

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
**UNIVERSITÉ de BLIDA 1**



**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**Département de biologie et physiologie cellulaire**

**MEMOIRE DE MASTER EN BIOLOGIE**

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**THEME**

**Rôle du stress oxydatif dans les altérations hépatiques  
induites par sepsis chez la souris.**

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> BOURREK Djoumana**

**M<sup>elle</sup> KACI Yousra**

Soutenu le : 08/09/2021

Devant le jury composé de :

**M<sup>me</sup> ABDUL HUSSEIN A.S.**

**MCA**

**USDB 1**

**Présidente**

**M<sup>me</sup> SOUR S.**

**MCB**

**USDB 1**

**Examinatrice**

**M<sup>me</sup> RAHIM I.**

**MCB**

**USDB 1**

**Promotrice**

**M<sup>me</sup> AÏSSANI –EL FERTAS R.**

**MCB**

**USDB 1**

**Co-promotrice**

**Promotion 2020 /2021**



## Remerciements

Nous remercions en premier lieu **ALLAH** le tous puissant de nous avoir illuminé et ouvert les portes du savoir, et de nous avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce travail.

Nous tenons à remercier profondément et sincèrement tous ceux qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail et nos profonds remerciements s'adressent en premier lieu.

À notre encadreur **Dr. RAHIM Ibtissem**, Maître de conférences à l'USDB1, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience... tout au long de la réalisation de ce mémoire. Pour tout cela, nous tenons à vous exprimer nos sentiments de profonde gratitude.

Nous tenons à remercier notre Co-promotrice **Dr. AÏSSANI El-Fertas Radia**, qui nous a enseigné la rigueur scientifique. Nous la remercions pour son aide précieuse et les conseils qu'elle nous a prodigués tout au long de ce parcours.

Nous tenons à exprimer notre respect aux membres du jury.

Nous commençons d'abord par le **Dr. Abdul Hussein A.S.** qui a accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme présidente de Jury. Qu'elle soit assurée de notre respectueuse considération.

Nos vifs remerciements vont aussi au **Dr. SOUR S.** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de juger et d'examiner ce modeste travail.

Nous adressons, nos sincères remerciements à M<sup>me</sup> le **Pr. SAADI LEILA**, professeur et chef d'option BMC à l'USDB1 pour la confiance et l'aide qu'elle nous a accordé.

Nous présentons ici le témoignage de nos sincères gratitude à tous les enseignants de l'USDB qui ont contribué à notre formation tout au long de 5 dernières années.

Nous remercions en particulier, M<sup>me</sup> **Dahenane Hania**, Ingénieur de laboratoire à l'USDB1 pour son aide et sa patience, veuillez trouver ici l'assurance de notre profond gratitude.

Nous avons croisé durant ce parcours sinueux, des personnes formidables au grand cœur, qui nous ont apporté aide et soutien sans rien demander en retour. La liste est bien longue et très éclectique; des enseignants : M<sup>me</sup> et M<sup>r</sup> Djazouli, M<sup>me</sup> Zatra, M<sup>me</sup> Boukenaoui, M<sup>r</sup> Medrouh) des ingénieurs de laboratoire (Hassina, Zakia, Naziha, Bounakhla, Abderrahman) des médecins (Dr. Kouchkar) et des responsables (M<sup>r</sup> Kharabi ex directeur de la station expérimentale). Nous ne vous oublierons jamais.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

## DEDICACE

### A mon très cher Père

*Ce travail est dédié à mon chère **Papa**, décédé très tôt, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études.*

*J'espère, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de sa grande fille qui a toujours prié pour le salut de son âme.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, lui accorde sa sainte miséricorde l'accueille en Son Vaste Paradis.*

### A ma très chère mère

*Je dédie ce travail à **ma mère**, la prunelle de mes yeux, Qu'elle trouve ici ma plus Profonde gratitude et tout mon Amour pour sa patience et son soutien et surtout pour ses prières pour moi tout au long de mes études.*

*A mes très chères sœurs : **Halima** ainsi que son mari **Abdelkrim**, **Nassima** ainsi que son mari **Mourad**, et **Hassina**. Je vous souhaite tous le bonheur du monde.*

*A mon âme sœur **Malika "Bicha"** merci de si bien accomplir ton rôle. Ma vie ne serait pas magnifique sans ton présence et ton amour.*

*A mes petites nièces et neveux que j'aime trop : **Rifal**, **Nacereddine**, **Amir** et **Abdallah**.*

*À tous mes proches et mes chères copines et amies:*

***Djamila**, **Iman**, **Racha**, **Maroua**, **Khaoula**, **Youssra**, **Fatima**, **Thanaa**, **Zakia** et **Rania***

*Merci pour votre présence et votre fidélité.*

*A mes très chers amis : **Djawad**, **Saïd**, **Zohier** et **Badereddine**, merci pour votre aide.*

*A mon binôme **YOUSRA** pour tous les souvenirs pendant les années d'études et les moments inoubliables que j'ai passé avec toi.*

**DJOUMANA**

## DEDICACE

*Du profond de mon cœur je dédie cet humble travail à tous ceux qui me sont chers,*

***A mon très cher Père Brahim***

*Tu as toujours été pour moi un exemple, du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tien à honorer l'homme que tu es.*

***A ma très chère mère Djamila***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer les sentiments que j'éprouve pour toi, Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie, tu m'a toujours soutenue.*

*A ma très chères sœur Alicia et mon frère Yousri, je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

*A ma grand-mère wnissa, mes tantes Samira, Nawel, Saida et mon oncle : Cherif et Sadak.*

*A mes amies à qui j'ai une confiance absolue :*

*Yousra, Malika, Nadjat, Fatima, Khaoula, Rania, Zakia, Amina, Naima, Imane.*

*A mon binôme Djoumana pour tous les moments et les souvenirs inoubliables pendant les années d'études ensemble surtout les deux dernières années, je vous aime beaucoup.*

**YOUSRA**

## **Résumé**

Le sepsis est un problème majeur de santé publique, associant une exacerbation de la réponse de l'hôte vis-à-vis de l'agent infectant, un stress oxydatif et une défaillance d'organes. Malgré les progrès thérapeutiques, la mortalité due à cette affection reste trop élevée. L'objectif de notre travail de recherche est de mettre en exergue l'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par sepsis d'une part, et d'autre part le rôle de la curcumine dans la prévention de ceux-ci.

Le sepsis polymicrobien a été induit par une CLP (*Cecal Ligation and Puncture*) chez des souris NMRI albinos. Ces dernières ont été traitées par une dose de 100mg/Kg de curcumine. Les souris ont été sacrifiées 24h après traitement et les organes (foie, rate et mésentère) ont été prélevés pour une étude biochimique et histologique.

Le stress oxydatif induit par sepsis est caractérisé par une augmentation du taux de MDA (marqueur pro-oxydant) et une diminution de la catalase (marqueur antioxydant). La curcumine exerce un effet antioxydant et rétablit l'équilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant en diminuant le MDA et en augmentant la catalase.

Les résultats histologiques montrent des dommages oxydatifs et métaboliques (cholestase, stéatose hépatique non alcoolique aiguë) hépatiques, associées à une activation de la réponse immunitaire et inflammatoire caractéristique avec une forte infiltration leucocytaire observée au niveau du foie, de la rate et du mésentère. La curcumine prévient les dommages oxydatifs, métaboliques et inflammatoires induits par sepsis.

Nos résultats ouvrent des perspectives très prometteuses quant à l'utilisation thérapeutique de la curcumine comme traitement du sepsis. En outre, nous affirmons le rôle clé du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis.

**Mots clés :** Sepsis, stress oxydatif, curcumine, foie, inflammation.

## **Abstract**

Sepsis is a major public health problem, associating an exacerbation of the host's response to the infecting agent, oxidative stress and organ failure. Despite the therapeutic progress, the mortality due to this condition remains too high. The objective of our research work is to highlight the involvement of oxidative stress in liver damage induced by sepsis on the one hand, and on the other hand the role of curcumin in preventing them.

Polymicrobial sepsis was induced by CLP (Cecal Ligation and Puncture) in albino NMRI mice. These were treated with a dose of 100 mg / kg of curcumin. The mice were sacrificed 24 hours after treatment and the organs (liver, spleen and mesentery) were removed for a biochemical and histological study.

The oxidative stress induced by sepsis is characterized by an increase in the level of MDA (pro-oxidant marker) and a decrease in catalase (antioxidant marker). Curcumin exerts an antioxidant effect and restores the balance of the pro-oxidant / antioxidant balance by lowering MDA and increasing catalase.

Histological results show oxidative and metabolic (cholestasis, acute non-alcoholic fatty liver disease) hepatic damage, associated with activation of the characteristic immune and inflammatory response with strong leukocyte infiltration observed in the liver, spleen and mesentery. Curcumin prevents oxidative, metabolic and inflammatory damage induced by sepsis.

Our results open very promising perspectives for the therapeutic use of curcumin as a treatment for sepsis. Furthermore, we affirm the key role of oxidative stress in the pathophysiology of sepsis.

**Keywords:** Sepsis, oxidative stress, curcumin, liver, inflammation.

## الملخص

تعفن الدم هو مشكلة صحية عامة كبرى ، حيث يرتبط بتفاقم استجابة المضيف للعامل المُعدى ، والإجهاد التأكسدي ، وفشل الأعضاء. على الرغم من التقدم العلاجي ، فإن معدل الوفيات بسبب هذه الحالة لا يزال مرتفعًا للغاية. الهدف من عملنا البحثي هو تسليط الضوء على تورط الإجهاد التأكسدي في تلف الكبد الناجم عن تعفن الدم من ناحية ، ومن ناحية أخرى دور الكركمين في الوقاية منها.

تم تحفيز تعفن الدم متعدد الميكروبات بواسطة CLP (ربط وثقب Cecal) في الفئران البيضاء NMRI. تم علاجها بجرعة 100 مجم / كجم من الكركمين. تم التضحية بالفئران بعد 24 ساعة من العلاج وتمت إزالة الأعضاء (الكبد والطحال والمساريق) لإجراء دراسة كيميائية حيوية ونسجية.

يتميز الإجهاد التأكسدي الناجم عن تعفن الدم بزيادة في مستوى MDA (علامة مؤيدة للأكسدة) وانخفاض في الكاتالاز (علامة مضادات الأكسدة). يمارس الكركمين تأثيرًا مضادًا للأكسدة ويعيد توازن توازن المواد المؤكسدة / المضادة للأكسدة عن طريق خفض MDA وزيادة الكاتالاز.

تظهر النتائج النسيجية التأكسد والتمثيل الغذائي (الركود الصفراوي ، مرض الكبد الدهني غير الكحولي الحاد) تلف الكبد ، المرتبط بتنشيط الاستجابة المناعية والالتهابية المميزة مع تسلل قوي لخلايا الدم البيضاء لوحظ في الكبد والطحال والمساريق. يمنع الكركمين الأضرار المؤكسدة والتمثيل الغذائي والالتهابات التي يسببها تعفن الدم .

تفتح نتائجنا أفقًا واعدة جدًا للاستخدام العلاجي للكركمين كعلاج لتعفن الدم . بالإضافة إلى ذلك ، نؤكد الدور الرئيسي للإجهاد التأكسدي في الفيزيولوجيا المرضية لتعفن الدم .

**الكلمات المفتاحية :** تعفن الدم ، الإجهاد التأكسدي ، الكركمين ، الكبد ، الالتهاب.

## **Abréviations**

**ADCC** :Cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps

**AKT**: alpha serine/threonine-protein kinase

**AP-1**: Activator protein 1

**Bzip**: basic leucine zipper

**Caspase1**: Interleukin-1 Converting Enzyme

**CAT**: Catalase

**CLP**: Cecal Ligation Puncture

**COX-2** : cyclooxygenase 2

**CXCR1** : C-X-C Motifs chemiokineReceptor 1

**CXCR2** : C-X-C Motifs chemiokineReceptor 2

**EDTA** : Ethylénediamine-tétraacétique

**ERK**: Extracellular signal-regulated kinases

**FNS** : Formule d'énumération sanguine

**GPx** :Gluthathion peroxydase

**GSH** :Gluthation

**HLA-DR** : Antigène Leucocytaire Humain-Antigène D

**HO-1**: Heme oxygenase-1

**H2O2**: Peroxyde d'hydrogène

**ICAM-1** : InterCellularAdhesionMolecule (CD54)

**IKB  $\alpha$** : NF-kappa-B inhibitor alpha

**IKK**: I $\kappa$ B Kinase (IKK)-Associated Protein 1

**IL-1 $\beta$** : Interleukine -1  $\beta$

**IL-8**: Interleukine -8

**IL-10** : Interleukine -10

**iNOS**: Oxyde Nitrique Synthase

**IRAF-3**: Interferon Regulatory Factor 3

**IRAK-1**: Interleukin-1- receptor-associated kinase

**IRAK2**: Interleukin-2 receptor-associated kinase 2

**JNK**: c-Jun N-terminal kinases

**Keap1**: Protéine Keap1 humaine

**MAP3K**: Mitogen Activated Protein (MAP) kinase

**MDA**: Malondialdéhyde

**MKK3/6:** Mitogen-activated protein kinase kinase 3

**MPO:** myéloperoxydase

**MYD88:** Myeloid Differentiation primary response 88

**NF-κB:** Nuclear Factor κB

**NLRP3:** NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

**NO•:** Oxydenitrique

**NQO1:** NAD(P) H dehydrogenase [quinone] 1

**NRF2:** Nuclear Respiratory Factor 2

**O2•-:** Anion superoxyde

**PAMPs:** Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase

**PPAR -γ:** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

**PRR:** Patherns Recognition Receptors

**qSOFA:** QuickSOFA

**RIP:** Receptor-interacting protein

**RNS:** Reactive Nitrogen species

**ROS:** Reactive oxygen Species

**SIRS :** Syndrome deRéponse inflammatoire Systémique

**SDS:** Dodécylsulfate de sodium

**SOD:** SuperoxydeDismutase

**SOFA:** Sequential Organ Failure Assessment

**TAK1:** Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1)

**TANK:** TRAF family member associated NFκB activator

**TBA :** Acide thiobarbiturique

**TBARS :** Espèces réactives de TBA

**TBK1:** TANK-binding kinase 1

**TIR:** Toll / IL-1R/R

**TIRAP:** adapter molecule associated with toll-like receptors

**TLRs:** ToolLike Receptors

**TNF α:** Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrosetumorale)

**TRAF:** TNF-Receptor-Associated Factor

**TRIF:** TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

**TRAM:** TRIF adaptor molecule

**VCAM-1:** VascularCellAdhesionMolecule

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Diagramme comparatif des définitions de sepsis décrite par les conférences de consensus de 1991 et 2016.	<b>4</b>
<b>Figure 2 :</b> Phases hyper-inflammatoire et d'immunodépression au cours du sepsis.	<b>5</b>
<b>Figure 3 :</b> Voies de signalisation des TLRs chez les mammifères.	<b>6</b>
<b>Figure 4 :</b> Production des espèces réactive de l'oxygène /nitrogène (ROS/RNS) et leur neutralisation par des antioxydants.	<b>10</b>
<b>Figure 5.</b> La curcumine, molécule actif de la plante <i>Curcuma longa</i> .	<b>12</b>
<b>Figure 6 :</b> Effets de la curcumine sur les voies inflammatoires et oxydatives.	<b>14</b>
<b>Figure 7 :</b> Etapes critiques de CLP induit chez la souris.	<b>17</b>
<b>Figure 8 :</b> Protocole expérimental chez les souris NMRI albinos.	<b>18</b>
<b>Figure 9 :</b> Effet des différents traitements sur le poids des souris NMRI albinos.	<b>21</b>
<b>Figure 10 :</b> Effet des différents traitements sur le poids du foie et de la rate.	<b>22</b>
<b>Figure 11 :</b> Le sepsis induit par CLP se traduit par une nécrose cœcale réduite par le traitement à la curcumine.	<b>23</b>
<b>Figure 12 :</b> Taux de malondialdéhyde hépatique chez les souris NMRI albinos.	<b>24</b>
<b>Figure 13 :</b> Activité catalase hépatique chez les souris NMRI albinos.	<b>25</b>
<b>Figure 14 :</b> Taux de protéines hépatiques chez les souris NMRI albinos.	<b>26</b>
<b>Figure 15 :</b> Taux d'érythrocytes et de plaquettes sanguins chez les souris NMRI albinos.	<b>27</b>
<b>Figure 16 :</b> Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang.	<b>28</b>
<b>Figure 17 :</b> Résultats de frottis sanguin, coloration MGG.	<b>29</b>
<b>Figure 18 :</b> Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris contrôle. Coloration HE (Gx100).	<b>31</b>
<b>Figure 19 :</b> Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris contrôle. Coloration HE (Gx400).	<b>31</b>
<b>Figure 20 :</b> Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique. Coloration HE (Gx400).	<b>32</b>
<b>Figure 21 :</b> Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique. Coloration HE (Gx1000).	<b>32</b>
<b>Figure 22 :</b> Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique traitées par la curcumine. Coloration HE (Gx1000).	<b>33</b>
<b>Figure 23 :</b> Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique traitées	<b>33</b>

par la curcumine. Coloration HE (Gx400).

**Figure 24 :** Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique traitées par la curcumine. Coloration HE (Gx1000). **34**

**Figure 25 :** Micrographie du mésentère des souris NMRI albinos. Coloration à l'hématoxyline et de l'éosine HE. **35**

**Figure 26 :** Micrographie de coupes transversales de la rate des souris NMRI albinos. Coloration à l'hématoxyline et de l'éosine HE. **36**

**Figure 27 :** Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants de la curcumine dans l'altération hépatique induit par sepsis. **39**

## **Tableaux annexes**

<b>Annexe 1</b> : Tableau I. Les scores SOFA.....	i
<b>Annexes 1 (Suite)</b> : Tableau II: Récepteurs TLRs chez l'homme et agonistes .....	ii
<b>Annexe 2</b> : Appareillage.....	iii

## **Glossaire**

**Lymphopénie** (ou lymphocytopénie) est caractérisée par un nombre de lymphocytes inférieur à la normale lors d'un hémogramme, soit moins de 1500 par mm<sup>3</sup>.

**Le score de Glasgow** : est une échelle permettant d'évaluer le niveau de conscience d'un patient. Il repose sur l'analyse de trois paramètres : l'ouverture des yeux, la réponse verbale et la réponse motrice.

**L'hépatite ischémique ou hépatite hypoxique**: résulte d'une diminution du débit sanguin hépatique [diminution des apports en oxygène des hépatocytes (cellules du foie), pouvant être aggravés par une augmentation de leur besoins en oxygène]. Il en résulte une nécrose hépatocytaire.

**La cholestase**: est une diminution ou un arrêt de la sécrétion biliaire, responsable d'un défaut de transport des acides biliaires du foie vers l'intestin et d'une augmentation de la concentration dans le sang et les tissus des acides biliaires.

**La cholangite sclérosante secondaire (CSS)** : est une maladie biliaire cholestatique chronique, caractérisée par une inflammation, une fibrose oblitérante des voies biliaires, une formation de sténose et une destruction progressive de l'arbre biliaire qui conduit à une cirrhose biliaire.

## **Sommaire**

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

### **Chapitre I : Rappels bibliographiques**

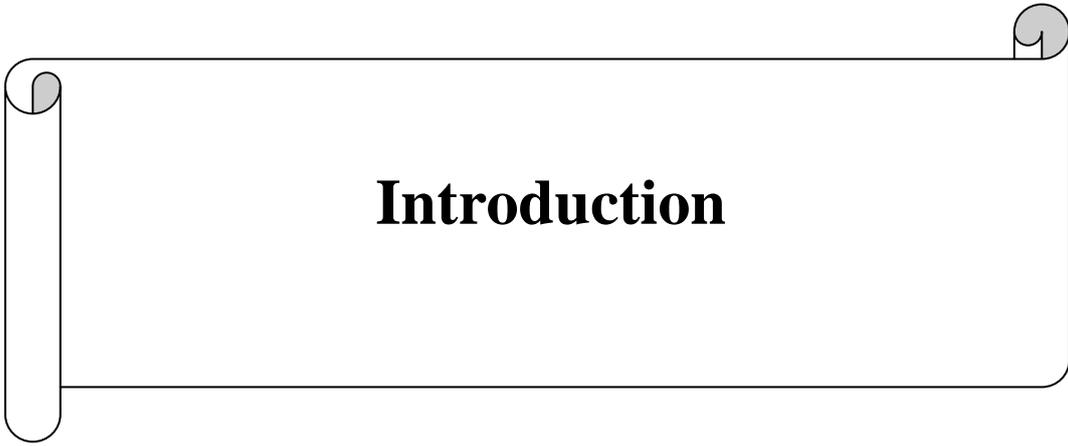
<b>I. Sepsis</b> .....	<b>2</b>
<b>I.1. Définition du sepsis</b> .....	<b>2</b>
<b>I.2. Physiopathologie du sepsis</b> .....	<b>4</b>
<b>I.2.1. Phase hyper –inflammatoire</b> .....	<b>5</b>
<b>I.2.2. Phase d’immunodépression</b> .....	<b>7</b>
<b>I.3. Dysfonctionnement hépatique associé au sepsis</b> .....	<b>8</b>
<b>I.4. Stress oxydant cellulaire et sepsis</b> .....	<b>9</b>
<b>I.4.1. Définition du stress oxydant</b> .....	<b>9</b>
<b>I.4.2. Systèmes pro- oxydant/antioxydant</b> .....	<b>9</b>
<b>I.4.3. Rôle du stress oxydant dans le sepsis</b> .....	<b>11</b>
<b>I.5. La curcumine</b> .....	<b>12</b>
<b>I. 5.1. Définition</b> .....	<b>12</b>
<b>I. 5.2. Les effets pléiotropes de la curcumine</b> .....	<b>13</b>

### **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

<b>II.1. Matériel</b> .....	<b>15</b>
<b>II.1.1. Matériel non biologique</b> .....	<b>15</b>
<b>II.1.2. Matériel biologique</b> .....	<b>15</b>
<b>II.2 Méthodes</b> .....	<b>16</b>
<b>II.2.1. Modèle murin de sepsis polymicrobien</b> .....	<b>16</b>
<b>II.2.2. Protocole pharmacologique</b> .....	<b>17</b>
<b>II.3. Etude biochimiques</b> .....	<b>18</b>
<b>II.3.1. Préparation de l’homogénat tissulaire</b> .....	<b>18</b>
<b>II.3.2. Dosage des protéines</b> .....	<b>18</b>
<b>II.3.3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif</b> .....	<b>18</b>
<b>II.3.3.1. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)</b> .....	<b>19</b>
<b>II.3.3.2. Dosage de l’activité catalase</b> .....	<b>19</b>
<b>II.4. Etude hématologique par FNS et frottis sanguin</b> .....	<b>19</b>
<b>II.5. Etude histologique</b> .....	<b>20</b>
<b>II.6. Etude statistique</b> .....	<b>20</b>

## **Chapitre III : Résultats et Discussion**

<b>III.1. Résultats</b> .....	<b>21</b>
<b>III.1.1. Effet du sepsis et de la curcumine sur le poids des souris et des organes (foie, rate)</b> .	<b>21</b>
<b>III.1.2. Effet macroscopique du CLP et du traitement à la curcumine sur le Cæcum des souris NMRI albinos</b> .....	<b>23</b>
<b>III.1.3. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de MDA hépatique</b> .....	<b>23</b>
<b>III.1.4. Effet du sepsis et de la curcumine sur l'activité catalase hépatique</b> .....	<b>25</b>
<b>III.1.5. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de protéines hépatiques</b> .....	<b>26</b>
<b>III.1.6. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux d'érythrocytes et plaquettes sanguins</b> .	<b>27</b>
<b>III.1.7. Effet de sepsis et de la curcumine sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins</b> .....	<b>28</b>
<b>III.1.8. Etude histologique</b> .....	<b>30</b>
<b>III.1.8.1. Effet du sepsis et de la curcumine sur l'histologie de foie</b> .....	<b>31</b>
<b>III.1.8.2. Effet du sepsis et de la curcumine sur l'histologie du mésentère</b> .....	<b>34</b>
<b>III.1.8.3. Effet du sepsis sur l'histologie de la rate</b> .....	<b>35</b>
<b>III.2. Discussion</b> .....	<b>36</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>40</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	



# **Introduction**

Le sepsis a été reconnu par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme une priorité de santé mondiale (**Reinhart et al., 2017**). Les données récentes indiquent qu'en 2017, le sepsis est survenue chez 48,9 millions de personnes dans le monde, entraînant la mort de 11 millions de patients (**Rudd et al., 2020**).

