types cellulaires impliqués dans la pathologie. Celles-ci sont effectuées sur des coupes de quelques micromètres, impliquant qu'une petite partie seulement de la biopsie est visualisée et analysée. De récentes méthodes d'imagerie devraient permettre une imagerie tridimensionnelle de plusieurs marqueurs spécifiques simultanément. En recherche, l'histologie confocale tissulaire a permis de mieux comprendre les étapes précoces d'interaction et de dissémination de *Shigella flexneri*, bactérie responsable

de dysenterie, dans l'intestin (figure ci-contre) (8). L'apport de la microscopie à feuillet de lumière devrait, elle, permettre une imagerie multiparamétrique tridimensionnelle des tissus faisant jusqu'à 1 cm³ avec une résolution subcellulaire (~5 μm), comblant un besoin technologique et méthodologique dans l'imagerie tissulaire. Ces technologies sont appelées à être utilisées en clinique dans un futur proche.

La combinaison du développement de nouvelles sondes spécifiques d'agents pathogènes et de types cellulaires d'intérêt et des nouvelles technologies d'imagerie tissulaire avec les techniques actuelles d'imagerie *in vivo* permettront prochainement d'avoir une vision multimodale multiparamétrique et multi-échelle des processus infectieux, allant de l'agent pathogène et des cellules au tissu et à l'organisme entiers.

TRANSFERT A LA CLINIQUE

Les techniques d'imagerie sont aussi des outils de choix pour évaluer l'efficacité des stratégies thérapeutiques mises en œuvre et identifier d'éventuelles complications ou séquelles au cours du suivi longitudinal des patients. La plupart sont largement utilisées en clinique et offrent donc des perspectives translationnelles en matière technologique mais aussi dans le domaine des connaissances fondamentales en physiopathologie. Elles peuvent notamment permettre d'identifier des marqueurs diagnostiques des maladies infectieuses.

Un enjeu de l'imagerie chez l'homme est la détection des lésions tissulaires, dont l'aspect et la topographie peuvent être spécifiques d'un agent infectieux et ainsi aider au diagnostic et au suivi de l'efficacité des thérapies. L'IRM est particulièrement intéressante car elle permet, outre la visualisation de l'inflammation et des lésions induites par l'infection, la détection précoce d'altérations métaboliques, ou fonctionnelles. L'IRM est ainsi la technique de choix pour l'imagerie des lésions musculaires au cours d'infections bactériennes résultant de fractures ou liées à la présence de prothèses (9), tandis que la TEP, avec le ¹⁸F-FDG, permet de déceler l'activité inflammatoire liée à l'infection, notamment au niveau osseux (10,11). Dans le cas des manifestations extrapulmonaires de la tuberculose, l'IRM est

aussi particulièrement adaptée à la détection des lésions musculo-squelettiques (12). Parmi les infections du système gastro-intestinal, la schistosomiase, deuxième maladie parasitaire après la malaria, est responsable d'une hépato-splénomégalie et d'une fibrose hépatique aux conséquences potentiellement mortelles. L'échographie est la technique de référence pour le diagnostic de la maladie et l'évaluation de la fibrose. Il a été montré que la combinée au ¹⁸F-FDG est capable de détecter les parasites dans le foie en raison de leur métabolisme glycolytique élevée lors d'études précliniques (13). Chez l'homme, seuls quelques cas isolés ont été imagés avec cette technique (14,15).

L'IRM et la TEP sont particulièrement adaptées à la détection des lésions tissulaires du système nerveux central (SNC). L'IRM présente l'avantage de déceler également des altérations métaboliques et fonctionnelles liées à l'infection. Elle est particulièrement indiquée dans les encéphalites virales (herpes, varicelle, Chikungunya, hépatite A...) et bactériennes (tuberculose, listériose...) potentiellement mortelles en aidant au diagnostic, notamment lorsque l'agent pathogène est indétectable dans les prélèvements biologiques. Elle permet de déceler des lésions tissulaires et/ou vasculaires dont la distribution spatiale est souvent caractéristique de l'infection (16). La diversité des approches IRM (anatomique avec ou sans agent de contraste, de diffusion, de perfusion, spectroscopie du proton...) est également bien adaptée au diagnostic des maladies parasitaires affectant le SNC (17). Le cas de la malaria cérébrale est une illustration du transfert vers l'homme de connaissances fondamentales en physiopathologie obtenues par imagerie de l'animal. Cette complication la plus létale de l'infection par *Plasmodium falciparum* se traduit par une encéphalopathie aboutissant au décès dans 15 à 20 % des cas, tandis que des déficits cognitifs et neurologiques peuvent subsister chez les survivants. Une étude par IRM du modèle murin de la maladie a démontré que la cause du décès, qui n'avait pas été clairement identifiée, était un œdème cérébral ischémique (18). Des études chez l'enfant ont confirmé l'implication de l'œdème cérébral dans cette pathologie (19). ■

