



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche Scientifique  
جامعة البليدة 1  
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biotechnologies

### *Mémoire*

*En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique*

### *Option*

*Biotechnologie et Pathologie Moléculaire*

### *Thème*

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

*Présenté par :*

*Melle. DAHMANI Zakia*

*et*

*Melle. ZOUADINE Rania*

*Devant le Jury :*

*M<sup>me</sup> LOUNICI L.*

*MCB*

*SNV, Blida1*

*Présidente*

*M<sup>me</sup> ROUAKI F.*

*MCA*

*SNV, Blida1*

*Examinatrice*

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

*MCB*

*SNV, Blida1*

*Promotrice*

*Session 2020 / 2021*

## Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier **Dieu** le tout puissant de nous avoir ouvert les portes de savoir, et de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à la contribution de plusieurs personnes à qui on voudrait témoigner notre gratitude.

Nous remercions infiniment notre promotrice le **Dr. RAHIM IBTISSEM**, Maître de Conférences à l'USDB1, d'avoir accepté de nous encadrer, pour le temps qu'elle a consacré à nous apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche. Son exigence nous a grandement stimulés.

Nous tenons à remercier vivement les membres du jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre modeste travail. **M<sup>me</sup> LOUNICI** et **M<sup>me</sup> ROUAKI**, veuillez trouver ici l'assurance de notre profond gratitude et l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

Nous avons l'honneur et le plaisir d'exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements au **Pr DJAZOULI ALIM** pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience durant nos 5ans d'études.

Nous adressons, nos sincères remerciements à **M<sup>me</sup> le Dr. AÏSSANIEL-FERTAS RADIA**, Maître de Conférences à l'USDB1, pour son aide et sa compréhension ainsi que sa patience.

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>f</sup>Djazouli**, **M<sup>me</sup>Zatra**, **M<sup>me</sup>Boukenaoui**, **M<sup>f</sup>Medrouh**, des ingénieurs de laboratoire (Hassina, Zakia, Naziha, Bounakhla, Abderrahman) des médecins (Dr. Kouchkar) et des responsables (**M<sup>f</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.

## *Dédicace*

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*A mon très cher père*

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A ma très chère mère*

*La femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A mes très chers frères AMINE et SALEH et à ma petite sœur adorée MALAK puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage et surtout réussite.*

*A mes grands-parents, mes oncles et mes tantes, que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

*A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connus jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements.*

*En particulier mon binôme RANIA pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

*A mes adorables camarades DJOUMANA et YOUSRA qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Elles m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de ce travail.*

**ZAKIA**

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :*

*A celle qui ma arrosée de tendresse et d'espoir ma chère mère **Dahlal Nora***

*Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon très cher père **Azzedine***

*Tu as été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.*

*A mes chers frères **Riad et Ramzi** je vous souhaite tous le bonheur du monde.*

*A ma deuxième mère **Saida**, et à mon adorable tante **Samia** qui ma soutenue moralement et financièrement.*

*A mes petites cousines et cousin adorés que j'aime trop : **Wafa, Sara, et Mohamed yakoub***

*A mon cher binôme : **Zakia** j'ai passé avec toi des moments inoubliables.*

*A mes amies **Yousra et Djoumana**.*

*A ma très chère copine **Amira** merci énormément pour ton soutien plus précieux, merci pour ton grand cœur pour toutes tes qualités qui seraient trop longues à énumérer, ma vie ne serait pas aussi magique sans ta présence et ton amour je t'aime de tout mon cœur.*

*A toute ma famille **Zouadine et Dahlal** spécialement à mes deux oncles **Mohamed et Sadak** pour leurs conseils.*

*À tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

**Rania**

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. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme sévère de lésions pulmonaires aiguës (ALI, *Acute Lung Injury*) survient chez 25% à 50% des patients atteints de sepsis.

Notre travail de recherche présente un intérêt fondamental dans la compréhension des mécanismes complexes de la physiopathologie du sepsis dans le but de développer une thérapie ciblée. En effet, nous avons d'une part étudié, à l'aide d'un modèle murin de sepsis polymicrobien, l'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par le sepsis 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 le poumon, la rate et le mésentère ont été prélevés pour une étude biochimique et histologique.

Les résultats du dosage biochimique montrent que le sepsis induit un stress oxydatif dans les poumons 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 pulmonaires, associées à une activation de la réponse immunitaire et inflammatoire caractéristique avec une forte infiltration leucocytaire observée au niveau de la rate et du mésentère. La curcumine prévient les dommages oxydatifs 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, Cecal Ligation and Puncture, stress oxydatif, curcumine, poumon, rate, mésentère.

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. Acute respiratory distress syndrome (ARDS), a severe form of acute lung injury (ALI, *Acute Lung Injury*) occurs in 25% to 50% of patients with sepsis.

Our research is of fundamental interest in understanding the complex mechanisms of the pathophysiology of sepsis in order to develop a targeted therapy. Indeed, on the one hand, we have studied, using a murine model of polymicrobial sepsis, the involvement of oxidative stress in pulmonary alterations induced by sepsis and on the other hand the role of curcumin in the prevention of these.

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

The results of the biochemical assay show that sepsis induces oxidative stress in the lungs 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 damage in the lungs, associated with activation of the characteristic immune and inflammatory response with strong leukocyte infiltration observed in the spleen and mesentery. Curcumin prevents oxidative and inflammatory damage induced by sepsis.

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

**Keywords:** Sepsis, Cecal Ligation and Puncture, oxidative stress, curcumin, lung, spleen, mesentery.

تعفن الدم هو مشكلة صحية عامة رئيسية، حيث يرتبط بتفاقم استجابة المضيف للعامل المُعدِي، و الإجهاد التأكسدي، وفشل الأعضاء. على الرغم من التقدم العلاجي، فإن معدل الوفيات بسبب هذه الحالة لا يزال مرتفعًا للغاية. متلازمة الضائقة التنفسية الحادة (ARDS)، وهي شكل حاد من إصابات الرئة الحادة ALI، (إصابة الرئة الحادة) وتحدث في 25٪ إلى 50٪ من مرضى تعفن الدم.

إن بحثنا مهم بشكل أساسي في فهم الآليات المعقدة للفيزيولوجيا المرضية لتعفن الدم من أجل تطوير علاج موجه. من ناحية، درسنا باستخدام نموذج فئران بيضاء NMRI لتعفن الدم متعدد الميكروبات، لدراسة تورط الإجهاد التأكسدي في الرئة والتغيرات التي يسببها تعفن الدم ومن ناحية أخرى دور الكركمين في الوقاية من هذه.

تم تحفيز تعفن الدم متعدد الميكروبات بواسطة CLP (Cecal Ligation and Puncture) في الفئران البيضاء NMRI، والتي عولجت بجرعة 100 مجم / كجم من الكركمين. تم التضحية بالفئران بعد 24 ساعة من العلاج وتمت إزالة الرئة و الطحال و المساريق لإجراء دراسة كيميائية حيوية و نسيجية.

تظهر نتائج التحليل البيوكيميائية أن تعفن الدم يؤدي إلى إجهاد مؤكسد في الرئتين يتميز بزيادة مستوى MDA (علامة مؤيدة للأكسدة) وانخفاض في Catalase (علامة مضادة للأكسدة). يمارس الكركمين تأثيرًا مضادًا للأكسدة ويعيد توازن المواد المؤكسدة / المضادة للأكسدة عن طريق خفض MDA وزيادة Catalase.

تظهر النتائج النسيجية أضرارًا تأكسدية في الرئتين، مرتبطة بتنشيط الاستجابة المناعية و الالتهابية المميزة مع تسلل قوي لخلايا الدم البيضاء لوحظ في الطحال والمساريقا. يمنع الكركمين الضرر التأكسدي والالتهابي الناجم عن تعفن الدم.

تفتح نتائجنا آفاقًا 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، الرئة، الطحال، المساريق.

**Abréviations :**

**ADCC** : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**CAT** : Catalase

**CLP** : Cecal Ligation and Puncture

**Cox-2** : Cyclooxygenase 2

**CPA** : Cellule présentatrice d'Antigène

**CRP** : Protéine C réactive

**CXCR1** : C-X-C Motifs chemiokine Receptor 1

**CXCR2** : C-X-C Motifs chemiokine Receptor 2

**D** : Dégranulation

**FNS** : Formule de numération sanguine

**G** : Granulocyte

**Gpx** : La glutathion peroxydase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**ICAM-I**: Intercellular adhesion molecule 1

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

**IL-8** : Interleukine -8

**iNOS** : Oxyde nitrique synthase inductible

**L**: Lymphocyte

**L'IL-12** : Interleukine -12

**L'IL-6** : Interleukine -6

**LPO** : Peroxydation lipidiques

**M**: Monocyte

**MAMPs** : Microbe-associatedmolecular patterns

**MDA** : Malondialdéhyde

**MODS**: Multiple organ dysfunction Syndrome

**MPO** : Myéloperoxydase

**MyD88** : Myeloid differentiation primary response 88

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor-kappa B

**NO** : Monoxyde d'azote

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : Anion superoxyde

**PAMPs** : Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PMN** : Polymorphonucléaires

**PN** : Polynucléaire

**PN**: Polynucléaire neutrophile

**PRRs** : Patterns Recognition Receptors

**Prx** : Peroxiredoxins

**qSOFA** : QuickSOFA

**RNS** : Reactive nitrogen sepecies

**ROS** : Reactive oxygen sepecies

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SOFA** : Sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment

**SPS** : Polyanéthol sulfonate de sodium

**SRIS** : Syndrome de réponse inflammatoire systémique

**TBA** : Acide thiobarbiturique

**TBARS** : Espèces réactives de TBA

**TLRs** : Toll-like receptors

**TNF- $\alpha$**  : Tumer necrosis factor  $\alpha$

**Trx** : Thioredoxine

## Liste de figures

<b>Figure 1 :</b> Diagramme comparatif des définitions de sepsis décrite par les conférences de consensus de 1991, 2001 et 2016.....	4
<b>Figure 2 :</b> Résumé des acteurs et événements physiopathologiques survenant et influençant le sepsis. ....	5
<b>Figure 3 :</b> Phases hyper-inflammatoire et d'immunodépression au cours du sepsis.....	6
<b>Figure 4 :</b> Voies de signalisation des TLRs chez les mammifères.....	7
<b>Figure 5 :</b> Altération des fonctions immunitaires (immunodépression) au cours du sepsis.....	9
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique du stress oxydatif chez les patients septiques.....	11
<b>Figure 7 :</b> La curcumine.....	13
<b>Figure 8 :</b> Etapes critiques de CLP induit chez la souris.....	18
<b>Figure 9 :</b> Protocole expérimental chez les souris NMRI .....	19
<b>Figure 10 :</b> Effet des différents traitements sur le poids des souris NMRI albinos.....	16
<b>Figure 11 :</b> Effet des différents traitements sur le poids du poumon et de la rate. ....	17
<b>Figure 12 :</b> Taux de malondialdéhyde pulmonaire chez les souris NMRI albinos.....	18
<b>Figure 13 :</b> Activité catalase pulmonaire chez les souris NMRI albinos. ....	19
<b>Figure 14 :</b> Taux de protéines pulmonaires chez les souris NMRI albinos.....	20

<b>Figure 15 :</b> Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang.....	<b>21</b>
<b>Figure 16 :</b> Résultats de frottis sanguin, coloration MGG.....	<b>22</b>
<b>Figure 17 :</b> Effet de la curcumine sur les dommages pulmonaires induits par CLP chez les souris NMRI albinos.....	<b>24</b>
<b>Figure 18 :</b> Micrographie du mésentère des souris NMRI albinos.....	<b>26</b>
<b>Figure 19 :</b> Micrographie de coupes transversales de la rate des souris NMRI albinos.....	<b>27</b>
<b>Figure 20 :</b> Effet de la curcumine dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis.....	<b>30</b>

**Tableaux annexes**

**Annexe 1** : Tableau I. Les scores SOFA .....**i**

**Annexe 1** : Tableau II: Agonistes des récepteurs TLRs chez l' homme hles mieux connus et leurs adaptateur.....**ii**

**Annexe 2** : Appareillages.....**iii**

**Annexe 2** : Tableau III: Liste des Listes de Réactifs et consommables.....**iv**

**Annexe 2** : Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine.....**v**

## SOMMAIRE

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

### **Chapitre I : Rappels Bibliographiques**

<b>I. Le sepsis, et la réponse immunitaire et inflammatoire .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1. Définition du sepsis.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Physiopathologie du sepsis .....</b>	<b>5</b>
<b>I.2.1. Phase hyper-inflammatoire.....</b>	<b>6</b>
<b>I.2.2. Immunodépression .....</b>	<b>8</b>
<b>I.3. Dysfonctionnement pulmonaire associé au sepsis .....</b>	<b>9</b>
<b>I.4. Stress oxydatif et sepsis .....</b>	<b>11</b>
<b>I.4.1. Définition du stress oxydatif .....</b>	<b>11</b>
<b>I.4.2. Systèmes pro-oxydant/Antioxydant .....</b>	<b>12</b>
<b>I.4.3. Stress oxydatif au cours du sepsis .....</b>	<b>13</b>
<b>I.5. La curcumine.....</b>	<b>13</b>
<b>I.5.1. Définition et origine .....</b>	<b>13</b>
<b>I.5.2. Pharmacocinétique .....</b>	<b>14</b>
<b>I.5.3. Les effets pléiotropes de la curcumine .....</b>	<b>15</b>

### **Chapitre II. Matériel et Méthodes**

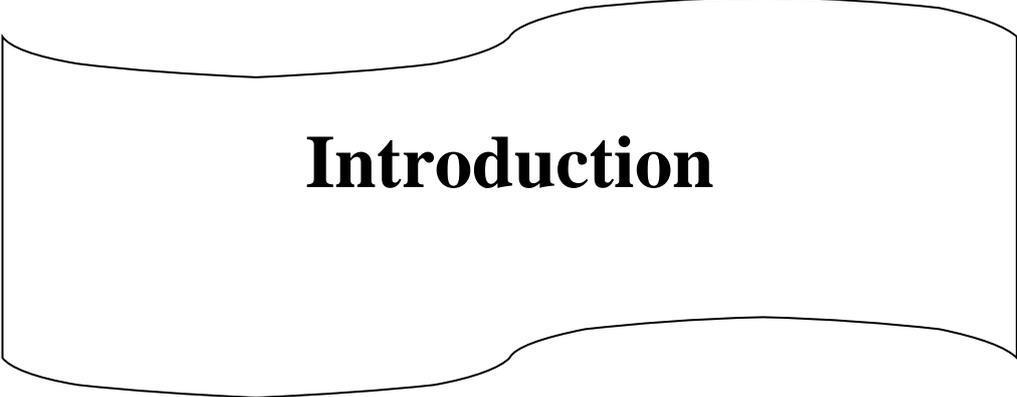
<b>II.1. Matériel .....</b>	<b>16</b>
<b>II.1.1. Matériel non biologique.....</b>	<b>16</b>
<b>II.1.2. Matériel biologique.....</b>	<b>16</b>
<b>II.2. Méthodes .....</b>	<b>17</b>
<b>II.2.1. Modèle de sepsis par ligature et ponction cœcale (CLP).....</b>	<b>17</b>
<b>II.2.2. Protocole pharmacologique .....</b>	<b>18</b>

