



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*

*Etude des altérations pulmonaires induites par sepsis chez la souris.*

*Présenté par :*

*Melle. BRAHMI Zahra*

*et*

*Melle. MOUNSI Imane*

*Devant le Jury :*

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

*MAA*

*SNV, Blida1*

*Présidente*

*M<sup>me</sup> KANANE A.*

*MCB*

*SNV, Blida1*

*Examinatrice*

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

*MCA*

*SNV, Blida1*

*Promotrice*

*Session 2022 / 2023*

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 nous voudrions témoigner notre gratitude.

À notre encadreur **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 pour réaliser ce travail de recherche. Pour sa patience, son aide, sa confiance et ses encouragements tout au long de ce travail. Nous tenons à vous exprimer nos sentiments de profonde gratitude.

Nous tenons à remercier les membres du jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre modeste travail. **Dr. KANANE A** et **Dr BENAZOUZE F**, 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 5 ans d'études.

Nous adressons, nos sincères remerciements à Mme **AÏSSANI EL-FERTAS RADIA**, Maître de Conférences à l'USDB1, pour son aide et sa compréhension ainsi que sa patience.

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 (Mesdames, **Zatra, Boukenaoui, Zerrouiti, Rouaki**, Messieurs. **Grandi, Bounaama**) des ingénieurs de laboratoire (Mesdames **Houria, Chafika, Salima, Fatima**) des médecins (**Pr. Benhamed, Dr Rahim**) et des responsables (**Pr.Meguati, Pr. Ouafi, Dr Boudjemaa, Mr Abderahman, M<sup>me</sup> Hania**).....Nous vous oublierons jamais.

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

## **Dédicace**

*Au nom de Dieu le Tout-Puissant*

*J'adresse ma plus profonde gratitude et tout mon amour à l'homme principal de ma vie mon  
cher **papa** qui m'a toujours encouragé dans mes études et ma vie.*

*A la plus belle et la plus chère femme dans ma vie ma **mère**, Qu'elle trouve ici ma plus  
Profonde gratitude et tout mon Amour pour son soutien et sa patience.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer les sentiments que j'éprouve pour vous, que dieu vous  
protège et vous accorde une longue vie en bonne santé, je suis tellement fier d'être votre fille.*

*À mon adorable sœur et la plus proche amie pour moi **Yamina**, et mes deux cher frère **Okba**  
et **Mohamed** je vous souhaite une longue vie pleine de bonheur et de joie.*

*A ma cher partenaire **Zahra**, avec qui j'ai partagé ce travail, et a tous mes copines : **Hind**,  
**Wafa**, **Lylia**. Je vous aime*

*A ma chère équipe : **Mouad**, **Sami**, **Chaima**, **Nabil**, avec qui j'ai partagé de meilleurs et les  
pires moments de ce travail; Nous avons travaillé dur ensemble; Je n'oublierai jamais les  
souvenirs que j'ai partagés avec vous, vous êtes les meilleurs.*

*A toutes les personnes non citées ici qui m'ont aidée et soutenue dans mes mauvaises et mes  
bonnes humeurs, A tous mes chers et les personnes qui m'aime je te souhaite une longue vie.*

**Imane**

## Dédicace

*Au nom de Dieu le Tout-Puissant*

*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, tu as toujours été pour moi un exemple, du père respectueux, de la personne méticuleuse, je tien à honorer l'homme que tu es. Quoi que je fasse ou que 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 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. Aucune dédicace ne saurait exprimer les sentiments que j'éprouve pour toi. Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie, tu m'as toujours soutenue.*

*A mon frère Mohammed Zohir, pour son soutien et pour ses encouragements permanent, et son soutien moral. Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.*

*A tous ma famille Brahmi et Hamiche, merci pour votre amour et vos encouragements.*

*A mon binôme Imane, pour tous les moments et les souvenirs inoubliables pendant les cinq années d'études ensemble, je vous aime beaucoup.*

*A mon amie Sally, merci pour votre présence et votre fidélité.*

*A mon équipe et mes camarades Mouad, Sami, Chaima et Nabil qui ont partagé avec moi des souvenirs et tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.*

*Enfin et surtout, je tiens à remercier notre promotrice Rahim Ibtissem, pour toute l'aide qu'elle nous a apportée et pour avoir été à nos côtés tout au long de la réalisation de ce projet.*

*Zahra*

## Résumé

Le sepsis est un problème majeur de santé publique qui est associée à des réponses exacerbées de l'hôte aux agents infectieux, à un stress oxydatif et à une défaillance des organes. Malgré les progrès thérapeutiques, la mortalité due à cette maladie est encore trop élevée. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une forme grave de lésion pulmonaire aiguë (ALI, *Acute Lung Injury*) qui 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 étudiée, à l'aide d'un modèle murin de sepsis polymicrobien, l'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par sepsis, et d'autre part le rôle de la mélatonine dans la prévention de ces derniers.

Le sepsis polymicrobien a été induit par une CLP (*Cecal Ligation and Puncture*) chez des souris BALB/c. Ces dernières ont été traitées par quatre doses de 30mg/Kg de mélatonine. Les souris ont été sacrifiées 24h après traitement et le poumon, la rate et le mésentère ont été prélevé pour une étude biochimique et histologique.

Les résultats du dosage biochimique montrent que le sepsis induit un stress oxydatif dans les poumons caractérisés par une augmentation du taux de MDA, MPO et NO (marqueurs pro-oxydants) et une diminution de la catalase et GSH (marqueurs antioxydants). La mélatonine exerce un effet antioxydant et rétablit l'équilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant en diminuant le MDA, MPO, NO et en augmentant la catalase et la GSH.

Les résultats histologiques montrent des dommages oxydatifs dans les poumons et l'activation de réponses immunitaires et inflammatoires caractéristiques avec une forte infiltration leucocytaire dans la rate et le mésentère. La mélatonine prévient les dommages oxydatifs et inflammatoires causés par sepsis.

Nos résultats ouvrent des perspectives prometteuses pour l'utilisation thérapeutique de la mélatonine dans le traitement du sepsis. De plus, nous affirmons le rôle clé du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis.

**Mots clés :** Sepsis, CLP, BALB/c, stress oxydatif, mélatonine, poumon, inflammation, rate, mésentère.

**Abstract**

Sepsis is a major public health problem that is associated with exacerbated host responses to infectious agents, oxidative stress and organ failure. Despite therapeutic progress, mortality from this disease is still too high. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a severe form of acute lung injury (*ALI*) that occurs in 25-50% of sepsis patients.

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

Polymicrobial sepsis was induced by CLP (*Cecal Ligation and Puncture*) in BALB/c mice. The latter were treated with four 30mg/kg melatonin doses. Mice were sacrificed 24 hours after treatment and the lung, spleen and mesentery were collected for a biochemical and histological study.

The results of the biochemical assay show that sepsis induces oxidative stress in the lungs characterized by increased levels of MDA, MPO and NO (pro-oxidant markers) and decreased catalase and GSH (antioxidant markers). Melatonin has an antioxidant effect and restores the balance of the pro-oxidant/antioxidant balance by decreasing MDA, MPO, NO and increasing catalase and GSH.

Histological results show oxidative damage in the lungs and activation of characteristic immune and inflammatory responses with strong leukocyte infiltration in the spleen and mesentery. Melatonin prevents oxidative and inflammatory damage caused by sepsis.

Our findings offer promising prospects for the therapeutic use of melatonin in the treatment of sepsis. In addition, we affirm the key role of oxidative stress in the pathophysiology of sepsis.

**Keywords:** Sepsis, CLP, BALB/ C, oxidative stress, melatonin, lung, inflammation, spleen, mesentery.

الإنتان هو مشكلة صحية عامة رئيسية ترتبط باستجابات المضيف المتفاقمة للعوامل المعدية والإجهاد التأكسدي وفشل الأعضاء. على الرغم من التقدم العلاجي، لا تزال الوفيات الناجمة عن هذا المرض مرتفعة للغاية. متلازمة الضائقة التنفسية الحادة (ARDS) هي شكل حاد من إصابات الرئة الحادة (ALI) التي تحدث في 25-50% من مرضى الإنتان.

عملنا البحثي له أهمية أساسية في فهم الآليات المعقدة للفيزيولوجيا المرضية للإنتان من أجل تطوير علاج مستهدف. من ناحية، درسنا، باستخدام نموذج الماوس من تعفن متعدد الميكروبات، تورط الإجهاد التأكسدي في التغيرات الرئوية الناجمة عن الإنتان، ومن ناحية أخرى دور الميلاتونين في الوقاية من هذه.

تم تحفيز تعفن الميكروبية المتعددة من قبل CLP ( *ligation and PunctureCecal* ) في الفئران BALB/ C. تم التعامل مع هذا الأخير مع أربع جرعات من الميلاتونين 30mg/kg. تم التضحية بالفئران بعد 24 ساعة من العلاج وتم جمع الرئة والطحال والمساريق لدراسة بيوكيميائية ونسجية.

تظهر نتائج الفحص الكيميائي الحيوي أن الإنتان يحفز الإجهاد التأكسدي في الرئتين التي تتميز بزيادة مستويات MDA و MPO و NO (علامات مؤيدة للأكسدة) وانخفاض الكاتالاز و GSH (علامات مضادة للأكسدة). الميلاتونين له تأثير مضاد للأكسدة ويعيد توازن التوازن المؤيد للأكسدة/ المضادة للأكسدة عن طريق خفض MDA، MPO، لا وزيادة الكاتالاز و GSH.

تظهر النتائج النسيجية الضرر التأكسدي في الرئتين وتنشيط الاستجابات المناعية والالتهابية المميزة مع تسلسل الكريات البيض القوي في الطحال والمراسيق. الميلاتونين يمنع الأضرار التأكسدية والالتهابية الناجمة عن الإنتان.

تقدم نتائجنا آفاقاً واعدة للاستخدام العلاجي للميلاتونين في علاج الإنتان. بالإضافة إلى ذلك، تؤكد الدور الرئيسي للإجهاد التأكسدي في الفيزيولوجيا المرضية للإنتان.