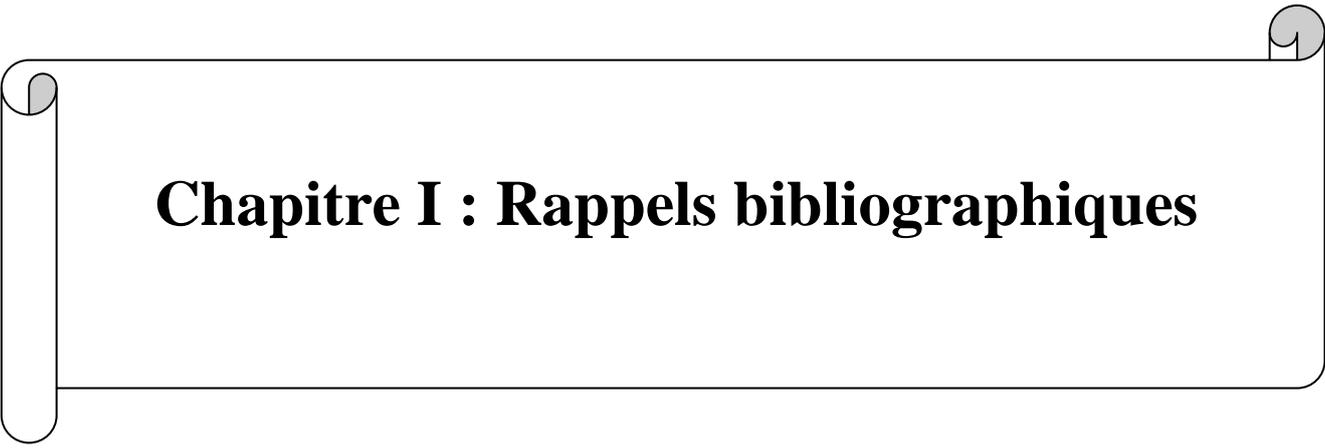
La mortalité élevée des patients revient à la complexité de la physiopathologie du sepsis et à l'absence d'un traitement efficace pour ce syndrome. Ceci constitue, à l'heure actuelle, un défi majeur pour les chercheurs afin de définir, diagnostiquer et cerner la physiopathologie de cette affection et la traiter de manière appropriée (**Laroye et al., 2017 ; Salomão et al., 2019**).

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives (oxygénées et azotées, ROS/RNS) et leur neutralisation par les mécanismes de défense antioxydant. Le ROS/RNS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions cellulaires associées à diverses pathologies, comme le sepsis (**Moukette et al., 2015 ; Jadeja et al., 2017**).

La complexité du syndrome septique exige une molécule avec un effet pléiotrope comme la curcumine, un composant actif du curcuma (**Abd-Elrazek et al., 2020**).

Dans le cadre du projet de fin d'études, il nous a été proposé d'étudier à l'aide d'un modèle murin de sepsis polymicrobien, l'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par sepsis et l'effet de la curcumine sur ces derniers. Pour répondre à ces objectifs nous avons développé un modèle murin de sepsis polymicrobien dans le but de:

- Evaluer le statut redox hépatique par dosage des marqueurs de stress oxydatif, pro-oxydants (MDA) et antioxydants (Catalase).
- Evaluer la réponse immuno-inflammatoire systémique au cours du sepsis par dosage de l'FNS.
- Etudier les altérations et les dommages hépatiques induits par sepsis par une étude histologique.
- Evaluer les effets antioxydants et anti-inflammatoires de la curcumine sur le sepsis.



# **Chapitre I : Rappels bibliographiques**

## I. Sepsis

Le sepsis est un problème de santé mondial et continue d'être la principale cause de décès par infection, avec un taux de mortalité supérieur à 40% (Napolitano, 2018 ; Qiu et al., 2019 ;Rudd et al., 2020).

En 2017, environ 48,9 millions de cas incidents de sepsis ont été enregistrés dans le monde et 11,0 millions décès liés au sepsis ont été signalés, représentant 19,7 % de tous les décès dans le monde (Napolitano, 2018 ; Qiu et al., 2019 ;Rudd et al., 2020).

### I.1. Définition du sepsis

Le sepsis est le terme anglo-saxon venant du grec Σήψις (putréfaction) et αίμα (sang), désigne la présence de bactéries (voire de champignons ou de virus) dans le sang (Funk et al., 2009).

Il fut décrit par Hippocrate comme dangereux, odorant, et correspondant à une décomposition biologique du corps. Ibn Sīnā l'avait aussi décrit comme une putréfaction du sang et des tissus avec fièvre (Majno, 1991 ; Funk et al., 2009).

Le sepsis est un syndrome physiopathologique complexe, défini comme un dysfonctionnement organique potentiellement mortel causé par une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection (Venet et al., 2017).

La physiopathologie complexe du sepsis a constitué un défi pour les chercheurs, afin de poser une définition adéquate et de développer une thérapie efficace. Depuis 1991 à ce jour, trois conférences de consensus ont été tenu dans le but d'établir une définition adéquate du sepsis, et d'identifier des critères de diagnostic cliniques rapides et efficaces pour le sepsis (Singer et al., 2016).

En 1991, le sepsis était défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) associé à une infection, qui évolue en sepsis sévère (sepsis et dysfonctionnement d'un organe) puis en choc septique (sepsis et hypotension sévère).

Le SRIS est attesté par la présence d'au moins deux critères parmi les 4 suivants : (i) fièvre ou hypothermie (température  $>38^{\circ}\text{C}$  ou  $<36^{\circ}\text{C}$ ), (ii) rythme cardiaque accéléré ( $>90$  battements/minute), (iii) rythme respiratoire accéléré ( $>20$  cycles/minute ou pression artérielle en  $\text{CO}_2 < 4,3\text{kPa}$ ), (iv) augmentation ou diminution du nombre de globules blancs sanguins ( $>12\ 000$  cellules/ $\mu\text{L}$  ou  $<4\ 000$  cellules/ $\mu\text{L}$  ou présence d'au moins 10% de granuleux immatures) (Figure 1) (Singer et al., 2016).

Cette définition a connue deux mises à jour en 2001 et en 2016, étant donné que cette dernière été beaucoup plus basée sur la réponse inflammatoire de l'hôte. En effet, une réaction de l'hôte à une infection implique non seulement l'activation des réponses pro

et anti-inflammatoires, mais également des modifications des voies non immunologiques (cardiovasculaire, autonome, neurologique, hormonal, métabolique et coagulation). De plus, l'utilisation de 2 critères de SRIS ou plus pour identifier le sepsis a été considéré d'une spécificité et une sensibilité inadéquates, étant donné que la fièvre, la tachycardie, la tachypnée et les modifications des globules blancs pourraient refléter une infection seulement (**Singer et al., 2016**).

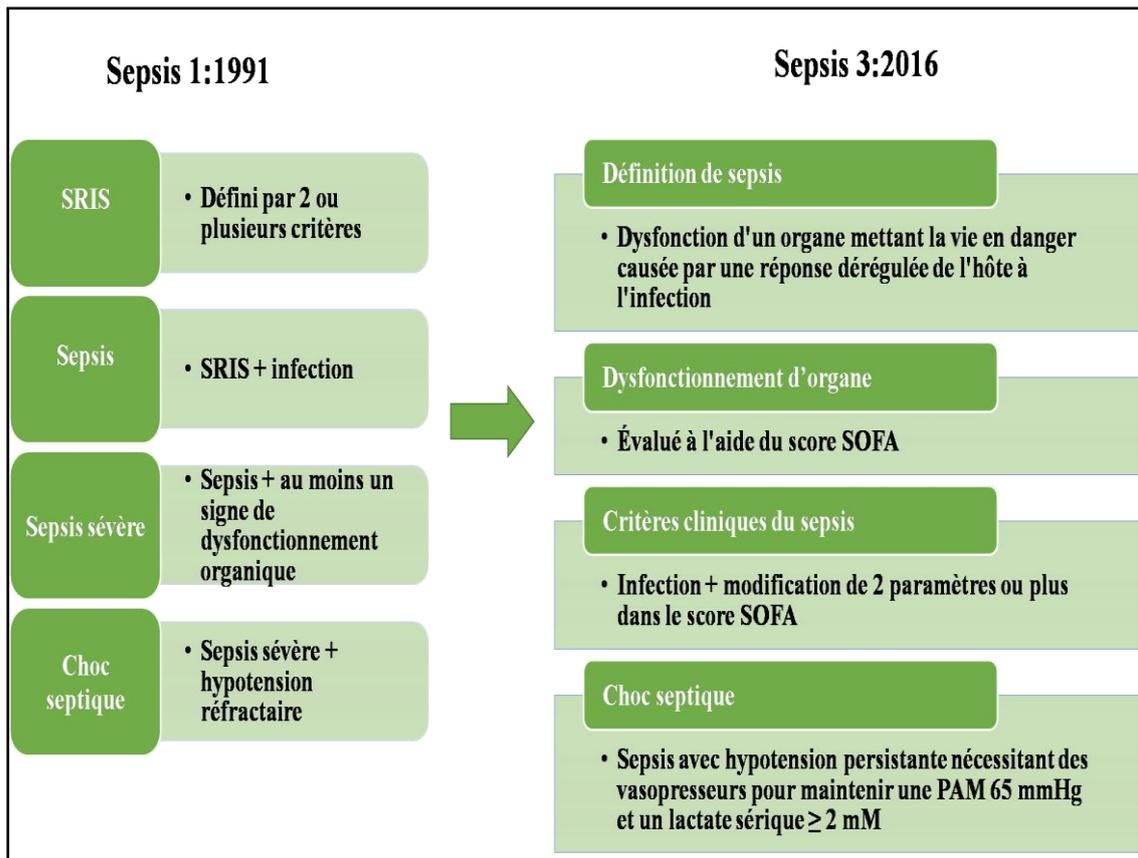
**En 2016**, une nouvelle définition et des nouveaux critères cliniques du sepsis ont été instaurés. Le sepsis est actuellement défini comme un dysfonctionnement mortel d'organes causé par une réponse dysrégulée de l'hôte à l'infection. Il est aggravé en choc septique, caractérisé par des anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques particulièrement profondes augmentant le risque de mortalité (**Singer et al., 2016 ; Cecconi et al., 2018**).

Les nouveaux critères cliniques du sepsis incluent une infection suspectée ou confirmée avec un dysfonctionnement d'organe, identifié par une augmentation de deux points ou plus du score SOFA (*the Sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment*) (**Figure 1**) (**Singer et al., 2016 ; Huang et al., 2019**) (**Tableau I, Annexe I**).

Un score clinique simplifié et rapide appelé quickSOFA (qSOFA), utilisé en milieu extrahospitalier, est basé sur deux des critères cliniques suivants : (i) fréquence respiratoire  $\geq 22$  cycles/min, (ii) pression artérielle systolique  $\leq 100$  mm Hg (iii) altération des fonctions supérieures (encéphalopathie ou syndrome confusionnel, score de Glasgow  $<14$ ) (**Singer et al., 2016 ; Font et al., 2020**).

Le choc septique est identifié, en plus des critères cliniques de sepsis, par une exigence de vasopresseur pour maintenir une pression artérielle supérieure ou égale à 65 mm Hg et un taux de lactate sérique supérieur à 2 mmol/L ( $>18$  mg/dL) (**Hotchkiss et al., 2016 ; Singer et al., 2016**).

Néanmoins, les limites de cette mise à jour de la définition et des critères cliniques de sepsis ont été débattues et une nouvelle mise à jour semble être nécessaire.

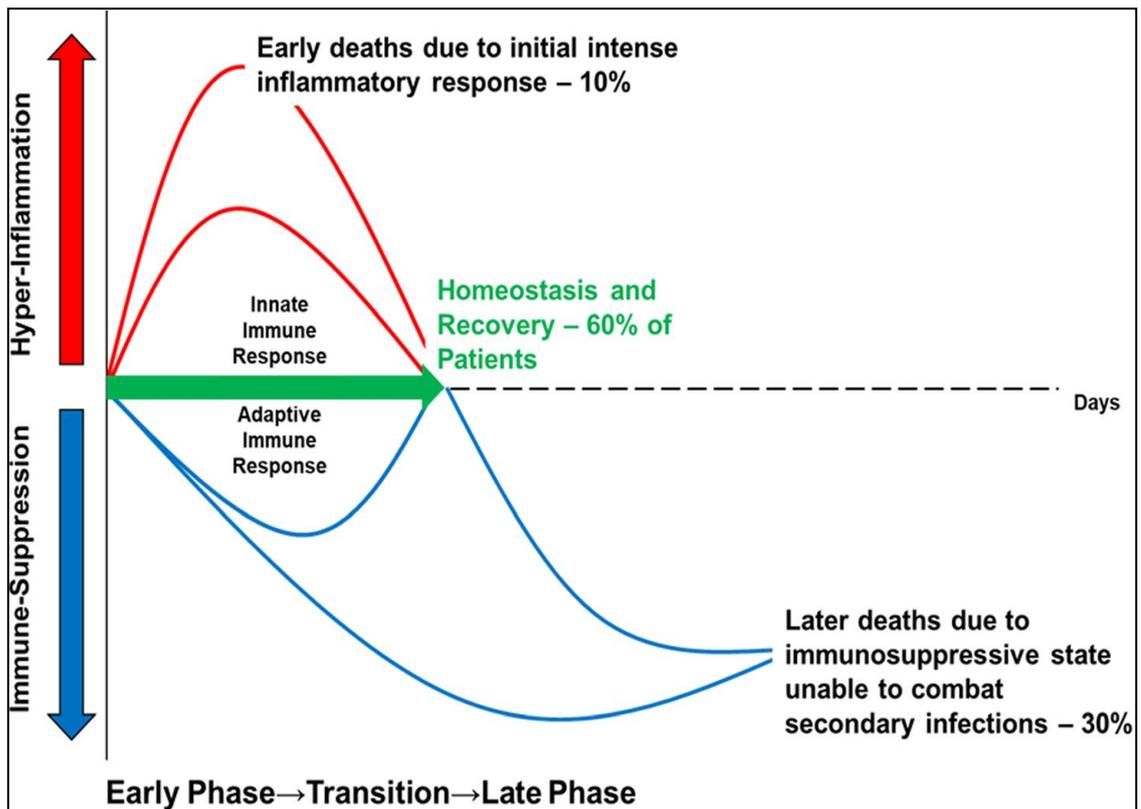


**Figure 1.**Diagramme comparatif des définitions du sepsis décrites par les conférences de consensus de 1991 et 2016 adaptée de (Napolitano, 2018).

**I.2. Physiopathologie du sepsis**

La physiopathologie du sepsis est extrêmement complexe, et est caractérisée par une réponse inflammatoire déséquilibrée et excessive, un stress oxydatif, et un désordre de plusieurs systèmes (immunitaire, coagulation, métabolique...) (Cimolai et al., 2015 ;Van der Poll et al., 2017).

La réponse immunitaire lors du sepsis est une succession de deux phases : une phase hyper inflammatoire et une phase d'immunodépression (Figure 2) (Ono et al., 2018).

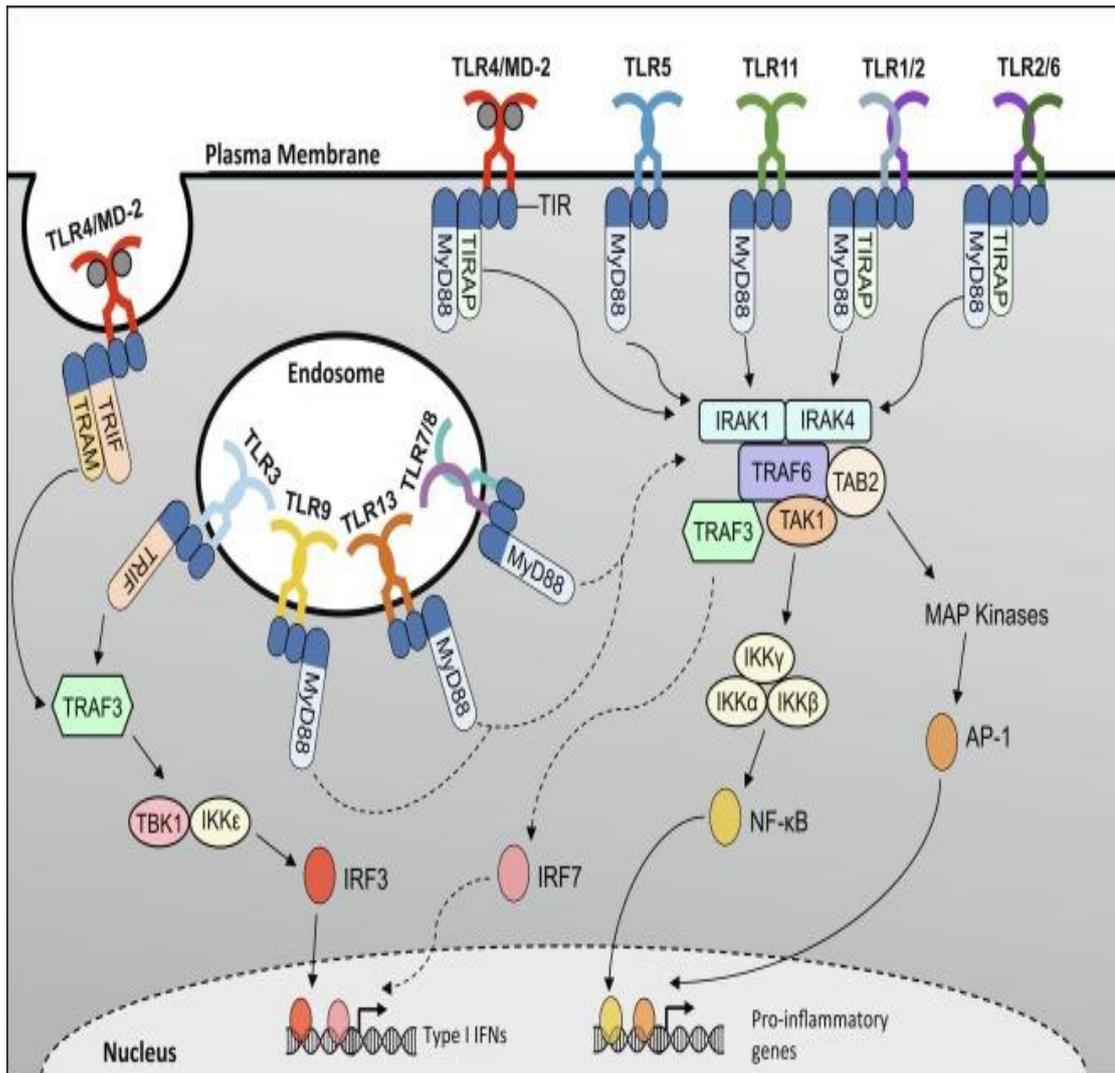


**Figure 2.** Phases hyper-inflammatoire et d'immunodépression au cours du sepsis (Brady et al., 2020).

### I.2.1. Phase hyper inflammatoire

Le sepsis est secondaire à une infection bactérienne, fongique ou virale. La réponse de l'organisme à ces agents pathogènes débute par la reconnaissance de motifs hautement conservés spécifiques des pathogènes ou « PAMPs » (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) par des récepteurs de l'immunité innée, les « PRR » (*Patterns Recognition Receptors*). Il résulte de cette interaction une réaction inflammatoire visant à limiter la dissémination de l'agent infectieux (Calderari et Liaudet, 2010 ; Dubroux, 2016).

Les Toll-like receptors ou « TLR » sont les récepteurs PRRs les plus décrits chez l'homme. Ils sont exprimés par les cellules immunitaires (monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques, LT, LB...) et par les cellules épithéliales (O'Neill et al., 2013). Leur activation initie une signalisation intracellulaire dépendante ou indépendante du MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) (Figure 3).



**Figure 3.** Voies de signalisation des TLRs chez les mammifères (Chandler *et al.*, 2019). La liaison du ligand à un TLR est proposée pour induire des changements de conformation qui initient des cascades de signalisation intracellulaire. La cascade de signalisation spécifique et la robustesse de la réponse sont influencées par le ligand, le TLR et les molécules adaptatrices. La signalisation peut se produire sur l'axe dépendant de MyD88 ou sur l'axe indépendant de MyD88/TRIF, avec des protéines caractéristiques impliquées dans les deux voies. Le résultat final des deux cascades est la translocation de facteurs de transcription dans le noyau, conduisant à une régulation à la hausse de gènes spécifiques qui contribueront à la réponse de l'hôte aux stimuli microbiens initiaux.