<b>II.2.3. Etude biochimique .....</b>	<b>19</b>
<b>II. 2. 3. 1. Préparation de l'homogénat tissulaire.....</b>	<b>19</b>
<b>II.2. 3. 2. Dosage des protéines.....</b>	<b>19</b>
<b>II.2. 3. 3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif .....</b>	<b>19</b>
<b>II.2.4. Etudehématologique par FNS et frottis sanguin.....</b>	<b>20</b>
<b>II.2.5. Etude histologique .....</b>	<b>21</b>
<b>II.2.6. Etude statistique .....</b>	<b>21</b>

### **Chapitre III. Résultats et Discussion**

<b>III.1. Résultats .....</b>	<b>22</b>
<b>III.1.1.Effet du sepsis et de la curcumine sur le poids des souris et des organes (poumon et rate) .....</b>	<b>22</b>
<b>III.1.2.Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de MDA pulmonaire.....</b>	<b>23</b>
<b>III.1.3.Effet du sepsis et de la curcumine sur l'activité catalase pulmonaire.....</b>	<b>25</b>
<b>III.1.4. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de protéines pulmonaires .....</b>	<b>26</b>
<b>III.1.5.Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins .....</b>	<b>27</b>
<b>III.1.6.Etude histologique.....</b>	<b>29</b>
<b>III.2.Discussion .....</b>	<b>33</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>37</b>

### **Références Bibliographiques.**



# **Introduction**

Le sepsis est le terme anglo-saxon et international employé pour caractériser une réponse inflammatoire généralisée associée à une infection grave. Il constitue un problème de santé publique majeur pour qui les taux de mortalité peuvent atteindre 40% (**Singer et al., 2016**).

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 sepsis est une réponse inflammatoire excessive et délétère pour plusieurs systèmes (redox, immunitaire, coagulation, métabolique ...) et organes (poumon, cœur, foie, rein,...) (**Pang et al., 2019 ; Danielski et al., 2020**). Le poumon est l'organe le plus vulnérable lors du syndrome septique. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme sévère de lésions pulmonaires aiguës (ALI, *Acute Lung Injury*), survient chez 25% à 50% des patients atteints de sepsis (**Bedirli et al., 2007 ; Choudhury et al., 2015**).

Un déséquilibre du système redox (oxydant /antioxydant) mène à un état de stress oxydatif caractérisé par une surproduction des ROS/RNS (**Migdal et Serres, 2011**).

Par conséquent, la complexité du syndrome septique exige une molécule avec un effet pléiotrope comme la curcumine (**Claustrat et al., 2015**).

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

- Evaluer le statut redox pulmonaire 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 pulmonaires 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. Le taux de mortalité associé au sepsis demeure élevé (>40%) et aucun traitement ne semble efficace. En 2017, environ 48,9 millions de cas incidents de sepsis ont été enregistrés dans le monde et 11,0 millions de décès liés au sepsis ont été signalés, représentant 19,7 % de tous les décès dans le monde (Napolitano, 2018 ; Qiu et al., 2019).

#### **I.1. Définition**

Le sepsis est un terme anglo-saxon venant des mots grecs Σήψις (putréfaction) et αίμα (sang), désigne la présence de bactéries (voire de champignons ou de virus) dans le sang (Funk et al., 2009). Le sepsis est un syndrome physiopathologique complexe qui constitue à l'heure actuelle un défi pour les chercheurs afin de poser une définition adéquate concernant sa physiopathologie et développer une thérapie efficace (Salomão et al., 2019).

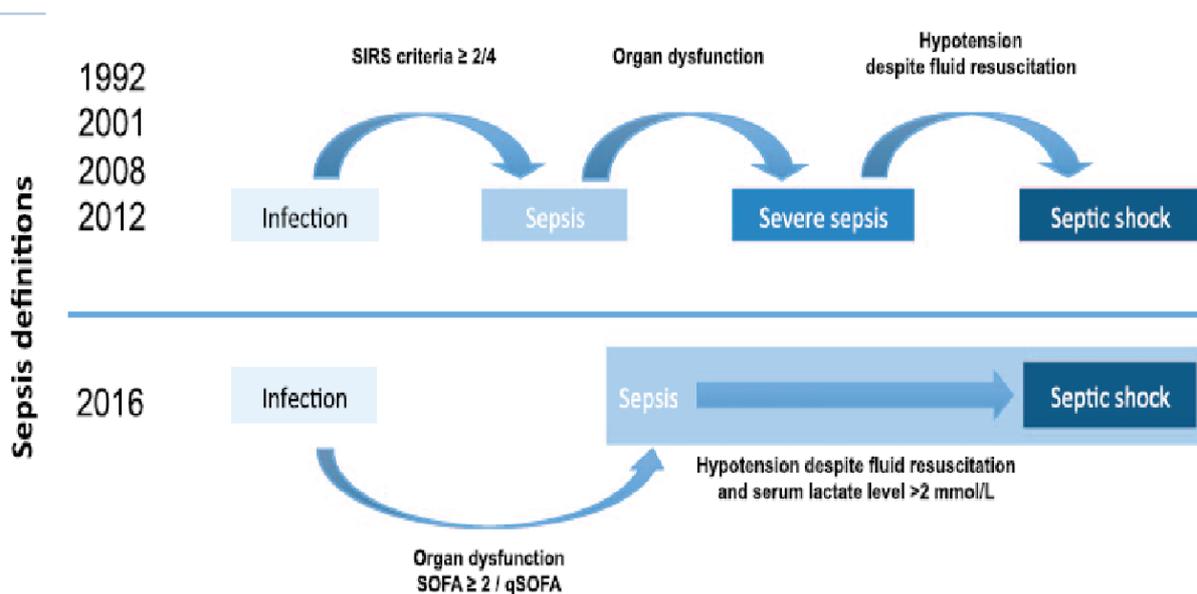
Trois conférences de consensus ont été tenu en 1991, 2001 et 2016 dans le but d'établir une définition adéquate du sepsis, et d'identifier des critères de diagnostic cliniques rapides et efficaces pour le sepsis. En **1991**, le sepsis a été défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique « SIRS » associé à une infection, qui évolue en sepsis sévère (sepsis et dysfonctionnement d'un organe) puis en choc septique (sepsis et hypotension sévère). Le SIRS est attesté par la présence d'au moins deux critères parmi les 4 suivants : (i) fièvre ou hypothermie (température >38°C ou <36°C), (ii) rythme cardiaque accéléré (>90 battements/minute), (iii) rythme respiratoire accéléré (>20 cycles/minute ou pression artérielle en CO<sub>2</sub><4,3kPa), (iv) augmentation ou diminution du nombre de globules blancs sanguins (>12 000 cellules/μL ou <4 000 cellules/μL ou présence d'au moins 10% de granuleux immatures). En **2016**, la définition a été révisée, étant donné que ce dernier été beaucoup plus basée sur la réponse inflammatoire de l'hôte, et aujourd'hui le sepsis est considéré comme un dysfonctionnement d'organes potentiellement mortel, résultant d'une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection. Le sepsis peut évoluer en choc septique, caractérisé par des anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques particulièrement profondes augmentant le risque de mortalité (**Figure 1**) (Singer et al., 2016).

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*) (**Tableau I**,

**annexe 1).** 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).

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) (Figure 1) (Singer *et al.*, 2016).

Néanmoins, les limites de cette mise à jour de la définition et des critères cliniques de sepsis ont été débattu et une nouvelle mise à jour semble être nécessaire (Figure 1) (Verdonk *et al.*, 2017 ; Napolitano, 2018).

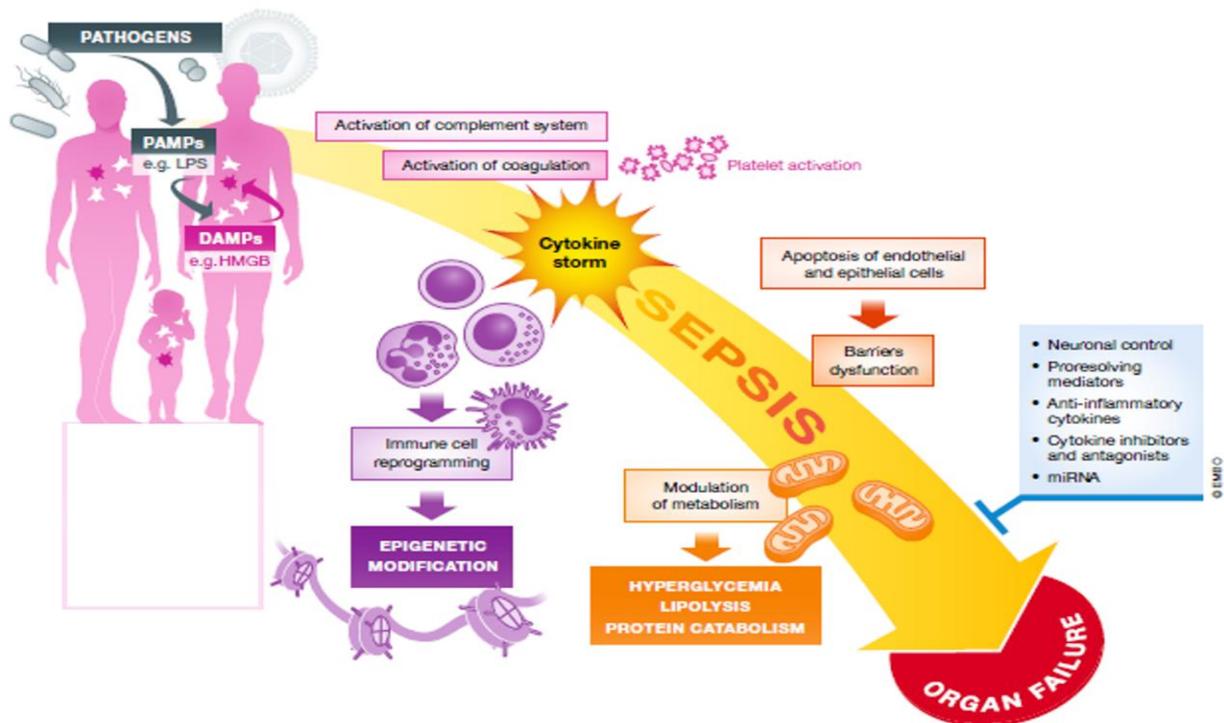


**Figure 1.** Diagramme comparatif des définitions de sepsis décrite par les conférences de consensus de 1991, 2001 et 2016 (Napolitano, 2018).

### I.2. Physiopathologie du sepsis

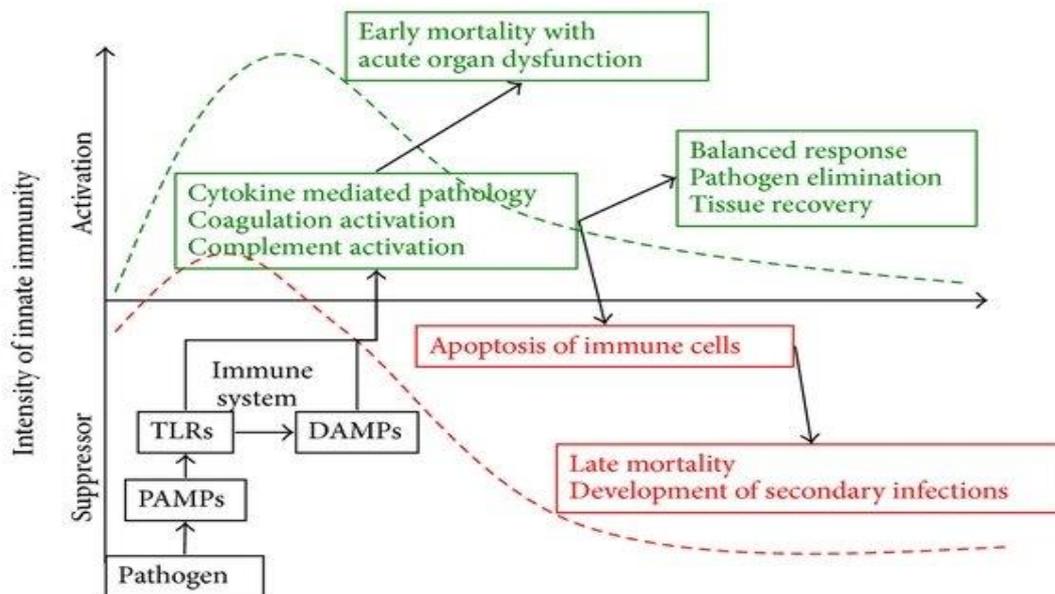
La physiopathologie du sepsis est extrêmement complexe, et est caractérisée par une réponse inflammatoire déséquilibrée et excessive, un stress oxydatif, et un désordre de plusieurs systèmes (immunitaire, coagulation, métabolique...) (Figure 2) (Cimolai *et al.*, 2015 ; Van der Poll *et al.*, 2017).

En plus de la défaillance viscérale engendrée, un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire et un défaut d'apport en oxygène dans les tissus (hypoxie) est aussi observé. Il s'en suit la formation de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et éventuellement à la mort (Cimolai *et al.*, 2015).



**Figure 2.** Résumé des acteurs et événements physiopathologiques survenant et influençant le sepsis. L'ampleur et la variété de la réponse humorale et cellulaire peut conduire à des dysfonctionnements d'organes, qui sont un dénominateur clé du sepsis par rapport à d'autres formes d'infection (Cavaillon *et al.*, 2020).

La réponse immunitaire déclenchée par les agents infectieux lors du sepsis, sont excessives et maintenues par des stimuli à la fois infectieux et non infectieux. Cette réponse est une succession de deux phases une phase hyperinflammatoire et une phase d'immunodépression (Figure 3) (Ono *et al.*, 2018).