**الكلمات المفتاحية:** الإنتان، BALB/C، CLP، الإجهاد التأكسدي، الميلاتونين، الرئة، التهاب، الطحال والمراسيق.

# **ABRÉVIATIONS**



**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ALI**: Acute Lung Injury

**BSA**: Bovin Serum Albumin

**CAT** : Catalase

**CIVD**: Coagulation intravasculaire disséminée

**CLP**: Cecal Ligation and Puncture

**COX-2** : cyclooxygenase 2

**EDTA** : Ethylénediamine-tétraacétique

**DAMPs**: Damage-Associated Molecular Patterns

**FNS** : Formule de numération sanguine

**GPx**: La glutathion peroxydase

**GSH** : Glutathion

**H-E**: Hématoxyline Eosine

**HMGB-1**: high-mobility group box 1 protein

**HOCl**: acide hypochloreux

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

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

**IDO** : indoléamine 2,3-dioxygénase

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

**IL-8** : Interleukine -8

**IL-10** : Interleukine -10

**IL-12** : Interleukine -12

**IL-18** : Interleukine -18

**INF $\gamma$**  : interféron gamma

**iNOS** : Oxyde nitrique synthase inductible

**MAMPs** : Microbe-associatedmolecular patterns

**MDA** : Malondialdéhyde

**MDSC:** Myeloid-derived suppressor cells

**MGG:** May-Gründwald-Giemsa

**MODS :** Multiple organ dysfunction Syndrome

**MPO :** Myéloperoxydase

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

**NO :** Monoxyde d'azote

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

**•OH :** radical hydroxyl

**ONOO<sup>-</sup> :** peroxydite

**PD-L1 :** programmed cell death ligand 1

**PAMPs :** Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PN :** Polynucléaire neutrophile

**PRRs :** Patterns Recognition Receptors

**qSOFA :** QuickSOFA

**RNS :** Reactive nitrogen sepecies

**ROS :** Reactive oxygen sepecies

**SDRA:** syndrome de détresse respiratoire aiguë

**SDS :** Dodécylsulfate de sodium

**SOD:** Superoxyde Dismutase

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

**SRIS :** Syndrome de réponse inflammatoire systémique

**TBA :** Acide thiobarbiturique

**TBARS :** Espèces réactives de TBA

**TLRs :** Toll-like receptors

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

**TNF-Rs :** récepteur soluble du TNF.

**VCAM-1:** Vascular Cell Adhesion Molecule

**VCl<sub>3</sub>**: Le chlorure de vanadium

**Liste de figures**

**Figure 1.** Réponses immunitaires au cours du sepsis .....6

**Figure 2.** Production des espèces réactives de l'oxygène /nitrogène (ROS/RNS) et leur neutralisation par des antioxydants .....8

**Figure 3.** Etapes critiques de CLP induite chez les souris .....12

**Figure 4.** Protocole expérimental chez les souris BALB/c. *i.p* .....13

**Figure 5.** Effet de la mélatonine dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis. ....28

**Tableaux annexes**

**Annexe 1** : Tableau I. Définitions du sepsis..... **i**

**Annexe 1** : Tableau II. Les scores SOFA..... **ii**

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

**Annexe 2** : Tableau III : Listes des réactifs et consommables..... **v**

**Annexe 3** : Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine..... **vi**

# **SOMMAIRE**

**SOMMAIRE**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Introduction.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Chapitre I : Synthèse Bibliographiques</b>                              |           |
| <b>I. Sepsis.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>I.1. Définition .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>I.2. Physiopathologie du sepsis .....</b>                               | <b>3</b>  |
| <b>I.2.1. Phase hyper-inflammatoire.....</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>I.2.2. Immunodépression .....</b>                                       | <b>5</b>  |
| <b>I.3. Dysfonctionnement pulmonaire associé au sepsis.....</b>            | <b>6</b>  |
| <b>I.4. Stress oxydatif et sepsis .....</b>                                | <b>7</b>  |
| <b>I.5. La mélatonine.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>Chapitre II. Matériels et Méthodes</b>                                  |           |
| <b>II.1. Matériels .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>II.1.1. Matériels non biologiques.....</b>                              | <b>11</b> |
| <b>II.1.2. Matériels biologiques.....</b>                                  | <b>11</b> |
| <b>II.2. Méthodes.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>II.2.1. Modèle de sepsis par ligature et ponction cœcale (CLP).....</b> | <b>12</b> |
| <b>II.2.2. Protocole pharmacologique .....</b>                             | <b>13</b> |
| <b>II.2.3. Etude biochimique.....</b>                                      | <b>13</b> |
| <b>II. 2. 3. 1. Préparation de l'homogénat tissulaire.....</b>             | <b>14</b> |
| <b>II.2. 3. 2. Dosage des protéines.....</b>                               | <b>14</b> |
| <b>II.2. 3. 3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif .....</b>           | <b>14</b> |
| <b>II.2.3.3.1. Dosage des paramètres pro-oxydants .....</b>                | <b>14</b> |
| <b>II.2.3.3.2. Dosage des paramètres antioxydants .....</b>                | <b>16</b> |
| <b>II.2.4. Etude hématologique par FNS.....</b>                            | <b>16</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>II.2.5.</b> Etude histologique ..... | 17 |
| <b>II.2.6.</b> Etude statistique .....  | 17 |

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

|   |           |
|---|-----------|
| <b>III.1. Résultats</b> .....   | <b>19</b> |
| <b>III.1.1.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur le poids des souris et des organes (poumon et rate) .....     | <b>19</b> |
| <b>III.1.2.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux d'érythrocytes et des plaquettes sanguins.....        | 20        |
| <b>III.1.3.</b> Effet de sepsis et de la mélatonine sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins.....         | 20        |
| <b>III.1.4.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux des granulocytes et de Mid sanguins .....             | 20        |
| <b>III.1.5.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux des protéines pulmonaires .....                       | 20        |
| <b>III.1.6.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur l'activité MPO, marqueur d'infiltration des neutrophiles..... | 21        |
| <b>III.1.7.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de MDA pulmonaire.....                                | 21        |
| <b>III.1.8.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de NO, marqueur de l'activité NOS.....                | 22        |
| <b>III.1.9.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur l'activité catalase pulmonaire.....                           | 23        |
| <b>III.1.10.</b> Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de glutathion réduit (GSH).....                      | 23        |
| <b>III.1.11.</b> Etude histologique.....  | 24        |
| <b>III.2.Discussion</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>Conclusion</b> .....   | <b>29</b> |

**Références Bibliographiques.**

**Annexes.**



# **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**). Les données récentes indiquent qu'en 2017, le sepsis est survenue chez 48,9 millions de personnes dans le monde, entraînant la mort de 11 millions de patients (**Rudd et al., 2020**).

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

Le 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**).

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives (oxygénées et azotées, ROS/RNS) et leur neutralisation par les mécanismes de défense antioxydant. Le ROS/RNS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions cellulaires associées à diverses pathologies, comme le sepsis (**Moukette et al., 2015 ; Jadeja et al., 2017**). Par conséquent, la complexité du syndrome septique exige une molécule avec un effet pléiotrope comme la mélatonine (**Rahim et al., 2017 ; Chen et al., 2021 ; Rahim et al., 2021**).

Dans le cadre du projet de fin d'études, il nous a été proposé d'étudier, à l'aide d'un modèle murin (souris BALB/c) de sepsis polymicrobien, l'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par sepsis et l'effet de la mélatonine 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, MPO, NO) et antioxydants (catalase, GSH).
- Evaluer la réponse immuno-inflammatoire systémique au cours du sepsis par dosage de l'FNS.
- Etudier les altérations et les dommages pulmonaires, spléniques et mésentériques induits par sepsis par une étude histologique.
- Evaluer les effets antioxydants et anti-inflammatoires de la mélatonine sur le sepsis polymicrobien.

# **CHAPITRE I**

## **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 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 à cette pathologie demeure élevé (>40%) et aucun traitement ne semble efficace (Napolitano, 2018 ; Qiu et al., 2019). Les données mondiales de 2017 indiquent environ 48,9 millions de cas incidents de sepsis avec 11,0 millions décès par au sepsis, représentant 19,7 % de tous les décès dans le monde. (Qiu et al., 2019 ; Rudd et al., 2020).

Ce syndrome touche toutes les tranches d'âge. Néanmoins, les nouveau-nés et les enfants de moins de 5ans (20,3 millions cas) ainsi que les individus de plus de 20 ans (23,7 millions cas) en sont les plus touchés (Rudd et al., 2020). De plus, le taux de mortalité est plus élevé chez les hommes comparés aux femmes (164,2/100 000 contre 134,1/100 000) (Rudd et al., 2020).

### I.1. Définition

Le sepsis est un terme anglo-saxon venant du grec « Σήψις » signifiant " putréfaction" (Vincent et al., 1992 ; Funk et al., 2009). Des mises à jour ont été introduites dans la définition du sepsis en raison d'une meilleure compréhension de sa physiopathologie. La première définition date de 1991, où on le décrit comme un Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique « SRIS », causée par une infection qui évolue en sepsis sévère (sepsis et dysfonctionnement d'un organe), puis en choc septique (sepsis et hypotension sévère) (Bone et al., 1992) (Tableau I, annexe 1).

Selon la dernière mise à jour de 2016, le sepsis est défini comme un dysfonctionnement d'organes mortel, causé par une réponse dysrégulée de l'hôte à l'infection. Il est aggravé en choc septique, caractérisé par des anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques profondes augmentant le risque de mortalité (Singer et al., 2016).

Les nouveaux critères de diagnostic du sepsis reposent sur la suspicion ou la confirmation d'une infection associée à un dysfonctionnement d'organe identifié par une augmentation aiguë de deux points ou plus du score SOFA (*the Sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment*) (Tableau II, annexe 1) (Singer et al., 2016).

### I.2. Physiopathologie

Le sepsis est un syndrome complexe au cours duquel, les réponses immunitaire et inflammatoire sont excessivement activées et maintenues par des stimuli à la fois infectieux et non infectieux (Delile, 2017). En plus la défaillance d'organes engendrée, un

dysfonctionnement endothélial et hémodynamique, et une hypoxie sont aussi observés. Ceci est suivi par la formation de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et éventuellement à la mort (**Bougle et Annane, 2007 ; Tesniere et al., 2008 ; Cimolai et al., 2015**).

La réponse immunitaire lors du sepsis implique les deux réponses innée et adaptative. Il s'agit d'une succession de deux phases : une phase hyper inflammatoire et une phase d'immunodépression (**Figure 1**) (**Cao et al., 2019**).