Quel que soit la voie empruntée, il résulte de cette stimulation l'activation de différents facteurs de transcription dont le NF-κB. Ce dernier contribue à l'expression de médiateurs clé de la réponse inflammatoire, dont notamment les cytokines pro-inflammatoires l'IL-1β, le TNF-α et les interférons de type I, les chimiokines : IL-8 ; des molécules d'adhérence : ICAM-I, VCAM-1 ; des enzymes : iNOS, Cox-2, SOD et

des facteurs de coagulation : facteur tissulaire. Ces médiateurs vont induire, d'une part, la production de nouveaux médiateurs inflammatoires et contribuer, d'autre part, au développement et au maintien des réponses immunitaires innée et adaptative (**Grimaldi, 2014 ; Lemarié et al., 2020**).

Ainsi, un cycle vicieux est instauré et une libération massive de cytokines à l'échelle systémique qualifiée d' «Orage ou tempête cytokinique » ou d'état d'hyper-inflammation systémique est observée (**Pougol, 2016**).

Les cytokines et les chimiokines libérées activent les cellules endothéliales qui expriment des molécules d'adhésion à leurs surfaces. Les polynucléaires neutrophiles circulants peuvent, ainsi, infiltrer les tissus, suivis par le recrutement et l'activation des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques. Ces dernières seront responsable de l'apprêtement antigénique ; elles participent à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B (**Grimaldi, 2014**).

Les lymphocytes T effecteurs migrent vers le site infectieux et participe, de par leurs activités helper et cytotoxiques à l'amplification de la réponse immune et à l'élimination des pathogènes et des cellules infectées. L'immunité humorale n'est pas en reste, puisque des anticorps immuns sont générés après activation, prolifération et différenciation des LB. Ces anticorps sont une fraction soluble très importante puisqu'elle est capable de neutraliser le germe infectieux et d'induire des mécanismes spécifiques tels que, l'activation du système du complément, l'opsonisation et l'ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*)(**Grimaldi, 2014**).

### **I.2.2.Phase d'immunodépression**

La persistance de la phase hyper inflammatoire au cours du syndrome septique entraine une immunodépression ou une immunoparalysie acquise du système immunitaire. Il s'agit d'une suppression immunitaire caractérisée par une altération des cellules immunitaires innées et adaptatives (apoptose, altérations fonctionnelles et modifications phénotypiques), qui ne seront plus capable de combattre l'infection (**Grimaldi, 2014 ; Pougol, 2016**).

Cette phase observe entre autres une lymphopénie résultant de l'apoptose des LB et LT (CD4+ et CD8+) et la réduction de leur prolifération, une reprogrammation des CPA conduisant à une diminution de l'expression du HLA-DR, ainsi qu'un phénotype immature des neutrophiles. Ces derniers subissent également des dysfonctions, altérant leurs capacités anti-microbiennes telles qu'une diminution de la production des ROS ou

une baisse de l'activité chimiotactique via une diminution de l'expression des récepteurs CXCR1 et CXCR2 (**Figure 2**) (**Lereclus, 2018 ; Cao et al., 2019**).

Des études récentes indiquent que les patients décédés d'un sepsis ont une immunosuppression marquée. Leur mortalité résulte d'une incapacité des patients à éliminer les infections primaires, ainsi que le développement d'infections secondaires (**Ono et al., 2018**).

### **I.3. Dysfonctionnement hépatique associé au sepsis**

Le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Ses fonctions comprennent : le métabolisme des glucides, des lipides, des protéines et d'hormones ; la biosynthèse des composants sanguins, des enzymes et de facteurs de coagulation ; la production de la bile ; la désintoxication ; le métabolisme des composés azotés ; la synthèse d'urée ; le stockage du glycogène, du cholestérol, de vitamines (A, D, B12), du fer et bien d'autres (**Woźnica et al., 2018**).

Lors d'infections systémiques, le foie régule les défenses immunitaires via la clairance bactérienne, la production de protéines de phase aiguë (APP) et de cytokines, et l'adaptation métabolique à l'inflammation (**Sun et al., 2020**).

Au cours du sepsis, le foie est endommagé par des agents pathogènes, des toxines ou des médiateurs inflammatoires. La lésion évolue d'un dysfonctionnement hépatocellulaire actif à des lésions hépatiques, puis à une insuffisance hépatique. Le dysfonctionnement hépatique consiste en de subtiles altérations des fonctions hépatocellulaires, telles qu'une diminution de la synthèse ou une diminution de la fonction de clairance. Les lésions hépatiques sont définies comme une lésion irréversible des hépatocytes. L'insuffisance hépatique est définie comme des dommages sévères et durables du foie et une perte de fonction dans 80 à 90 % des cellules hépatiques (**Yan et al., 2014**).

Les lésions hépatiques ont un effet critique sur la gravité et l'issue du sepsis. Les données cliniques et expérimentales suggèrent que le dysfonctionnement hépatique est un signe précoce de sepsis et que le dysfonctionnement hépatique précoce chez les patients atteints de sepsis est un facteur de risque spécifique et indépendant de mauvais pronostic (**Strnad et al., 2017 ; Sun et al., 2020**).

L'incidence de l'insuffisance hépatique dans le sepsis est inférieure à l'incidence de l'insuffisance d'autres organes en raison de la grande capacité de régénération du foie et de sa capacité à résister aux agressions (**Strnad et al., 2017 ; Sun et al., 2020**). Les incidences de dysfonctionnement hépatique et d'insuffisance hépatique associés au

sepsis varient de 34 % à 46 % et de 1,3 % à 22 %, respectivement, chez tous les patients atteints de sepsis (Yan et al., 2014). L'incidence moyenne de dysfonctionnement hépatique chez les patients atteints de sepsis est de 39,9 %, inférieure à l'incidence de dysfonctionnement respiratoire, rénal et neurologique et presque identique à l'incidence de dysfonctionnement cardiovasculaire. Une insuffisance hépatique survient chez 8,5% des patients atteints de sepsis (Yan et al., 2014). Néanmoins, l'incidence des dysfonctionnements hépatiques reste variée car les outils diagnostiques actuels font défaut, notamment ceux permettant de détecter les atteintes hépatiques précoces (Woźnica et al., 2018).

Cependant, le dysfonctionnement et l'insuffisance hépatiques sont associés à de graves complications dans le sepsis. Les taux de mortalité chez les patients atteints de sepsis présentant un dysfonctionnement ou une insuffisance hépatique vont de 54 à 68 %, ce qui est plus élevé que les taux de mortalité des patients atteints de sepsis présentant un dysfonctionnement ou une insuffisance pulmonaire (l'organe le plus souvent affecté dans le sepsis) (Strnad et al., 2017 ; Sun et al., 2020).

Chez les patients gravement malades, les manifestations cliniques comprennent une hépatite hypoxique (ischémique), une cholestase induite par un sepsis et une cholangite sclérosante secondaire (Yan et al., 2014).

#### **I.4. Stress oxydatif et sepsis**

##### **I.4.1. Définition du stress oxydatif**

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, est un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants en faveur d'une surproduction des espèces réactives de l'oxygène/nitrogène (ROS/RNS). Il se produit quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Redouane et Flih., 2015).

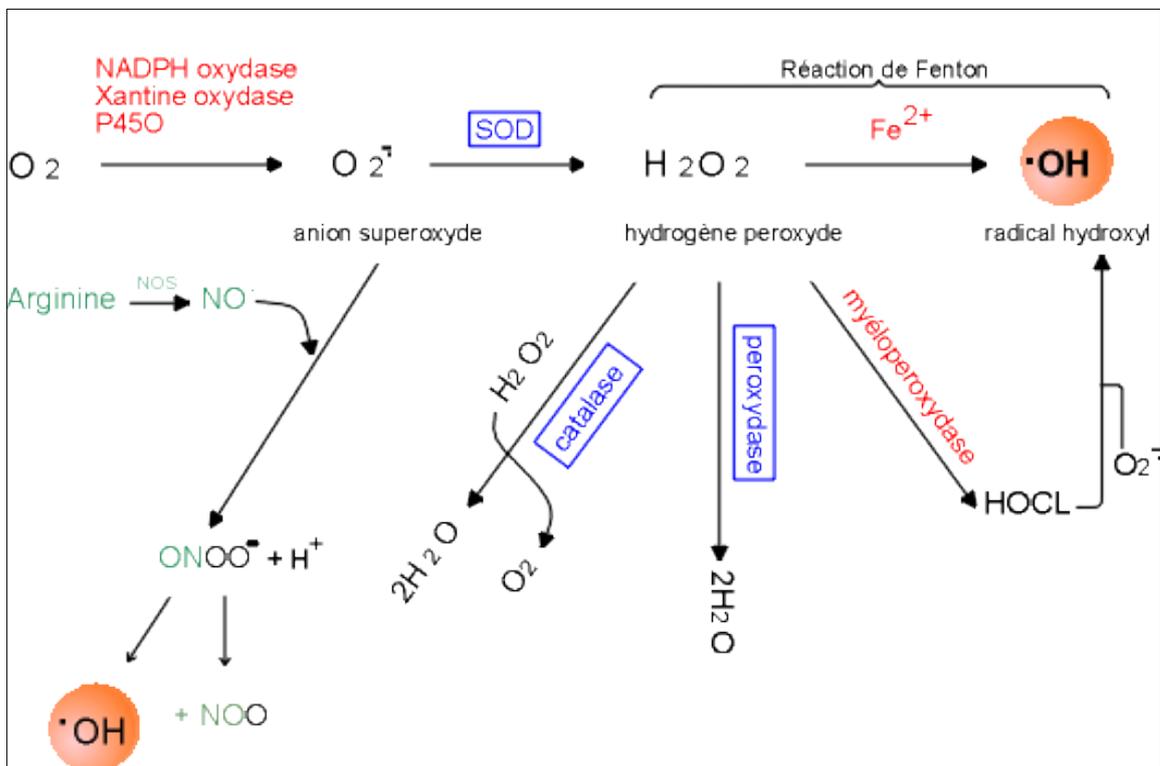
Les ROS/RNS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions cellulaires (Moukette et al., 2015 ; Jadeja et al., 2017). La génération excessive de ROS/RNS épuise les antioxydants endogènes, qui par la suite, ne parviennent pas à piéger toutes les ROS conduisant à des lésions cellulaires associées à diverses pathologies, comme le cancer, les maladies infectieuses, cardiovasculaires et neurodégénératives (Jadeja et al., 2017) (Figure 4).

##### **I.4.2. Systèmes pro-oxydant/antioxydant**

Dans des conditions physiologiques, une production contrôlée et à des doses raisonnables des espèces réactives de l'oxygène/nitrogène (ROS/RNS) est indispensable

à de nombreuses fonctions physiologiques comme la signalisation cellulaire, la mort cellulaire programmée et la réponse immunitaire (Ye et al., 2015 ; Belaïch, 2016). Le taux des ROS/RNS est maintenu à des concentrations physiologiques grâce à un équilibre entre leur production par le système pro-oxydant et leur élimination par le système antioxydant.

Les ROS/RNS sont générées par de sources endogènes et exogènes à partir de l’oxygène (O<sub>2</sub>) et de l’azote (N). Ainsi, les principales sources endogènes des ROS/RNS sont la chaîne respiratoire mitochondriale, la NAD(P) H oxydase, la xanthine oxydase et la NOSynthase (Figure 4). Les ROS/RNS exogènes résultent de la pollution, de la fumée de cigarette, de l’alcool, de certains médicaments, des solvants industriels, et des radiations (Hrycay et Bandiera., 2015).



**Figure 4.** Production des espèces réactives de l’oxygène /nitrogène (ROS/RNS) et leur neutralisation par des antioxydants (Hierso, 2015). •O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d’hydrogène, •OH : radical hydroxyl, ONOO<sup>-</sup> : peroxynitrite, HOCl : acide hypochloreux, •NO : monoxyde d’azote.

Les pro-oxydants sont représentés par des espèces réactives de l’oxygène (ROS) et de l’azote (RNS), radicalaire ou non radicalaire.

L'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  constitue la première espèce réactive de l'oxygène radicalaire résultant d'une réaction de réduction électronique de l'oxygène. La dégradation de ces radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet-}$  est contrôlée par des systèmes de défense antioxydants, qui s'adaptent au taux de radicaux présents. Ainsi, la production des radicaux superoxydes est régulée par des métalloenzymes, les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent leur dismutation en peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ . Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas en soi un radical mais une molécule, il est lui-même toxique et capable de donner naissance, via des réactions de type « réaction de Fenton », à la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, le radical hydroxyle  $\bullet OH$ . La quantité de peroxyde d'hydrogène est régulée par l'enzyme héminique, la catalase (CAT) et par la glutathion peroxydase (GPx) qui catalysent sa réduction par le glutathion (GSH) en eau et oxygène (**Figure 4**) (**Carange, 2010 ; Bounedjah, 2014 ; Zerargui, 2015 ; Noichri, 2016**).

Les RNS englobent principalement le radical monoxyde d'azote ( $\bullet NO$ ) et le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). Le  $\bullet NO$  est synthétisé par la NO synthase à partir de la L-arginine, en présence d'oxygène. Le  $\bullet NO$  forme avec l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  un puissant oxydant, le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) (**Shah et al., 2014 ; Phaniendra et al., 2015**).

Pour se protéger des effets délétères des ROS/RNS, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est non enzymatique exogène apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes et endogène comme glutathion ; l'autre est enzymatique et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. Quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (**Poisson, 2013**).

#### **I.4.3. Rôle du stress oxydatif dans le sepsis**

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont décrit le stress oxydatif chez les patients atteints de sepsis, avec des preuves de production de ROS/RNS associée à des dommages d'organes, et une déplétion antioxydante (**Spanidis et al., 2015 ; Yamaguchi et al., 2018 ; Pahlavani et al., 2019**).

Le niveau de stress oxydatif semble corrélé avec la sévérité du sepsis. Il est significativement plus élevé chez les patients atteints de SRIS avec défaillances

d'organes que chez ceux n'ayant pas de défaillances d'organes et pourrait contribuer à la survenue de multiples défaillances d'organes (Motoyama et al., 2003 ; Huet et al., 2007). De plus, le stress oxydatif semble jouer un rôle dans le maintien de la réponse inflammatoire systémique *via* l'activation des réponses inflammatoires par les voies redox (Arnalich et al., 2000).

De plus, il a été démontré que les ROS induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  par activation de la voie NF-kB (Naik et Dixit., 2011). A son tour le TNF- $\alpha$  produit en aval induit une apoptose cellulaire contribuant aux dommages d'organes (Hughes et al., 2005).

Néanmoins, l'importance du stress oxydatif est sous-estimée malgré les preuves de son rôle central dans la pathogénèse du sepsis. La notion de stress oxydatif n'a pas été soulignée dans les directives de la dernière conférence de consensus de 2016.

## I.5. La curcumine

### I.5.1. Définition

La curcumine (1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione) ou diferuloylméthane est un polyphénol hydrophobe isolée des rhizomes d'une plante médicinale appartenant à la famille des Zingiberaceae « *Curcuma longa*L. » (Figure 5) (Zhong et al., 2016 ; Ghazimoradi et al., 2017 ; Fereydouni et al., 2019).



**Figure 5.** La curcumine, molécule active de la plante *Curcuma longa* (Arshad et al., 2017).

La curcumine est utilisée depuis des siècles dans les régimes alimentaires et les médecines traditionnelles des cultures asiatiques et indiennes et demeure aujourd'hui une épice alimentaire populaire dans le monde entier (**Aggarwal et al., 2007**).

La curcumine a été isolée pour la première fois du curcuma en 1815 et la structure a été délimitée en 1910 sous le nom de diferuloylméthane (**Sasaki, 2012**). Plusieurs rapports montrent qu'il est non toxique pour les cellules normales et induit une toxicité sélective dans les cellules tumorales. En général, des doses allant de 0,2 à 8 g / jour de la curcumine se sont révélées non toxiques pour l'homme (**Li et al., 2018**).

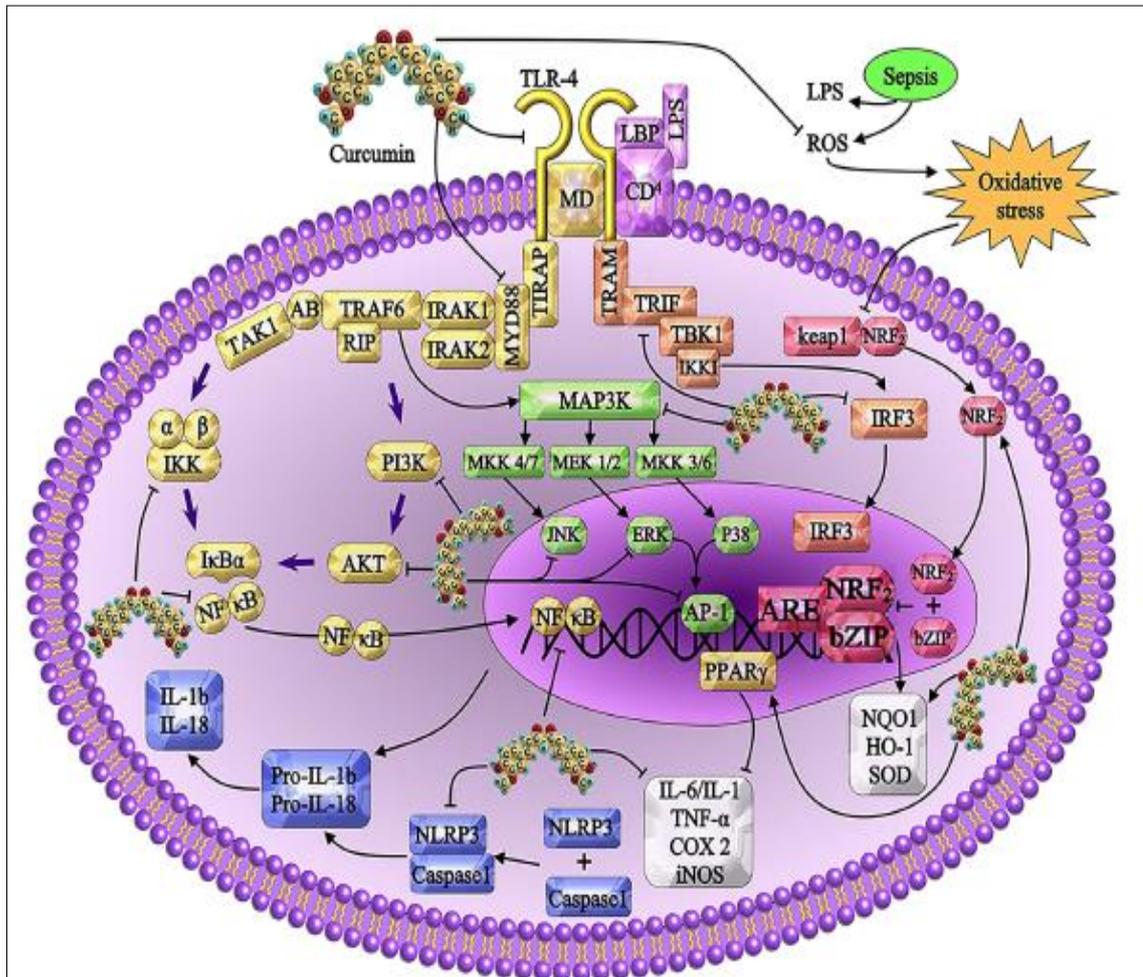
### **I.5.2. Les effets pléiotropes de la curcumine**

La curcumine est décrite comme possédant un très large spectre d'actions dans plusieurs domaines: utilisations traditionnelles ou études scientifiques actuelles. En médecine traditionnelle, la curcumine peut être utilisée pour traiter les affections hépatiques, les helminthiases, éléphantiasis et autres parasitoses, les ulcères gastriques ou cutanés, l'eczéma, les maladies inflammatoires, les hémopathies, les vertiges et les gonorrhées, etc... (**Duke et al., 2002**).

Des études récentes ont montré que la curcumine possède de multiples activités biologiques (pléiotrope) et propriétés pharmacologiques, notamment anti-inflammatoire (**Dhir, 2018**), antioxydante (**Khanji et al., 2018**), et scavenger des radicaux libres (**Zhong et al., 2016 ; Vaughn et al., 2017**), anticancéreuse et antiproliférative (**Pan et al., 2018 ; Barati et al., 2019**), et antimicrobienne (**Marini et al., 2018**).

Certaines études ont suggéré des effets protecteurs de la curcumine contre de nombreuses maladies telles que le sepsis (due à la modulation des réponses immunitaires) (**Chen et al., 2018**), le syndrome métabolique (en raison de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, supprimant l'adipogenèse, réduisant la pression artérielle élevée et diminuant l'inflammation) (**Ghazimoradi et al., 2017**), les maladies inflammatoires de l'intestin (inhibent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, la 5-lipoxygénase et TLR comme le récepteur 4 (TLR-4)) (**Singla et al., 2014**), la polyarthrite rhumatoïde (due à la régulation de la réponse immunitaire et diminuer l'expression des cytokines et des chimiokines (telles que la protéine chimiotactique des monocytes (MCP-1)) (**Khayyal et al., 2018**), les maladies cardiovasculaires (en raison de l'ajustement de l'enzyme liée au métabolisme des lipoprotéines, la diminution de l'inflammation et du stress oxydatif) (**Li et al., 2019**).

De plus, plusieurs études ont montré le rôle de la curcumine dans la régulation de la réponse immunitaire à l'infection, en ciblant plusieurs voies moléculaires, y compris la voie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) et AP-1 (*activator protein 1*) (Tabrizi et al., 2019) et Nrf-2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), qui conduit respectivement à inhibition de l'inflammation et le stress oxydatif (Figure 6) (Xie et al., 2017).



**Figure 6.** Effets de la curcumine sur les voies inflammatoires et oxydatives. IRAK1 : kinase 1 associée au récepteur de l'interleukine-1; RIP : protéine en interaction; TBK1 : kinase 1 se liant à TANK; TRAF : facteur associé aux récepteurs du TNF; TRAM : molécule adaptatrice liée au TRIF; TRIF: interféron- $\beta$  induisant un adaptateur contenant un domaine TIR (Karimi et al., 2019).



## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogies de la FSNV de l'université de Blida 1, le laboratoire de pédagogie de la station expérimentale, le laboratoire de phytopharmacie du département de Biotechnologie et le laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC d'Alger, durant une période de 4 mois du 01 Mars au 04 juillet 2021.

Notre travail a porté sur :

- ✓ l'étude de l'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par sepsis polymicrobien.
- ✓ le rôle de la curcumine dans la prévention du stress oxydatif et des altérations hépatiques induites par sepsis polymicrobien.

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Cellulaire et Moléculaire, nous devons réaliser un travail de recherche sur les altérations hépatiques stress oxydant- dépendante induite par sepsis ainsi que le rôle de la curcumine.

Ce travail devait inclure en plus des paramètres de stress oxydatif (MDA, NO, MPO, Catalase et GSH), des paramètres de la réponse inflammatoires (FNS, CRP, procalcitonine) et de la cytotoxicité hépatique (ASAT, ALAT, PAL). Toutefois, nous avons rencontrés plusieurs problèmes et obstacles dont la perte des échantillons (organes et sérums) à cause d'une panne du congélateur, le manque de matériel et réactifs,...etc.

Dans ces circonstances, notre travail est limité à une étude biochimique des paramètres de stress oxydatif (MDA et catalase), et FNS et à une étude histologique.

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1. Matériel non biologique**

- La verrerie, les appareillages, les solutions et réactifs utilisés dans cette étude sont résumés dans l'**annexe II**.
- Curcumine (Sigma).

### **II.1.2. Matériel biologique**

Notre travail a été réalisé à l'aide d'un modèle animal de sepsis polymicrobien (CLP, *Cecal Ligation Puncture*) en utilisant des souris NMRI albinos.

#### **Animaux**

Le modèle murin de sepsis a été réalisé sur des souris NMRI albinos mâles, âgées de 10 à 12 semaines (28-35g), fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA, Kouba, Alger).

Les souris ont été acclimatées à l'animalerie de l'Université Saad Dahleb de Blida 1, dans un environnement où la température moyenne était de 25 °C et l'humidité était ambiante. Le régime alimentaire se limitait à un aliment granulé (glucides 49,80% ; protéines 34,50% ; lipides 10% et complexe minéral vitaminé : 5,70%) et à de l'eau du robinet. Les souris ont eu un accès libre à l'alimentation et à l'eau « *ad libitum* ».

Toutes les expériences ont été menées conformément à la législation Algérienne de la protection des animaux d'expérimentations utilisées à des fins scientifiques [loi n°12-235/2012; Décret exécutif n° 10-90].

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Modèle murin de sepsis polymicrobien

Le sepsis a été induit par une ligature et une ponction cœcale (CLP), un modèle expérimental de caractère polymicrobien reflétant les changements physiopathologiques et les symptômes cliniques typiques en termes d'hypothermie, tachycardie et tachypnée, observée chez les patients septiques (**Rittirsch et al., 2009**).

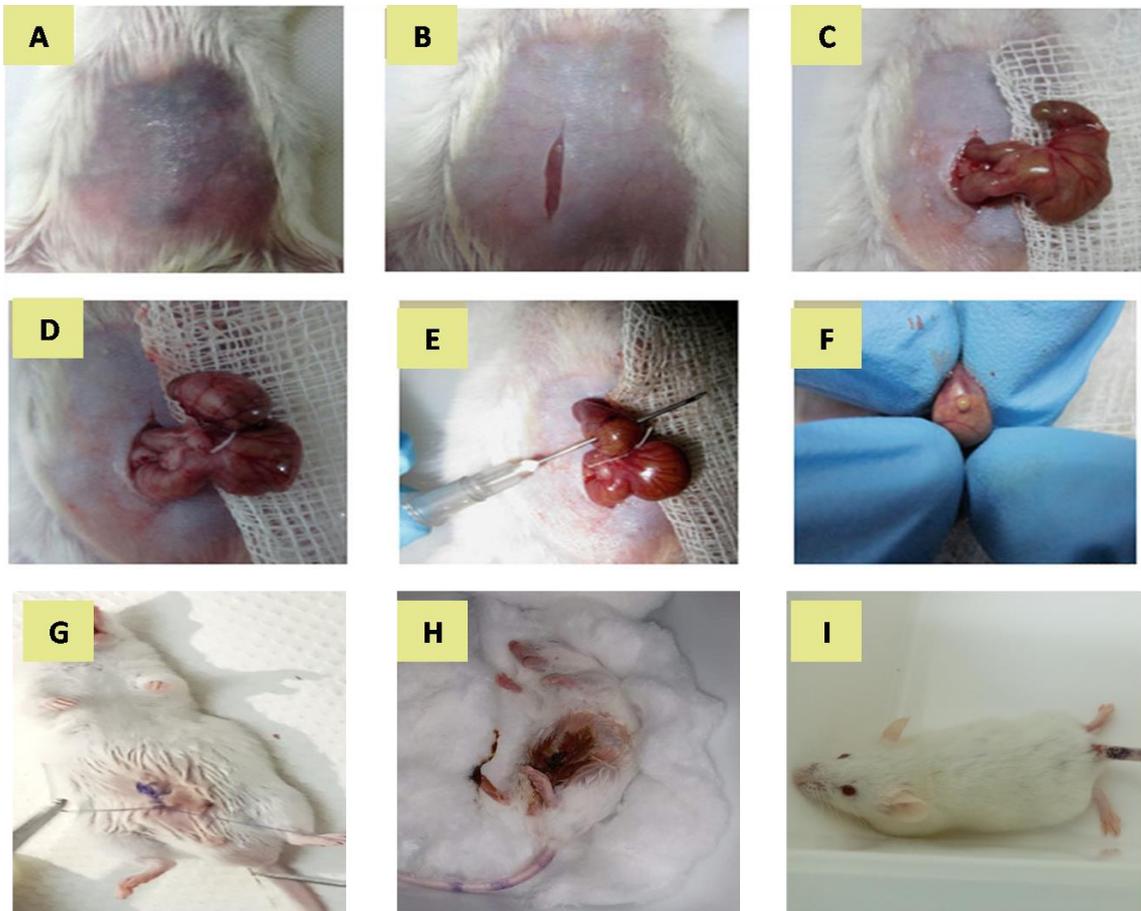
Le modèle de CLP est celui qui est le plus souvent utilisé car non seulement il fournit une meilleure représentation de la complexité du sepsis humain, mais aussi les agents pathogènes sont endogènes, imitant ainsi une lésion traumatique conduisant à une péritonite chez l'homme (**Rittirsch et al., 2009**).

Il s'agit d'une ligature et d'une ponction cœcale (CLP). Ce modèle, décrit il y a plus de trente ans, consiste à exposer le cæcum pour le ligaturer puis le perforer avec une aiguille. Ce modèle comporte à la fois une infection bactérienne mais également une atteinte ischémique du tube digestif (**Bouroche, 2012**).

Les souris sont anesthésiées avec de la kétamine à 10mg/Kg/*i.p* (par voie intrapéritonéale, *ip*), puis mises sur une table d'opération aseptique dans un environnement opératoire stérile. Le quadrant inférieur de l'abdomen est rasé puis désinfecté par l'alcool afin de faire une incision abdominale médiane de 1 cm pour bien exposer le cæcum (**Figure 7A-C**). Ce dernier est ligaturé sous la valve iléo-cœcale avec une suture de soie 4-0, pour obtenir la même sévérité du sepsis, puis perforé trois fois avec une aiguille de calibre 22 (**Figure 7E et F**).

Une petite quantité de fèces est légèrement pressée à travers le site de ponction. Le cæcum est replacé dans la cavité péritonéale et l'incision abdominale est ensuite suturée (**Figure 7G-I**).

À la fin de la procédure chirurgicale, les souris sont immédiatement remises dans leurs cages avec un accès libre à l'eau et à la nourriture.



**Figure 7.** Etapes critiques de CLP induit chez la souris. (A) Rasage et désinfection de la région abdominale. (B) Incision abdominale médiane de 1 cm (C) Exposition du cæcum. (D) Ligature du cæcum sous la valve iléo-cæcale. (E) Ponction cæcale avec une aiguille de calibre 22. (F) Libération d'une petite quantité de fèces des sites de ponction. (G) et (H) Suture et désinfection de l'incision abdominale par du Bétadine. (I) Réanimation de la souris après CLP.

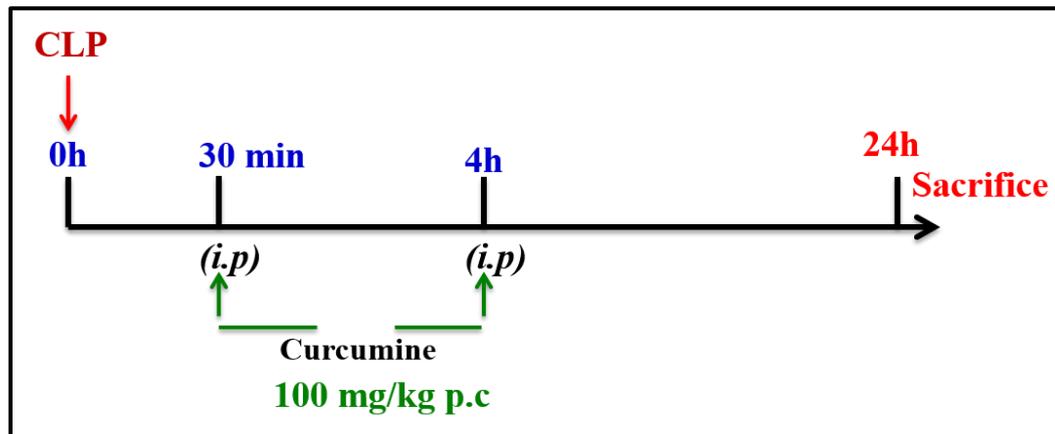
### II.2.2. Protocole pharmacologique

Les souris NMRI albinos ont été réparties en trois lots (**Figure 8**) :

1. Lot Contrôle (n=5) : n'ayant reçu aucun traitement.
2. Lot septique (CLP) (n=5) : ayant subi une CLP.
3. Lot septique traité à la curcumine (CLP-Cur) (n=5) : ayant subi une CLP suivie d'injections de 2 doses de 100 mg/kg/i.p de curcumine après 30 min et 4h de CLP.

Les animaux ont été sacrifiés 24 h après la CLP et les organes : foie, rate et mésentère ont été rapidement prélevés, lavés dans une solution froide de NaCl à 0,9 % et préparés pour l'étude biochimique et histologique.

Le sang a été prélevé par ponction cardiaque sur tube EDTA afin de déterminer la formule d'énumération sanguine (FNS) et de réaliser un frottis sanguin.



**Figure 8.** Protocole expérimental chez les souris NMRI albinos. *i.p* : voie intrapéritonéale. p.c : poids corporel.

### II.3. Etude biochimiques

#### II.3.1. Préparation de l'homogénat tissulaire

Les tissus hépatiques ont été homogénéisés à 4°C, à 800 rpm en utilisant un homogénéisateur SS2 avec un pilon en Téflon, dans 10 volumes de tampon phosphate (50mM, pH 7.2) contenant 0,5% de Triton x100. Après trois cycles de congélation-décongélation, les homogénats sont centrifugés 20 min à 10000g/4°C. Les surnageants sont récupérés puis aliquotés et conservés à -20 C°, jusqu'à utilisation (**Blandizzi et al., 2005**).

#### II.3.2. Dosage des protéines

La concentration des protéines hépatiques est mesurée par la méthode colorimétrique de Bradford. Cette méthode est basée sur l'interaction du bleu de coomassie G250 avec les protéines, formant un complexe de couleur bleu qui absorbe fortement à 595 nm.

La concentration protéique est proportionnelle à l'intensité de l'absorption, elle est déterminée à partir d'une courbe étalon établie au préalable avec la protéine BSA (*Bovine Serum Albumin*) à 0.1% (**Bradford, 1976**).

#### II.3.3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif

Nous avons recherchés deux marqueurs biochimiques du stress oxydatif, à partir des homogénats de tissus hépatique en dosant:

- Un marqueur pro-oxydant : le malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation lipidique.
- Un marqueur antioxydant : la catalase (CAT), enzyme du système antioxydant enzymatique cellulaire.

### II.3.3.1. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est un index direct de la peroxydation lipidique. La méthode est basée sur la détermination, par spectrophotométrie à 532nm, de l'intensité de la couleur rose produite après réaction de deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) avec les peroxydes lipidiques ou les espèces réactives de TBA (TBARS) entre autre le MDA (Lefèvre et al., 1998).

100 µL d'homogénat hépatiques sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant: 375µL d'acide acétique 20% pH 3.5, 375µL d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.8%, 50µL de sodium dodecylsulfate (SDS) à 8,1%. Le volume réactionnel est complété à 1.0 ml avec de l'eau distillée est incubé à 95°C pendant 1heure (Ohkawa et al.,1979).

La réaction est arrêtée par un refroidissement rapide (bain glacial) et une centrifugation à 3000g pendant 10 min et à 4°C. La densité optique est mesurée à 532 nm et les résultats sont exprimés en nmoles/mg de protéine (Ohkawa et al., 1979).

### II.3.3.2. Dosage de l'activité catalase

La catalase est une enzyme ubiquitaire localisée dans les peroxysomes et dans le cytosol (Aebi, 1984).Elle catalyse la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Jevva et al., 2015).

Le dosage de l'activité catalase a été effectué, par suivi de la cinétique de transformation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et oxygène (Hidalgo et al., 2006).

10µL d'homogénat tissulaire sont mélangés à 990 µL de tampon phosphate 50mM, pH 7.4. La réaction est déclenchée par l'addition de 500 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 mM. La cinétique de la réaction est suivie pendant 2 min à 25°C. L'activité de la catalase est mesurée par une diminution de l'absorbance à 240nm (Aebi, 1984).

L'activité catalase est exprimée en Unité par min et par mg de protéines (U/min/mg de protéines) (Aebi, 1984).

Une unité de catalase correspond à K/6,93x10<sup>3</sup>-.  $K = (2,3/t) (\log A1/A2)$  où t : temps en seconde ; A1 : Absorbance à temps zéro et A2 : Absorbance à 2 minutes.

## II.4. Etude hématologique par FNS et frottis sanguin

L'hémogramme ou numération-formule sanguine (NFS) est un examen hématologique qui permet d'obtenir une évaluation quantitative (numération) et qualitative (formule) des éléments figurés du sang : les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes (Cloutier et al., 2014).

Il est souvent requis devant une suspicion d'anémie, une altération de l'état général, en cas d'hémorragie, de thromboses, d'infection persistante ou de cancer. Il est aussi

prescrit dans le cadre de la surveillance d'un traitement médicamenteux (Berthélémy, 2014). L'hémogramme a été réalisé à l'aide d'un automate.

L'étude fine des Formules sanguines a été faite au microscope après coloration au May-Gründwald-Giemsa (MGG).

Une goutte de sang, prélevé sur tube EDTA, est étalée uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche de cellules. Le frottis est ensuite séché rapidement à l'abri des poussières. Il est ensuite fixé par May-Grünwald pendant 3 min puis coloré par Giemsa pendant 15 min et lavé à l'eau courante. Les lames sont séchées puis observées au microscope grossissement Gx100, Gx400 et Gx1000.

### II.5. Etude histologique

L'étude histologique a été réalisée sur le foie, la rate et le mésentère. Les foies et les rates des souris furent découpés puis fixés dans du formol tamponné à 4% pendant 24h. Les pièces (foie et rate) ont été déshydratées par passage successifs dans des bains d'alcools à degrés croissants (70°, 90° et 100°) suivis d'un bain de toluène.

Des blocs ont été confectionnés, après imprégnation des fragments fixés à la paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été faites à l'aide d'un microtome (Américain Optical) et colorées à l'hématoxyline-éosine (H-E) (Martoja et Martoja., 1967).

Le mésentère fixé dans du formol à 4% pendant 24h est lavé à l'aide d'une solution de PBS (*phosphate-buffered saline*) pH 7.4. Il est étalé sur lame puis coloré à l'H-E.

Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope muni de caméra numérique. Les protocoles histologiques sont décrits en détail dans l'**annexe III**.

### II.6. Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le logiciel GraphPad Prism v. 6.0 a été utilisé pour analyser les données.

Le test ANOVA unidirectionnel avec un test *post hoc* de Tukey est utilisé pour comparer les différences entre les groupes expérimentaux, avec  $p < 0,05$  étant considéré comme statistiquement significatif.



## **Chapitre III : Résultats et discussion**

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche fondamentale des mécanismes physiopathologiques du sepsis dans le but de développer une thérapie efficace. Pour ce faire nous avons élaboré un modèle murin de sepsis polymicrobien. L'interprétation et la discussion des résultats se feront comme suit:

- Nous déterminerons l'implication du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire dans les altérations hépatiques induites par sepsis.

- Ensuite, nous étudions les altérations histologiques induites par sepsis dans le foie, la rate et le mésentère.

- Enfin, nous rechercherons l'effet de la curcumine sur le stress oxydatif, la réponse inflammatoire et les dommages histologiques induits par sepsis.

### III.1. Résultats

#### III.1.1. Effet du sepsis et de la curcumine sur le poids des souris et des organes (foie, rate)

La perte du poids peut être le signe d'une maladie sous-jacente parfois grave telle que les maladies infectieuses dont le sepsis. Cette perte de poids pourrait être expliquée par la forte demande d'énergie exercée sur l'organisme pour combattre l'agent pathogène.

La variation du poids des souris a été suivie par des pesées avant et après traitement des souris soumises aux différents protocoles pharmacologiques. Le foie et la rate ont été également pesés après sacrifice. Les résultats sont illustrés dans les figures 9 et 10.

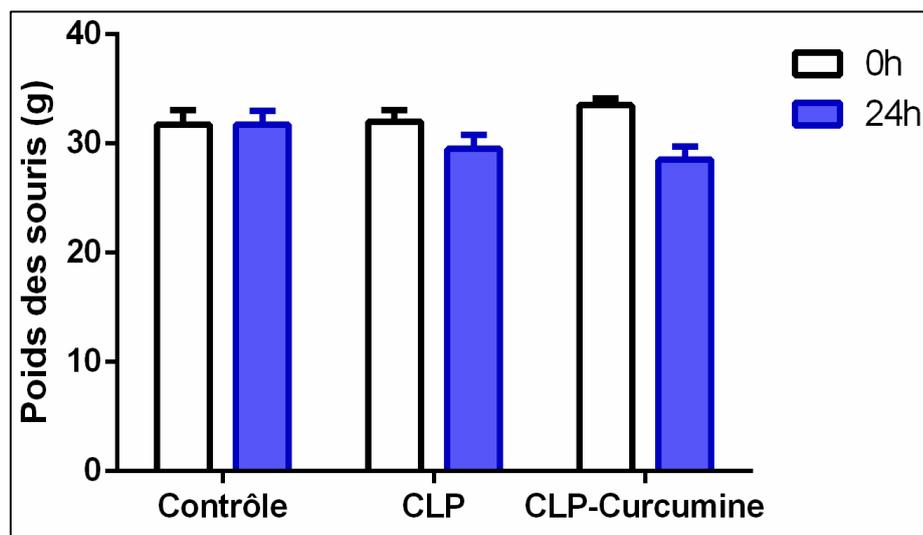
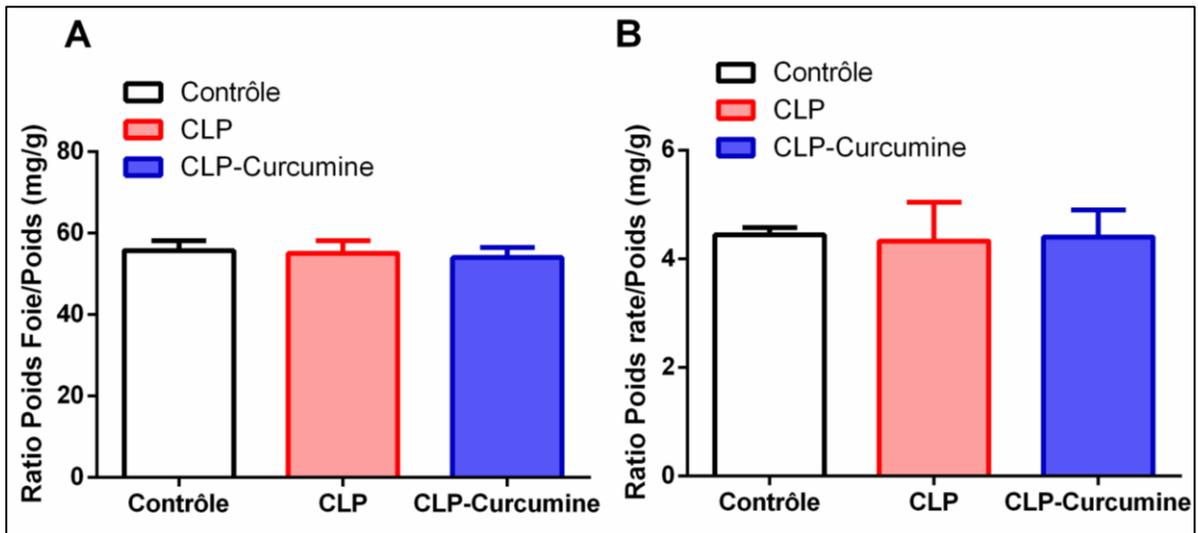


Figure 9. Effet des différents traitements sur le poids des souris NMRI albinos.

Les résultats de notre étude montrent que le poids des souris contrôle reste inchangé après 24h alors qu'on observe une légère diminution non significative chez les souris septiques et septiques traités à la curcumine (**Figure 8**). Nos résultats sont différents des travaux de **Rozenberg et al. (2006)** et **Rahim (2009)** dans d'autres modèles de sepsis, et qui ont démontré une diminution du poids des animaux septiques.



**Figure 10.** Effet des différents traitements sur le poids du foie et de la rate. **A** : ratio poids des foies / poids des souris. **B** : ratio poids de la rate/ poids des souris.

L'hépatosplénomégalie résulte de l'association d'une hépatomégalie (hypertrophie du foie) et d'une splénomégalie (hypertrophie de la rate). L'hépatosplénomégalie est le signe d'une pathologie sous-jacente comme : les maladies infectieuses, la cirrhose, la leucémie ou le lymphome, ou l'anémie hémolytique, ... etc.