**Figure 3.** Phases hyper-inflammatoire et d'immunodépession au cours du sepsis (Fang et al., 2015).

### I.2.1. Phase hyper-inflammatoire

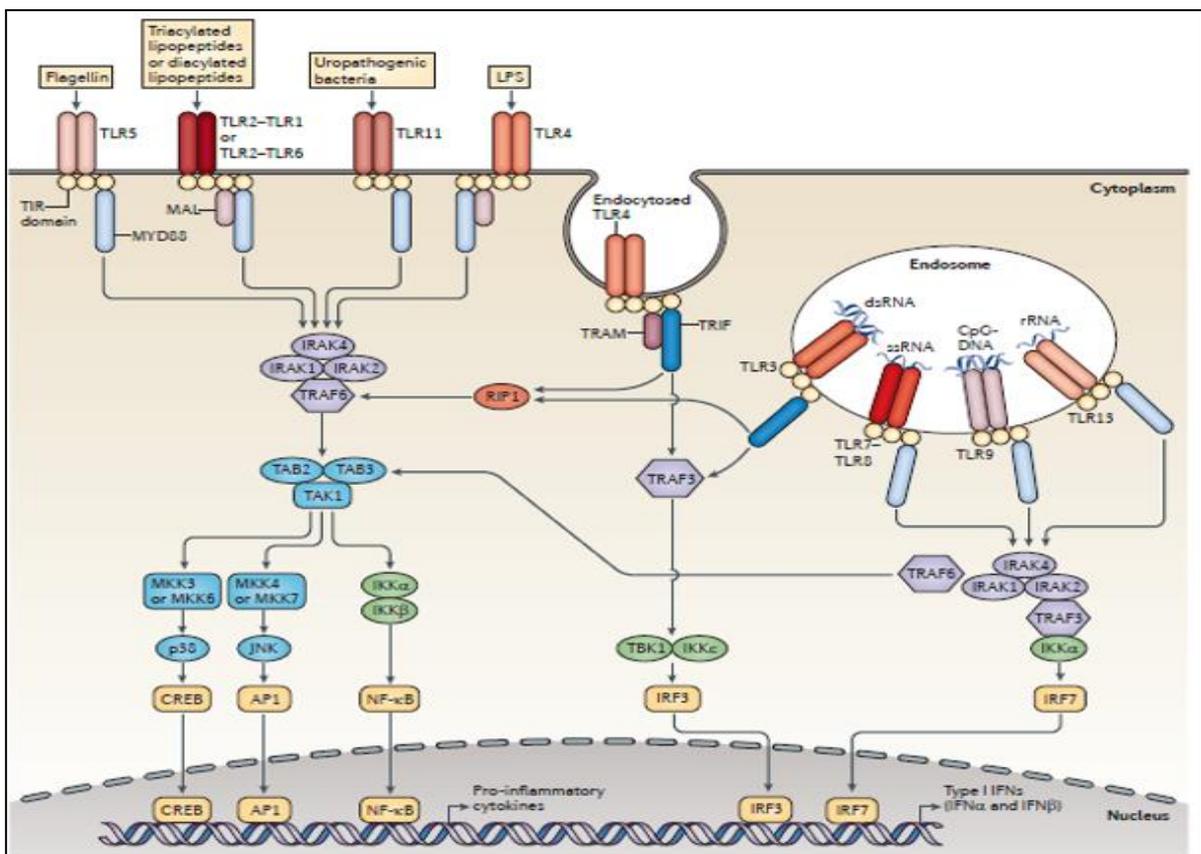
Au cours de la phase initiale du sepsis, une suractivation du système immunitaire a lieu dans le but d'éliminer l'agent pathogène envahissant. Cette phase est initiée par la reconnaissance du pathogène et est caractérisée par une « tempête de cytokines » pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6, et si elle n'est pas contrôlée, elle entraîne des lésions tissulaires excessives se manifestant par un choc septique et/ou un dysfonctionnement multi-organique (MOD) (Tsirigotis et al., 2016).

- **La reconnaissance du pathogène** : Tout syndrome septique 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 locale visant à limiter la dissémination du germe infectieux (Bosmann et al., 2013 ; Grimaldi, 2014).

Les Toll-like receptors ou « TLR » sont les récepteurs PRRs les plus décrits chez l'homme (Tableau II, annexe 1). 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*) et quelle que soit la voie empruntée, il résulte de cette stimulation l'activation de différents facteurs de transcription dont le NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*). Ce dernier contribue à l'expression de médiateurs clé de la réponse inflammatoire, dont notamment l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et les interférons de type I. Ces cytokines vont induire, d'une part, la production de nouveaux médiateurs inflammatoires (Cytokines, chimiokines, NO...) et ainsi contribuer au développement des réponses immunitaires innée et adaptative. D'autre part, elles induisent l'expression de peptides antimicrobiens destinés à l'élimination du pathogène (**Figure 4**) (**Poujol, 2016**).

Plusieurs travaux de recherche ont démontré le rôle clé du NF- $\kappa$ B dans la pathogénèse, le dysfonctionnement d'organe et la létalité au cours du sepsis. Il fut démontré que le niveau d'activation du NF- $\kappa$ B est positivement corrélé à la gravité du sepsis montrant une augmentation de son activité chez les patients septiques décédés par rapport aux survivants (**Poujol, 2016**).



**Figure 4.** Voies de signalisation des TLRs chez les mammifères (O'Neill *et al.*, 2013).

### **- Déclenchement de la réponse immuno-inflammatoire :**

Les médiateurs inflammatoires induits suite à cette réponse déclenchée par le pathogène sont nombreux et les cytokines pro-inflammatoires comptent parmi les plus importants.

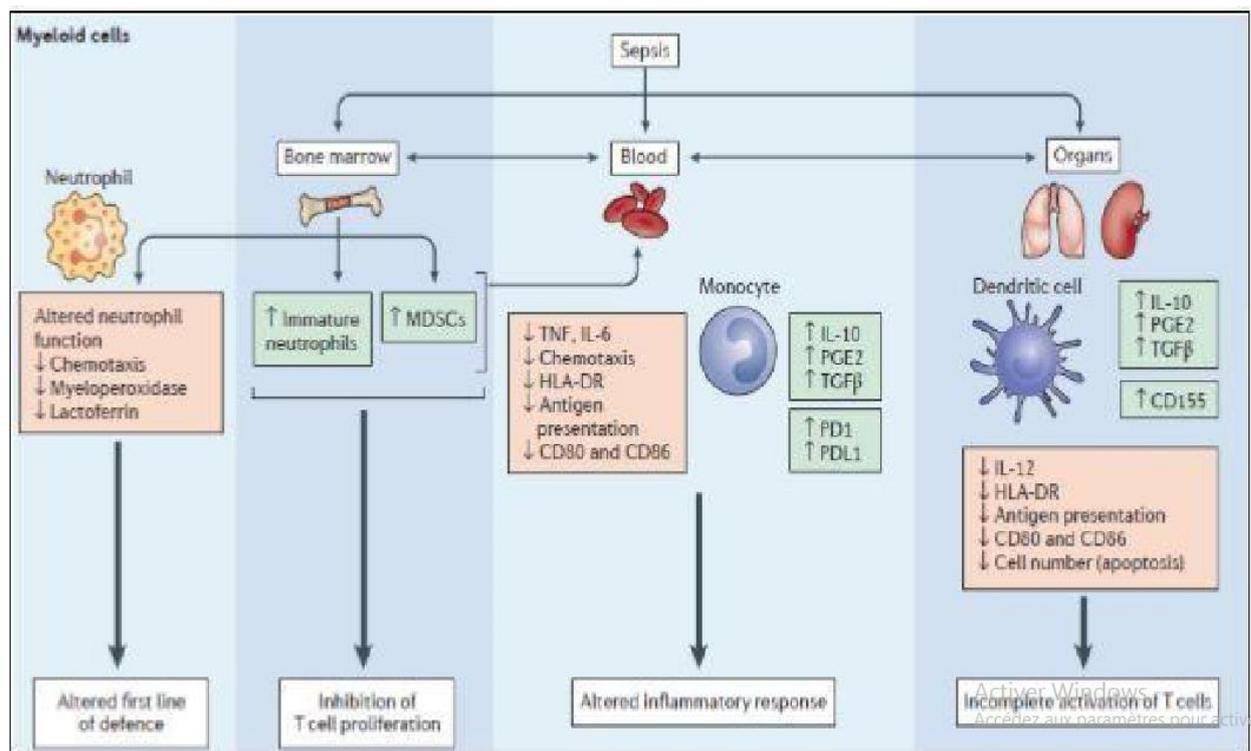
Le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et l'INF $\gamma$  sont les plus particulièrement étudiées dans le cadre des syndromes septiques. La libération de ces cytokines stimule la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Les polynucléaires neutrophiles circulants peuvent infiltrer les tissus, suivis par le recrutement et l'activation des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques. Ces dernières seront responsables de l'apprêtement antigénique ; elles participent à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B. Les lymphocytes T effecteurs migrent vers le site infectieux et participe, de par ses 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'ils sont capables de neutraliser les germes infectieux et d'induire des mécanismes spécifiques tels que l'activation du système du complément, et l'opsonisation et l'ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Grimaldi, 2014).

Les mécanismes de régulation négative de ces phénomènes tardent à se mettre en place, la sécrétion massive de cytokines à l'échelle systémique est qualifiée d'« Orage ou tempête cytokinique » et on observe ainsi un état d'hyper-inflammation systémique (Pougol, 2016).

### **1.2.2. Immunodépression**

La deuxième phase observe des altérations des cellules immunitaires innées et adaptatives (apoptose, altérations fonctionnelles et modifications phénotypiques), qui ne seront plus capable de combattre l'infection. Cette immunoparalysie résulte de la persistance de la phase hyperinflammatoire au cours du syndrome septique. Cette réponse hyperinflammatoire est caractérisée par des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, déclenchées de manière simultanée plutôt que successives (Figure 3) (Grimaldi, 2014 ; Pougol, 2016).

Des études indiquent que le sepsis est associé à une forte déplétion des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et B et des cellules dendritiques (DC) qui subissent une apoptose ainsi qu'une reprogrammation des cellules présentatrice de l'antigène (monocytes/macrophages) (Figure 5) (Boomer et al., 2011 ; Hotchkiss et al., 2013).



**Figure 5.** Altération des fonctions immunitaires (immunodépression) au cours du sepsis (Ono *et al.*,2018). La réponse immunitaire innée est modifiée après sepsis chez les patients ainsi que dans les modèles murins. Ces altérations immunitaires se produisent non seulement dans le sang, mais également dans la moelle osseuse et dans les organes distants du site initial de l'infection. Ces altérations incluent, (i) une libération excessive, par la moelle osseuse, de neutrophiles immatures et de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (ii) des altérations fonctionnelles des neutrophiles matures, (iii) des altérations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques, (iv) ces altérations concernent des fonctions effectrices diminuées, et la production accrue de médiateurs anti-inflammatoires. Ces modifications sont délétères pour l'hôte, elles entraînent une diminution de la réponse de première intention contre l'infection et une modification des fonctions des lymphocytes T.

### I.3. Dysfonctionnement pulmonaire associé au sepsis

Le poumon est un organe vital assurant les échanges gazeux chez les vertébrés, ce qui l'expose à des agents pathogènes aériens, des allergènes et à d'autres substances toxiques qui peuvent être à l'origine d'infections ou d'inflammation pulmonaires. Il sert également d'organe immunitaire crucial, qui abrite à la fois des cellules immunitaires innées et adaptatives pour induire une puissante réponse immunitaire (Kumar, 2020).

Ainsi, le poumon est l'organe le plus vulnérable lors du syndrome septique. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme sévère de lésions pulmonaires aiguës (ALI,

*Acute Lung Injury*), survient chez 25% à 50% des patients atteints de sepsis (**Sevransky et al., 2009 ; Gu et al., 2014**). Le SDRA/ALI est l'un des facteurs pronostiques les plus critiques de mortalité chez les patients atteints de sepsis (**Park et al., 2019**).

Le SDRA/ALI est caractérisé par un œdème alvéolaire, une insuffisance respiratoire hypoxémique aiguë et une réponse inflammatoire pulmonaire accrue (**Bedirli et al., 2007 ; Choudhury et al., 2015**). L'œdème pulmonaire riche en protéines caractérisant l'ALI/SDRA provoque une hypoxémie réfractaire, un raidissement des poumons et une difficulté à respirer (**Bernard, 2017 ; Kumar et al., 2020**).

Le SDRA/ALI est aussi associé à de graves lésions tissulaires et, dans les cas graves, des lésions pulmonaires irréversibles pouvant entraîner la mort (**Bernard, 2017 ; Kumar et al., 2020**). Bien que le sepsis soit le déclencheur le plus courant d'ALI/SDRA, les mécanismes sous-jacents ne sont pas complètement compris, limitant la découverte de traitements efficaces. Des études antérieures ont révélé que la physiopathologie d'ALI/SDRA induit par sepsis est complexe et multifactorielle, y implique une activation incontrôlée de l'inflammation, un dysfonctionnement endothélial, des changements hémodynamiques et des troubles microcirculatoires, une apoptose des cellules épithéliales alvéolaires, un stress oxydatif excessif, et un dysfonctionnement de la coagulation (**Sano et Reed., 2013 ; Zarjou et Agarwal., 2011 ; Lin et al., 2015**).