### I.2.1. Phase hyper inflammatoire

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

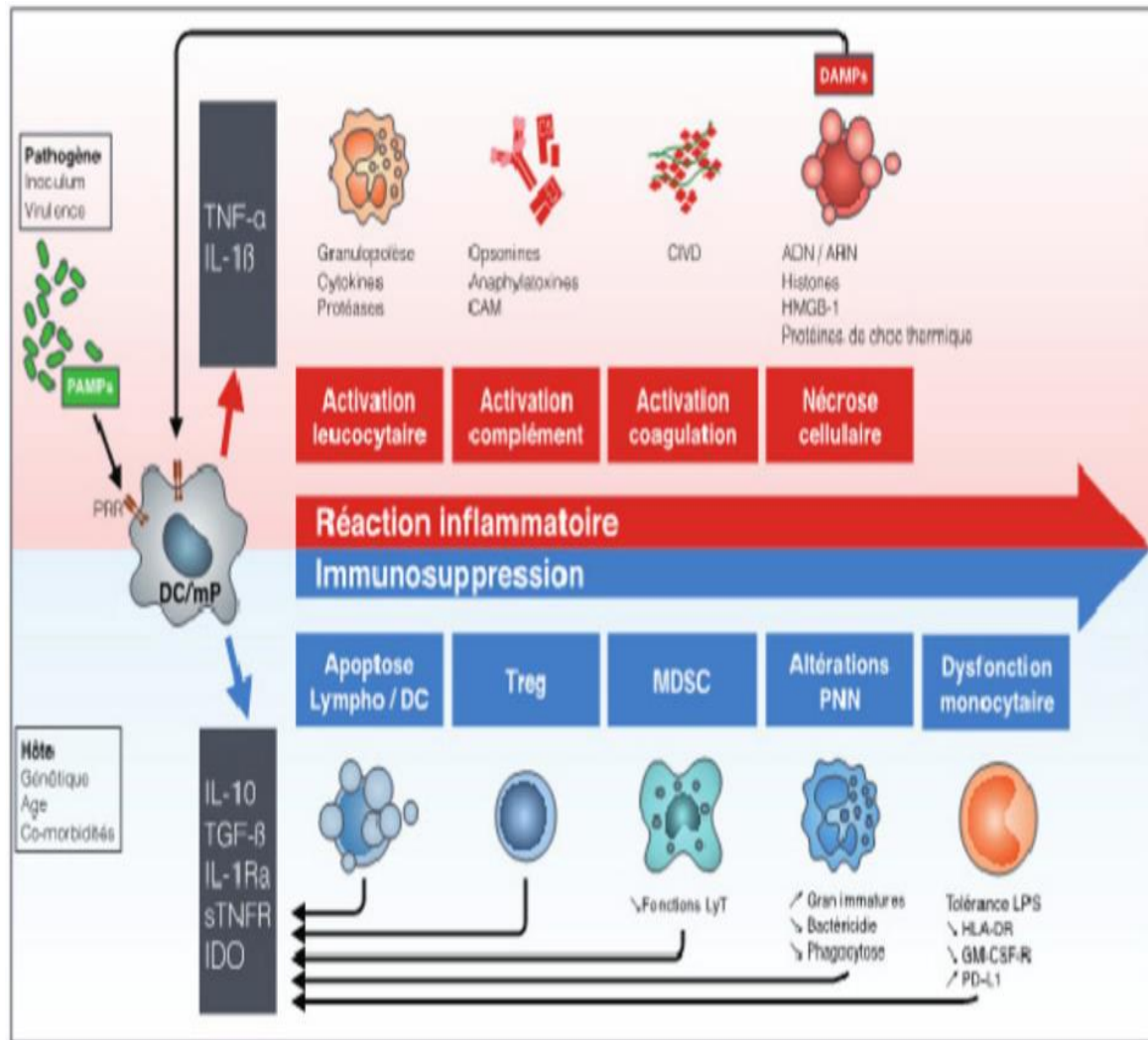
L'activation des PRR et du système de complément par les PAMPs, ou les DAMPs induit de multiples voies de signalisation intracellulaires complexes, redondantes et complémentaires conduisant à l'expression de plusieurs classes de gènes communs qui sont impliqués dans l'inflammation, l'immunité adaptative et le métabolisme cellulaire (**Tang et al., 2012**). L'une des principales voies de signalisation activée par sepsis est la voie NF- $\kappa$ B (**Gossez, 2019**). Ce dernier régule l'expression de médiateurs pro/anti-inflammatoires, dont les cytokines : l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , IL 12, IL 18, l'INF $\gamma$  et IL10 ; les chimiokines : IL-8 ; des molécules d'adhérence : ICAM-1, VCAM-1 ; des enzymes : iNOS, Cox-2, SOD et les facteurs de coagulation : facteur tissulaire. Ces médiateurs vont induire la production de nouveaux médiateurs inflammatoires et ainsi contribuer au développement et au maintien des réponses immunitaires innée et adaptative (**Grimaldi, 2014**). De plus, la réaction inflammatoire va provoquer des lésions tissulaires responsables de la libération d'alarmines (DAMPs) aggravant cette réaction. Ainsi, un cycle vicieux est instauré, une libération massive de cytokines à l'échelle systémique qualifiée d'« Orage cytokinique » ou d'état d'hyper-inflammation systémique est observée (**Pougol, 2016**).

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

Les réponses inflammatoires caractéristiques du sepsis comprennent également l'activation du système du complément, du système de coagulation et de l'endothélium vasculaire, dont les fonctions sont étroitement interconnectées et trans-réglées (**van der Poll et al., 2017**). Une forte activation de ces derniers contribue au dysfonctionnement endothéliale, au défaut d'apport en oxygène dans les tissus (hypoxie), à la formation de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et aux défaillances d'organes et éventuellement à la mort (**Figures 1**) (**Bougle et Annane, 2007 ; Tesniere et al., 2008 ; Cimolai et al., 2015**).

### **I.3.2. Phase d'immunosuppression (immunoparalysie)**

Cette phase correspond à d'une suppression immunitaire caractérisée par une altération des cellules immunitaires innées et adaptatives (apoptose, altérations fonctionnelles et modifications phénotypiques), qui ne seront plus capable de combattre l'infection. Elle est associée à une réaction anti-inflammatoire systémique destinée à favoriser la réparation tissulaire, et caractérisée par l'expression de molécules anti-inflammatoires (interleukine-10, transforming growth factor-beta, indoléamine 2,3-dioxygénase [IDO]), le développement de MDSC (Cellule myéloïde suppressive (Myeloid-derived suppressor cell)). 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) (**Boomer et al., 2011 ; Hotchkiss et al., 2013**) (**Figure 2**).



**Figure 1.** Réponses immunitaires au cours du sepsis (Uhel *et al.*, 2015). CAM : complexe d'attaque membranaire ; CIVD : coagulation intravasculaire disséminée ; DAMPs : Damage-associated molecular patterns ; DC : cellules dendritiques ; HMGB-1 : high-mobility group box 1 protein ; LyT : lymphocytes T ; IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase ; MDSC : Cellule myéloïde suppressive ou Myeloid-derived suppressor cell ; mP : macrophages ; PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns ; PD-L1 : programmed cell death ligand 1 ; PRR : Pattern-recognition receptors ; sTNF-R : récepteur soluble du TNF.

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

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**).

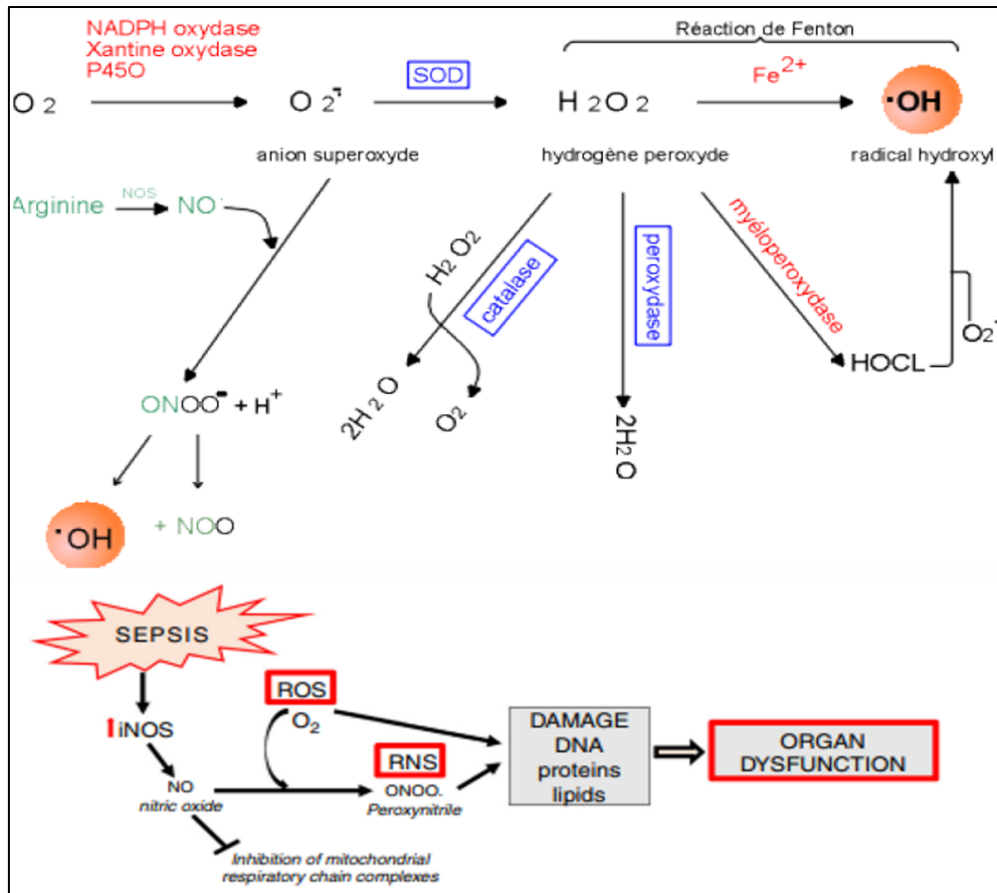
Malheureusement et malgré des décennies de recherche, il n'existe aucune stratégie de prévention ni de thérapie efficace pour l'ALI/SDRA en raison des complications de l'étiologie et de sa pathogenèse. Les antibiotiques et les mesures de soutien (ventilation) sont les seuls traitements disponibles pour les patients atteints de sepsis et d'ALI/SDRA avec 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**

Dans les conditions physiologiques, les espèces réactives de l'oxygène/nitrogène ROS/RNS sont produites dans la cellule à des doses raisonnables. Leur concentration est maintenue équilibrée grâce aux systèmes antioxydants qui veillent au maintien d'une homéostasie redox (balance antioxydants/ pro-oxydants). Cependant cette homéostasie 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 oxydant (**Migdal et Serres., 2011**).

Les ROS/RNS excédentaires oxydent et endommagent toutes les molécules cellulaires comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions tissulaires associées à diverses pathologies qu'elles soient cardiovasculaires, infectieuses, neurodégénératives ou cancéreuses (**Figure 2**) (**Romá-Mateo et al., 2015 ; Jadeja et al., 2017**).





**Figure 2.** Production des espèces réactives de l'oxygène /nitrogène (ROS/RNS) et leur neutralisation par des antioxydants (Hierso, 2015 ; Sygitowicz et Sitkiewicz.,2021). $\cdot O_2^-$  : anion superoxyde,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène,  $\cdot OH$  : radical hydroxyl,  $ONOO^-$  : peroxynitrite, HOCl : acide hypochloreux,  $\cdot NO$  : monoxyde d'azote.

Les ROS/RNS sont générées 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 NO Synthase (Figure 2) (Hrycay et Bandiera., 2015).

La dégradation des radicaux superoxydes est contrôlée par des systèmes de défense antioxydants, comme la superoxydes dismutases SOD (métalloenzymes) qui catalysent leur dismutation en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Bien que ce dernier ne soit pas en soi un radical mais une molécule, il est lui-même toxique et capable de générer le radical hydroxyle  $\cdot OH$ , le plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant. La quantité de  $H_2O_2$  est régulée par la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPx), qui catalysent sa réduction par le glutathion (GSH) en eau et oxygène (Bouguirne, 2012 ; Shah et al., 2014).

Les RNS englobent principalement le radical monoxyde d'azote ( $\cdot NO$ ) et le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). Le  $\cdot NO$  est synthétisé par la NO synthase à partir de la L-arginine, en présence

d'oxygène. Il forme avec l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  un puissant oxydant, le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ) (Shah *et al.*, 2014 ; Phaniendra *et al.*, 2015).

### I.5. La mélatonine

Certaines molécules naturelles présentent des activités biologiques intéressantes en cas de sepsis. En effet, des études ont été menées sur la quercétine, la curcumine, la vitamine C et plus récemment la mélatonine en raison de leur potentiel antioxydant pouvant améliorer l'état de stress oxydatif associé au sepsis.

La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est une neurohormone liposoluble synthétisée principalement par la glande pinéale mais aussi par des tissus extra-pinéaux tels que la rétine, le tractus gastro-intestinal, les follicules pileux épithéliaux, la peau, les globules rouges et les plaquettes (Favero *et al.*, 2017). Sa synthèse chez les mammifères est régulée par la photopériode selon un rythme circadien dont le pic plasmatique coïncide toujours avec une période d'obscurité (vers 2–3 heures du matin) (Claustrat *et al.*, 2015).

Sa nature liposoluble, lui permet non seulement d'agir via des récepteurs membranaires (MT1, MT2 et MT3) mais aussi nucléaires (ROR/RZR). De plus, elle pourrait agir par d'autres mécanismes comme l'interaction avec des protéines cytosoliques ou avec les mitochondries, et via la neutralisation des ROS/RNS (Acuña Castroviejo *et al.*, 2007).