Dans notre travail nous avons évalué les ratios du poids des organes (foie et rate) par rapport aux poids des animaux, comme marqueurs d'hépatosplénomégalie. Nos résultats ne montrent aucun changement de poids des organes foie et rate chez les souris septiques et septiques traités à la curcumine comparés aux souris contrôle (**Figure 10**).

Ces résultats pourraient être expliqués par la différence des modèles et du délai de traitement qui était court (24h) mais suffisant pour induire un sepsis.

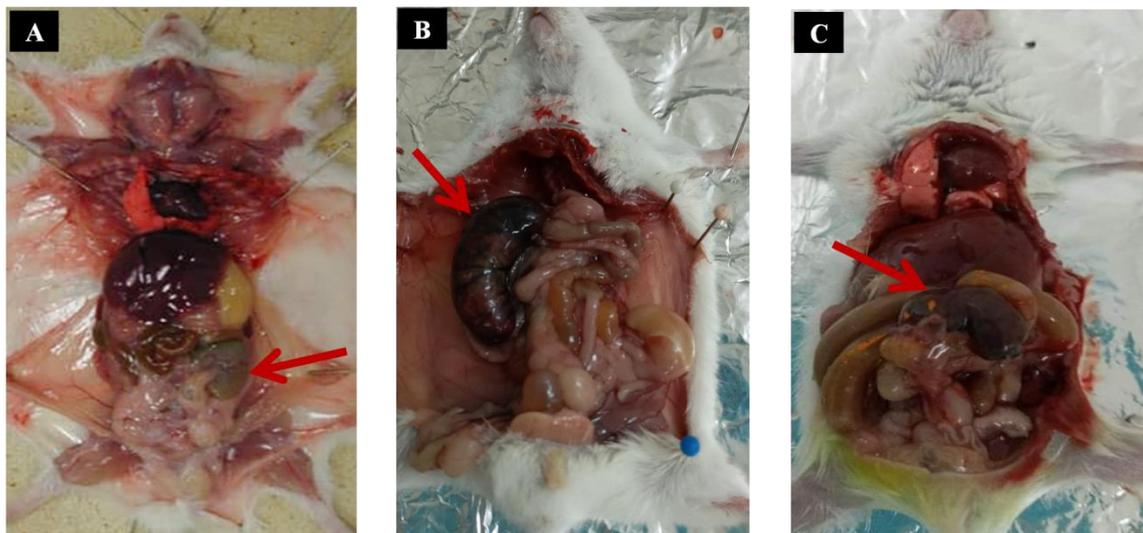
L'absence de l'hépatomégalie, après 24h de sepsis, pourrait être expliquée par la grande capacité de régénération du foie en plus de sa capacité de résistance aux

agressions et qui nécessiterait probablement plus de 24h pour apparaître (Strnad *et al.*, 2017 ; Sun *et al.*, 2020).

### III.1.2. Effet macroscopique du CLP et du traitement à la curcumine sur le Cæcum des souris NMRI albinos

Nos résultats montrent que les souris ayant subi une CLP présentent une nécrose ischémique cæcale qui désigne la diminution de l'apport du sang artériel riche en oxygène à cause de la ligature. L'hypoxie provoque la mort des cellules (**Figure 11B**).

Le traitement par la curcumine réduit la nécrose ischémique cæcale induite par CLP chez les souris NMRI albinos (**Figure 11C**).

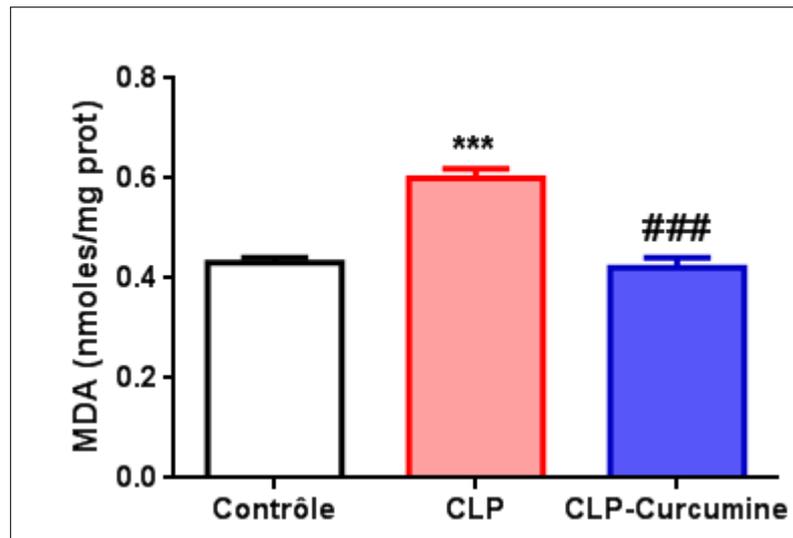


**Figure 11.** Le sepsis induit par CLP se traduit par une nécrose cæcale réduite par le traitement à la curcumine. A : contrôle, B : CLP, C : CLP + Curcumine. Flèche rouge : cæcum.

Des études ont démontré l'effet de la curcumine dans la protection contre l'ischémie d'organes tels que le foie (Bavarsad *et al.*, 2018), le cœur (Yeh *et al.*, 2005), et les reins (Shahed *et al.*, 2001). Cet effet protecteur a été principalement attribué aux propriétés antioxydantes de la curcumine (Sahebkar *et al.*, 2015) et à l'inhibition de la réponse inflammatoire médiée par les récepteurs TLRs (Wang *et al.*, 2017).

### III.1.3. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de MDA hépatique

Le taux de MDA hépatique, marqueur de peroxydation lipidique, est représenté dans la figure 12.



**Figure 12.** Taux de malondialdéhyde hépatique chez les souris NMRI albinos. \*\*\* $P < 0.001$  vs lot contrôle; ### $P < 0.01$  vs lot CLP.

Le taux basal de MDA hépatique est de  $0,431 \pm 0,010$  nmoles/mg de prot chez les souris contrôle. Ce taux augmente significativement de 39,2% et atteint  $0,600 \pm 0,020$  U/min/mg de protéine chez les souris septiques (**Figure 12**). Nos résultats sont similaires à ceux de plusieurs travaux réalisés dans différents modèles animaux de sepsis (**Ritter et al., 2013 ; Savcun et al., 2013**).

Le traitement par la curcumine diminue le taux de MDA aux taux contrôle, il est de  $0,421 \pm 0,020$  nmoles/mg de prot (**Figure 12**).

Le sepsis est caractérisé par un stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre les oxydants en faveur d'une surproduction de ROS. La première cible des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (**Hulbertl, 2005 ; Pamplona et al., 2000**).

L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui induisent une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (**Hong et al., 2004**). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (**Marnett, 1999**). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA).

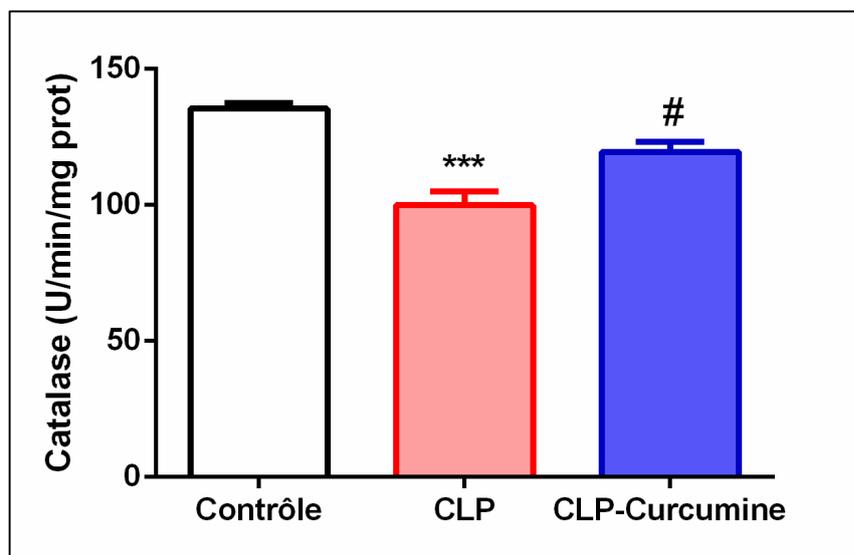
La peroxydation des phospholipides membranaire permet la libération de MDA dans l'espace extracellulaire et finalement dans le sang; il a donc été utilisé comme

biomarqueur efficace de l'oxydation des lipides (Draper et Hadley, 1990 ; Dalle-Donne et al., 2006). Il a été démontré que le taux de MDA sérique pourrait être utilisé comme un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteints de sepsis et un prédicteur de mortalité des patients (Lorente et al., 2013 ; Toufekoula et al., 2013 ; Weiss et Deutschman., 2014 ; Lorente, 2015).

La curcumine neutralise les ROS et prévient la peroxydation lipidique (Farzaei et al., 2018). La curcumine pourrait également supprimer le stress oxydatif induit par le CLP via une régulation à la hausse de l'activité des enzymes anti-oxydantes dont la SOD (Sompamit et al., 2009) et la catalase (Su et al., 2004).

#### III.1.4. Effet du sepsis et de la curcumine sur l'activité catalase hépatique

Les résultats du dosage de l'activité catalase hépatique sont représentés dans la figure 13.



**Figure 13.** Activité catalase hépatique chez les souris NMRI albinos. \*\*\* $P < 0.001$  vs lot contrôle; # $P < 0.05$  vs lot CLP.

L'activité catalase basale hépatique était de  $135,06 \pm 2,2$  U/min/mg de prot chez les souris contrôle. Elle diminue de 26,22% et atteint  $99,9 \pm 5,1$  U/min/mg protéines chez les souris septiques (Figure 13).

La curcumine restaure l'activité catalase aux taux contrôle et qui est de  $119,5 \pm 3,7$  U/min/mg de prot (Figure 13).

La catalase est une enzyme anti-oxydante qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène, un dangereux ROS ayant la capacité de traverser les membranes et d'oxyder différentes molécules, protéines, lipides, glucides et ADN.

La diminution de l'activité catalase pourrait indiquer un état de stress oxydatif instauré lors du sepsis. Ces résultats sont en accord avec différents travaux effectués sur différents modèles animaux de sepsis (Singh et Sharma., 2011 ; Zhong et al., 2016).

De même, il a été démontré que le taux de catalase sérique diminue chez les patients septiques indiquant une baisse de la barrière anti-oxydante en faveur d'un stress oxydatif (Kumar et al., 2018).

Le dosage des activités des enzymes antioxydantes SOD et catalase pourrait être considérée comme un marqueur de mauvais pronostic chez les patients septiques (Molina et al., 2017 ; Kumar et al., 2018).

### III.1.5. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de protéines hépatiques

Les résultats du dosage des taux protéiques hépatiques sont représentés dans la figure 14.

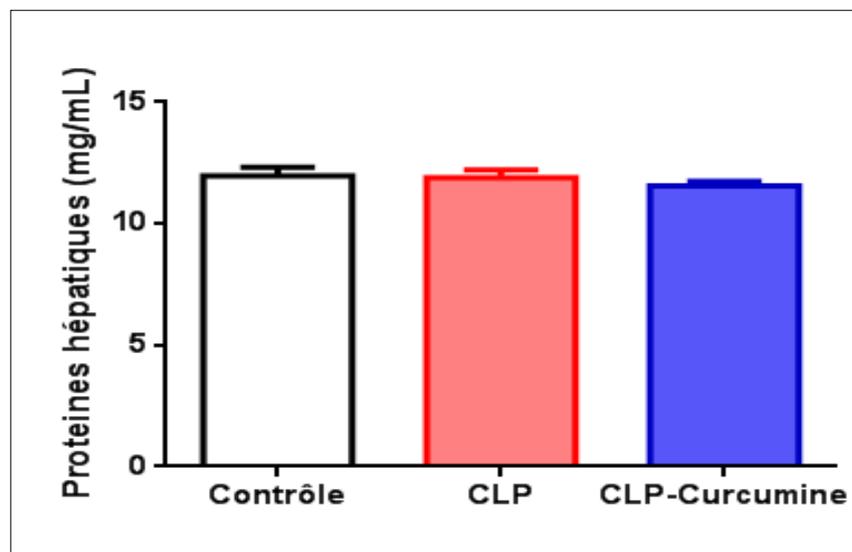
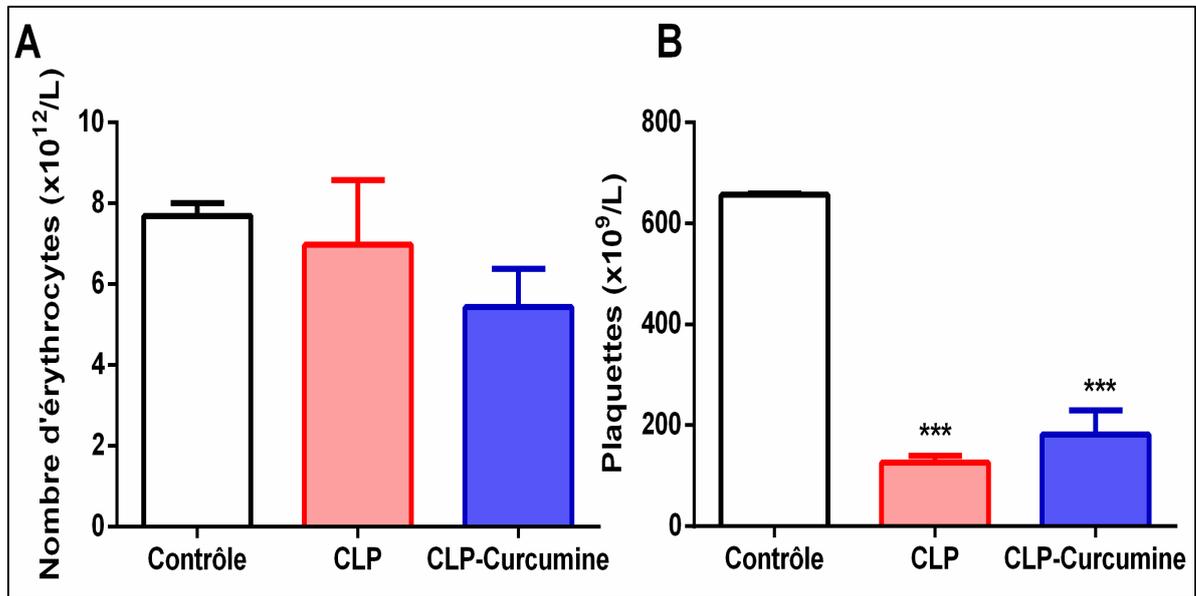


Figure 14. Taux de protéines hépatiques chez les souris NMRI albinos.

Les résultats de notre étude montrent une légère diminution non significative de taux de protéine hépatique chez les souris septiques et septiques traités à la curcumine (Figure 14).

### III.1.6. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux d'érythrocytes et plaquettes sanguins

Les résultats du dosage des taux d'érythrocytes et de plaquettes sanguins, marqueurs de thrombose, sont représentés dans la figure 15.



**Figure 15.** Taux d'érythrocytes et de plaquettes sanguins chez les souris NMRI albinos. **A** : taux d'érythrocytes sanguins, **B** : taux de plaquettes sanguins. \*\*\* $P < 0.001$  vs lot contrôle.

Les taux basaux respectifs d'érythrocytes et de plaquettes étaient de  $7,68 \pm 0,27 \times 10^{12}/L$  et de  $656,5 \pm 2,59 \times 10^9/L$ , chez les souris contrôle (**Figure 15**).

Le taux d'érythrocytes reste inchangé alors que le taux de plaquettes diminue de 80,7% chez les souris septiques (Erythrocytes :  $6,97 \pm 1,38 \times 10^{12}/L$  ; plaquettes :  $126,5 \pm 12,99 \times 10^9/L$ ) (**Figure 15**).

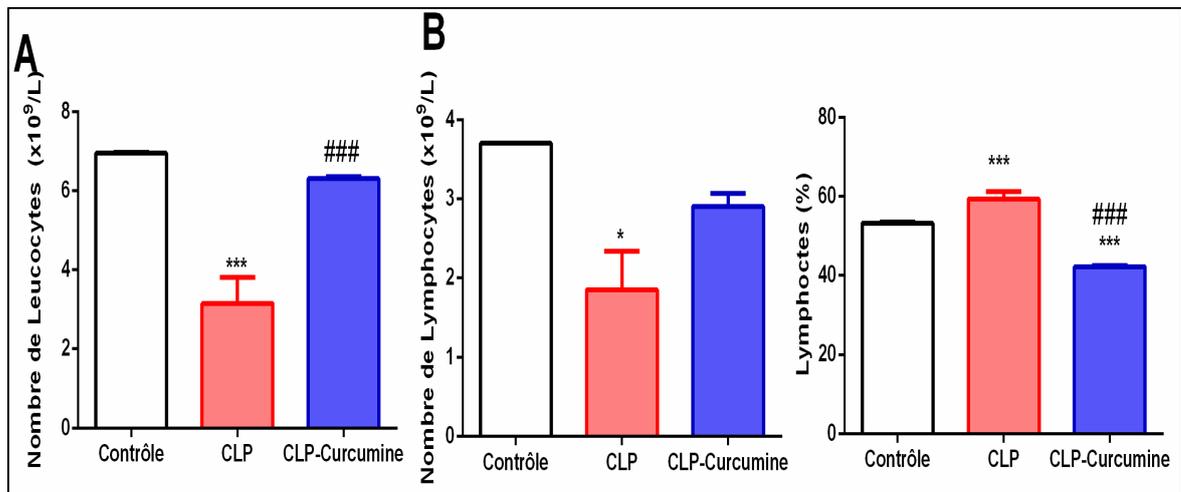
Le traitement par la curcumine ne restaure pas le taux d'érythrocytes et de plaquettes et qui demeurent comparables à ceux des souris septiques (Erythrocytes :  $5,42 \pm 0,82 \times 10^{12}/L$  ; plaquettes :  $182 \pm 47,34 \times 10^9/L$ ) (**Figure 15**).

La coagulation sanguine constitue un des symptômes du syndrome septique caractérisé par une diminution du taux des plaquettes sanguins. Cette thrombopénie pourrait indiquer la présence thromboses veineuses ou artérielles de différents organes résultant de l'activation plaquettaire (Vardon et al., 2015 ; Stark et al., 2021).

Nous n'avons pas noté dans cette étude de diminution du taux d'érythrocytes chez les souris septiques alors que dans d'autres travaux basés sur d'autres modèles de sepsis une érythropénie a été observée (Oguz et al., 1998 ; Markwart et al., 2014). Ceci pourrait être expliqué par la différence des modèles étudiés et du temps de sacrifice.

### III.1.7. Effet de sepsis et de la curcumine sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins

Les résultats du dosage des taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins, marqueurs d'inflammation, sont représentés dans la figure 16.



**Figure 16.** Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang. **A** : taux de leucocytes sanguins. **B**, taux et pourcentage de lymphocytes sanguins. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs lot contrôle; ### $P < 0.001$  vs lot CLP.

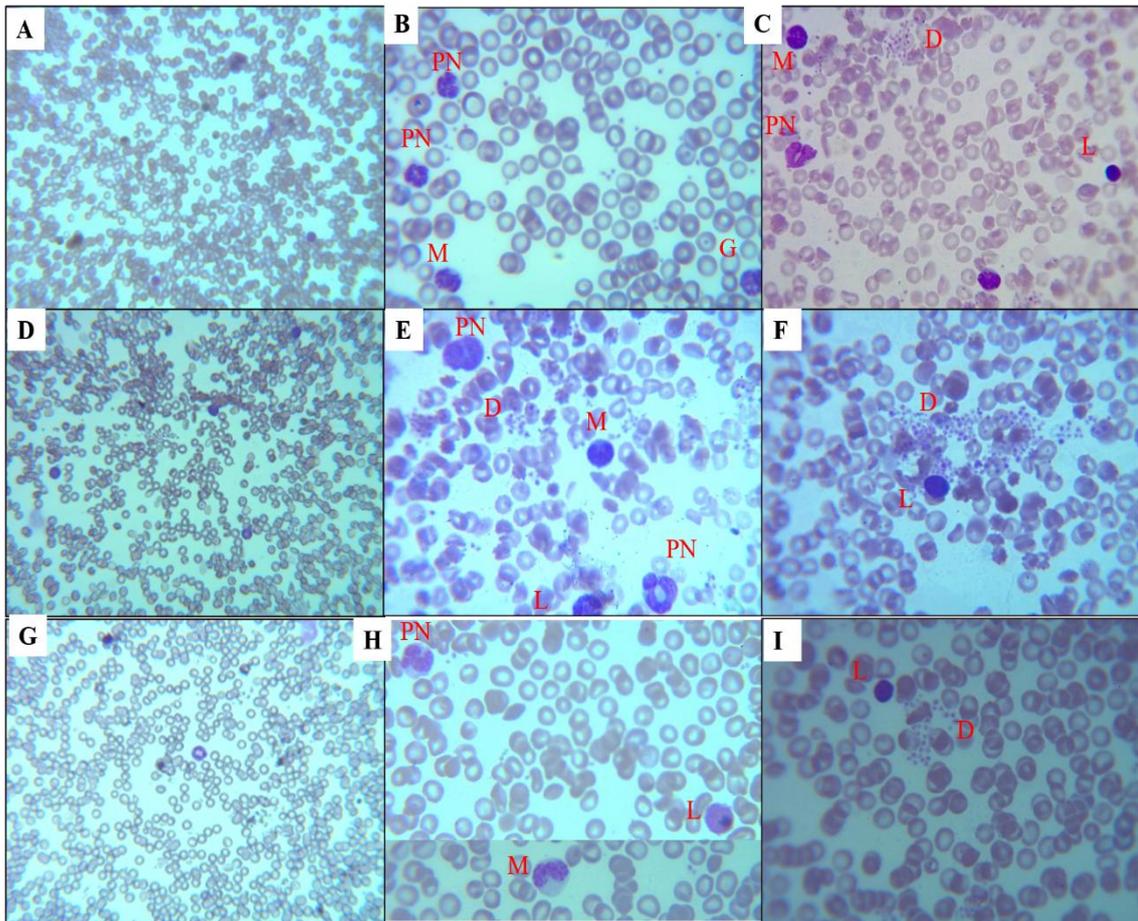
Les taux respectifs de leucocytes et de lymphocytes des souris contrôle étaient de  $6,9 \pm 0,03 \times 10^9/L$  et de  $3,7 \pm 0,0001 \times 10^9/L$  (Figure 16). Les souris septiques présentent une leucopénie et une lymphopénie traduites par une diminution de 54,7% et 50% des taux de leucocytes et de lymphocytes respectivement. Les taux respectifs de leucocytes et de lymphocytes étaient de  $3,15 \pm 0,7 \times 10^9/L$  et  $(1,85 \pm 0,5 \times 10^9/L)$  chez les souris septiques. Néanmoins, le pourcentage des lymphocytes augmente significativement chez les souris septiques comparées aux souris contrôlées (Figure 16).