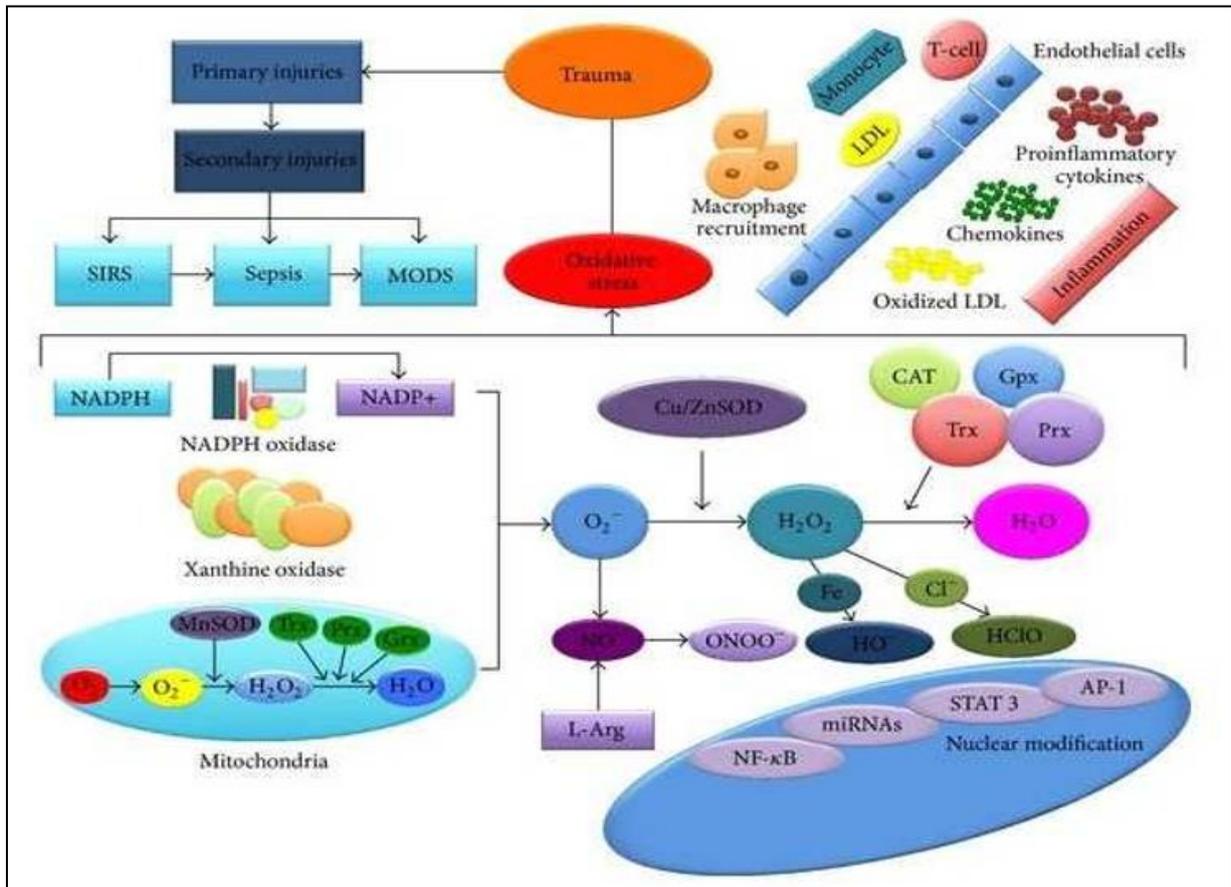
Malheureusement et malgré des décennies de recherche, il n'existe aucune stratégie de prévention ni de thérapie efficace pour l'ALI/SDRA en raison des complications de l'étiologie et de la pathogenèse de l'ALI/SDRA. Les antibiotiques et les mesures de soutien (ventilation) sont les seuls traitements disponibles pour les patients atteints de sepsis et d'ALI/SDRA, et ces mesures ont un impact limité sur les taux de mortalité élevés de ces patients (**Aziz et al., 2018 ; Kumar et al., 2020**).

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

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

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants en faveur d'une surproduction des espèces réactives de l'oxygène/nitrogène (ROS/RNS) (**Romá-Mateo et al., 2015**). Ce déséquilibre peut se produire 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 (**Kirschvink et al., 2008**).

Les ROS/RNS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions associées à diverses pathologies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, infectieuses et neurodégénératives (**Figure 6**) (**Romá-Mateo et al.,2015 ; Jadeja et al., 2017**).



**Figure 6.** Représentation schématique du stress oxydatif chez les patients septiques (**Papurica et al., 2015**). L'infection induit une série de lésions secondaires dues aux déséquilibres biologiques et biochimiques. Le premier effet secondaire installé est le SIRS, suivi d'un sepsis, et enfin de MODS (*multiple organ dysfunction Syndrome*). Les inflammations générées par l'action des cellules polymorphonucléaires (PMN), ainsi que par l'hypermétabolisme, maintiennent et augmentent le stress oxydatif. Les mitochondries sont considérablement affectées produisant ainsi des quantités importantes d'anion superoxyde. Les radicaux libres produits au niveau cellulaire sont neutralisés par de nombreuses enzymes antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la thioredoxine (Trx), la glutathion peroxydase (Gpx), et la peroxiredoxins (Prx).

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

A l'état quiescent, une homéostasie redox est maintenue grâce à un équilibre de la balance des systèmes antioxydants/ pro-oxydants. Cet équilibre permet une production contrôlée des ROS/RNS à des doses raisonnables indispensable à de nombreuses fonctions physiologiques comme la signalisation cellulaire, la mort cellulaire programmée et la défense de l'organisme. Cependant cette homéostasie redox peut être rompue, soit par une production excessive de ROS/RNS (pro-oxydants) soit par une diminution des capacités anti-oxydantes. On parle alors de stress oxydatif. Les ROS/RNS sont générés par de sources endogènes et exogènes à partir de l'oxygène( $O_2$ ) 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. 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 (Ye et al., 2015).

L'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  constitue la première espèce réactive 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 aux 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 oxydatif, 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 (Ye et al., 2015).

### **I.4.3. Stress oxydatif au cours du sepsis**

Le rôle clé du stress oxydatif dans la pathogénèse du sepsis a été largement démontré aussi bien chez les patients septiques qu'à l'aide de modèles animaux de sepsis (Spanidis et al., 2015 ; Rahim et al., 2021).

De nombreuses études ont décrit le stress oxydatif chez les patients atteints de sepsis, avec une forte production de ROS/RNS associée à des dommages d'organes, et une déplétion d'antioxydants (Spanidis et al., 2015 ; Yamaguchi et al., 2018 ; Pahlavani et al., 2019).

Il a été aussi rapporté que le niveau de stress oxydatif est corrélé avec la sévérité de sepsis. Il est significativement plus élevé chez les patients atteints de SIRS 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). En outre, 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- $\kappa$ B (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).

### I.5. La curcumine

#### I.5.1. Définition et origine

La curcumine est un polyphénol hydrophobe extrait du rhizome d'une plante médicinale vivace appartenant à la famille des Zingiberaceae « *Curcuma domestica* Val. » Ou « *Curcuma longa* L. » (Figure 7) (Arshad *et al.*, 2017).



**Figure 7.** La curcumine, ingrédient actif 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 (**Sazaki, 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 (**Lietal., 2018**).

### **I.5.2. Pharmacocinétique**

La curcumine est hautement pléiotropique et sécuritaire, ce qui pourrait faire d'elle une molécule prometteuse dans de nombreux domaines thérapeutiques. Toutefois, la curcumine a une faible biodisponibilité en raison de sa mauvaise absorption intestinale, une métabolisation rapide par le foie et la paroi intestinale ainsi qu'une élimination systémique rapide. De fortes doses la curcumine sont nécessaires pour obtenir des dosages efficaces de curcumine dans les différentes indications thérapeutiques. En effet, une étude clinique réalisée sur 25 patients et portant sur la pharmacocinétique a rapporté que la curcumine administré oralement chez l'homme à des doses allant de 4 à 8 g/jour pendant 3 mois, conduit à des concentrations plasmatiques allant de 0,51 ( $\pm 0,11$ ) à 1,77 ( $\pm 1,87$ )  $\mu\text{M}$ . La concentration sérique atteint un maximum 1 à 2 heures après l'absorption orale puis décline rapidement (**Purpura et al., 2017**).

Dans une étude réalisée chez 15 sujets ayant consommé 0,45 à 3,6 g/jour de curcumine durant 4 mois, la curcumine n'était pas détectée dans le sérum des patients ayant consommé de faibles doses. Pour de fortes doses de curcumine 10g et 12g, ( $35,33 \pm 3,78 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) pour la dose de 10g plutôt que pour 12 g ( $26,57 \pm 2,97 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), cela pourrait indiquer une saturation du mécanisme de transport dans l'intestin pour la curcumine libre. De plus, la concentration sérique maximale ( $C_{\text{max}}$ ) pour la dose de 10g était de  $2,30 \pm 0,26 \mu\text{g} / \text{mL}$  comparé à  $1,73 \pm 0,19 \mu\text{g} / \text{mL}$  pour la dose de 12 g (**Sahebkar et al., 2014**).

### **I.5.3. 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**).

Il a été démontré que la curcumine présente des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Elle a également des activités hépatoprotectrices et néphroprotectrices, protège contre l'infarctus du myocarde et possède des propriétés hypoglycémiantes et antirhumatismales (Anand et al., 2008 ; Sazaki, 2012 ; Subhan et al., 2014).

En outre, la curcumine possède une large gamme d'activités biologiques, elle est un bon antioxydant (la curcumine est dix fois plus antioxydant que la vitamine E), et inhibe la peroxydation lipidique qui joue un rôle important dans l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Aussi, la curcumine agit comme un piègeur de radicaux libres. Elle protège l'hémoglobine de l'oxydation *in vitro*, la curcumine peut inhiber significativement la génération des espèces réactives de l'oxygène, comme les anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sui et al., 1993 ; Cheikh Ali, 2014 ; Martin, 2016).

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-κB, 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-κB (*nuclear factor-kappa B*) et AP-1 (*activatorprotein 1*) (Tabrizi et al., 2019) et Nrf-2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), qui conduisent respectivement à inhibition de l'inflammation et le stress oxydatif (Xie et al., 2017).

## **Chapitre II : Matériels 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 15 Mars au 04 juillet 2021.

Notre travail a porté sur :

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

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Pathologie Moléculaire, nous devons réaliser un travail de recherche sur les altérations pulmonaires 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 pulmonaires (LDH). 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 2**.
- 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 and Puncture*) en utilisant des souris NMRI albinos.

### Animaux

Le modèle murin de sepsis a été réalisé sur des souris NMRI albinos mâles (n=25), 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 de sepsis par ligature et ponction cœcale (CLP)**

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**).

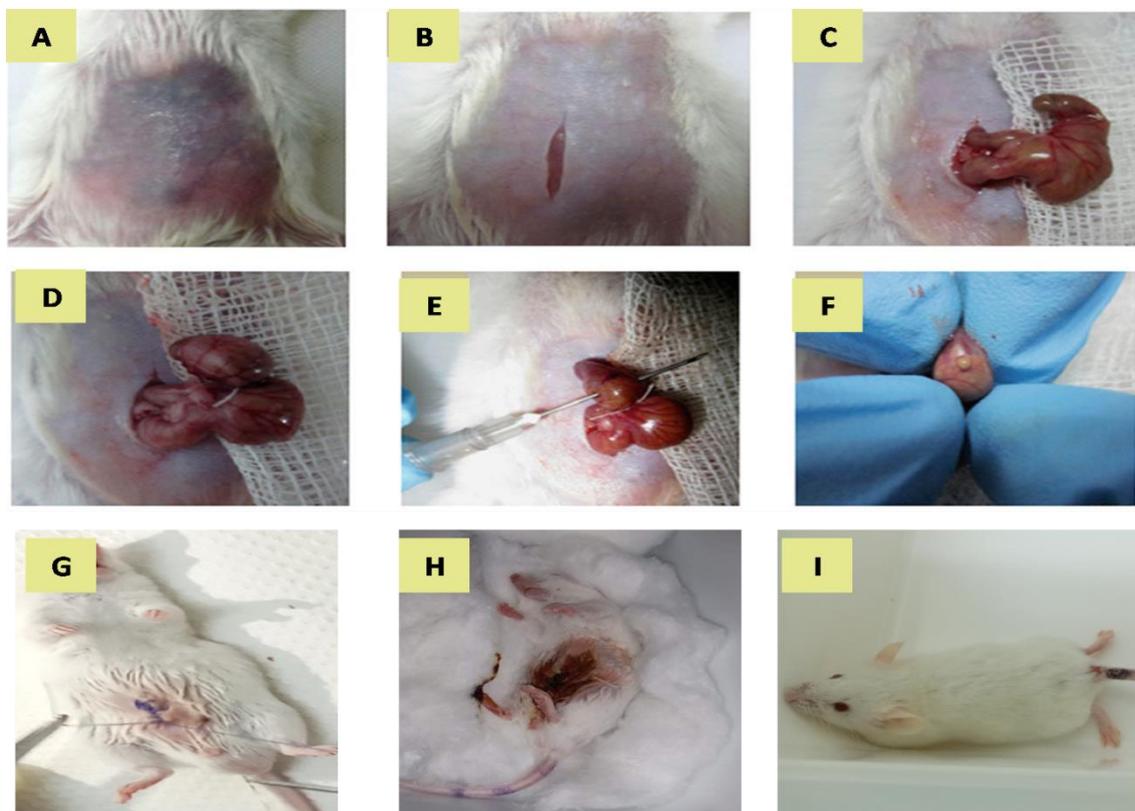
Il s'agit d'une ligature et d'une ponction cœcale (CLP). Ce modèle, décrit il y a plus de trente ans, consiste à exposer le cæcum pour le ligaturer puis le perforer avec une aiguille. Ce modèle comporte à la fois une infection bactérienne mais également une atteinte ischémique du tube digestif (**Bouroche, 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-cæcale 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 8.** Etapes critiques de CLP induit chez la souris. A : Désinfection de la zone abdominale après rasage. B : Incision abdominale médiane de 1 cm. C : Exposition du cæcum. D : Ligature du cæcum sous la valve iléo-cæcale.(E) Ponction cæcale trois fois avec une aiguille de calibre 22. (F) Libération d'une petite quantité de selles des sites de ponction. (G) et (H) Suture et désinfection de l'incision abdominale par du Betadine. (I) Réanimation de la souris après CLP.

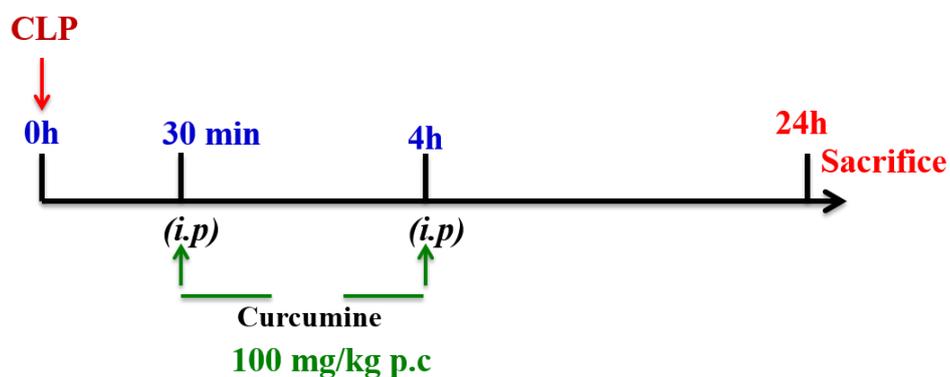
### **II.2.2. Protocole pharmacologique**

Les souris NMRI albinos ont été réparties en trois lots (**Figure 9**):

1. Lot Contrôle : n'ayant reçu aucun traitement.
2. Lot septique (CLP) : ayant subi une CLP.
3. Lot septique traité à la curcumine (CLP-Cur) : 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 : poumon, 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.