La mélatonine est connue par son effet pléiotrope anti-inflammatoire, antioxydant, anti-apoptique, immunomodulateur, anti-tumoral, chronorégulateur...etc (Wei Hu *et al.*, 2017).

## **CHAPITRE II**

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## II. Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogies de la FSNV de l'université de Blida 1, le laboratoire de pharmacologie cellulaire et signalisation de la FSB-USTHB et le laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC d'Alger, durant une période de 2 mois du 03 Mai au 02 juillet 2023. Ce travail de recherche a porté sur :

- L'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par sepsis polymicrobien, *in vivo*.

- Le rôle de la mélatonine dans la prévention du stress oxydatif, de la réponse inflammatoire et des altérations pulmonaires induits par sepsis polymicrobien.

### 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**.

La mélatonine utilisée dans notre travail est une molécule synthétique fournie par FAGRON, Iberica S.A.U. Espagne.

#### II.1.2. Matériel biologique

La présente étude a été réalisée *in vivo* à l'aide d'un modèle animal de sepsis polymicrobien (CLP, *Cecal Ligation Puncture*) en utilisant des souris de type BALB/c.

#### Animaux

Notre étude *in vivo* a été réalisé sur des souris mâles de type BALB/c (n=15), âgées de 10 à 12 semaines (26-33g), fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA, Kouba, Alger).

Les souris ont été acclimatées à l'environnement de l'animalerie de l'Université de Blida 1 avec une température moyenne de 25 °C et une humidité 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 donné en ad libitum.

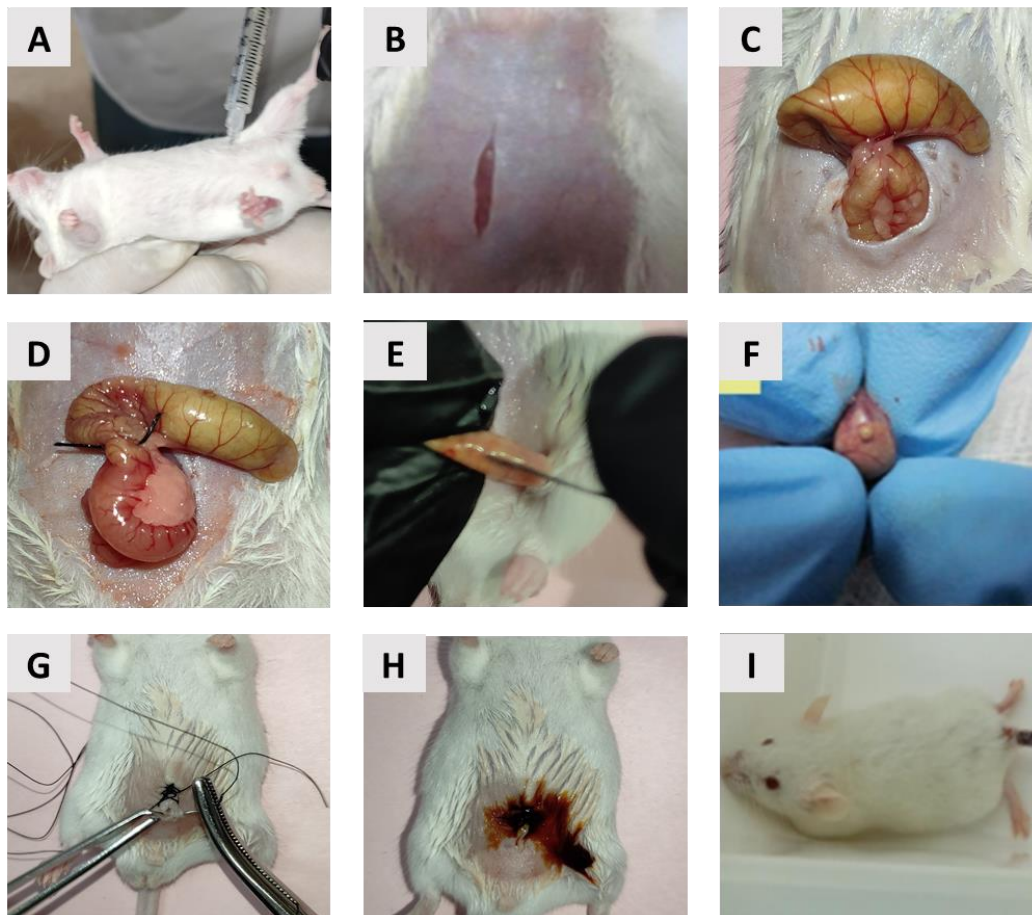
Toutes les expériences ont été menées conformément à la législation Algérienne de la protection des animaux d'expérimentations utilisées à des fins scientifiques [loi n°12-235/2012; Décret exécutif n° 10-90].

## II.2. Méthodes

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

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

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



**Figure 3.** Etapes critiques de CLP induite chez la souris. **A** : injection de l'anesthésie par voie ip. **B** : rasage et désinfection de la zone abdominale et Incision médiane de 1 cm. **C** : Exposition du cæcum. **D** : Ligature du cæcum sous la valve iléo-cæcale. **E** : Ponction cæcale avec une aiguille de calibre 22. **F** : Libération d'une petite quantité de fèces des sites de ponction. **G** et **H** : Suture et désinfection de l'incision abdominale par du Bétadine. **I** : Réanimation de la souris après CLP.

Les souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine/acepromazine (à 10mg/Kg/*i.p* et 2mg/Kg/*i.p* respectivement, donné par voie intra-péritonéale). Elles sont ensuite placées sur une table d'opération aseptique dans un environnement opératoire stérile. La partie inférieure de leur abdomen est rasée puis désinfecté par l'alcool afin de faire une incision abdominale médiane de 1 cm, qui permettra de bien exposer le cæcum (**Figure 3 A-C**). Une fois exposé, le cæcum 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. Une petite quantité de fèces est légèrement pressée à travers le site de ponction. Le cæcum est ensuite replacé dans la cavité péritonéale et l'incision abdominale est ensuite suturée (**Figure 3 D-I**).

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

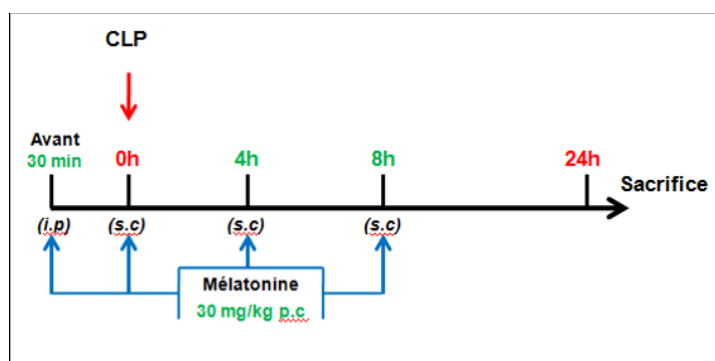
### II.2.2. Protocole pharmacologique

Les souris BALB/c ont été réparties en trois lots (**Figure 4**):

1. **Lot Contrôle (n=5)** : n'ayant reçu aucun traitement.
2. **Lot septique (CLP) (n=5)** : ayant subi une CLP.
3. **Lot septique traité à la mélatonine (CLP-Met) (n=5)** : ayant reçu 4 doses de 30 mg/kg/*i.p* de mélatonine, dissoute dans 0,25% d'éthanol/eau physiologique stérile (**Ortiz et al., 2014**) (**Figure 5**). Une première dose 30 min avant CLP puis une deuxième dose au même moment de CLP, et une troisième et une quatrième dose à 4 h et 8 h post-CLP.

Les animaux ont été sacrifiés 24 h après la CLP. Les organes (poumon, rate et mésentère) ont été rapidement prélevés, lavés avec 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).



**Figure 4.** Protocole expérimental chez les souris BALB/c. *i.p* : voie intrapéritonéale ; *s.c*, voie sous-cutané; *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 Serum Albumin*) à 0.1% (**Bradford, 1976**).

#### II.2.3.3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif

Nous avons analysés cinq marqueurs biochimiques du stress oxydatif, dans les homogénats pulmonaires dont :

- Les marqueurs pro-oxydants : le malondialdéhyde (MDA), marqueur de peroxydation lipidique, le monoxyde d'azote (NO, RNS et marqueur d'activation de la NOS), et la myéloperoxydase (MPO, enzyme marqueur de l'infiltration des neutrophiles).
- Les marqueurs antioxydants : la catalase (CAT), enzyme du système antioxydant enzymatique cellulaire et le glutathion réduit (GSH, du système antioxydant non enzymatique).

##### II.2.3.3.1. Dosage des paramètres pro-oxydants

###### ➤ 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).

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

La réaction est arrêtée par un refroidissement rapide (bain glacial) et une centrifugation à 3000g pendant 10 min et à 4°C. La densité optique est mesurée à 550 nm et les résultats sont exprimés en nmoles/mg de protéine (Ohkawa *et al.*, 1979).

➤ Dosage du taux de monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote est un radical libre ubiquitaire synthétisé par la NO synthase à partir de l'arginine (Tousoulis *et al.*, 2012). Le NO est un gaz instable qui est rapidement métabolisé en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). Son dosage se fait de manière indirecte par la détermination des taux de ces métabolites nitrites et nitrates (Grand *et al.*, 2001).

Le NO est dosé par la méthode de Griess (Griess *et al.*, 1879) où des aliquotes de surnageants sont traités par du vanadium chloride ( $\text{VCl}_3$ ) et mélangés à des volumes équivalents d'un agent révélateur (le réactif de Griess, composé d'acide sulfanilique à 1 % et 0.1% de N-1-naphtyl- éthylènediamine), puis incubés pendant 45 min à température ambiante. L'absorbance des échantillons est mesurée à la longueur d'onde de 540 nm. Les concentrations des nitrites/nitrates sont déterminées à l'aide d'une courbe étalon d'une solution mère de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) et les résultats sont exprimés en  $\mu$ Moles/mg de protéines (Miranda *et al.*, 2001).

➤ Dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO)

La MPO est une peroxydase caractéristique des granules primaires des Polynucléaires Neutrophiles (PN) (Sertejn *et al.*, 2003). Nous avons donc recherché l'infiltration des tissus par les PN en dosant l'activité peroxydase de la MPO. Cette dernière oxyde l'orthodianisidine (substrat chromogène) en présence de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et en milieu acide. L'orthodianisidine oxydée absorbe fortement à 460 nm. De ce fait, L'activité MPO est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 460nm (Krawisz *et al.*, 1984).

Pour ce faire, sur une plaque 96 puits 20 $\mu$ L d'homogénat pulmonaire sont mélangés avec milieu réactionnel contenant : 67 $\mu$ L de PBS 80mM pH5.4, 56 $\mu$ L de PBS 0.22M pH 5.4 et

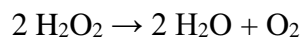


10µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.0017%. La réaction est déclenchée par l'addition de 13µL d'ortho à 18,4mM. La cinétique de la réaction est suivie pendant 10 min à 30°C. L'activité MPO est exprimée en µmoles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformées/min/mg de protéines.