Le traitement par la curcumine a restauré le taux de leucocytes alors que le pourcentage des lymphocytes a diminué pendant que le taux de lymphocytes reste inchangé comparé aux souris septiques (Figure 16).

Ces résultats ne corroborent pas avec ceux du frottis sanguin qui montrent une augmentation du taux de leucocytes chez les souris septiques comparées aux souris

contrôle (**Figure 17C-F**). Les frottis sanguins des souris septiques montrent une activation des leucocytes qui se manifeste par une augmentation de la taille des cellules telle que les neutrophiles et les monocytes (**Figure 17C et E**) et une dégranulation des granulocytes, une déformabilité des érythrocytes et l'apparition des amas plaquettaires (**Figure 17C et F**). La curcumine réduit le nombre de leucocytes aux taux similaires aux contrôles, la déformabilité des érythrocytes et les amas plaquettaires (**Figure 17G-I**). On observe une activation réduite des leucocytes et un taux de granules réduit comparé aux frottis des souris septiques (**Figure 17H et I**).

Cette discordance entre les résultats de FNS et de frottis sanguins pourrait être expliquée par des résultats erronés de l'FNS. Ainsi, des erreurs faites par l'automate d'hématologie, une mauvaise conservation de l'échantillon durant le transport ou une coagulation partielle non détectée pourraient entraîner des résultats erronés.



**Figure 17.** Résultats de frottis sanguin, coloration MGG. A (Gx400), B (Gx1000): frottis de souris contrôle. D (Gx400), C, E et F (Gx1000): frottis des Souris septiques. G (Gx400) et H et I (Gx1000): frottis de souris septiques traitées par la curcumine. D :

Dégranulation, G : Granulocyte, L: Lymphocyte, M: Monocyte, PN: Polynucléaire neutrophile.

### **III.1.8. Etude histologique**

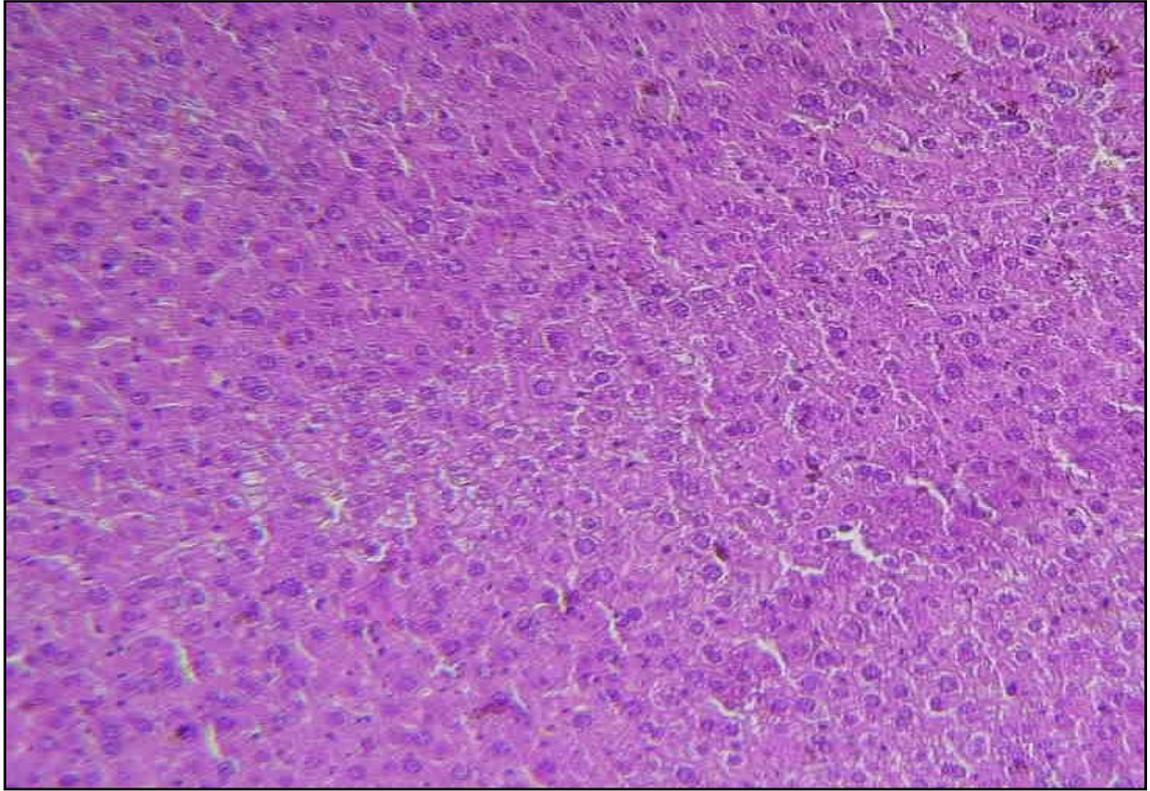
Durant notre étude nous avons réalisé une étude histologique par une coloration à l'hématoxyline-éosine des trois organes : le foie, la rate et le mésentère.

#### **III.1.8.1. Effet du sepsis et de la curcumine sur l'histologie de foie**

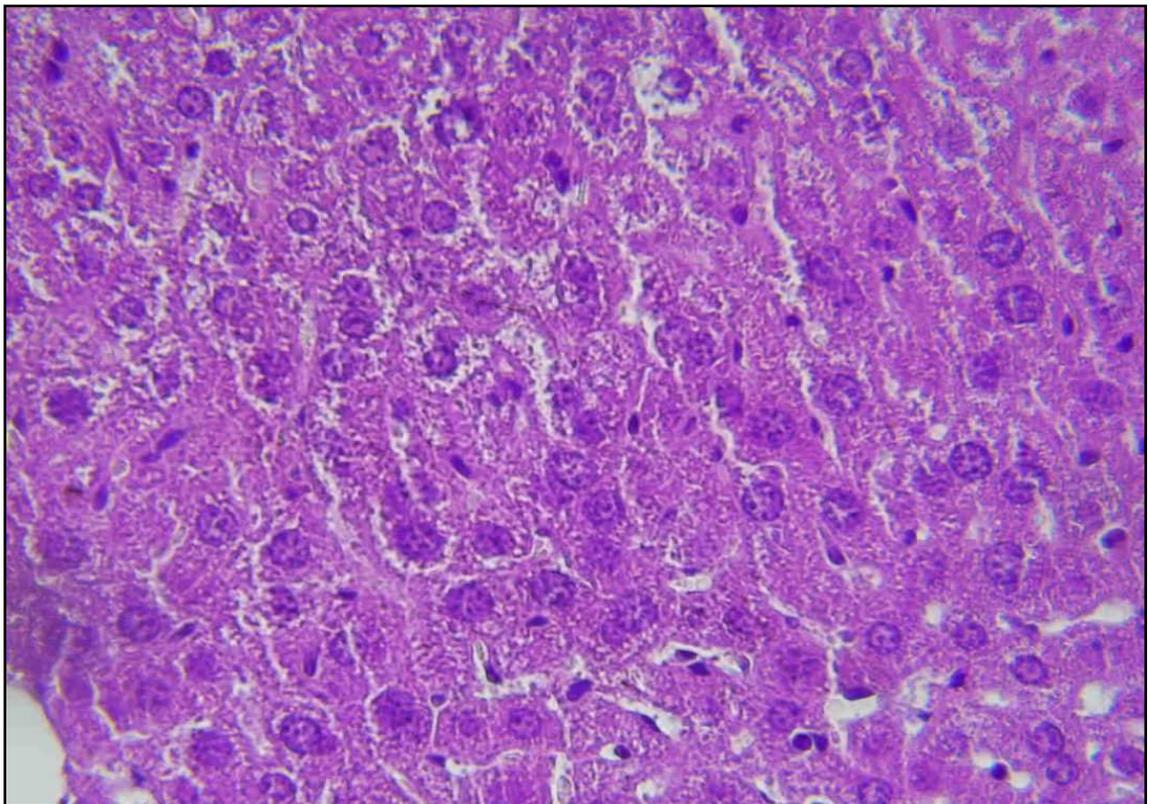
L'architecture du tissu hépatique des souris contrôle est homogène sans lésion tissulaire ou modification structurelle. Les hépatocytes sont arrangés en travée aplaties, les sinusoides sont en dispositions radiaire (**Figures 18 et 19**).

Le foie des souris septiques présentent une Cholestase qui se manifeste par amas de bile dans les canalicules intra-hépatocytaires, une dilatation des sinusoides hépatiques, une activation des cellules de Kupffer et une hypertrophie des noyaux des hépatocytes étaient hypertrophiés (**Figure 21**). On note également une infiltration leucocytaire (**Figure 22**) et une stéatose hépatique non alcoolique aiguë qui se caractérise par une accumulation de lipides dans les hépatocytes donnant à ces derniers une image caractéristique, évoquant des bulles translucides (**Figure 20**).

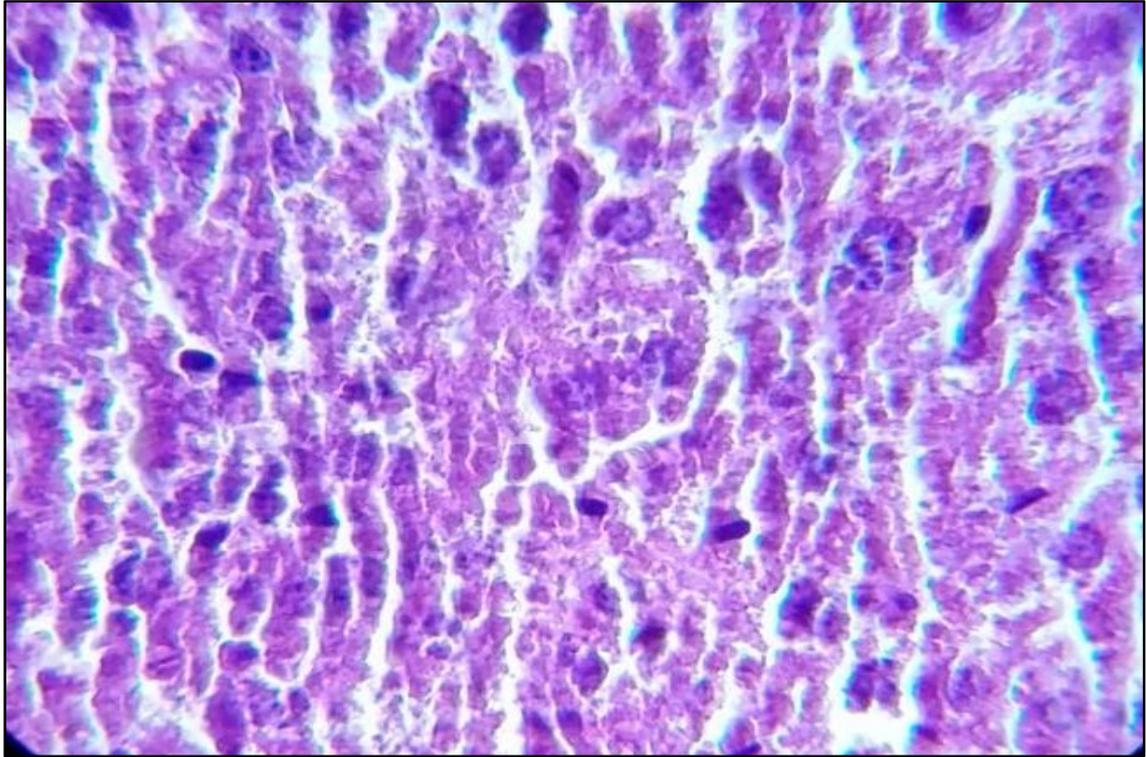
Le traitement par la curcumine réduit les dommages induits par sepsis par la prévention de la formation des amas de bile, l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, l'infiltration leucocytaire ainsi que par la diminution de l'hypertrophie des cellules de Kupffer et l'élargissement des sinusoides (**Figure 23 et 24**).



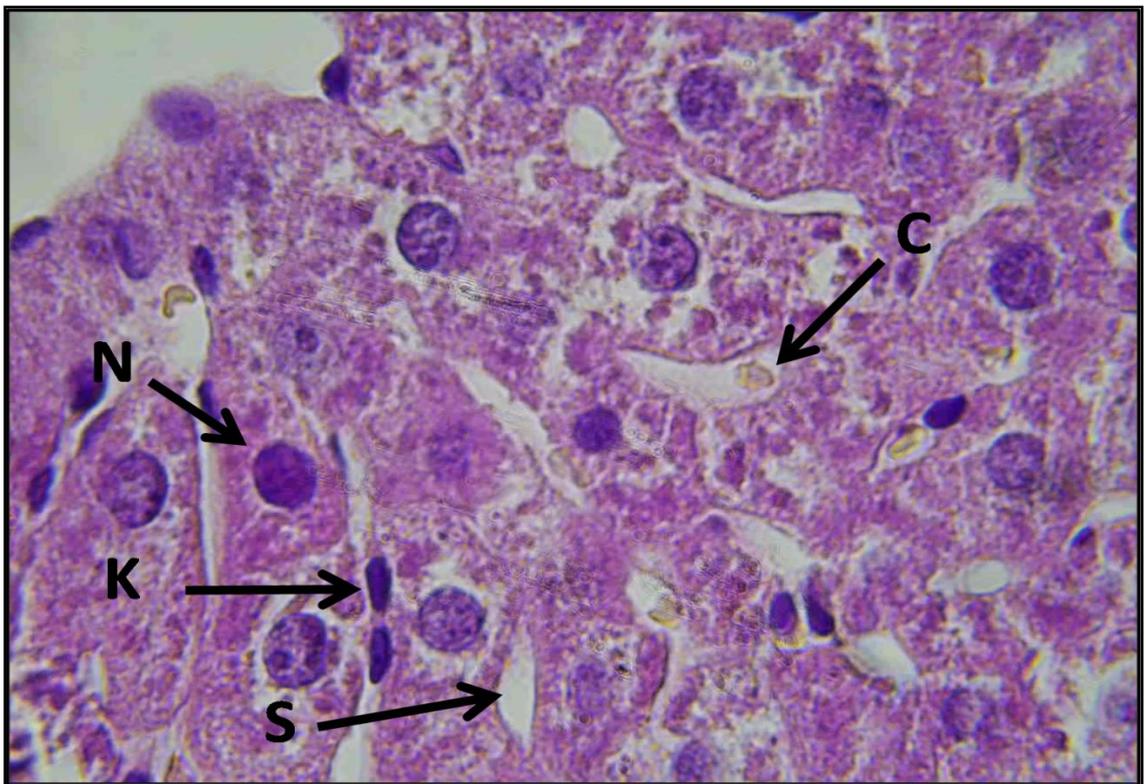
**Figure 18.** Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris contrôle. Coloration HE (Gx100).



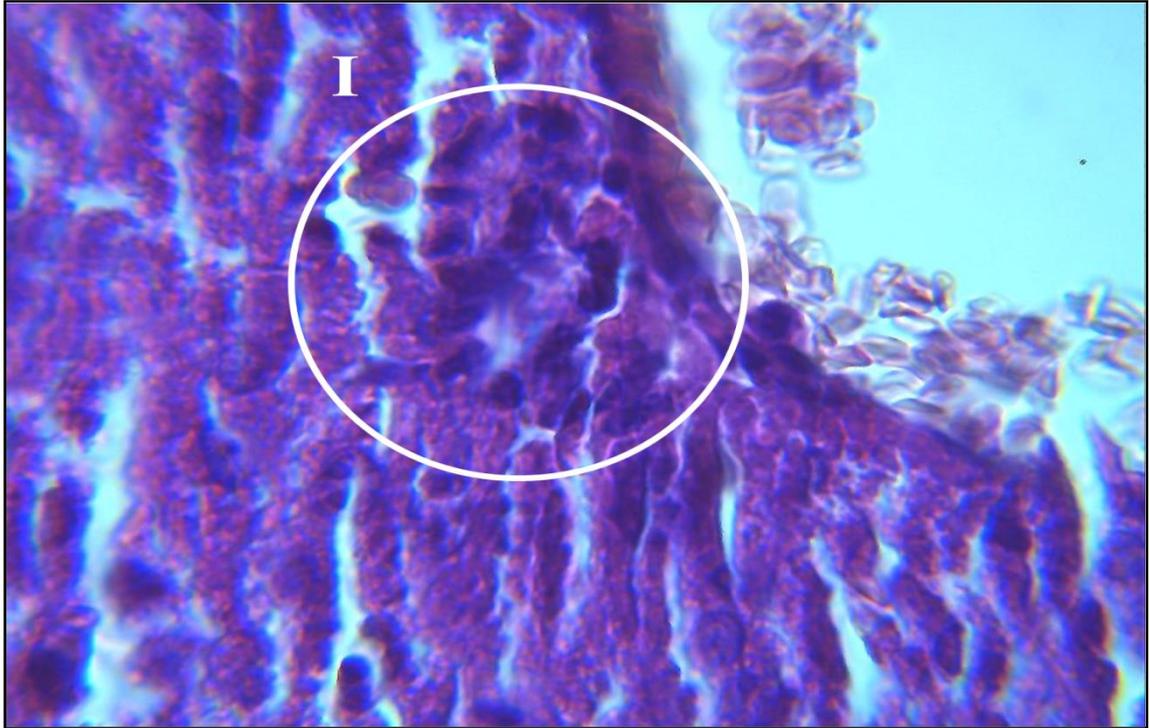
**Figure 19.** Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris contrôle. Coloration HE (Gx400).



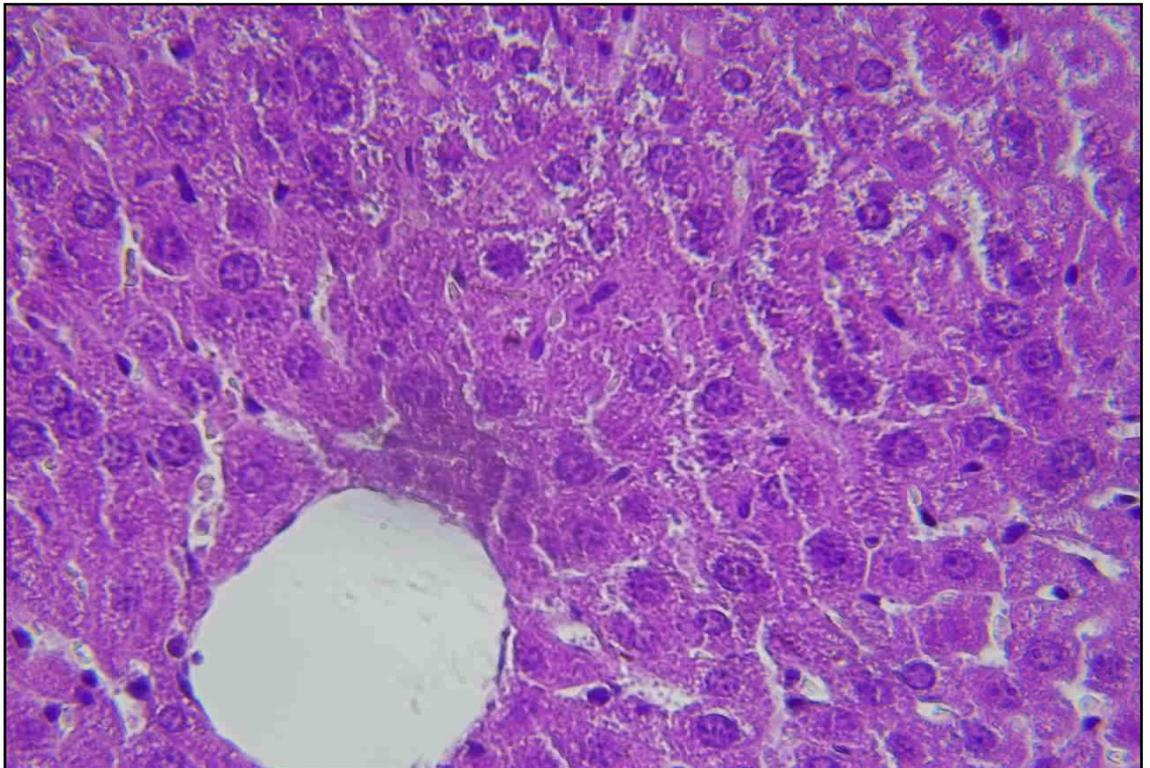
**Figure 20.** Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique. Coloration HE (Gx400). St é a t o s e h é p a t i q u e n o n a l c o o l i q u e a i g u é



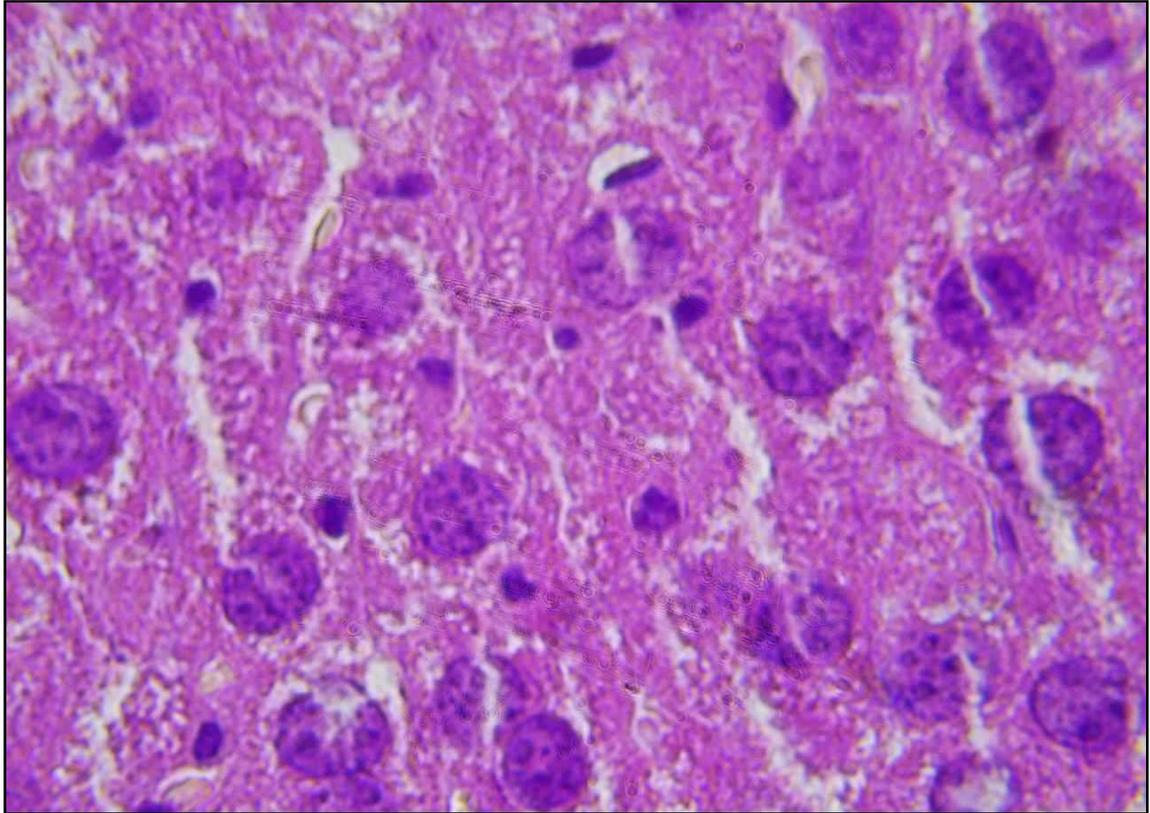
**Figure 21.** Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique. Coloration HE (Gx1000). C : cholestase, K : cellules de Kupfer, N : noyau volumineux, S : sinusos h é p a t i q u e s .