**Figure9.** Protocole expérimental chez les souris NMRI albinos.*i.p* : voie intrapéritonéale.p.c : poids corporel.

### II.2.3. Etude biochimique

#### II. 2. 3. 1. Préparation de l'homogénat tissulaire

Les tissus pulmonaires 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.2. 3. 2. Dosage des protéines

La concentration des protéines pulmonaires 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 SerumAlbumin*) à 0.1% (**Bradford, 1976**).

### **II.2. 3. 3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif**

Nous avons recherchés deux marqueurs biochimiques du stress oxydatif, à partir des homogénats de tissus pulmonaire 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. 2.3. 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 pulmonaire sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant : 375µL d'acide acétique 20% pH 3.5, 375µL d'acide thiobarbiturique à 0.8%, 50µL de sodium dodecylsulfate à 8,1%. Le volume réactionnel est complété à 1.0 ml avec de l'eau distillée est incubé à 95°C pendant 1heure.

La réaction est arrêtée par un refroidissement rapide à 0°C et une centrifugation à 3000g pendants 10 min et à 4°C. La densité optique est mesurée à 532 nm et les résultats sont exprimés en nmoles/mg de protéine (**Rozenberg et al., 2006**).

#### **II. 2. 3. 3. 2. Dosage de l'activité catalase**

La catalase est une enzyme ubiquitaire localisée dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elle catalyse la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène.

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.

50µl d'homogénat tissulaire sont mélangés à 950 µL de tampon phosphate 50mM, pH 7.0. 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, elle est exprimée en U/min/mg de protéines (Aebi, 1984).

Une unité de catalase correspond à  $K/6,93 \times 10^3$ .  $K = (2,3/t) (\log A1/A2)$  où t : temps en seconde ; A1 : Absorbance à temps zéro et A2 : Absorbance à 2 minutes.

### **II.2.4. 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.2.5. Etude histologique**

L'étude histologique a été réalisée sur le foie, la rate et le mésentère. Les poumons et les rates des souris furent découpés puis fixés dans du formol tamponné à 4% pendant 24h. Les pièces ont été déshydratées par passage successifs dans des bains d'alcools à degrés croissants (70°, 90° et 100°) suivis d'un bain de toluène (Martoja et Martoja, 1967).

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 (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'hématoxyline-éosine.

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 2**.

### **II.2.6. Etude statistique**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le logiciel GraphPadPrism v. 6.0 est 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 discussions**

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 pulmonaires induites par sepsis.

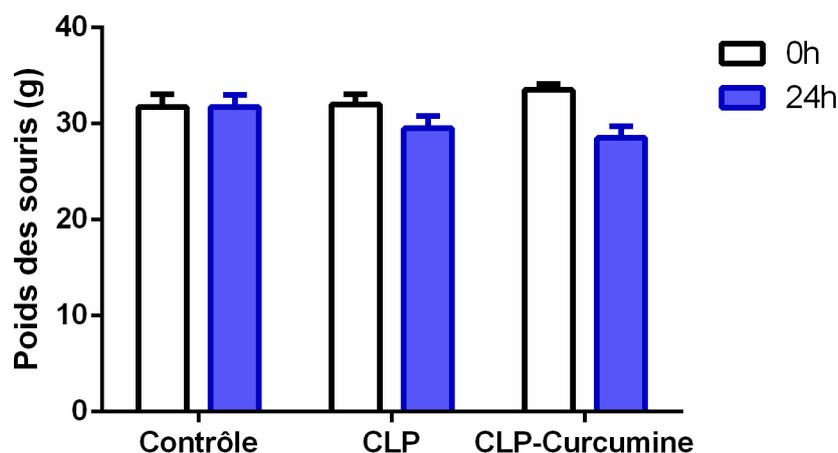
- Ensuite, nous étudions les altérations histologiques induites par sepsis dans le poumon, la rate et le mésentère.

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

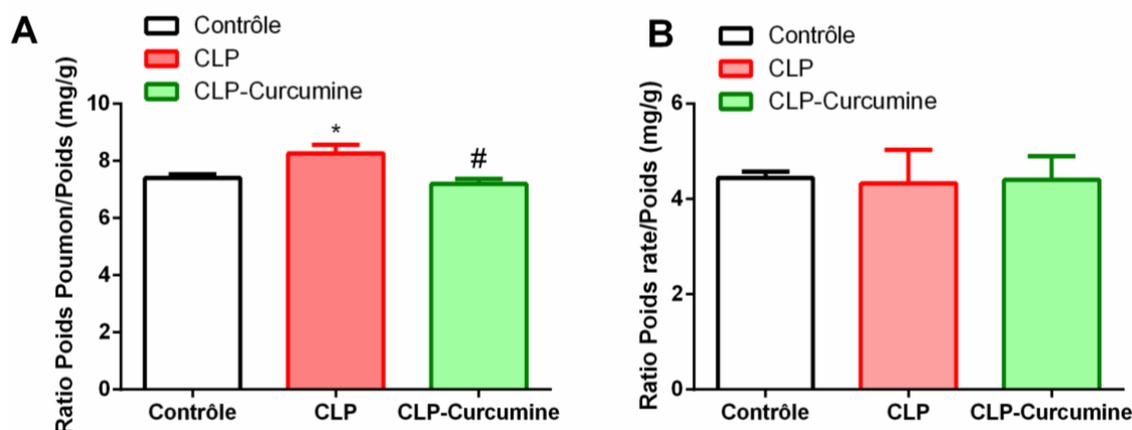
### III.1. Résultats

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

La perte de 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. Les résultats de l'effet du sepsis sur le poids des souris, du poumon et de la rate sont illustrés dans les figures 10 et 11.



**Figure 10.** Effet des différents traitements sur le poids des souris NMRI albinos.



**Figure 11.** Effet des différents traitements sur le poids du poumon et de la rate. **A**, ratio poids des poumons / poids des souris. **B**, ratio poids de la rate/ poids des souris. \* $P < 0.05$  vs lot contrôle ; # $P < 0.05$  vs lot CLP.

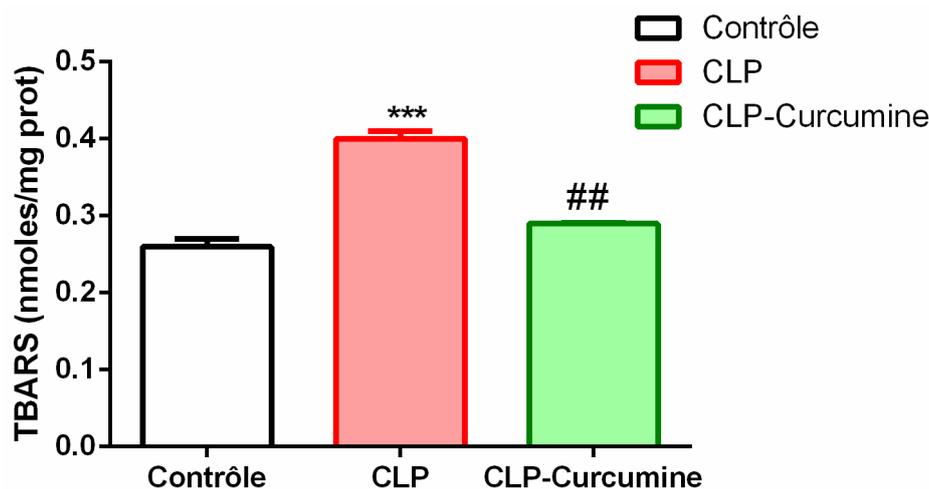
Les résultats de notre étude montrent que le poids des souris contrôle reste inchangé après 24h alors qu'on observe une légère diminution non significative chez les souris septiques et septiques traités à la curcumine (**Figure 10**). Nos résultats sont différents des travaux de **Rozenberg et al. (2006)** et **Rahim (2009)** dans d'autres modèles de sepsis, et qui ont démontré une diminution du poids des animaux septiques. 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.

Nous avons également observé une augmentation de 11.6% du poids des poumons alors que le poids de la rate reste inchangé chez les souris septiques comparés aux souris contrôle (**Figure 11**). Ces résultats suggèrent une augmentation du volume des poumons des souris septiques signe de réponse immunitaire et inflammatoire.

La curcumine diminue le poids des poumons des souris septiques au taux contrôle (**Figure 11A**).

### III.1.2. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de MDA pulmonaire

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



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

Le taux basal de MDA pulmonaire est de  $0,260 \pm 0.01$  nmoles/mg de prot chez les souris contrôle. Ce taux augmente significativement de 53.8% ( $0.400 \pm 0.01$  nmoles /mg de prot) chez les souris septiques (**Figure 12**).

Le traitement par la curcumine diminue le taux de MDA aux taux contrôle, il est de  $0.29 \pm 0.001$  nmoles /mg de prot (**Figure 12**). Nos résultats sont similaires à ceux de plusieurs travaux réalisés dans différents modèles animaux de sepsis (**Sompamit et al., 2009 ; Rahim et al., 2012 ; Kostakoglu et al., 2020 ; Wang et al., 2020**).

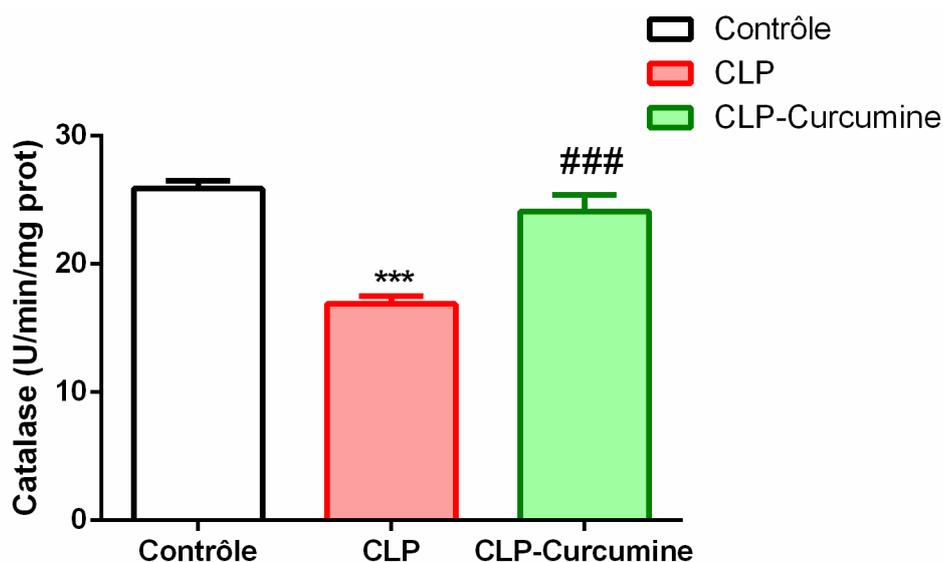
Le sepsis est caractérisé par un stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre les oxydants, tels que les ROS et les RNS, et des composés antioxydants, tels que la glutathion réductase et la superoxydedismutase (**Andrades et al., 2009**). Cet état hyperoxydant endommage les lipides et les protéines, altère la fonction cellulaire normale et induit l'apoptose. Le stress oxydatif induit la peroxydation des lipides membranaires, ce qui génère divers produits finaux de décomposition tels que le malondialdéhyde (MDA). Le MDA est un aldéhyde de faible poids moléculaire résultant d'attaques de radicaux libres sur des acides gras polyinsaturés lors de la dégradation de phospholipides membranaires cellulaires (**Draper et Hadley., 1990; Dalle-Donne et al., 2006**). L'induction de la peroxydation lipidique lors du sepsis a été largement démontré chez l'Homme et dans divers modèles animaux (**Rahim, 2009 ; Lorente et al., 2013 ; Toufekoula et al., 2013 ; Lorente, 2015**).

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. 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 (Sompanit et al., 2009) et la catalase (Su et al., 2004).

### III.1.3. Effet du sepsis et de la curcumine sur l'activité catalase pulmonaire

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



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

L'activité catalase basale était de  $25,9 \pm 0,6$  U/min/mg de prot. Elle diminue de 34,7% soit  $16,9 \pm 0,6$  U/min/mg de prot chez les souris septiques (Figure 13).

La curcumine rétablit l'activité catalase aux taux contrôle et qui est de  $24,1 \pm 1,3$  U/min/mg de prot (Figure 13).

La catalase est une enzyme antioxydante 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.

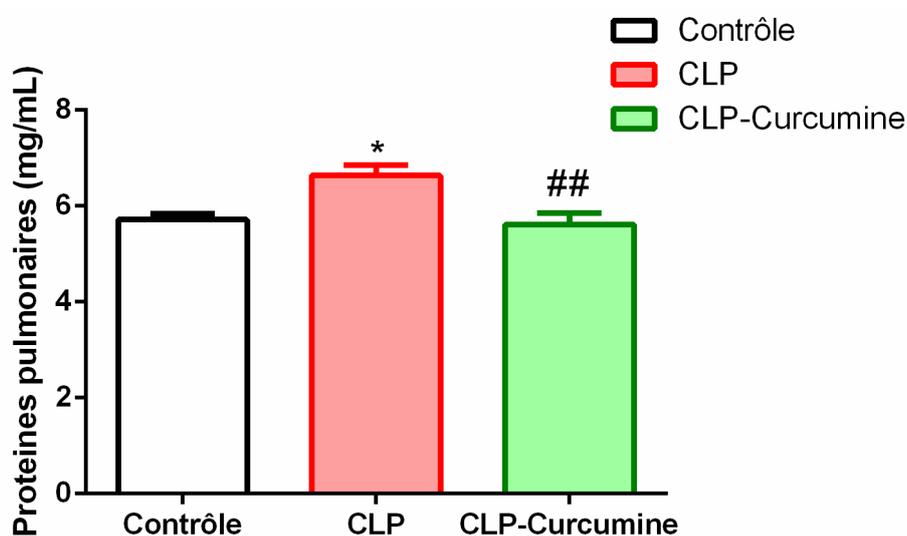
La diminution de l'activité catalase pourrait indiquer un état de stress oxydatif instauré lors du sepsis. Ces résultats sont en accord avec différents travaux effectués sur différents modèles animaux de sepsis (Rahim *et al.*, 2012 ; Ibrahim *et al.*, 2020).