- (1) www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/fr
- (2) Jelicks LA et al. (2013) *Am J Pathol* 182, 296-304
- (3) Li XF et al. (2017) *Theranostics* 7, 912-25
- (4) Santangelo PJ et al. (2015) *Nat Methods* 12, 427-32
- (5) van Oosten M et al. (2015) *FEMS Microbiol Rev* 39, 892-916
- (6) Auletta S et al. (2016) *Clin Transl Imaging* 4, 229-52
- (7) Weinstein EA et al. (2014) *Sci Transl Med* 6, 259ra146
- (8) Arena ET et al. (2015) *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E3282-90
- (9) Turecki MB et al. (2010) *Skeletal Radiol* 39, 957-71
- (10) Love C, Palestro CJ (2016) *Clin Radiol* 71, 632-46
- (11) Jamar F et al. (2013) *J Nucl Med* 54, 647-58
- (12) Jain AK (2010) *J Bone Joint Surg Br* 92, 905-13
- (13) Salem N et al. (2010) *PLoS Negl Trop Dis* 4(9), e827
- (14) Ye S et al. (2014) *Int J Clin Exp Pathol* 7, 6339-44
- (15) Altinyay ME et al. (2016) *Clin Nucl Med* 41, 211-3
- (16) Bertrand A et al. (2017) *Med Mal Infect* 47, 195-205
- (17) Abdel Razek AA et al. (2011) *Neuroimaging Clin N Am* 21, 815-41
- (18) Penet MF et al. (2005) *J Neurosci* 25, 7352-8
- (19) Seydel KB et al. (2015) *N Engl J Med* 372, 1126-37
- (20) Arena ET et al. (2015) *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E3282-90

Des bulles et des ultrasons pour améliorer le diagnostic et la délivrance des médicaments

Couplés à l'injection intraveineuse d'agents de contraste composés de microbulles, les ultrasons ont révolutionné la classification des lésions hépatiques cancéreuses, contribuant à une meilleure prise en charge des patients. Ils peuvent aussi être focalisés en profondeur dans les tissus et apporter localement un stimulus mécanique et/ou thermique. Ces deux phénomènes peuvent être mis à contribution pour délivrer des médicaments de façon ciblée, en plus grand quantité et plus spécifiquement que s'ils étaient injectés dans la voie sanguine.

© SCIENCE SOURCE/BSIP

Les auteurs

Ayache Bouakaz¹, Benoît Larrat²
et Nathalie Lassau³

¹ Imagerie et Cerveau,
Inserm UMR 930,
Université François Rabelais,
Tours

² Neurospin,
CEA, Université Paris Saclay,
Gif-sur-Yvette

³ Gustave Roussy,
UMR8081 CNRS-Université Paris-Sud,
Villejuif

L'échographie de contraste est apparue en Europe en 2003, principalement pour caractériser les lésions hépatiques. Elle permet de distinguer les lésions malignes des lésions bénignes à partir de l'analyse qualitative à trois phases – artérielle, portale et tardive – après l'injection par voie intraveineuse d'un produit de contraste. Une telle injection en routine est également utilisée pour détecter des métastases hépatiques chez les patients à risque. La mise sur le marché asiatique du Sonovue, l'agent de contraste commercialisé par la société italienne Bracco dans les années 2010, et son autorisation aux États-Unis cette année pour la caractérisation hépatique donnera probablement une très forte dynamique à cette indication.

Afin de rendre cette technique plus robuste, des méthodes de quantification de la prise de contraste ont été développées après injection en bolus* du

Sonovue, en Europe, ou en infusion continue, privilégiée au Canada. La première méthodologie, financée par l'Institut national du cancer et approuvée dans plusieurs essais monocentriques et sur une large étude multicentrique menée par Gustave Roussy – plus de 500 patients inclus dans 19 centres –, a validé un biomarqueur lié au volume vasculaire tumoral, avec une corrélation significative à la survie sans progression et à la survie globale, pour prédire l'efficacité des traitements anti-angiogéniques (1).