**Figure 22.** Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique. Coloration HE (Gx1000).I : infiltration leucocytaire.



**Figure 23.**Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique traités par la curcumine. Coloration HE (Gx400).Pas d'infiltration leucocytaire.



**Figure 24.** Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris septique traitées par la curcumine. Coloration HE (Gx1000).

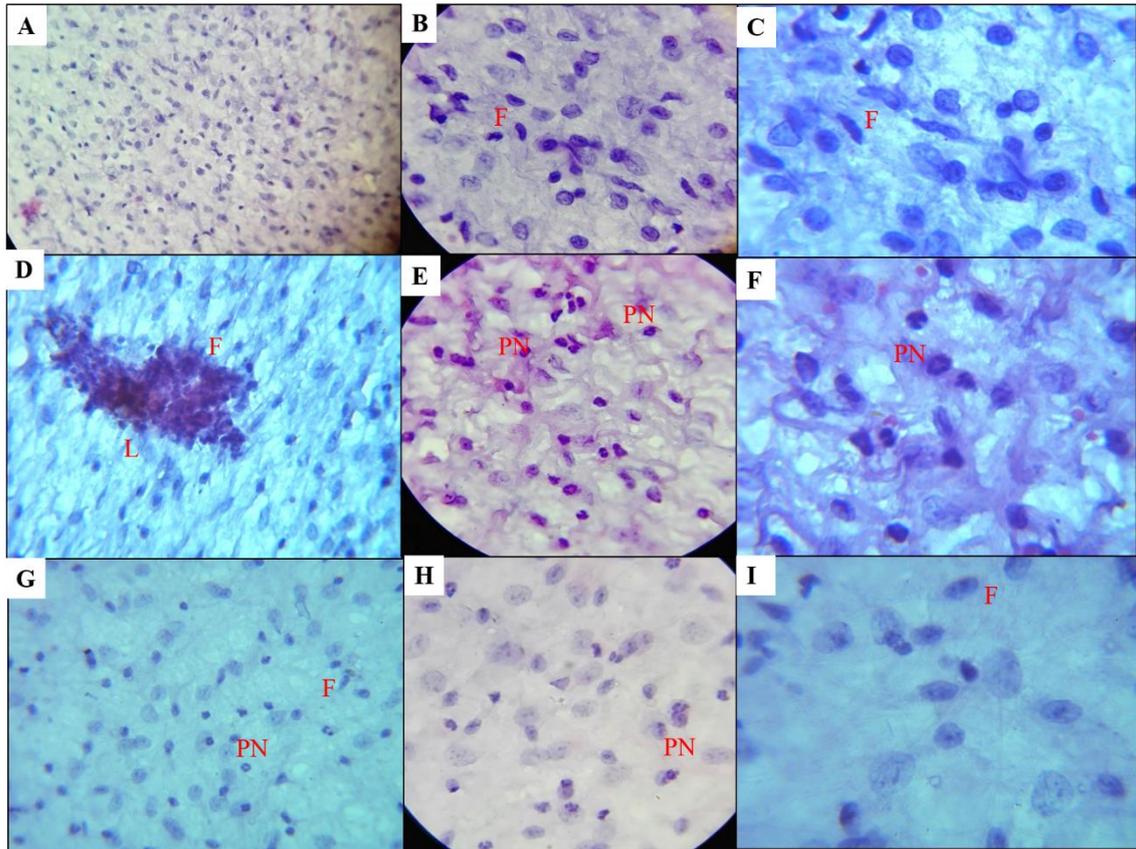
### III.1.8.2. Effet du sepsis et de la curcumine sur l'histologie du mésentère

Le mésentère est une membrane fine richement vascularisée contenant des ganglions mésentériques, ce qui nous permet une meilleure observation de l'infiltration leucocytaire péritonéale au cours de l'inflammation aiguë induite par CLP.

Le mésentère des souris NMRI albinos (**Figure 25A-C**) montre une architecture normale faite essentiellement de fibroblastes. Le mésentère des souris septiques montre des signes d'une inflammation aiguë caractérisée par une activation des fibroblastes (**Figure 25D**) et une importante infiltration leucocytaire, principalement des polynucléaires neutrophiles (**Figure 25E et F**).

Les neutrophiles préactivés par les signaux pro inflammatoires (cytokines, chémokines et facteurs chimioattractants) émis par la paroi abdominale après inflammation du péritoine (péritonite) par CLP, adhèrent à l'endothélium vasculaire, puis atteignent le site inflammatoire par extravasation et diapédèse. Au site inflammatoire, les neutrophiles vont phagocyter et détruire les particules bactériennes par bactéricidie et exocytose d'enzymes lytiques.

Le traitement des souris septiques par la curcumine réduit l'infiltration leucocytaire et l'activation des fibroblastes chez les deux souches NMRI albinos (**Figure 25G-I**).



**Figure 25.** Micrographie du mésentère des souris NMRI albinos. Coloration à l'hématoxyline et de l'éosine HE. A (Gx400), B et C(Gx1000): Mésentère de souris contrôle. D (Gx400), E et F(Gx1000): Mésentère de souris septiques. G (Gx400), H et I(Gx1000): Mésentère de souris septiques traitées par la curcumine. F:Fibroblaste, L : Leucocytes, PN: Polynucléaire neutrophile.

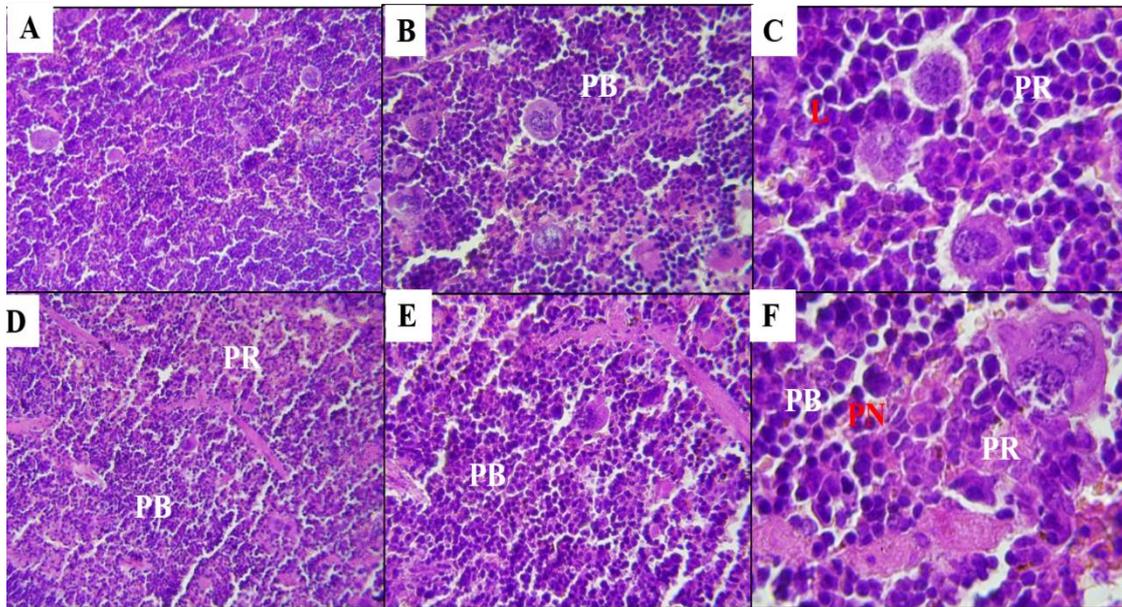
### III.1.8.3. Effet du sepsis sur l'histologie de la rate

Pour des raisons techniques, nous allons vous présenter dans ce qui suit des résultats incomplets de l'histologie de la rate.

Les coupes histologiques de la rate des souris contrôle montrent architecture normale avec pulpe blanche faite de follicules lymphoïdes centrés d'une artériole et entourés par la pulpe rouge faite de sinus (**Figure 26A-C**).

Les coupes histologiques de la rate des souris septiques montrent une architecture riche en cellules comparée au contrôle. La pulpe blanche est faite de follicules

lymphoïdes plus larges tandis que la pulpe rouge présente une infiltration massive de polynucléaires et de macrophages (**Figure 26D-F**).



**Figure 26.** Micrographie de coupes transversales de la rate des souris NMRI albinos. Coloration à l'hématoxyline et de l'éosine HE. A (Gx100), B (Gx400), et C (Gx1000): rate de souris contrôle. D (Gx100), E (Gx400), et F(Gx1000): rate de souris septiques. L : Leucocytes, PN: Polynucléaire neutrophile, PB : Pulpe blanche faite de follicules lymphoïdes plus larges, PR : une pulpe rouge plus cellulaire.

### III.2. Discussion

Dans la présente étude nous avons démontré l'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par le sepsis. Ce stress oxydatif est caractérisé par une augmentation de marqueurs pro-oxydants (MDA) et une diminution d'anti-oxydant (catalase).

Le foie est la plus grosse glande du corps humain et joue un rôle central dans l'homéostasie métabolique et immunologique. Cet organe est responsable de plus de 200 fonctions, telles que la détoxification, le stockage, la production d'énergie, la conversion des nutriments, l'équilibre hormonal et la coagulation. Ces fonctions physiologiques importantes font du foie un organe critique pour la survie de l'hôte après une altération grave telle que le sepsis. Des études ont montré que le dysfonctionnement et l'insuffisance hépatiques constituent des complications graves du sepsis qui contribuent directement à la progression de la maladie et à la mort (Yan *et al.*, 2014).

Le dysfonctionnement hépatique survient souvent au début du sepsis par exemple chez les animaux il survient généralement après 1h30 post-CLP et après moins de 24h de l'apparition de la maladie chez les patients (**Recknagel et al., 2012**).

Au cours du sepsis, non seulement l'infection elle-même, mais aussi la réponse inflammatoire excessive, et le dysfonctionnement microcirculatoire sont responsables de l'atteinte hépatique (**Woźnica et al., 2018**).

Le foie est un organe parenchymateux composé de 3 types de cellules : les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques. L'interaction de ces cellules et des cellules immunitaires avec les bactéries ou leurs constituants initie une réponse inflammatoire hépatique et systémique à l'origine des dommages cellulaires hépatiques (**Woźnica et al., 2018**).

Les PAMPs ou les MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) ou même les DAMPs (*Damage or danger-associated molecular patterns*) activent les récepteurs PRRs (TLRs) induisant ainsi plusieurs voies de signalisation, impliquées dans la réponse inflammatoire (**Vijay, 2018 ; Kumar et al., 2020**).

Le NF- $\kappa$ B constitue un facteur de transcription clé de la réponse inflammatoire, induite au cours du sepsis. Il régule l'expression de plus de 200 gènes tels que des cytokines pro- inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), des chimiokines (IL-8), des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), des enzymes pro-oxydantes (iNOS, Cox-2), des enzymes antioxydantes (SOD, GPx), des molécules anti-apoptotiques (Bcl2) et des facteurs de coagulation (facteur tissulaire) (**Leentjens et al., 2013**).

Certains de ces produits participent à l'amplification de la réponse inflammatoire. En effet, les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , et TNF $\alpha$ ), exercent un feedback positive sur la voie NF- $\kappa$ B intensifiant ainsi la réponse inflammatoire et conduisant à l'état hyperinflammatoire caractéristique du sepsis (**Liu et Malik., 2006**).

Le système immunitaire tente de rétablir cette réponse hyper-inflammatoire dédérée et d'éliminer l'agent pathogène, par activation du système immunitaire inné, accumulation de neutrophiles et de macrophages, sécrétion de cytokines, recrutement des lymphocytes T et B, et formation d'anticorps (**Idell, 2012 ; Chen et al., 2014 ; Wang et al., 2019**).

Néanmoins, cette réponse cause encore plus de dommages collatéraux hépatiques entraînant ainsi une anergie des mécanismes de défense de l'hôte, des lésions hépatiques

et une défaillance hépatique et enfin une mortalité (Yan *et al.*, 2014 ; Woźnica *et al.*, 2018).

Parallèlement à la réponse inflammatoire, un stress oxydatif s'installe. Le stress oxydatif influence les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'inflammation et causent directement des lésions tissulaires (Kvietys et Granger., 2012; Bedreag *et al.*, 2015).

En effet, l'activation des cellules immunitaires et des cellules Kupffer lors du sepsis conduit à la libération des cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 et IL-18, des ROS, du monoxyde d'azote (NO), et une infiltration du foie par les neutrophiles. Les Neutrophiles activés produisent encore plus de ROS/RNS et de cytokines, dans le but d'éliminer le pathogène (Doi *et al.*, 1993 ;Woźnica *et al.*, 2018).

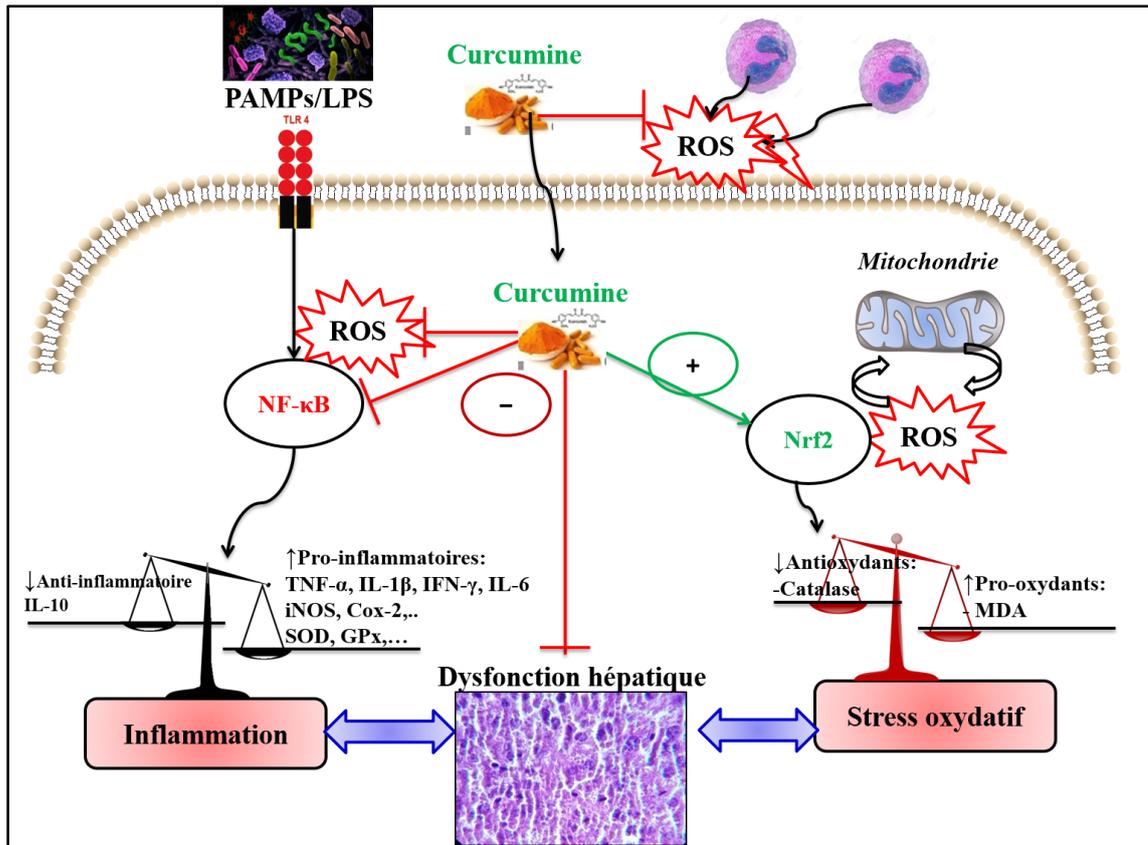
Les ROS/RNS et les cytokines libérées amplifient la réponse inflammatoire, et endommagent les constituants cellulaires (ADN, lipides, protéines) conduisant à des lésions cellulaires et à des dommages hépatiques ((Zhong *et al.*, 2016 ;Woźnica *et al.*, 2018).

En outre, les ROS/RNS activent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et amplifient ainsi la réponse inflammatoire et le stress oxydatif (Rubattu *et al.*, 2019).

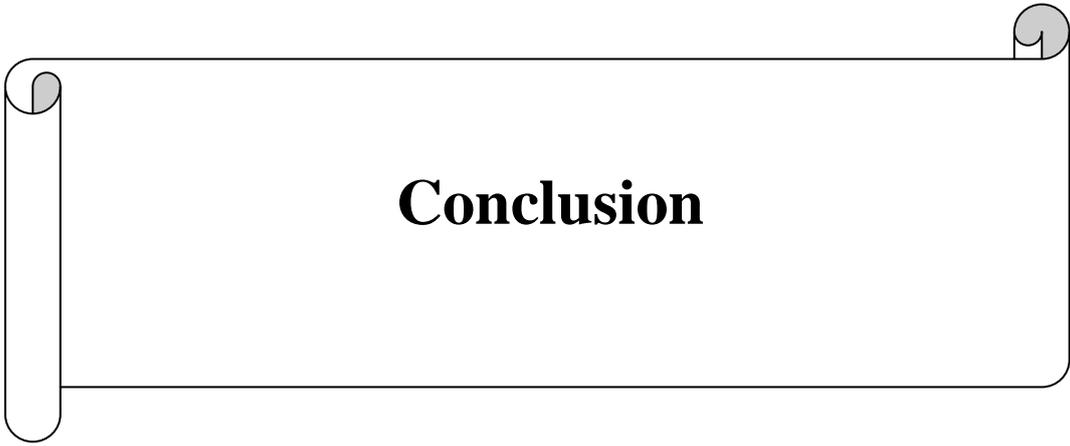
Nos résultats suggèrent également le rôle de la curcumine dans l'inhibition de la réponse inflammatoire, du stress oxydatif et des altérations hépatiques.

En effet, la curcumine est une molécule pléiotrope avec un effet anti-inflammatoire, anti- oxydant et anti-apoptotique. La curcumine neutralise les ROS et régule la réponse anti- oxydante Nrf2-dépendante (Hombourger, 2010; Karimi *et al.*, 2019). En outre, la curcumine réprime la réponse inflammatoire dépendante du NF- $\kappa$ B, rétablit l'homéostasie mitochondriale, et réduit les dommages hépatiques sepsis-dépendants (Figure 23) (Linnik *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019).

Toutefois, malgré les preuves prometteuses des effets thérapeutiques de la curcumine sur le syndrome septique, d'autres études semblent nécessaires pour étudier son effet et ses mécanismes d'action possibles chez des patients septiques.



**Figure 27.** Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants de la curcumine dans l'altération hépatique induit par sepsis.



**Conclusion**

L'ensemble des résultats de notre travail suggère :

L'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par sepsis caractérisé par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MDA), une diminution de marqueur antioxydant enzymatique (catalase).

Ce stress oxydatif est associé à réponse inflammatoire excessive caractérisée par une infiltration leucocytaire hépatique, des dommages oxydatifs hépatiques, une cholestase, stéatose hépatique non alcoolique aiguë, dilatation des sinusoides hépatique.

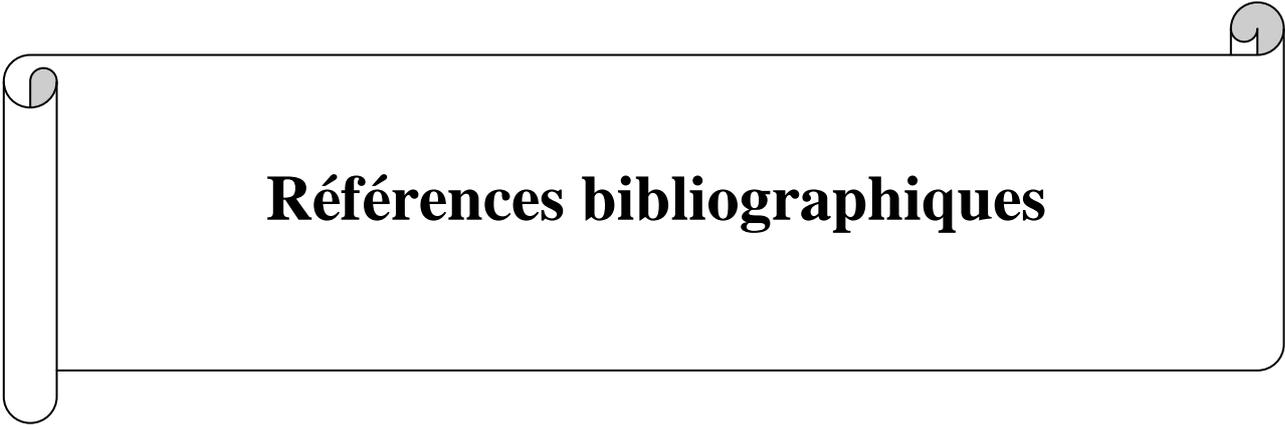
En outre l'activation de la réponse immuno-inflammatoire est caractérisée par une forte infiltration leucocytaire dans le mésentère et la rate des souris septiques.