#### II.2.3.3.2. Dosage des paramètres antioxydants

##### ➤ Dosage de l'activité catalase

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



Le dosage de l'activité catalase a été effectué, par suivi de la cinétique de transformation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et oxygène. 50µl d'homogénat tissulaire sont mélangés à 950 µL de tampon phosphate 50mM, pH 7.4. La réaction est déclenchée par l'addition de 500 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 mM. La cinétique de la réaction est suivie pendant 2 min à 25°C. L'activité de la catalase est mesurée par une diminution de l'absorbance à 240nm, 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.

##### ➤ Dosage du taux de glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion réduit a été réalisé selon la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Cette méthode est basée sur la formation d'une couleur jaune entre le réactif d'Ellman (DTNB ; 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) et le groupement sulfhydryle de GSH. Le complexe formé le NMBA (2-nitro-5-mercaptobenzoic acid) absorbe fortement à 412 nm (Padmondabhan et al., 2006).

Pour ce faire, 60µL d'homogénat tissulaire sont mélangés avec 60µL d'acide sulfosalicylique 5% à 4°C puis vortexés et incubés pendant 1heure à 4°C. Après centrifugation à 3000g, pendant 10min/4°C, 50µL de surnageant sont mélangés au milieu réactionnel contenant 200µL de tampon phosphate 0.2M, pH 8 et 10µL de réactif d'Ellman 0.01M. Le mélange est incubé pendant 5 min à l'abri de la lumière avant la lecture de la densité optique à 405 nm. La concentration tissulaire en GSH est exprimée en µmoles/mg de protéines (Padmondabhan et al., 2006).

#### II.2.3. Etude hématologique par NFS :

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.

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

L'étude histologique a été réalisée sur le poumon, 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 (poumon et rate) ont été déshydratées par passage successifs dans des bains d'alcools à degrés croissants (70°, 90° et 100°) suivis d'un bain de toluène.

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

Le mésentère fixé dans du formol à 4% pendant 24h est lavé à l'aide d'une solution de PBS (*phosphate-buffered saline*) pH 7.4. Il est étalé sur lame puis coloré à l'H-E. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope muni de caméra numérique. Les protocoles histologiques sont décrits en détail dans **l'annexe III**.

#### **II.2.5. Etude statistique**

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

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

## **CHAPITRE III**

# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

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

- Nous déterminerons l'implication du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire dans les altérations 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 mélatonine 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 mélatonine 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 peut s'expliquer par les besoins énergétiques élevés de l'organisme pour lutter contre les agents pathogènes.

Les résultats de notre étude montrent que le poids des souris contrôle et les souris septiques traitées par la mélatonine restent inchangé après 24h alors qu'on observe une légère diminution non significative chez les souris septiques. 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 du poids des poumons alors que le poids de la rate reste inchangé chez les souris septiques comparés aux souris contrôle. La mélatonine réduit significativement le poids des poumons aux valeurs contrôle.

Ces résultats indiquent une augmentation du volume pulmonaire chez les souris septiques, signe d'une réponse immunitaire et inflammatoire. La mélatonine a réduit le poids des poumons des souris septiques aux taux contrôle.

### III.1.2. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux d'érythrocytes et des plaquettes sanguins

Le taux d'érythrocytes et de plaquettes diminue respectivement chez les souris septiques. Le traitement par la mélatonine restaure le taux d'érythrocytes à des taux comparables à ceux des souris contrôle, mais pas ceux des plaquettes.

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

Nos résultats sont similaires à ceux d'autres travaux utilisant d'autres modèles de sepsis où une érythropénie a été observée (Oguz *et al.*, 1998 ; Markwart *et al.*, 2014).

### III.1.3. Effet de sepsis et de la mélatonine sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins

Les souris septiques présentent une leucopénie et une lymphopénie avec une diminution des taux de leucocytes et de lymphocytes respectivement. De même, le pourcentage des lymphocytes diminue chez les souris septiques comparées aux souris contrôle.

Le traitement par la mélatonine réduit la leucopénie et les lymphopénies observées chez les souris septiques.

### III.1.4. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux des granulocytes et de Mid sanguins

Les taux des Granulocytes (neutrophile, éosinophile, basophile) et des cellules de taille moyenne (Mid : monocyte, éosinophile, basophile, blasts) sanguins, marqueurs d'inflammation diminuent significativement chez les souris septiques.

La mélatonine augmente les taux des granulocytes et des Mid comparés aux souris septiques.

### III.1.5. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux des protéines pulmonaires

Le taux basal de protéines pulmonaires est comparable à ceux traitées par la mélatonine. Chez les souris septiques, ce taux diminue. Le taux revient au taux de base après traitement à la mélatonine.

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

### III.1.6. Effet du sepsis et de la mélatonine sur l'activité MPO, marqueur d'infiltration des neutrophiles

Les résultats du dosage de l'activité MPO pulmonaire sont représentés dans la **figure 11**. L'activité myéloperoxydase augmente significativement chez les souris septiques comparées aux souris contrôle. La mélatonine réduit l'activité MPO aux valeurs contrôles.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Kingir et al. (2019)** ; **Li et al. (2019)** ; **Xu et al. (2019a)** et **Xu et al. (2019b)**.

La myéloperoxydase est une hémoprotéine stockée dans les granules azurophiles des neutrophiles. Elle synthétise de l'acide hypochloreux et d'autres oxydants réactifs pour phagocyter les bactéries ingérées. Ainsi, la MPO est un composant important de l'immunité innée et l'un des principaux piliers de l'activité antibactérienne des neutrophiles (**Winterbourn et al., 2000** ; **Klebanoff, 2005**).

Il a été démontré que le dosage de la MPO plasmatique pourrait être utilisée comme biomarqueur de diagnostic différentiel entre un SIRS sans infection et un sepsis et qui pourrait prédire la mortalité des patients atteints de sepsis. Lors d'un sepsis, les neutrophiles libèrent le contenu de leurs granules, contenant la MPO et des ROS dont l'acide hypochloreux, dans le plasma afin de combattre l'agent pathogène. La MPO et les ROS formées par la MPO peuvent endommager les cellules sanguines ainsi que les organes (**ElGammasy et al., 2015** ; **Schrijver et al., 2017**).

De plus, il a été démontré que l'acide hypochloreux, un oxydant puissant, est impliqué dans la destruction des bactéries (**Nathan, 2002**) mais aussi la destruction des tissus par induction de nécrose et d'apoptose (**Klebanoff, 2005**).

La mélatonine exerce un effet antioxydant et anti-inflammatoire et contrecarrée la réponse septique. Elle diminue le taux de MPO, neutralise les ROS et active les enzymes antioxydantes (**Costantino et al., 1998** ; **Sener et al., 2005** ; **Reiter et al., 2014** ; **Reiter et al., 2016**).

### III.1.7. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de MDA pulmonaire

Le sepsis augmente le taux de MDA comparé au contrôle. Le traitement à la mélatonine réduit le taux de MDA à des valeurs similaires à ceux du contrôle.

Nos résultats sont similaires à plusieurs études menées dans divers modèles animaux de sepsis (**Victor et De la Fuente., 2003** ; **An et al., 2016** ; **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 superoxyde dismutase (**Andrades et al., 2009**). Cet état hyperoxydant endommage les lipides et les protéines, altère la fonction cellulaire normale et induit une apoptose. Le stress oxydatif induit une 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 de l'attaque des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires cellulaires par les radicaux libres (**Draper et Hadley., 1990; DalleDonne 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, donc il a été utilisé comme biomarqueur efficace de l'oxydation des lipides (**Draper et Hadley, 1990 ; Dalle-Donne et al., 2006**). De même, il a été démontré que le taux de MDA sérique pourrait être utilisé comme un marqueur de mauvais pronostic et un prédicteur de mortalité chez les patients atteints de sepsis (**Lorente et al., 2013 ; Toufekoula et al., 2013 ; Weiss et Deutschman., 2014 ; Lorente, 2015**).

### III.1.8. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de NO, marqueur de l'activité NOS

Le taux de NO pulmonaire augmente significativement chez les souris septiques comparées au contrôle. La mélatonine diminue le taux de NO.

Le rôle du NO dans la pathogénèse septique a été largement démontré aussi bien chez l'homme que dans des modèles animaux (**Rahim, 2009 ; Qiu et al., 2019**). Des taux de NO significativement élevés ont été observés chez les patients septiques dès le jour de l'admission par rapport à des volontaires sains et ceci de façon corrélée à la gravité du tableau clinique et aux taux de TNF $\alpha$ . La production de NO diminuait ensuite progressivement chez les patients survivants d'environ 25 % à 15 jours de l'admission, tandis qu'elle augmentait chez les patients non survivants (**Besnier et al., 2015**).

Il a été suggéré que l'activation de l'iNOS induirait une augmentation importante du NO plasmatique et serait impliquée dans la vasodilatation et donc l'hypotension artérielle observée au cours du sepsis (**Luiking et al., 2010 ; Besnier et al., 2015**).

Le NO participe à la genèse de l'état de choc et est responsable de la dysfonction macro- et microvasculaire. De plus, le NO semble impliqué dans les phénomènes d'infiltration

leucocytaire et d'activation plaquettaire. Enfin, dans certaines situations pathologiques, le NO participe à la formation d'un de ses dérivés, le peroxy-nitrite (ONOO-), présentant des propriétés bactéricides, mais également toxiques sur le métabolisme mitochondrial et cellulaire. Il serait donc potentiellement impliqué dans la défaillance d'organes et l'immunodépression tardive du sepsis (Besnier *et al.*, 2015).

### III.1.9. Effet du sepsis et de la mélatonine sur l'activité catalase pulmonaire

Nos résultats montrent une réduction de l'activité catalase chez les souris septiques comparées au contrôle.

La mélatonine augmente l'activité catalase à des valeurs proches du contrôle.

La catalase est une enzyme antioxydante qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène, une ROS dangereuse qui a la capacité de traverser les membranes et d'oxyder des molécules diverses, protéines, lipides, glucides, 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).

Nos résultats sont similaires à des travaux réalisés dans différents modèles animaux de sepsis (Xu *et al.*, 2019).

### III.1.10. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de glutathion réduit (GSH)

Le taux de GSH diminue significativement chez les souris septiques comparé au contrôle.

Le traitement par la mélatonine augmente le taux de GSH à des taux comparables à ceux du contrôle.

Le glutathion est un constituant important des mécanismes de protection intracellulaire contre divers stimuli nocifs, notamment le stress oxydatif. Ce tripeptide, constitue un cofacteur de la glutathion peroxydase (GPx), une enzyme antioxydante sélénium-dépendante qui dégrade le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau. Durant cette réaction deux molécules de GSH sont convertis en une molécule de glutathion disulfure GSSG. Le glutathion est consommé au cours de ce processus



et doit être reconstitué afin que la cellule empêche l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à des niveaux toxiques. La reconstitution du glutathion n'est toutefois pas favorisée pendant les périodes d'hypermétabolisme prolongé et d'insuffisance calorique, qui accompagnent souvent des maladies graves telles que le sepsis entraînant l'épuisement des réserves de glutathion (**Sener et al., 2005**). De plus, le GSH a des effets sur l'immunité, il est souvent considéré comme anti-inflammatoire, car il inhibe la production et l'effet de plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires. Les patients septiques montrent une déplétion du taux de GSH, qui pourrait constituer un marqueur d'un mauvais pronostic (**Villa et al., 2002 ; Pravda, 2014**).

La mélatonine, une molécule antioxydante restaure le taux de GSH et induit l'expression d'enzyme antioxydante GPx (**Sener et al., 2005 ; Lowes et al., 2011 ; Garcia et al., 2015 ; Rahim et al., 2017**).