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.1.4. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de protéines pulmonaires

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



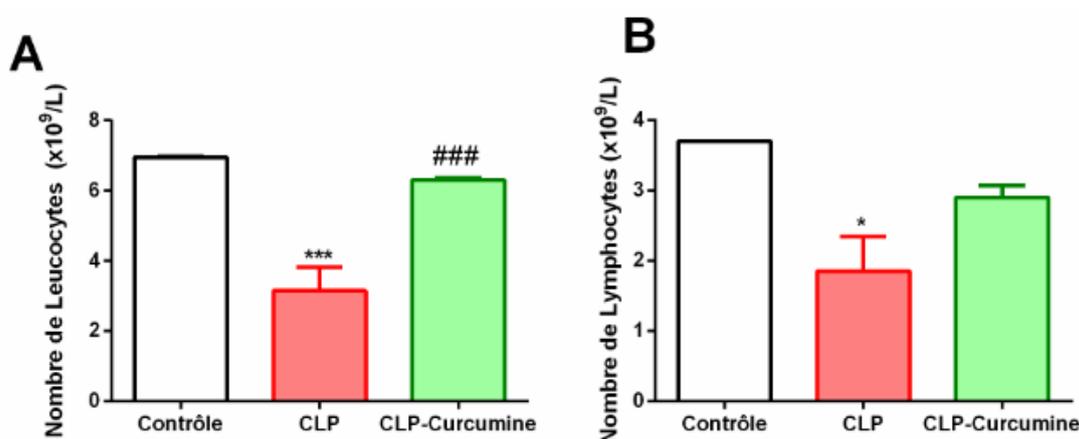
**Figure 14.** Taux de protéines pulmonaires chez les souris NMRI albinos. \* $P < 0.05$  vs lot contrôle; ## $P < 0.01$  vs lot CLP.

Le taux de protéine pulmonaire basal est de  $5,72 \pm 0,12$  mg/mL. Il augmente de 16,1% et atteint  $6,764 \pm 0,21$  mg/mL, chez les souris septiques. Ce taux retourne aux taux basal après traitement par la curcumine, il est de  $5,62 \pm 0,24$  mg/mL (Figure 4).

Ces résultats suggèrent la présence d'œdème pulmonaire chez les souris septiques et qui est inhibé par le traitement par la curcumine.

### III.1.5. Effet du sepsis et de la curcumine sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins

Les résultats des taux de leucocytes et de lymphocytes et du frottis sanguin sont représentés dans les figures 15 et 16.



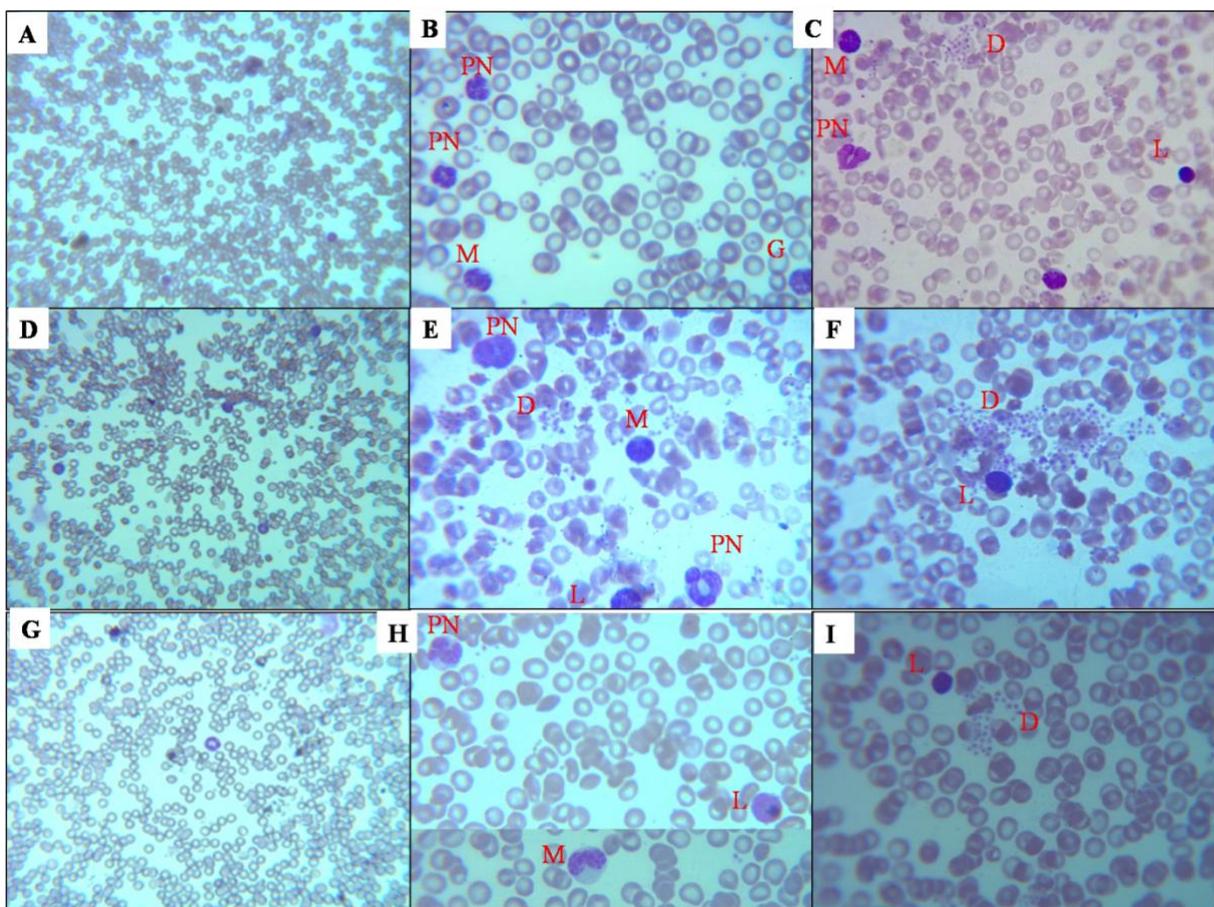
**Figure 15.** Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang. **A**, taux de leucocytes sanguins. **B**, taux de lymphocytes sanguins. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs lot contrôle ; ### $P < 0.001$  vs lot CLP.

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 15). 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.

La curcumine a augmenté le taux des lymphocytes 2 fois et les leucocytes par 28,93% par rapport au CLP, elle a aussi diminué le taux des leucocytes avec 20,7% par rapport au contrôle (Figure 15).

Ces résultats ne corroborent pas avec ceux du frottis sanguin qui montrent une augmentation du taux de leucocytes chez les souris septiques comparés aux souris contrôle (**Figure 16C-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 16C et E**) et une dégranulation des granulocytes (**Figure 16C et F**). La curcumine réduit le nombre de leucocytes aux taux similaires aux contrôles (**Figure 16G-I**). On observe une activation réduite des leucocytes et un taux de granules réduit comparé aux frottis des souris septiques (**Figure 16H 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.



**Figure16.** 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.1.6. Etude histologique

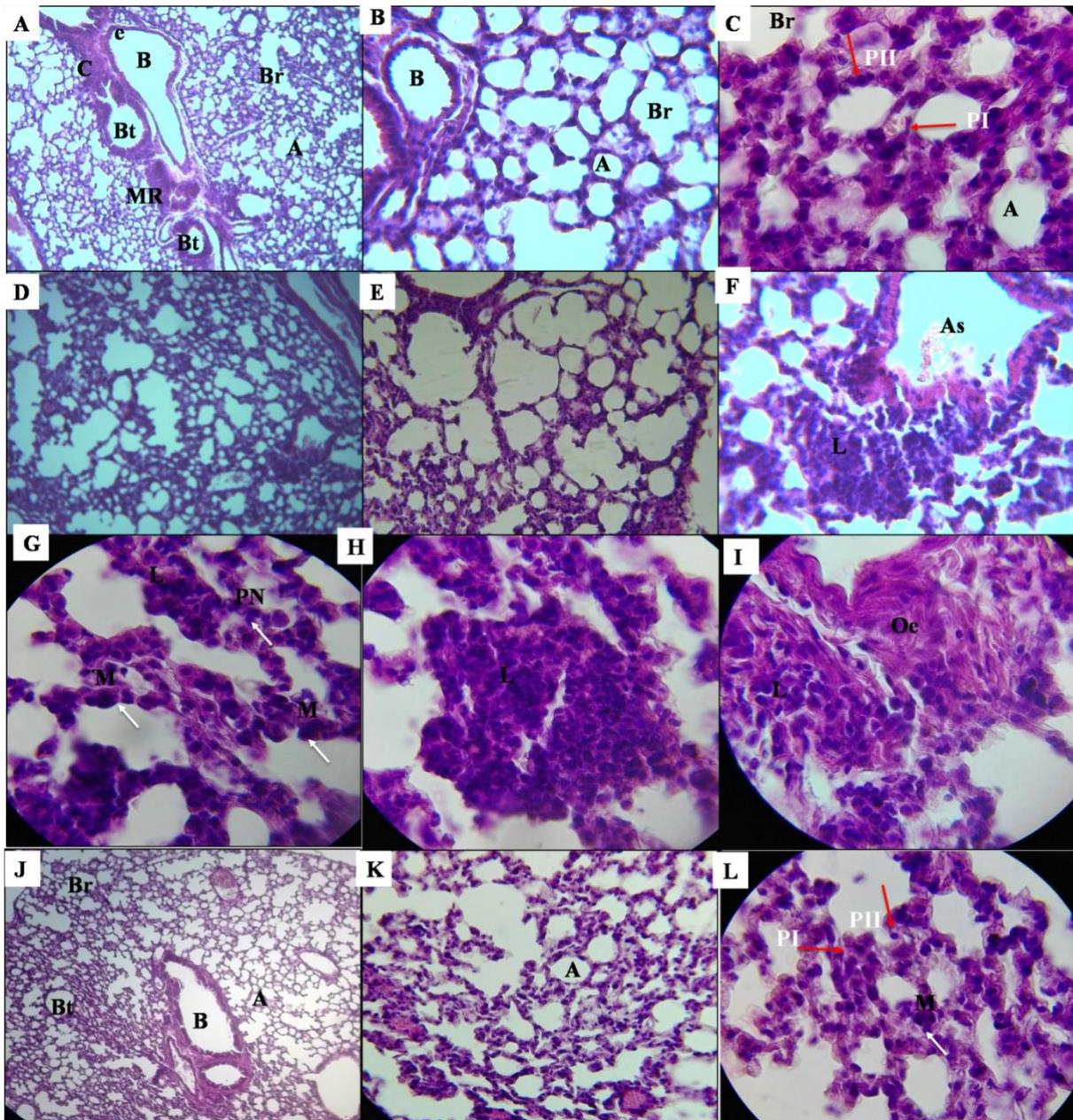
#### ✓ Effet du sepsis et de la curcumine sur l'histologie pulmonaire

L'ensemble des résultats histologiques montrent une architecture normale du tissu pulmonaire chez les animaux sans lésions tissulaires ou modifications structurales. La paroi alvéolaire est intacte, la lumière alvéolaire est bien visible et les cloisons inter-alvéolaires sont régulières. On note aussi, la présence des pneumocytes I et II, ainsi que les macrophages alvéolaires (**Figures 17 A-C**).

Les animaux septiques montrent des anomalies structurales caractérisées par une destruction de l'architecture du tissu pulmonaire, une altération des parois alvéolaires, un rétrécissement de la lumière alvéolaire, une diminution significative du nombre des sacs alvéolaires (**Figures 17D et E**), une infiltration massive des leucocytes, une activation des macrophages alvéolaires (**Figures 17F, G et H**) associées à un Œdème interstitiel et alvéolaire pulmonaire (**Figure 17F et I**).

Le traitement par la curcumine réduit les dommages induits par sepsis et préserve l'architecture du tissu pulmonaire avec une architecture similaire à celle des animaux contrôle. On note en comparaison avec les animaux septiques une diminution de l'infiltration leucocytaire, des lésions parenchymateuses avec une paroi alvéolaire moins épaisse, une lumière alvéolaire plus grande et un nombre de sacs alvéolaires plus élevé. Ainsi, la curcumine protège les tissus pulmonaires des lésions et des dommages oxydatifs et inflammatoires induits par sepsis (**Figures 17J, K et L**).

Ces résultats concordent à ceux des travaux réalisés sur d'autres modèles animaux de sepsis (**Xiao et al., 2012 ; Tyagi et al., 2014 ; Aziz et al., 2018**).



**Figure 17.** Effet de la curcumine sur les dommages pulmonaires induits par CLP chez les souris NMRI albinos. Coloration à l'hématoxyline et de l'éosine HE. A (Gx100), B (Gx400) et C (Gx1000): Micrographie d'une coupe transversale du poumon de souris contrôle. D (Gx100), E et F (Gx400) et G, H et I (Gx1000): Micrographie d'une coupe transversale du poumon de souris septiques. G (Gx100), K (Gx400) et L (Gx1000): Micrographie d'une coupe transversale du poumon de souris contrôle de souris septiques traitées par la curcumine. A: Alvéoles, As: Artère satellite, B: Bronche, Br: Bronchiole respiratoire, Bt: Bronchiole terminale, C: Cartilage, e: épithélium, L: Leucocyte, M: Macrophage alvéolaire, MR: Muscle de Reissessen, Oe: Œdème, PI: Pneumocyte type I, PII: Pneumocyte type II, PN: Polynucléaire neutrophile.