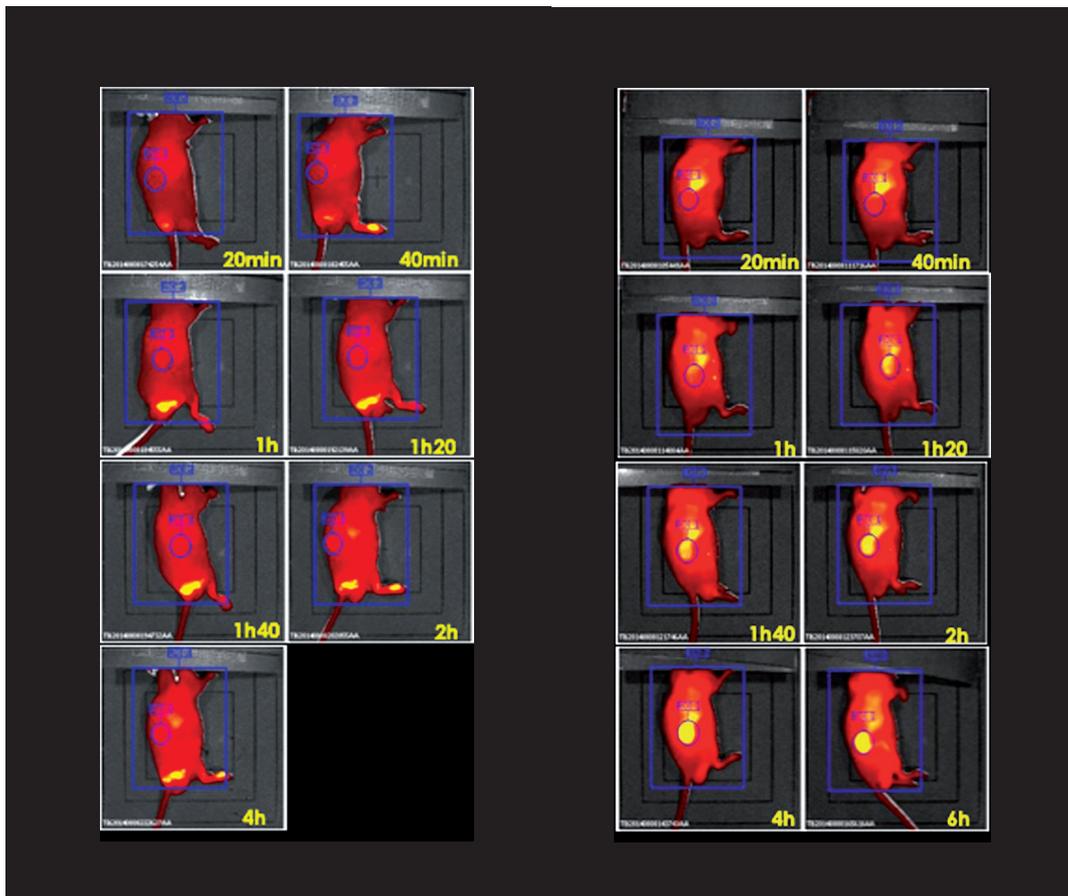
PETIT PANORAMA DES PROJETS EN COURS

L'amélioration de la biodisponibilité d'un médicament peut être obtenue en encapsulant le principe actif puis en le libérant par un stimulus physique tel que les ultrasons. Par exemple, la doxorubicine encapsulée dans des liposomes thermo-sensibles – Thermodox, de la société du New Jersey Celision, actuellement en essais cliniques avancés – a montré une amélioration d'efficacité. L'augmentation de biodisponi-

bilité peut aussi résulter d'une augmentation locale du flux sanguin, d'un meilleur passage des parois vasculaires par le principe actif ou encore d'une aide à la diffusion interstitielle. Là encore, les ultrasons, combinés ou non à l'injection de microbulles, peuvent induire ces effets qui peuvent, bien sûr, être associés (2).

L'imagerie, essentiellement l'IRM et celle par ultrasons, joue un rôle clé dans le guidage de cette délivrance de médicaments. Elle permet de repérer et de délimiter la région à traiter, puis de cartographier en temps réel l'élévation de température (thermométrie) ou bien l'activité des microbulles sous ultrasons (détection de cavitation) pendant l'intervention (3,4). De plus en plus, le même échographe sert à la fois à l'imagerie et à la libération contrôlée des principes actifs. Enfin, l'imagerie confirme aussi, dans certains cas, l'efficacité de la délivrance à court terme (médicament fluorescent, agent de contraste associé à la molécule active...) mais, surtout, l'efficacité thérapeutique à plus long terme – la régression d'une tumeur par exemple (5).