### III.1.11. Etude histologique

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

Les résultats histologiques montrent une histologie pulmonaire normale chez les animaux contrôle, sans lésions tissulaires ni altérations structurelles. Les parois alvéolaires sont intactes, la lumière alvéolaire est bien visible et les cloisons inter-alvéolaires sont régulières.

Le poumon des animaux septiques présente des anomalies structurelles caractérisées par une perturbation de l'architecture des tissus pulmonaires, des modifications des parois alvéolaires, un rétrécissement de la lumière alvéolaire et une réduction significative du nombre de sacs aériens. Nous avons également observé une infiltration leucocytaire, une activation des macrophages alvéolaires associés à une hémorragie pulmonaire.

Le traitement à la mélatonine atténue les dommages causés par le sepsis et préserve l'architecture des tissus pulmonaires avec des structures similaires à celles des animaux témoins. Des lésions parenchymateuses avec moins d'infiltration leucocytaire, des parois alvéolaires plus minces, des lumières alvéolaires plus grandes et un plus grand nombre de sacs alvéolaires sont présentes par rapport aux animaux septiques. Par conséquent, la mélatonine protège le tissu pulmonaire des lésions et dommages oxydatifs et inflammatoires induits par sepsis. 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**).

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

Les coupes histologiques de la rate des souris BALB/c contrôle montrent architecture normale avec pulpe blanche faite de follicules lymphoïdes centrés d'une artériole et entourés par la pulpe rouge faite de sinus. Les coupes histologiques de la rate des souris BALB/c septiques montrent une architecture riche en cellules comparée au contrôle. La pulpe blanche est faite de follicules lymphoïdes plus larges tandis que la pulpe rouge présente une infiltration massive de polynucléaires et de macrophages.

Le traitement des souris BALB/c septiques par la mélatonine réduit l'activation folliculaire au niveau de la rate. La pulpe rouge présente une architecture riche en cellule mais l'intensité cellulaire est moindre comparée au contrôle avec présence de macrophage et une diminution de neutrophiles.

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

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

Le mésentère des souris BALB/c présente une structure normale constituée essentiellement de fibroblastes. Le mésentère de souris septiques montre des signes d'inflammation aiguë caractérisée par une activation des fibroblastes et une infiltration leucocytaire étendue, principalement des neutrophiles.

Les neutrophiles, pré-activés par des signaux pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines) sécrétés par la paroi abdominale après inflammation du péritoine par CLP (péritonite), adhèrent à l'endothélium vasculaire puis s'extravasent et atteignent le site enflammé par extravasation. Aux sites d'inflammation, les neutrophiles phagocytent les particules bactériennes et les détruisent par l'action bactéricide et l'exocytose des enzymes lytiques. Le traitement des souris septiques avec de la mélatonine réduit l'infiltration des leucocytes et l'activation des fibroblastes chez les souris BALB/c.

### 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, MPO, NO) et une diminution de marqueurs d'anti-oxydants (catalase, GSH) (**Figure 5**).

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**). Ils résultent 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-associated molecular patterns*) activent les récepteurs PRRs (TLRs) induisant ainsi plusieurs voies de signalisation, impliquées dans la réponse inflammatoire (**Figure 21**) (**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) (**Figure 21**) (**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 un état hyper-inflammatoire et un orage ou une tempête cytokinique caractéristique de sepsis (**Herwald et Egesten., 2010**). Bien que, la surexpression des cytokines pro-inflammatoires est nécessaire à l'élimination des agents pathogènes envahisseurs, elles contribuent également à l'inflammation des tissus et au dysfonctionnement de plusieurs organes (**Vincent et al., 2013 ; Weber et Swirski., 2014**).

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 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. Ce dernier influence les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'inflammation et causent directement des lésions tissulaires (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 extra cellular traps*) dans le but d'éliminer le pathogène. Ces produits participent à l'augmentation et au maintien de la réponse inflammatoire, au dysfonctionnement pulmonaire (Delgado-Rizo et al., 2017 ; Aziz et al., 2018).

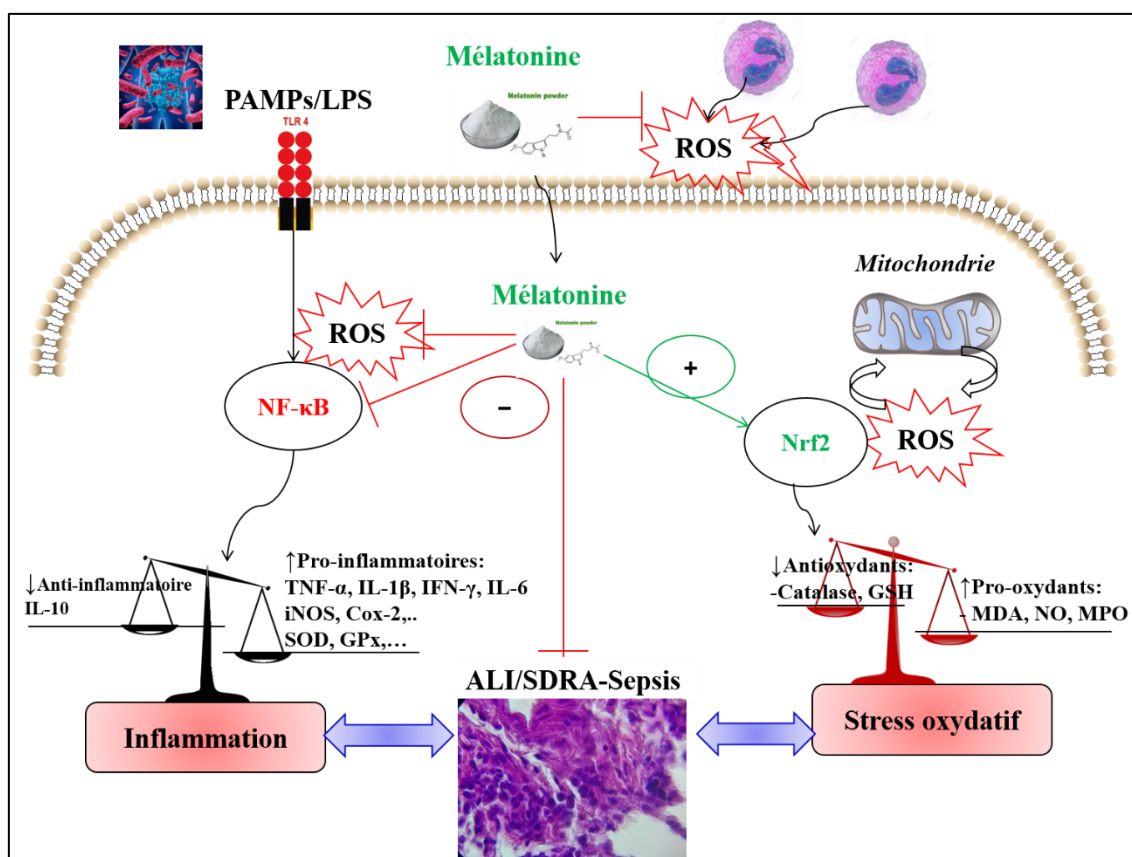
Cependant, la production de ROS augmente également dans les macrophages, les cellules endothéliales et épithéliales du tissu pulmonaire (Valavanidis et al., 2013). Les ROS/RNS libérées amplifient la réponse inflammatoire, et endommagent les constituants cellulaires (ADN, lipides, protéines) conduisant 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 et amplifient ainsi la réponse inflammatoire et le stress oxydatif (Zhou et al., 2001; Horton, 2003).

Les RNS, principalement l'oxyde nitrique (NO•) et le peroxyneutre (ONOO<sup>-</sup>) sont produits sous le contrôle de NF- $\kappa$ B après activation des deux NO Synthases inductibles cytosolique (iNOS) et mitochondriale (i-mtNOS). Le NO• est le produit principal de ces enzymes, il provoque des effets délétères car il induit une vasodilatation systémique et une hypotension, et augmente les dommages cellulaires (Lanone et al., 2000 ; Lundberg et Weitzberg, 2005). De plus, le NO• réagit rapidement avec l'O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> donnant un produit très toxique le peroxyneutre ONOO<sup>-</sup> (Lipton et al., 1993). Le peroxyneutre inhibe de manière irréversible les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I et III), l'ATP synthase, réduisant la production d'ATP et favorisant ainsi la mort cellulaire (Cadenas et al., 2000; Escames et al., 2003; Garcia et al., 2017).

Par conséquent, la complexité de la réponse immuno-inflammatoire associée au stress oxydatif et à la mort cellulaire lors du syndrome septique exige une thérapie à base d'une molécule ayant un effet pléiotrope anti-inflammatoire, immunorégulateur, antioxydant et anti-apoptotique comme la mélatonine. (Rodriguez *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2017 ; Rahim *et al.*, 2017 ; Rahim *et al.*, 2021).

La mélatonine est un antioxydant puissant qui élimine et neutralise les ROS/RNS et induit l'expression des enzymes anti-oxydantes (SOD, GPx et GRd) par activation du facteur de transcription NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (Rodriguez *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2017 ; Rahim *et al.*, 2017, Rahim *et al.*, 2021).

En outre, la mélatonine réprime la réponse inflammatoire dépendante du NF- $\kappa$ B, rétablit l'homéostasie mitochondriale, et réduit les dommages pulmonaires sepsis-dépendants (Escames *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2014 ; García *et al.*, 2015 ; An *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2019a ; ibrahim *et al.*, 2020).



**Figure 5.** Effet de la mélatonine dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis (**originale**).

**CONCLUSION**  
**Et**  
**PERSPECTIVES**

L'étude de l'effet du sepsis et de la mélatonine dans notre modèle de souris BALB/c suggère:

- L'implication du stress oxydatif dans les dommages oxydatifs pulmonaires induits par sepsis caractérisé par une augmentation de marqueurs pro-oxydants (MDA, MPO, et NO), et une diminution de marqueurs antioxydants (catalase, et GSH). 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 mésentère et la rate des souris septiques. En revanche, une immuno-paralysie systémique caractérisée par une leucopénie, une lymphopénie, une granulopénie et une neutropénie ont été noté chez les souris septiques.
- La mélatonine caractérisée 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 mélatonine 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 :

- Elucider les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'immuno-paralysie (leucopénie, lymphopénie, neutropénie), caractéristique du sepsis chez les patients et observée dans notre modèle de BALB/c.
- Etudier la réponse immuno-inflammatoire et les mécanismes physiopathologiques à un temps précoce (6h, 12h et 18h) et tardif de sepsis (48h, 72h et 96h).
- Etudier l'effet de la mélatonine sur la mortalité induite par sepsis en utilisant un modèle de CLP létale.
- Rechercher des paramètres diagnostics précoces et spécifiques du sepsis.

**RÉFÉRENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**



**A**

- Acuña-Castroviejo, D., Cutando, A., Gómez-Moreno, G., Arana, C. & Reiter, R. J. (2007). Melatonin: potential functions in the oral cavity. *Journal of periodontology*, 78(6), 1094-1102.
- Aebi H.(1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* ; 105:121-126.
- An R, Zhao L, Xi C, Li H, Shen G, Liu H, Zhang S, Sun L.2016. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Basic Res Cardiol*; 111:8.
- Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci Elite Ed*; 1: 277-87
- Aziz, M., Hirano, Y., Ode, Y., Ochani, M., Wang, P. (2018). Targeting junctional adhesion molecule-C ameliorates sepsis-induced acute lung injury by decreasing CXCR4+ aged neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 104(6), 1159-1171.