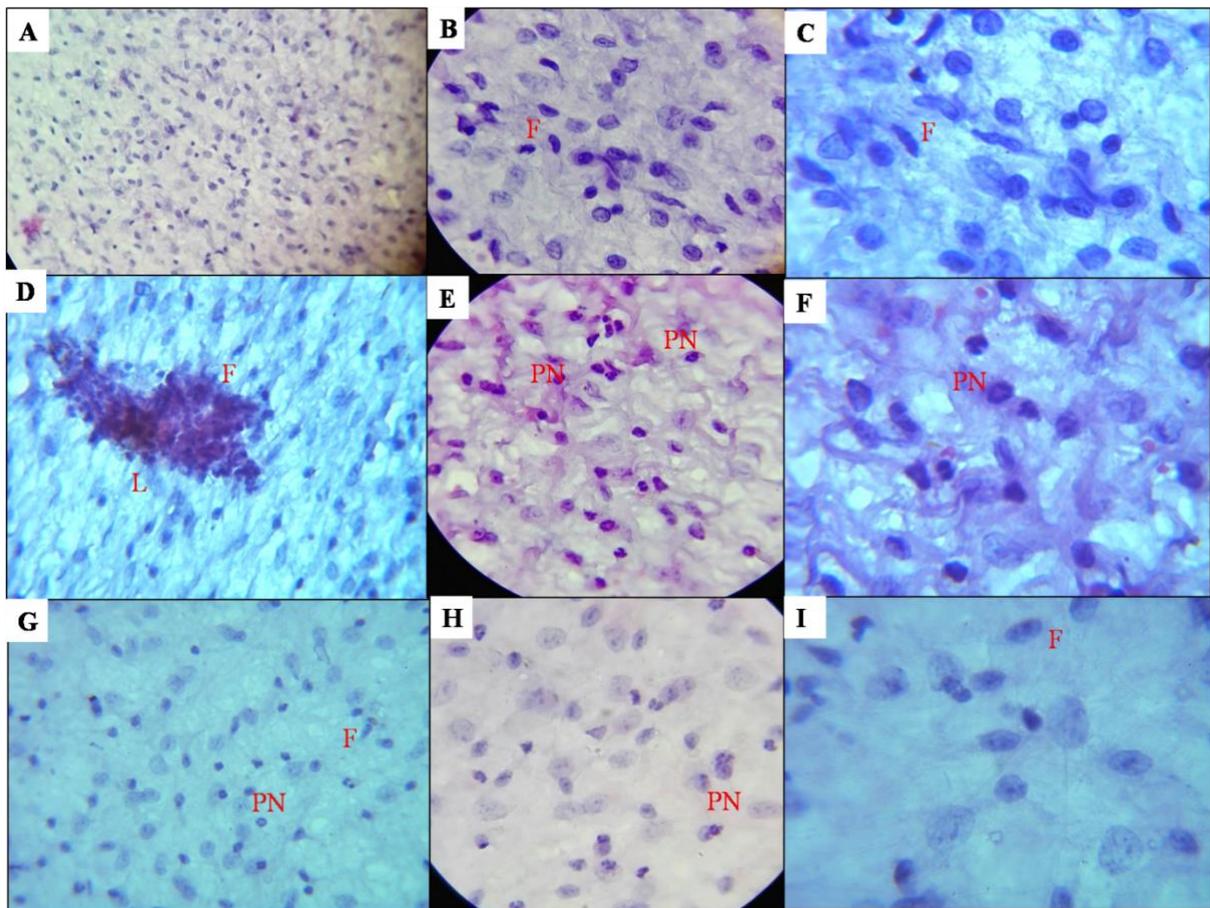
✓ *Effet du sepsis et de la curcumine sur l'histologie du mésentère*

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 18A-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 18D**) et une importante infiltration leucocytaire, principalement des polynucléaires neutrophiles (**Figure 18E 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 18G-I**).



**Figure 18.** 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.

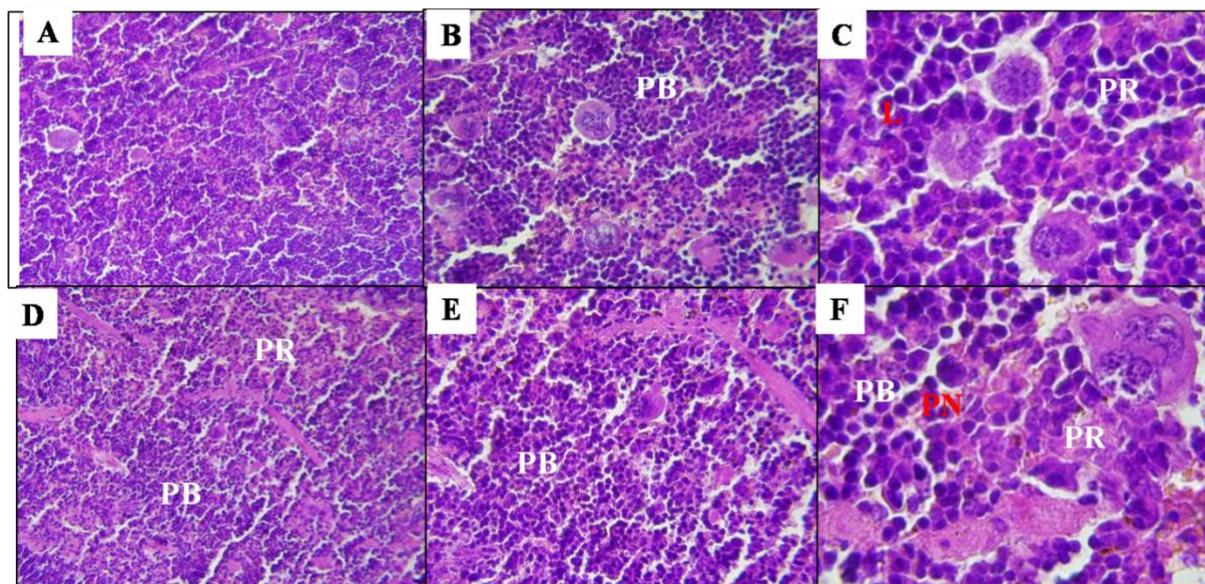
✓ *Effet du sepsis sur l'histologie de la rate*

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 19A-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 blanche présente une infiltration massive de polynucléaires et de macrophages (**Figure 19D-F**).



**Figure 19.** 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. Fibroblaste, 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 pulmonaires 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 poumon est un organe sensible et considéré comme le premier organe majeur touché par le sepsis. L'atteinte pulmonaire durant le syndrome septique conduit à des lésions pulmonaires aiguës (ALI, *acute lung injury*) ou à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*), une forme plus sévère que ALI (Phua et al., 2002 ; Bao et al., 2010 ; Chen et al., 2018).

L'ALI/ARDS sont associés à une mortalité importantes chez les patients (Xiao et al., 2012). Il résulte d'une réponse aux infections microbiennes pulmonaires ou systémiques. Les PAMPs ou les MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) ou même les DAMPs (*Damage or*

*danger-associatedmolecular 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-I, 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 délétère 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 pulmonaires entraînant ainsi une anergie des mécanismes de défense de l'hôte, des lésions pulmonaires et une défaillance rapide du poumon et enfin une mortalité (Idell, 2012 ; Chen et al., 2014 ; Wang et al., 2019).

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 lors du sepsis conduit à une infiltration incontrôlée des poumons par les neutrophiles. Les Neutrophiles activées produisent des ROS/RNS, des cytokines, des chimiokines, de la myéloperoxydase (MPO), et des NETs (*neutrophil extracellular traps*) dans le but d'éliminer le pathogène. Ces produits à l'augmentation et au maintien de la réponse inflammatoire, au dysfonctionnement pulmonaire (Delgado-Rizo et al., 2017 ; Aziz et al., 2018).

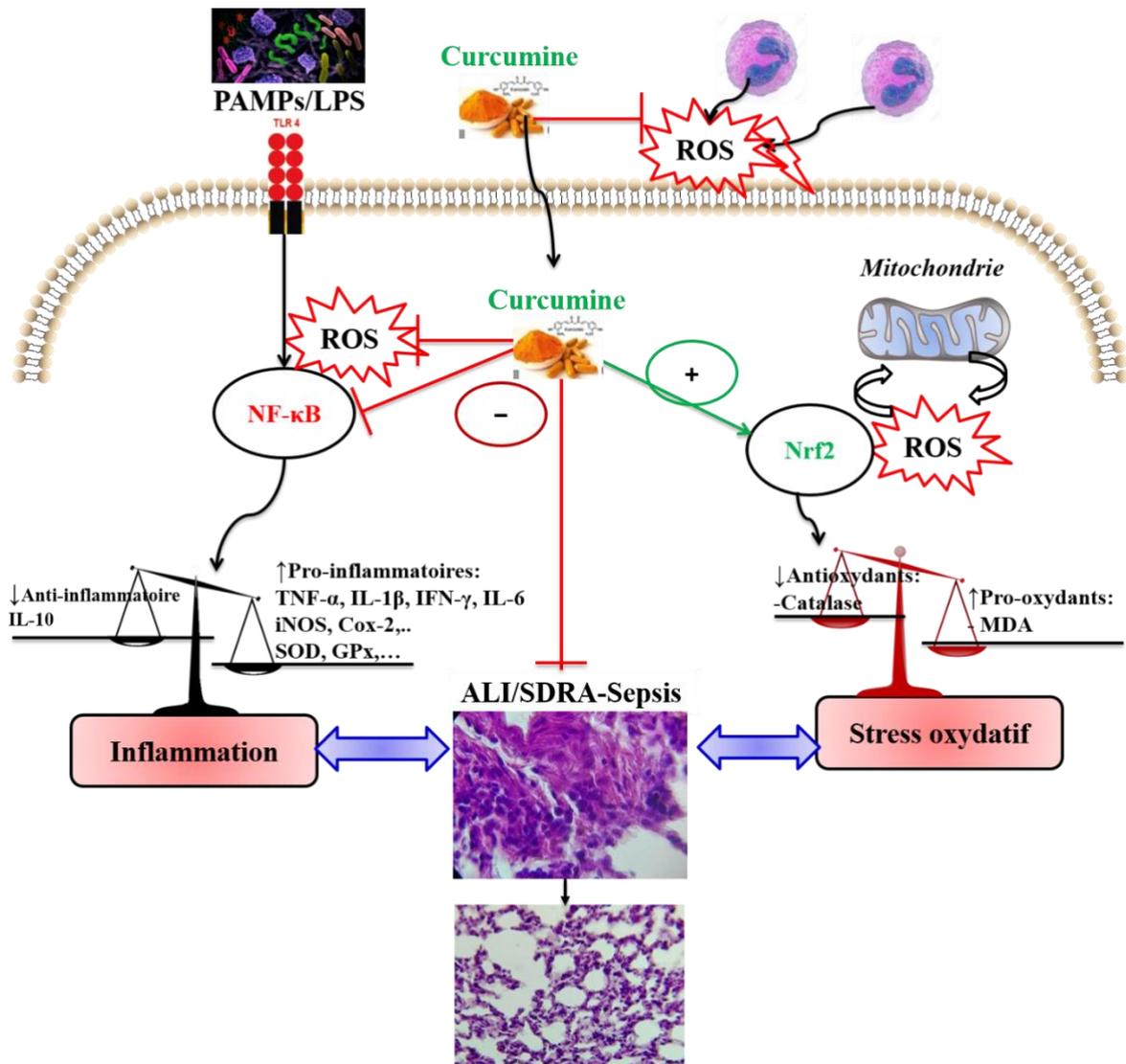
Cependant, la production de ROS augmente également dans les macrophages, les cellules endothéliales et épithéliales du tissu pulmonaire (**Valavanidis et al., 2013**). Les ROS/RNS libérées amplifient la réponse inflammatoire, et endommagent les constituants cellulaires (ADN, lipides, protéines) conduisant à des lésions cellulaires et à des dommages pulmonaires (**Wang et al., 2019 ; Xu et al., 2019**).

En outre, les ROS/RNS activent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B amplifiant ainsi la réponse inflammatoire et le stress oxydatif (**Zhou et al., 2001 ; Horton, 2003**).

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

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 (**Sompamit et al., 2009 ; 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 pulmonaires sepsis-dépendants (**Figure 20**) (**Xiao et al., 2012 ; Tyagi et al., 2014**).

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 20.** Effet de la curcumine dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis.

# **Conclusion**

L'étude de l'effet du sepsis et de la curcumine dans notre modèle de souris NMRI albinos suggère :

Une implication du stress oxydatif dans les dommages oxydatifs pulmonaires induits par sepsis caractérisé par une augmentation de marqueurs pro-oxydants (MDA), et une diminution de marqueur antioxydant enzymatique (catalase). Ce stress oxydatif est associé à des dommages oxydatifs pulmonaires.

Une activation de la réponse immuno-inflammatoire caractérisée par une forte infiltration leucocytaire dans le poumon, 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**

- Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. (2009). The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci Elite Ed*; 1: 277-87
- Arnalich F, García-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.
- Bedirli A, Kerem M, pasaoglu H, Akyurek N, Tezcaner T, Elbey S, Memis L, Sakrak O. (2007). Bêta-Glucan attenuates inflammatory cytokine release and prevents acute lung injury in an experimental model of sepsis. *The european society for surgical research*, 27(4), 397-401.
- Bosmann MA ET Peter A. Ward. (2013). The inflammatory response in sepsis. The University of Michigan Medical School, Department of Pathology, USA.
- Cardoso-Sousa L, Aguiar E, Caixeta D, Vilela DA, Costa D, Silva T, Cunha TH, Faria P, Espindola F, Jardim A, Vieira AL, Oliveriara T, Goulart L, Sabino-Silva R, Mukhopadhyay P. (2019). Effects of salbutamol and phlorizin on acute pulmonary inflammation and disease severity in experimental sepsis. *Plos one*, 14(9), e0222575.
- Chen X, Cai X, Le R, Zhang M, Gu X, Shen F, Hong, Chen Z. (2018). Isoliquiritigenin protects against sepsis-induced lung and liver injury by reducing inflammatory responses, 496, 245-252.
- Choudhury S, Kandasamy K, Maruti BS, Addision M, Kasa JK, Darzi S, Singh TU, Parida S, Dash JR, Singh V, Mishra SK. (2015). Atorvastatin along with imipenem attenuates acute lung injury in sepsis through decrease in inflammatory mediators and bacterial load. *European Journal of Pharmacology*, 765, 447-456.
- Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, Bugger H. (2015). Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. *Int. J Mol Sci*; 16:17763-17778.
- Cinar IR, Sirin BU, Aydin PE, Toktay ER, Cadirci E, Halici I , Halici Z. (2019). Ameliorative effect of gossypin against acute lung injury in experimental sepsis model of rats. *Life Sciences*. 221, 327-334.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A.(2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*;52(4): 601-23
- Danielski LG, Giustina AD, Bonfante S, Barichello T, & Petronilho F. (2020). The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development. *Inflammation* ; 43 (1): 24-31.
- Draper HH, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*; 186: 421-31