* Dose administrée au complet en une seule fois, généralement par injection intraveineuse



Observations par imagerie en fluorescence d'animaux traités par le cétuximab – un anticorps monoclonal murin humanisé qui bloque le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) – marqué au fluor (à gauche) et par le cétuximab marqué accompagné d'une sonoporation (à droite). Cette technologie provoque l'accumulation du cétuximab dans la tumeur uniquement lorsqu'il est co-administré avec les microbulles.

© A. BOUAKAZ/INSERM UMR 980

DÉLIVRANCE LOCALISÉE

Avec l'utilisation des microbulles, la modalité d'échographie a connu des développements technologiques qui ont considérablement amélioré la précision et la confiance du diagnostic (6). Aussi ces microbulles sont-elles actuellement explorées comme un système d'administration de médicaments dans divers organes et pathologies. Sous l'action des ultrasons, les oscillations des microbulles perméabilisent transitoirement les barrières biologiques, notamment la barrière vasculaire (7). Cette technique, appelée « sonoporation », potentialise l'extravasation de molécules thérapeutiques dans la région d'intérêt en augmentant leur biodisponibilité uniquement dans la zone où les ondes sont focalisées. Cette approche a été validée avec succès *in vitro* et sur des modèles animaux pertinents cliniquement par l'équipe Imagerie et Ultrasons de l'unité Inserm U930 (figure ci-dessus) (8,9). Son évaluation

clinique débutera à la fin de l'année dans le cadre de l'essai SONCHIMIO, au Centre hospitalier universitaire de Tours, pour traiter des métastases hépatiques non résecables du cancer colorectal. Le but est de démontrer la faisabilité de la technique grâce à un échographe dédié et une sonde innovante permettant à la fois d'imager et d'appliquer les séquences de sonoporation.

UNE HISTOIRE DE BARRIÈRES

Dans le cerveau, les parois vasculaires sont bien moins perméables au passage des médicaments que celles d'autres organes. Environ 95 % des principes actifs connus ne passent pas suffisamment pour avoir une activité thérapeutique. Bien que vitale en temps normal, la barrière hémato-encéphalique constitue le principal frein au développement de nouveaux traitements pour les pathologies cérébrales, telles que

les tumeurs et les maladies neuro-dégénératives.

Plusieurs équipes, dont celle du CEA-NeuroSpin, à Saclay, ont démontré que la sonoporation avec emploi de microbulles circulantes, sous réserve de traverser la boîte crânienne proprement et de maîtriser l'énergie du faisceau, augmente transitoirement, localement et réversiblement la perméabilité vasculaire dans le cerveau (10).

Forts de résultats chez l'animal, le projet public-privé 3BOPUS (*Blood-Brain Barrier OPening with UltraSound*), qui démarre en novembre 2017, soutenu par l'Agence nationale de la recherche et les pôles de compétitivité Medicen et Alsace BioValley, vise à fournir, d'ici à trois ans, un nouveau dispositif médical robotisé d'ultrasons transcrâniens, optimisé pour la délivrance locale de médicaments dans le cerveau. D'autres dispositifs sont en essai clinique au Canada et en France pour valider cette nouvelle voie de délivrance thérapeutique (11,12). ■

- (1) O'Connor JP *et al.* (2017) *Nat Rev Clin Oncol* 14, 169-86
- (2) Lai CY *et al.* (2013) *Front Oncol* 3, 204
- (3) Grüll H, Langereis S (2012) *J Control Release* 161, 317-27
- (4) Arvanitis CD *et al.* (2012) *PLoS ONE* 7(9), e45783
- (5) Couture O *et al.* (2011) *Med Phys* 38, 1116-23
- (6) Sennoga C *et al.* (2017) *Expert Opin Drug Deliv* 14, 1031-43
- (7) Bouakaz A *et al.* (2016) *Adv Exp Med Biol* 880, 175-89
- (8) Escoffre JM *et al.* (2013) *Mol Pharm* 10, 2667-75
- (9) Barré T *et al.* (2015) *Local and targeted delivery of a therapeutic monoclonal antibody in a colorectal cancer model: in-vivo proof of concept*. IEEE IUS, Taipei
- (10) Marty B *et al.* (2012) *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1948-58
- (11) [tinyurl.com/NCT02343991](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02343991)
- (12) [tinyurl.com/NCT02523212](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02523212)