La curcumine prévient le stress oxydatif et rétabli la balance redox, inhibe la réponse inflammatoire et exerce un effet immuno-régulateur chez les souris septiques.

L'ensemble de nos résultats ouvrent des perspectives très prometteuses quant à l'utilisation thérapeutique de la curcumine comme traitement du sepsis. En outre, nous affirmons le rôle clé du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Etudier l'effet de la curcumine sur la mortalité induite par sepsis en utilisant un modèle de CLP létale.
- Elucider les mécanismes par lesquels la curcumine exerce son effet immuno-régulateur.
- Rechercher des paramètres de diagnostic précoce du sepsis.
- Etudier l'implication du stress oxydatif et l'effet de la curcumine chez des patients septiques.
- Rechercher d'éventuelles corrélations entre les paramètres du stress oxydatif, le dysfonctionnement d'organes et le pronostic des patients septiques Algériens.



## **Références bibliographiques**

### A

- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*;105:121-126.
- Arnalich F, Garc á-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C. (2000). Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect. Immun*; 68:1942-1945.

### B

- Bavarsad, K., Riahi, M. M., Saadat, S., Barreto, G., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2018). Protective effects of curcumin against ischemia-reperfusion injury in the liver. *Pharmacological Research*; 1016; 12-14.
- Bela ĩh R, & Boujraf S. (2016). Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des Maladies Métaboliques* ; 10(1) : 38-42.
- Berthélémy S. (2014). L'hémogramme ou numération-formule sanguine. *Actualités Pharmaceutiques* ; (53) 538 : 53-55.
- Bouglé A. (2018). Caractérisation du comportement des cellules souches musculaires humaines au cours du choc septique et mécanismes de protection grâce aux cellules souches mésenchymateuses. Université Sorbonne Paris.
- Bounedjah O. (2014). Mécanismes d'assemblage des granules de stress dans des conditions de stress oxydatif et osmotique. Université d'Evry Val d'Essonne.
- Bouroche GA.(2012). Pneumonies acquises sous ventilation mécanique dans les suites d'un sepsis sévère : particularité des infections intra-abdominales .Université Paris Descarte.
- Brady J, Horie S et John G.(2020).Role of the adaptive immune response in sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental*, 8:20.

### C

- Calderari B et Liaudet L. (2010).Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysfonction d'organes au cours du sepsis. *Revue Médicale Suisse*, 6 : 2406-24077.
- Cao C, Yu M, Chai Y. (2019). Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death & Disease*; (10): 2-14.
- Carange J. (2010). Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, Une nouvelle stratégie de neuroprotection. L'université du Québec à Trois-Rivières.

- Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. (2018). Sepsis and septic shock. *Lancet* 2018. 392, 75–76.
- Chandler E, Harberts M et Ernst K. (2019). Pathogen Sensing: Toll-Like Receptors and NODs (Innate Immunity). University of Maryland School of Dentistry. Baltimore, MD, United States; 5-13.
- Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, Bugger H. (2015). Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci* ; 16:1776317778.
- Cloutier L, René A, Jutras A. (2014). La formule sanguine complète. *Pratique clinique* ; 1-11.

### D

- Doi F, Goya T, Torisu M. (1993). Potential role of hepatic macrophages in neutrophil-mediated liver injury in rats with sepsis. *Hepatology* ; 17: 1086–1094.
- Dubroux M. (2016). Mise en place du sepsis bag dans la prise en charge du sepsis sévère et du choc septique dans les services d'accueil des urgences de Lorraine. Université de Lorraine.

### F

- Farzaei, M.H.; Zobeiri, M.; Parvizi, F.; El-Senduny, F.F.; Marmouzi, I.; Coy-Barrera, E.; Naseri, R.; Nabavi, S.M.; Rahimi, R.; Abdollahi, M. (2018). Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. *Nutrients*; 10, 855.
- Font MD, Braghadheeswar MD, Ashish K et Khanna MD. (2020). Sepsis and Septic Shock – Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. Elsevier Inc. 0025-7125, 2.
- Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. (2009). Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin* ; 25(1) : 83–101.

### G

- Grimaldi DA. (2014). Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression postinfectieuse. *Médecine humaine et pathologie*. Université René Descartes – Paris.

### H

- Hidalgo ME, Fernández E, Cabello A, et al. (2006). Evaluation of the antioxidant response of *Chiton granosus* Fremy, 1928 (Mollusca: Polyplacophora) to oxidative pollutants. *Rev Biol Sea Oceanogr* ; 41:155-165.

- Hierso R.(2015).Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la drépanocytose : crises vaso-occlusives ,taux d'anticorps anti-bande 3 et oxydation du globule rouge. Université des antilles et de guyane.
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB et Rhee SJ. (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340, 107-115.
- Hotchkiss R, Moldawer L, Opal S, Reinhart K, Turnbull I et Vincent J. (2016).Sepsis and septic shock.*Nat Rev Dis Primers*, 45:13.
- Hrycay EG, Bandiera SM. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol* ; 74: 35-84.
- Huang K, Li M, Li H, Li M, Jiang Y, and Fang X. (2016).Accurate quantification of creatinine in serum by coupling a measurement standard to extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Sci Rep* ; 6: 19283 .
- Huet O, Obata R, Aubron C, et al. (2007). Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock .*Crit Care Med* ; 35(3):821-6.
- Hulbert AJ. (2005). on the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234, 277-288.

### J

- Jadeja RN, Devkar RV, Nammi S. (2017).Oxidative Stress in Liver Diseases: Pathogenesis, Prevention, and Therapeutics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ; 2017 :8341286-2 .
- Jeeva JS, Sunitha J, Ananthalakshmi R, Rajkumari S, Ramesh M, Krishnan R.(2015). Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases *J, Pharm Bioallied Sci* ; 7(2): S331 – S333.

### K

- Karimi A, Ghodsi R, Kooshki F, Karimi M, Asghariazar V et Tarighat-Esfanjani A. (2019). Therapeutic effects of curcumin on sepsis and mechanisms of action: A systematic review of preclinical studies. *Phytotherapy Research*. 2019;1–23.
- Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Sivastava CK, Metha S, Jyoti A. (2018). Evaluation of oxidative stress and antioxidant status: Correlation with the severity of sepsis. *Scandinavian journal of immunology* 87(4), e12653.

### L

- Lemarié J, Gibot S. (2020). Choc septique (Chapitre 167 du traité complet). Elsevier Masson SAS. 196-197.
- Lereclus E. (2018). Origine et rôles des cellules myéloïdes suppressives dans le sepsis. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges.
- Wang L, Li N, Lin D et Zang Y. (2017). Curcumin protects against hepatic ischemia /reperfusion induced injury through inhibiting TLR4/NF-κB pathway, *Oncotarget*, 8; 65414-65420.

### M

- Markwart R, Weigel C, Bauer M, Griffith T, Frank M, Markwart R, Condotta S, Requardt R, Borken F, Badovinac B et Rubio I. (2014). Immunosuppression after Sepsis: Systemic Inflammation and Sepsis Induce a Loss of Naïve T-Cells but No Enduring Cell-Autonomous Defects in T-Cell Function. *Plos one*, 10.1371; 5-30.
- Marnett LJ. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95.
- Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, et al. (2003). Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*; 31(4):1048-52.
- Moukette B, Pieme CA, Nya Biapa PC, Ngogang JY. (2015). In vitro antioxidant and antilipoperoxidative activities of bark extracts of *Xylopiya aethiopia* against ionmediated toxicity on liver homogenates. *J Complement Integr Med* ; 12(3):195-204.

### N

- Napolitano LM. (2018). Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect* ; 19(2):117-125.
- Noichri Y. (2016). Stress oxydant et Infarctus du Myocarde. L'université paris sud.

### O

- Oguz K, Baskurt, Gelmont D et Herbert J. (1998). Red Blood Cell Deformability in Sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157:421-427.
- Ohkawa H, Ohishi N et Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*; 95:351-358.
- O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. (2013). The history of Toll-like receptors redefining innate immunity. *Immunology* ; 13: 453-460.

- Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Aosasa S. (2018). Mechanisms of sepsis - induced immunosuppression and immunological modification therapies for sepsis. *Ann Gastroenterol Surg* ; 2 (5): 327–329.

### P

- Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A et Barja G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169-183.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases . *Indian J Clin Biochem*; 30(1): 1- 26.
- Poisson C. (2013). rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. université paris-sud, 11.135-416.
- Poujol FA. (2016). Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et clinique des altérations lymphocytaires induites lors des syndromes septiques, Université Claude Bernard –Lyon 1.

### Q

- Qiu C, Wu J, Pei F, Wang L, Mei M, Guan X , Ouyang B .(2018). Correlation between oxidative stress factors and prognosis of patients with sepsis . *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* ; 31 (7):847-851.

### R

- Rahim I. (2009). Modulation de la défaillance myocardique induite par *Escherichia coli* chez le rat blanc, par l'aspirine et la curcumine. université des sciences et de la technologie houari boumediene.
- Rahim I. (2017). Rôle des Toll-Like récepteurs dans le choc septique polymicrobien. Etude pharmacologique, cellulaire et moléculaire. université des sciences et de la technologie houari boumediene.
- Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, Dyson A, Carré JE, Kortgen A, Krafft C, Popp J, Sponholz C, Fuhrmann V, Hilger I, Claus RA, Riedemann NC, Wetzker R, Singer M, Trauner M, Bauer M. (2012). Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med*. 9(11): 1001338.
- Redouane S et Flih R. (2015). La relation entre l'hépatotoxicité et le stress oxydant. Université des Frères Mentouri Constantine.

- Reithmair M, Buschmann D, Märte M, Kirchner B, Hagl D, Kaufmann I, Pfob M, Chouker A, Steinlein OK, Pfaffl MW .(2017). Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J Cell Mol Med*, 21: 2403 – 2411
- Ritter C,Andrades M,Frota M,Bonato F,Pinho R,Polydoro M,Klamt F,Pinheiro C,Menna-Barreto S,Moreira J,Dal-Pizzol F.(2003).Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Medicine*, 29:1782–1789.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*; 4:31-36.
- Rozenberg S, Besse S, Brisson H, Jozefowicz E, Kandoussi A, Mebazaa A, Riou B, Vallet B and Tavernier B. (2006).Endotoxin-induced myocardial dysfunction in senescent rats *Critical Care*;10:1-9.
- Rudd E, Johnson CS,Agesa K, Scachelford K, Tsoi D et al. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study. *Sciencedirect*, 395(10219), 200-211.

### S

- Sahebkar M, Serban C, Ursoniu S et Banach M. (2015).Effect of curcuminoids on oxidative stress: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Journal of functional foods* (18) 898-909.
- Savcun G, Özkan E, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Şehirli A, Enis Tok O, Ercan Fet Şener G.(2013). Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in an experimental sepsis model in rats. *experimental study*;vol. 19, no. 6.
- Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. (2014). Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus .*J Biomed Sci* ; 21(1): 23.
- Shahed A.R, Jones E et Shoskes D.(2001).Quercetin and curcumin up-regulate antioxidant gene expression in rat kidney after ureteral obstruction or ischemia/reperfusion injury, *Transplantation proceedings* 33(6) 2988.
- Singer M, Deutshman CS, Seymour CW, Shankas-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. (2016). The third international consensus definition for sepsis and septic shock (sepsis3). *Jama*, 315, 801-810.
- Singh, R et Sharma, P. (2011).Hepatoprotective effect of curcumin on lindane-induced oxidative stress in male wistar rats. *Toxicol. Int.*, 18, 124.

- Spanidis Y, Goutzourelas N, Stagos D, Kolyva AS, Gogos C A, Bar-Or D, Kouretas D. (2015). Assessment of Oxidative Stress in Septic and Obese Patients Using Markers of Oxidation-reduction Potential. *in vivo* ; 29 (5): 595-600.
- Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. (2017). Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *PubMed Hepatol*, 14(1):55–66.
- Stark K et Massberg S.(2021). Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *springer nature*,10.1038;1-16.
- Sun J, Zhang J, Wang X, et al. (2020). Gut-liver crosstalk in sepsis-induced liver injury. *Crit Care*. 24(1):614.

### V

- Van der poll T, Marol L. (2017). Coagulation and sepsis. *Thrombosis research*, 149,38-44.
- Vardon F, Vincent M énier , Alexandra Piton, Vincent Minville , Marie-Pierre Gratacap, Bernard Payras.(2015). P ôle anesth ésie-r éanimation. 1:3-4.
- Venet F et Monneret G. (2017). Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Springer Nature*, 137,121-122.

### W

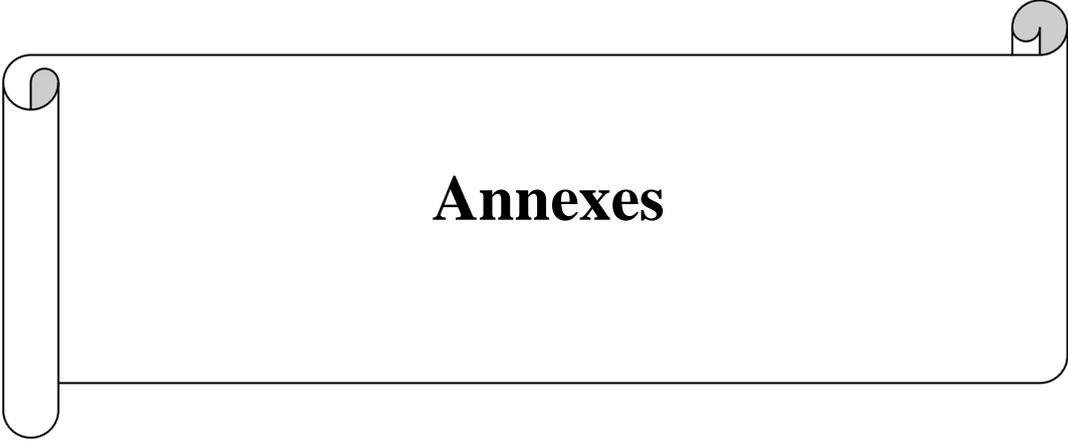
- Woźnica EA, Inglot M, Woźnica RK, Łysenko L.( 2018). Liver dysfunction in sepsis. *Adv Clin Exp Med*,27(4):547-551.

### Y

- Yan C.H, Chen T.P, Wu Y.C, Lin Y.M et Jing Lin P. (2005). Inhibition of NFkappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion, *The Journal of surgical research* 125(1) 109-16.
- Yan J, Li S, Li S. (2014). The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol*,33(6):498-510.
- Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* ; 1850 (8):1607–1621.

### Z

- Zerargui F. (2015). Activit é antioxydante des extraits de racines *Tamus communis L.* et caract érisation des substances bioactives. *Universit é Ferhat Abbas S éif 1*.
- Zhong W, Qianb K, Xiong J, Wanga A et Zoue Y.(2016). Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF-kB related signaling. *ScienceDirect*,0753-3322 :302–313.



**Annexes**

## Annexes:

### Annexe 1 :

**Tableau I.** Les scores SOFA (the Sequential Organ Failure Assessment). Adapté de Singer et al (Singer et al., 2016).

Système	Paramètre	Score				
		0	1	2	3	4
Respiratoire	PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 avec assistance ventilatoire	< 100 et assistance ventilatoire
Coagulation	Numération plaquettaire (G/L)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hépatique	Bilirubine, mg/L (mmol/L)	< 12 (<20)	12–19 (20–32)	20–59 (33–101)	60–119 (102–204)	> 120 (204)
Cardiovasculaire	(Posologies de catécholamines en µg/kg/min, pendant au moins 1 h)	MAP ≥ 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dopamine < 5 ou dobutamine	Dopamine 5,1–15 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradrénaline ≤ 0,1	Dopamine > 15 ou adrénaline > 0,1 ou noradrénaline > 0,1
Neurologique	Échelle de Glasgow	15	13–14	10–12	6–9	< 6
Rénal	Créatinine, mg/L (µmol/L)	< 12 (110)	12–19 (110–170)	20–34 (171–299)	35–49 (300–440)	< 50 (440)
	Diurèse (mL/jour)				< 500	< 200

**FIO<sub>2</sub>**, fraction de l'oxygène inspire (Fraction of inspired oxygen). **MAP**, moyenne de pression artérielle (Meanarterial pressure), **PaO<sub>2</sub>**, Pression partielle d'oxygène (partial pressure of oxygen).

**Tableau II:** Récepteurs TLRs chez l'homme et agonistes (Lemarié et al., 2020).

Tableau 1 Reconnaissance des motifs microbiens par les récepteurs TLRs et Nods.		
Récepteur	Motif moléculaire (Mamp)	Pathogène
TLR1	Triacyl lipopeptides	Bactéries, mycobactéries
TLR2	Lipoprotéines	Bactéries
	Acide lipoteichoïque	Bactéries à Gram positif
	Lipoarabinomannane	Mycobactéries
	Glycolipides	Spirochètes
	Zymosan	Levures
	Protéines virales	Herpes simplex virus
	LPS « atypique »	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	dsRNA	Virus
TLR3	dsRNA	Virus
TLR4	LPS « classique »	Bactéries à Gram négatif
TLR5	Flagelline	Bactéries flagellées ( <i>S.typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )
TLR6	Acide lipoteichoïque	Bactéries à Gram positif
	Diacyl lipopeptides	Mycoplasmes
TLR7	ssRNA	Virus
TLR8	ssRNA	Virus
TLR9	ADN (CpG non méthylés)	Bactéries, virus, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TLR10	?	?
Nod1	Peptidoglycane (résidu Dap)	Bactéries à Gram négatif
Nod2	Peptidoglycane (résidu MDP)	Bactéries à Gram négatif et positif

## Annexe 2

- **Matériel non biologique**

### Appareillages :



Balance de précision



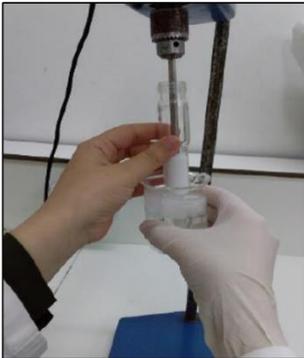
Vortex



Centrifugeuse



Autoclave



Homogénéisateur



Plaque chauffante



pH mètre



Microscope optique



Spectrophotomètre UV-visible

## Annexe 3

### Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine

#### A. Fixation

La fixation consiste immerger le tissu dans du formol tamponné à 4% dans le but de conserver les structures à l'état le plus proche du vivant et de s'opposer à l'autolyse tissulaire. Les structures sont figées et les antigènes immobilisés *in situ*, afin qu'ils ne soient pas altéré par les différents bains réactionnels. Cette étape doit se faire immédiatement après le prélèvement pour éviter l'autodigestion des tissus et la contamination par des microorganismes. Les fragments tissulaires sont mise dans des cassettes en plastiques puis fixées dans du formol tamponné pendant 24 heures.

#### B. Déshydratation et inclusion

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation par immersion dans des bains d'éthanol (le fixateur est éliminé) de degré croissant 70°, 80°, 95°, et 100° puis dans des bains de solvant miscible à la paraffine comme le toluène ou le xylène (l'alcool est éliminé). Le prélèvement est ensuite inclus dans la paraffine fondue par chauffage pendant 3h. La paraffine infiltre et enrobe les tissus et leur donne une consistance solide nécessaire à la confection des coupes histologiques fines. Ces étapes sont automatisées dans un appareil de déshydratation et d'imprégnation (LEICA) et sont résumés dans le tableau IV.

**Tableau III.** Circuit de la batterie de déshydratation et d'imprégnation du tissu à la paraffine.

Étapes	Réactifs	Durée
<b>Fixation</b>	Formol tamponné à 4%	1h
<b>Déshydratation</b>	1 bain d'éthanol 70°	6h
	1 bain d'éthanol 80°	6h
	1 bain d'éthanol 95°	6h
	3 bains d'éthanol 100°	6h x3
<b>Inclusion</b>	3 bains de xylène	3h x3
	3 bains de paraffine	3hx3

Une fois totalement imprégné, le tissu est placé dans un moule contenant de la paraffine fondue (portée à 56/58°C), la chaleur provoque l'évaporation du solvant et les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine, après refroidissement, on procède alors au démoulage ; on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.

### C. Coupes histologiques et coloration H-E

Les coupes histologiques sont faites avec un microtome ((LEICA) permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies et étalées sur des lames de verre préchauffées au bain-marie à 45°C, puis séchées une nuit à 40-45°C ou 1h à 60°C.

Les coupes histologiques sont **colorées** à l'hématoxyline-éosine (H-E), une coloration topographique qui permet une vue d'ensemble de la morphologie des cellules afin de déterminer leur répartition, architecture et structure. C'est une coloration bichromatique composée d'un colorant nucléaire basique, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique acide, l'éosine. L'hématoxyline colore les noyaux en bleu violet tandis que l'éosine colore les cytoplasmes en rose (**Fischer et al., 2008**).

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée, après déparaffinage des coupes (physique à l'étuve 80°C pendant 5 min et chimique dans 2 bains de toluène pendant 3 min), en immergeant les lames dans des bains d'éthanol de degré décroissant (100°,95°,80°,70°) puis dans l'eau distillée (**Tableau V**) (**Fischer et al., 2008**).

Les coupes sont d'abord colorées par l'hématoxyline pendant 10 minutes puis à l'éosine pendant 1 min. Elles sont rincées après chaque coloration pour éliminer l'excès des colorants

Les lames sont montées pour préserver les colorations. Ils sont déshydratés grâce à 3 bains de d'alcool 100° suivis de 3 bains de toluène pendant 40 sec chacun, puis des lamelles de verre sont collées par-dessus (grâce à des résines synthétiques Eukit) afin de préserver les préparations. Les lames ainsi montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années.

**Tableau IV.**Etapes de coloration hématoxyline- éosine.

<b>Etapes</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Durée</b>
<b>Déparaffinage</b>	Etuve 100°C	5min
	3 bains de toluène	2min x3
<b>Réhydratation</b>	1 bain d'éthanol 100°	2min
	1 bain d'éthanol 95°	2min
	1 bain d'éthanol 80°	2min
	1 bain d'éthanol 70°	2min
	1 bain d'eau distillée	2min
<b>Coloration H-E</b>	Hématoxyline	10min
	Lavage eau	2min
	Eosine	1min

	Lavage eau	2min
<b>Déshydratation</b>	3 bains d'éthanol 100°	45sec x3
	3 bains de Toluène	45sec x3

#### **D. Observation microscopique**

Les lames ont été observées au microscope photonique et interprétées par un médecin anatomopathologiste.