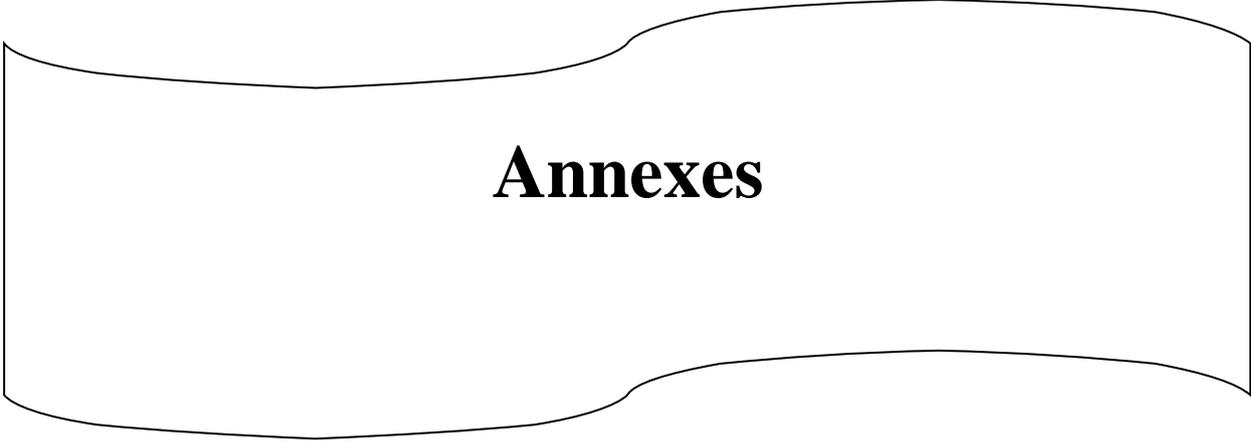
- Fan J, Ye RD, Malik AB. (2001). Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* ; 281:1037-1050.
- Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. (2009) .Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin* ; 25(1) : 83–101.
- Grimaldi DA. (2014). Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression postinfectieuse. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes – Paris.
- Hong GU, Zheng D, Zheng L, Ni RU, Wang GR, Fan GU, Lu Z, Peny TI. (2018). Administration of of nicotinamide riboside presents oxidative stress and organ injury in sepsis. *Free radical biology and medicine*, 123, 125-137
- Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, Nguyen-Khoa T, Conti M, Vicaut E, Mira JP, Duranteau J. (2007). Plasma-induced endothelial oxidative stress related.
- Ibrahim Y, Moussa RA, Bayoumi A, Ahmed A. (2020). Tocilizumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of sepsis via down-regulation of NFKb/JNK : possible role of P-glycoprotein. *Inflammopharmacology*, 28(1), 215-230.
- Kingir ZE. (2018). Effects of dopagliflozin on experimental sepsis model in rats. *Turkish journal trauma and emergency surgery*, 25, 213-221.
- Kirschvink N , Moffarts B , Lekeux P .(2008). The oxidant / antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*; 177:178-191.
- Kostakoglu U, Topcu AT, Atak M, Tumkaya LE, Mecantepe TO, Uydu HU. (2020). The protective effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor against cecal ligation and puncture-induced sepsis via oxidative stress and inflammation. *Life Sciences*, 241, 117051.
- 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.
- Laroye C, Gibot S, Reppel L, Bensoussan D. (2017). Mesenchymal Stromal/Stem Cells: A New Treatment For Sepsis And Septic Shock? . *Stem Cells* ; 35(12):2331-2339.
- Lefevre G, Beljean-Leumarie M, Beyerle F, Bowefont-Rousselot D, Cristol JP, Therond P, Torreilles J. (1998). Evaluation of lipid peroxydation by assaying the thioharbituric-acidereactive substances. *Annales de biologie clinique*, 56(3), 305-319.
- Leetjens J, Kox M, Van der hoeven J, Netea M, Pikkers. (2013). Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis : From immunosuppression to immunostimulation, Time for paradigm change ? *Pubmed*, 23590272.

- Li ZE, Jia Y, Freng YA, Cui R, Miao R, Zhang XI, Qu K, Liu CH, Zhang JI. (2019). Melatonin alleviates sepsis-induced injury by inhibiting pyroptosis and apoptosis in vivo and in vitro experiments. *Aging*, 11(4), 1226-1239.
- Lin WH, Chen CW, Huang YW, Chao L, Lin YS, Lin CF. (2015). Kallistatin protects against sepsis-related acute lung injury via inhibiting inflammation and apoptosis. *Scientific reports*, 5, 12463.
- Liu SF, Malik AB. (2006). NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* ; 290:622-645.
- Lorente LE, Martín MA M, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez AL, Labat LO, Díaz CE, Solé-Violán JO, Ferreres JO, María Borreguero-León JU, Jiménez AL, and MoreraFumero AR . (2013). Prognostic Value of Malondialdehyde Serum Levels in Severe Sepsis: A Multicenter Study. *PLoS One* ; 8(1) : e53741.
- Lorente LE. (2015).New Prognostic Biomarkers of Mitochondrial Oxidative Stress in Septic Patients. *Archives of Critical Care Medicine*; 1 (2)- e3125.
- Migdal C et Serres M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)*, 27(4), 405-412.
- Molina VI, Dessauer BE, Rodrigo RA & Carvajal CR. (2017) Oxidative stress biomarkers in pediatric sepsis : a prospective observational pilot study. *REDOX REPORT* ; VOL : 22, NO. 6, 330–337.
- Motoyama, Takeshi MD, Okamoto, Kazufumi MD, Kukita, Ichirou MD, Hamaguchi, Masamichi MD, Kinoshita, Yoshihiro MD, Ogawa, Hisao MD. (2003). Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome, 31 (4), 1048-1052.
- Napolitano Lena M. Sepsis. (2018). Definitions and Guideline Changes. *SURGICAL INFECTIONS*; Vol: 19, Number 2. □ Nathan C. (2002).Points of control of inflammation. *Nature*; 420: 846–852.
- O'Neill, L., D. Golenbock et A.G. Bowie (2013). The history of Toll-like receptorsredefining innate immunity. *Nature Reviews | Immunology*.Volume 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.
- Pahlavani N, Sedaghat A, Bagheri Moghaddam A, Mazloumi Kiapey S, Navashenag J, Jarahi L, Reazvani R, Nourouzy A, Nematy M, Safarian M, Ghayour-Mobarhan M. (2019). Effects of propolis and melatonin on oxidative stress, inflammation, and clinical status in patients with primary sepsis: Study protocol and review on previous studies. *Clinical NutritionESPEN*, 33, 125-131.

- Pang J, Zheng Y, Han Q, et al. (2019). The Role of ALDH2 in Sepsis and the To-Be Discovered Mechanisms. *Adv Exp Med Biol* ; 1193:175-194.
- Papurica M, Rogobete AF, Sandesc D, Dumache R, Nartita R, Sarandan M, Cradigati AC, Luca L, Corina Vernic C, and Bedreag1 OH. (2015) .Redox Changes Induced by General Anesthesia in Critically Ill Patients with Multiple Traumas. *Molecular Biology International* ; 2015 : 11 .
- Poujol FA. (2016).Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et clinique des altérations lymphocytaire induites lors des syndromes septiques, Université Claude Bernard –Lyon 1
- 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.
- Rahim I, Djerjouri B, Sayed RK, Fernandez-Ortiz M, Fernandez-Gil B, Hidalgo-Gutiérrez A, Lopez LC, Escames G, Reites RJ, Acuna-Castroviego D. (2017). Melatonin administration to wild type mice and nontreated NLRP3 mutant mice share similar inhibition of inflammatory reponse during sepsis. *Journal of pineal research*, 63(1), e12410.
- 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.
- 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.
- Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC. (2019).Sepsis: evolving concepts and challenges ; 52(4): e8595.
- Sano R et Reed JC. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1833: 3460–3470.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al.(2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis3) . *JAMA*; 315:801-810.
- 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.
- Toufekoula RH, Papadakis VA, Tsaganos TH, Routsis CH , E Orfanos ST , Kotanidou AN , Carre DI , Raftogiannis MA, Baziaka FO and Giamarellos-Bourboulis EV.(2013). Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram C –

negative bacteria: experimental and clinical evidence. *Critical Care*;17.

- Van der poll T, Marol L. (2017). Coagulation and sepsis. *Thrombosis research*, 149, 38-44.
- Verdonka FR, Alice BL, and Alexandre ME. (2017). The new sepsis definition: limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis; Vol: 30-2.
- Vijay K. Toll-likereceptors in immunity and inflammatorydiseases: past, present, and future. *Int Immunopharmacol.* (2018)59:391–412. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.002
- Wang WA, Yang XI, Chen QI, Guo MI, liu S, Liu J, Wang JI, Huang FE. (2020). Sinomenine attenuates septic-associated lung injury through the Nrf2-keap1 and autoplgy. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 72(2), 259-270.
- Weiss SL et Deutshman CS. (2014). Elevated malondialdehyde levels in sepsis-something to 'stress' about ? *Critical Care.* 18(2), 1-2.
- Yamaguchi J, Nagase M, Yamamoto Y, Sakurai A, Kubo A, Mitsuhaski H, Matsuoko M, Ihara S, Kinoshita K. (2018). Increased oxidative stress and renal injury in patients with sepsis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 63(2), 137-143.
- Ye L, Zheng Z, Jiang L, Gao Y, Tang L, Zhang M. (2015). The accuracy of preseosin for the giagnosis of sepsis from SIRS : a systematic review and meta-analysis. *Annals of intensive care*, 5(1), 48.
- 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.
- Zarjou A et Argaval A. (2011). Sepsis and acute kindey injury. *Journal of the american society of nephrology*, 22(6), 999-1006.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. (2001). NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*; 31 (11): 1405-1416.



# **Annexes**

## Annexe 1

Tableau I. Les scores SOFA (Singer *et al.*, 2016).

Système		Score				
		0	1	2	3	4
<b>Respiration</b>						
<b>PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub></b> (kPa)	mmHg	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) avec assistance respiratoire	<100 (13.3) avec assistance respiratoire
<b>Coagulation</b>						
<b>Plaquettes</b>	x10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Foie</b>						
<b>Bilirubine</b>	mg/dL (μmoles/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9(20-32)	2.0-5.9(33-101)	6.0-11.9(102-204)	>12.0(204)
<b>Cardiovasculaire</b>	MAP≥70mmHg	MAP<70mmHg	Dopamine<5 or dobutamine <sup>a</sup>	Dopamine 5.1-15 or epinephrine≤0.1 or norepinephrine≤0.1 <sup>a</sup>	5.1-15	Dopamine>15 or epinephrine>0.1 or norepinephrine>0.1 <sup>a</sup>
<b>Système nerveux central</b>						
<b>Glasgow Scale score<sup>b</sup></b>	Coma	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Rénal</b>						
<b>Créatinine</b>	mg/dL (μmoles/L)	<1.2(110)	1.2-1.9(110-170)	2.0-3.4(171-299)	3.5-4.9(300-440)	>5.0(440)
<b>Production d'urine</b>	mL/d				<500	<200

**FIO<sub>2</sub>**, fraction de l'oxygène inspire (Fraction of inspired oxygen). **MAP**, moyenne de pression artérielle (Mean arterial pressure), **PaO<sub>2</sub>**, Pression partielle d'oxygène (partial pressure of oxygen). **a**, les doses de catecholamine sont données comme μg/kg/min pour au moins 1 heure. **b**, les scores de l'échelle Galasgow Coma varie de 3 à 15, le score le plus élevé indique une meilleure fonction neurologique.

**Tableau II.** Agonistes des récepteurs TLRs chez l'homme les mieux connus et leurs adaptateurs (Delneste et al.,2016).

Récepteurs	Ligands	Pathogène	Adaptateurs
TLR1 (+TLR2)	Triacyl de lipoprotéines	Bactéries Mycobactéries	MyD88/MAL
TLR2	Lipoprotéines Peptidoglycanes Acides lipotéichoïques Porines Lipoarabinomannanes OmpA	Bactéries Gram+ Bactéries Gram- Mycobactéries	MyD88/MAL
TLR3	ARN double brin	Virus	TRIF
TLR4	Lipopolysaccharides Protéines virales	Bactéries Gram-	MyD88/MAL  TRIF/TRAM
TLR5	Flagelline	Bactéries	MyD88
TLR6 (+TLR2)	Diacyl lipopeptides	Mycoplasme	MyD88/MAL
TLR7/TLR8	ARN simple brin	Virus	MyD88
TLR9	ADN hypométhylé	Bactéries	MyD88

*Annexe 2*

Les appareillages



**Homogénéiseur**



**Vortex**



**Balance de précision**



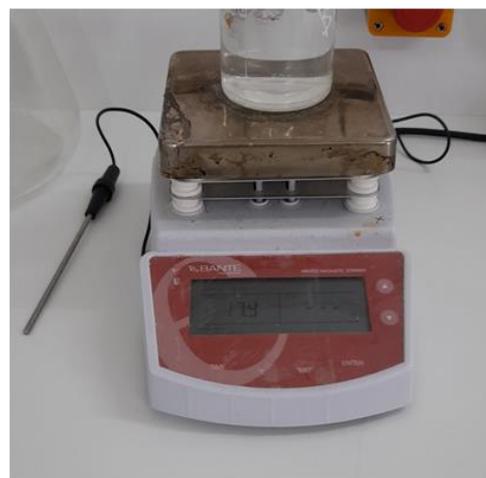
**PH mètre**



**Agitateur**



**Centrifugeuse**



**Plaque chauffante/Agitateur**



**Spectrophotomètre**

**Tableau III.** Liste des Listes de Réactifs et consommables

<i><b>Réactifs et solutions</b></i>	<i><b>Consommables</b></i>
NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaOH, SDS (Sodium Dodécyl Sulfate),	Eppendorf
KCl, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Lames et lamelles
Bleu de coomassie G250, Muiy-Grunwald, Giemsa, Hématoxyline-éosine	Tube en plastique 3mL, Tube à vice en verre, Tube Falcon 15mL 50mL
Acide orthophosphorique 85%, Acide Acétique, HCl, TBA (Thiobarbituricacid), EDTA	Cuve de spectrophotmètre 1et 3mL, Cuve en quartz
BSA (Bovine serumalbumin)	Flacon en verre, Boite de pétri, Papier pH
Ethanol 100°, Formol,	Trousse de dissection

**Annexe 2 (suite)**

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 altérés 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 mis dans des cassettes en plastiques puis fixés 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 IV.** Circuit de la batterie de déshydratation et d'imprégnation du tissu à la paraffine.

<b>Etapes</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Durée</b>
<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	3h x3

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 V.** Etapes de coloration hématoxyline- éosine.

Étapes	Réactifs	Durée
Déparaffinage	Étuve 100°C	5min
	3 bains de paraffine 3hx3	2min x3
	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
Coloration H-E	Hématoxyline	10min
	Lavage eau	2min

	Eosine	1min
	Lavage eau	2min
Déshydratation	3 bains d'éthanol 100°	45sec x3
	3 bains de Toluène	45sec x4

**D. Observation microscopique**

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