**B**

- Bao, Z., Ye, Q., Gong, W., Xiang, Y., & Wan, H. (2010). Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury. *International immunopharmacology*, 10(2), 259-263.
- 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.
- Bedreag, O. H., Rogobete, A. F., Sarandan, M., Cradigati, A. C., Papurica, M., Dumbuleu, M. C., ... & Sandesc, D. (2015). Oxidative stress in severe pulmonary trauma in critical ill patients. Antioxidant therapy in patients with multiple trauma—a review. *Anaesthesiology Intensive Therapy*, 47(4), 351-359.
- Bernard, S., Monteiller, V., Komatitsch, D., & Lasaygues, P. (2017). Ultrasonic computed tomography based on full-waveform inversion for bone quantitative imaging. *Physics in Medicine & Biology*, 62(17), 7011.
- Berthélémy, S. (2014). L'hémogramme ou numération-formule sanguine. *Actualités Pharmaceutiques*, 53(538), 53-55.

- Besnier M, Caporali A, Meloni M, Nailor A, Mitić T, Shantikumar S, Riu F, Sala-Newby GB, Rose L, Katare R, Voellenkle C. p75NTR-dependent activation of NF-κB regulates microRNA-503 transcription and pericyte–endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nature communications*. 2015 Aug 13;6(1):8024.
- Blandizzi, C., Fornai, M., Natale, G., Colucci, R., Tuccori, M., Carazzina, G., Antonioli, L., Baldi, S., Lubrano, V., Abramo, A., & Del Tacca, M. (2005). Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 372(1), 79–87.
- Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D (2016) TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends Cell Biol*; 26:249–261.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101, 1644–1655.
- Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C., Takasu, O., Osborne, D. F., Walton, A. H., & Hotchkiss, R. S. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama*, 306(23), 2594-2605.
- Bouglé A, Annane D. (2007). Physiopathologie du choc septique. *Antibiotiques* ; 9: 9-19.
- Bouguerne B. (2012). Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat. Université Toulouse, Toulouse, 198p
- Bradford MM.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem* ; 72:248- 254.

## C

- Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A. (2000). Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic Res* ; 33:747–756.
- Calderari B et Liaudet L. (2010). Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dysfonction d'organes au cours du sepsis. *Revue Médicale Suisse*, 6 : 2406-24077.
- Cao C, Yu M, Chai Y. (2019). Pathological alteration and therapeutic implications of sepsis-induced immune cell apoptosis. *Cell Death & Disease*; (10) : 2-14.

- Chen, L., Iwashyna, T.J., Odden, A., Rohde, J., Bonham, C., Kuhn, L., Malani, P. and Flanders, S., 2014. Identifying patients with severe sepsis using administrative claims: patient-level validation of the angus implementation of the international consensus conference definition of severe sepsis. *Medical care*, 52(6), p.e39.
- 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
- Claustrat, B., and J. Leston. "Melatonin: Physiological effects in humans." *Neurochirurgie* 61.2-3 (2015): 77-84.
- Cloutier L, René A, Jutras A. (2014). La formule sanguine complète. *Pratique clinique* ; 1- 11.
- Costantino G, Cuzzocrea S, Mazzon E, et al. (1998). Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation *Eur J Pharmacol*; 363:57-63.

### D

- 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
- Delgado-Rizo V, Martínez-Guzmán MA, Iñiguez-Gutierrez L, García-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol*. 2017 Feb 6;8:81.
- Draper HH, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*; 186: 421-31
- Dubroux M. (2016). Mise en place du sepsis bag dans la prise en charge du sepsis severe et du choc septique dans les services d'accueil des urgences de lorraine. Université de Lorraine.

### E

- ElGammasy .T M. A, Abushady NA M, Hamza MO T, Shaker R.(2015). Increased myeloperoxidase activity as an indicator of neutrophil-induced inflammation and sepsis in neonates.Egypt J Pediatr Allergy Immunol ;13(1):15-20.
- Escames, G., León, J., Macías, M., Khaldy, H., & Acuña-Castroviejo, D. (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. The FASEB Journal, 17(8), 1-22.
- Eugénie D. Impact de la délétion totale et endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino-résistance dans un modèle de sepsis sévère expérimental. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. (NNT : 2017NORMR011). (tel-01541315).,

## F

- Favero, Gaia, Lorenzo Franceschetti, Francesca Bonomini, Luigi Fabrizio Rodella, and Rita Rezzani. "Melatonin as an anti-inflammatory agent modulating inflammasome activation." International journal of endocrinology 2017 (2017).
- Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. (2009) .Sepsis and septic shock: a history. Crit Care Clin ; 25(1) : 83–101.

## G

- García, José A., et al. "Disruption of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- $\alpha$  and blocks the septic response in mice." The FASEB Journal 29.9 (2015): 3863-3875.
- Garcia JA, Ortiz F, Miana J, Doerrier C, Fernandez-Ortiz M, Rusanova I, Escames G, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. (2017).Contribution of inducible and neuronal nitric oxide synthases to mitochondrial damage and melatonin rescue in LPS-treated mice.J Physiol Biochem 73:235–244.
- Gossez, M. (2019). *Role of regulatory B cells in sepsis-induced immunosuppression* (Doctoral dissertation, Université de Lyon).
- Grand F, Guitton J, Goudable J. (2001). Optimisation of the measurement of nitrite and nitrate in serum by the Griess reaction . Ann Biol Clin ; 59(5):559-65
- Griess, P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H., Weselsky und Benedikt. "Ueber einige azoverbindungen." Chemische Berichte, 12, 426-428.
- Grimaldi DA. (2014). Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression postinfectieuse. Médecine hum

- Gu, Wan-Jie, et al. "The effect of goal-directed therapy on mortality in patients with sepsis-earlier is better: a meta-analysis of randomized controlled trials." *Critical Care* 18 (2014): 1-10.

### H

- Hierso, Régine. Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la drépanocytose: crises vaso-occlusives, taux d'anticorps anti-bande 3 et oxydation du globule rouge. Diss. Antilles, 2015.
- Herwald, H., & Egesten, A. (2010). Journal of Innate Immunity. Journal of Innate Immunity, 2(1), 93-94.
- Horton JW (2003) Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*;189:75–88
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 13(12), 862-874.
- Hrycay EG, Bandiera SM. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*; 74: 35-84.
- Hughes G, Murphy MP, Ledgerwood EC. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem J*; 389:83–89.

### I

- Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., Elshahat, M. E., & Elfiky, A. A. (2020). COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. *Journal of Infection*, 80(5), 554-562.

### J

- Jadeja, Ravirajsinh N., Ranjitsinh V. Devkar, and Srinivas Nammi. "Oxidative stress in liver diseases: pathogenesis, prevention, and therapeutics." *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017 (2017).

### K

- Kınğır, Z. B., Kumral, Z. N. Ö., Çam, M. E., Çilingir, Ö. T., Şekerler, T., Ercan, F., ... & Okuyan, B. (2019). Effects of dapagliflozin in experimental sepsis model in

rats. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery/Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*, 25(3).

- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*, 77(5), 598-625.
- Kumar V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. *Int Immunopharmacol*. 2020 Dec;89(Pt B):107087

### L

- Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Henin D, Poderoso JJ, Panis Y, Zedda C, Billiar T, Payen D, Aubier M, Boczkowski J. (2000). Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Respir Crit Care Med*; 162:2308–2315.
- Leentjens, J., Kox, M., van der Hoeven, J. G., Netea, M. G., & Pickkers, P. (2013). Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change?. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(12), 1287-1293.
- 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.
- Lefevre G, Beljean-Leumarie M, Beyerle F, Bowfont-Rousselot D, Cristol JP, Therond P, Torreilles J. (1998). Evaluation of lipid peroxidation by assaying the thioarbituric acid reactive substances. *Annales de biologie c*
- 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.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*;364:626–632.
- Lorente LE, Martín MA M, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez AL, Labarta LO, Díaz CE, Solé-Violán JO, Ferreres JO, María Borreguero-León JU, Jiménez AL, and Morera-Fumero 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.
- 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:L622–L64
- Lowes DA, Almawash AM, Webster NR, Reid VL, Galley HF. (2011). Melatonin and structurally similar compounds have differing effects on inflammation and mitochondrial function in endothelial cells under conditions mimicking sepsis. *Br J Anaesth*; 107(2):193 -201
- Lipton, S. A., Choi, Y. B., Pan, Z. H., Lei, S. Z., Chen, H. S. V., Sucher, N. J., ... & Stamler, J. S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364(6438), 626-632.
- 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.
- Luiking, Yvette C., Mariëlle PKJ Engelen, and Nicolaas EP Deutz. "Regulation of nitric oxide production in health and disease." *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 13.1 (2010): 97.
- Lundberg JO, Weitzberg E (2005) NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25:915–922.

### M

- Markwart, R., Condotta, S. A., Requardt, R. P., Borken, F., Schubert, K., Weigel, C., ... & Rubio, I. (2014). Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naive T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. *PloS one*, 9(12), e115094.
- Martoja, M., & Marcaillou, C. (1993). Localisation cytologique du cuivre et de quelques autres métaux dans la glande digestive de la seiche, *Sepia officinalis* L (Mollusque Céphalopode). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(3), 542-550.
- Migdal, Camille, and Mireille Serres. "Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant." *médecine/sciences* 27.4 (2011): 405-412.
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62–71.

- Miravittles, M., Soler-Cataluña, J. J., Calle, M., Molina, J., Almagro, P., Quintano, J. A., ... & Ancochea, J. (2017). Spanish Guidelines for Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GesEPOC) 2017. Pharmacological Treatment of Stable Phase. *Archivos de bronconeumologia*, 53(6), 324-335.
- Morgan MJ, Liu ZG (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21:103–115.

### N

- Napolitano LM. (2018). Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect ;* 19(2):117-125.
- Nathan C. (2002). Points of control of inflammation. *Nature*; 420: 846–852

### O

- Oguz, H. N., & Prosperetti, A. (1998). The natural frequency of oscillation of gas bubbles in tubes. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 103(6), 3301-3308.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3. PMID: 36810.

### P

- Padmanabhan, S., Delles, C., Marcano, A. C. B., Munroe, P. B., McClure, J. D., Brain, N. J., ... & Dominiczak, A. F. (2006). Variants of the human mu type glutathione-s-transferase (GSTM) gene family are associated with hypertension.
- Phaniendra, Alugoju, Dinesh Babu Jestadi, and Latha Periyasamy. "Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases." *Indian journal of clinical biochemistry* 30 (2015): 11-26.
- Poujol FA. (2016). Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et clinique des altérations lymphocytaires induites lors des syndromes septiques, Université Claude Bernard –Lyon 1.
- Pravda JAY. (2014). Metabolic theory of septic shock. *World J Crit Care Med*; 4:3(2): 45-54.

### Q



- Qiu C, Wu J, Pei F, et al. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2019;31(7):847-851. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.07.010
- Qiu C, Wu J, Pei F, et al. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2019;31(7):847-851. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.07.010

R

- 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 response 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.
- Rahim, M. N., & Chandran, S. S. C. (2021). Investigating EFL students' perceptions on e-learning paradigm-shift during Covid-19 pandemic. *Elsya: Journal of English Language Studies*, 3(1), 56-66.
- Rawisz, J.E., Sharon, P., and Stenson, W.F. 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, 87(6): 1344–1350.
- Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS (2005) Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via posttranslational modification. *Antioxid Redox Signal* ; 7:619–626.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*; 61:253-278.
- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, et al. Reducing oxidative/ nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009;44:175-200.
- Reiter RJ, Tan DX, Galano A. (2014). Melatonin: exceeding expectations. *Physiology Bethesda*; 24:325–333.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*; 4:31-36S 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.

- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, et al. (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* ;36:1–9.
- Romá-Mateo, Carlos, Carmen Aguado, José Luis García-Giménez, José Santiago Ibáñez-Cabellos, Marta Seco-Cervera, Federico V. Pallardó, Erwin Knecht, and Pascual Sanz. "Increased oxidative stress and impaired antioxidant response in Lafora disease." *Molecular neurobiology* 51 (2015): 932-946.
- Rozenberg S, Besse S, Brisson H, Jozefowicz E, Kandoussi A, Mebazaa A, Riou B, Vallet B and Tavernier B. (2006). Endotoxin-induced myocardial dysfunction in senescent rats *Critical Care*;10:1-9.
- Rudd E, Johnson CS, Agesa K, Scachelford K, Tsoi D et al. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study. *ScienceDirect*, 395(10219), 200-211.

## S

- Sano R et Reed JC. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1833: 3460–3470.
- Schrijver IR , Kemperman HA , Roest MA , Kesecioglu JO and Dylan W. de Lange1. (2017). Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. *Intensive Care Medicine Experimental*; 5:43
- Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BC.(2005). Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today*;35(1):52-9.
- Serteyn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., & Deby-Dupont, G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét*, 147, 79-93.
- Sevransky, J. E., Martin, G. S., Shanholtz, C., Mendez-Tellez, P. A., Pronovost, P., Brower, R., & Needham, D. M. (2009). Mortality in sepsis versus non-sepsis induced acute lung injury. *Critical care*, 13(5), 1-6.
- Shah Niranjana, Gupta, Rakesh Kumar, Amit Kumar Patel. Arun Kumar Choudhary, Uday Kant Jha, Uday Chandra Yadav, Pavan Kumar Gupta, and Uttam Pakuwal.

"Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review." *Asian Pacific journal of cancer prevention* 15, no. 11 (2014): 4405-4409.

- Shen HM, Pervaiz S. (2006). TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J*; 20:1589–1598.
- 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.
- Stark, K., & Massberg, S. (2021). Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. *Nature Reviews Cardiology*, 18(9), 666-682.
- Sygitowicz, Grażyna, and Dariusz Sitkiewicz. "Molecular mechanisms of organ damage in sepsis: an overview." *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 24 (2021): 552-560.

## T

- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMP s and DAMP s: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews*, 249(1), 158-175.
- Tesniere A, Pèned F, Mira JP. (2008). Immunité innée et sepsis: quand le danger vient de l'intérieur. Endogenous danger signal participate in immune system activation in sepsis; 17:379-386
- 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.
- Tousoulis, Dimitris, Anna-Maria Kampoli, Costas Tentolouris, Nikolaos Papageorgiou, and Christodoulos Stefanadis. 2012. "The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function." *Current Vascular Pharmacology* 10 (1): 4–18

## U

- Uhel, F., Tadié, J. M., & Le Tulzo, Y. (2015). Choc septique: mécanismes du décès. *Réanimation*, 24, S352-S360.

## V

- Valavanidis, Athanasios, et al. "Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung

carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms." *International journal of environmental research and public health* 10.9 (2013): 3886-3907.

- Van der poll T, Marol L. (2017). Coagulation and sepsis. *Thrombosis research*, 149, 38
- Vardon, F., Mrozek, S., Geeraerts, T., & Fourcade, O. (2015). Hypothermie accidentelle chez le traumatisé grave. *Anesthésie & Réanimation*, 1(3), 238-247.
- Victor VM, De la Fuente M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Radic Res.* 2003;37(1):19-27.
- Vijay K. Toll-likereceptors in immunity and inflammatory diseases: past, present, and future. *Int Immunopharmacol.* (2018)59:391–412. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.002
- Villa, P., Sacconi, A., Sica, A., & Ghezzi, P. (2002). Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *The Journal of infectious diseases*, 185(8), 1115-1120.
- Vincent JL, Opale SM, Marshall JC, Tracey KJ. Définitions de la septicémie : il est temps de changer. *Lancette.* (2013) 381 : 774–5.

## W

- Wang RI, Hui LI, Li XU, Hui ZH and Rui XI.(2015). Involvement of nuclear receptor RZR/ROR $\gamma$  in melatonin-induced HIF-1 $\alpha$  inactivation in SGC-7901 human gastric cancer cells. *Oncology Reports* ; 34: 2541-2546,
- Wang WA, Yang XI, Chen QI, Guo MI, Liu S, Liu J, Wang JI, Huang FE. (2019). Sinomenine attenuates septic-associated lung injury through the Nrf2-keap1 and autophagy. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 72(2), 259-270.
- Wei Hu, Chao DE, Zhiqiang Ma, Dongjin WA, Chongxi Fan, Tian Li, Shouyin Di, Bing Gong, Reiter RU and Yang YA.(2017). Utilizing melatonin to combat bacterial infections and septic injury. *British Journal of Pharmacology* ;174 754–768.
- Weiss, S. L., & Deutschman, C. S. (2014). Elevated malondialdehyde levels in sepsis—something to 'stress' about?. *Critical Care*, 18, 1-2.
- Weber, G. F., Chousterman, B. G., Hilgendorf, I., Robbins, C. S., Theurl, I., Gerhardt, L. M., ... & Swirski, F. K. (2014). Pleural innate response activator B cells protect against pneumonia via a GM-CSF-IgM axis. *Journal of Experimental Medicine*, 211(6), 1243-1256.

- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. (2000) .Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*; 7:53–58.

X

- Xiao, L. P., Shi, Z. J., Xu, F., & Sun, R. C. (2012). Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 118, 619-623.
- Xu, L., Zhang, W., Kwak, M., Zhang, L., Lee, P. C. W., & Jin, J.-O. (2019). *Protective Effect of Melatonin Against Polymicrobial Sepsis Is Mediated by the Anti-bacterial Effect of Neutrophils. Frontiers in Immunology*, 10.

Z

- Zarjou A et Argaval A. (2011). Sepsis and acute kidney 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* 31:1405–1416.

# **ANNEXES**

## Annexe 1

**Tableau I.** Définitions du sepsis (*American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*) (**Bone et al., 1992**).

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>SIRS</b>          | Au moins deux des anomalies suivantes :<br><ul style="list-style-type: none"> <li>– température &gt; 38 °C ou 90/min</li> <li>– fréquence cardiaque &gt; 90/min</li> <li>– fréquence respiratoire &gt; 20/min ou PaCO<sub>2</sub> &lt; 32 mmHg</li> <li>– leucocytes sanguins &gt; 12 000/mm<sup>3</sup> ou 10 % de cellules immatures</li> </ul> |
| <b>Sepsis</b>        | SIRS associé à une infection cliniquement ou microbiologiquement documentée   |
| <b>Sepsis sévère</b> | Sepsis et dysfonction d'au moins un organe :<br><ul style="list-style-type: none"> <li>– hypotension (PAS &lt; 90 mmHg ou réduction d'au moins 40 mmHG de la PAS Habituelle en l'absence d'autres cause)</li> <li>– oligurie</li> <li>– encéphalopathie aiguë</li> <li>– hypoxie inexpliquée</li> <li>– coagulopathie</li> </ul>                  |
| <b>Choc septique</b> | Sepsis sévère et hypotension persistante malgré un remplissage adéquat et/ou nécessité de drogues vasoactives   |

**SIRS** : systemic inflammatory response syndrome ; **PAS** : pression artérielle

**Tableau II.** Les scores SOFA (*the Sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment*).

Adapté de Singer et al (Singer et al., 2016).

|   |       | Score       |                  |                                       |   |   |
|---|-------|-------------|------------------|---------------------------------------|---|---|
| Système                                     |       | 0           | 1                | 2                                     | 3   | 4   |
| <b>Respiration</b>                          |       |             |                  |                                       |   |   |
| PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub><br>(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>                          |       |             |                  |                                       |   |   |
| Plaquettes x10 <sup>3</sup> /μL             |       | ≥150        | <150             | <100                                  | <50   | <20   |
| <b>Foie</b>                                 |       |             |                  |                                       |   |   |
| Bilirubine<br>(μmoles/L)                    | mg/dL | <1.2 (20)   | 1.2-1.9(20-32)   | 2.0-5.9(33-101)                       | 6.0-11.9(102-204)   | >12.0(204)  |
| Cardiovasculaire                            |       | 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> | Dopamine>15 or epinephrine>0.1 or norepinephrine>0.1 <sup>a</sup> |
| <b>Système nerveux central</b>              |       |             |                  |                                       |   |   |
| Glasgow Scale score <sup>b</sup>            | Coma  | 15          | 13-14            | 10-12                                 | 6-9   | <6  |
| <b>Rénal</b>                                |       |             |                  |                                       |   |   |
| Créatinine, mg/dL<br>(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)   |
| Production d'urine<br>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.



*Annexe 2*

**Les appareillages**



**Centrifugeuse réfrigérée**



**Test ELISA**



PH mètre



Vortex

Balance de précision



Agitateur

Microscope optique

Homogénéisateur



Centrifugeuse



Spectrophotomètre UV-visible

## Listes des réactifs et consommables

| <i>Réactifs et solutions</i>  | <i>Consommables</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 (Thiobarbituric acid), EDTA.                              | Cuve de spectrophotmètre 1et 3mL, Cuve en quartz.                   |
| BSA (Bovine serum albumin).   | Flacon en verre, Boite de pétri, Papier Ph.                         |
| Ethanol 100°, Formol.   | Trousse de dissection.  |

## Annexe 3

**Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine****A. Fixation**

La fixation consiste à 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 fixées dans du formol tamponné pendant 24 heures.

**B. Déshydratation et inclusion**

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

**Tableau III.** 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 IV**) (**Fischer et al., 2008**).

Les coupes sont d'abord colorées par l'hématoxyline pendant 10 minutes puis à l'éosine pendant 1 min. Elles sont rincées après chaque coloration pour éliminer l'excès des colorants. Les lames sont montées pour préserver les colorations. Ils sont déshydratés grâce à 3 bains de d'alcool 100° suivis de 3 bains de toluène pendant 40 sec chacun, puis des lamelles de verre sont collées par-dessus (grâce à des résines synthétiques Eukit) afin de préserver les

préparations. Les lames ainsi montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années.

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

| <b>Etapes</b>         | <b>Réactifs</b>        | <b>Durée</b> |
|-----------------------|------------------------|--------------|
| <b>Déparaffinage</b>  | Etuve 100°C            | 5 min        |
|                       | 3 bains de toluène     | 2 min x3     |
| <b>Réhydratation</b>  | 1 bain d'éthanol 100°  | 2 min        |
|                       | 1 bain d'éthanol 95°   | 2 min        |
|                       | 1 bain d'éthanol 80°   | 2 min        |
|                       | 1 bain d'éthanol 70°   | 2 min        |
|                       | 1 bain d'eau distillée | 2 min        |
| <b>Coloration H-E</b> | Hématoxyline           | 10 min       |
|                       | Lavage eau             | 2 min        |
|                       | Eosine                 | 1 min        |
|                       | Lavage eau             | 2 min        |
| <b>Déshydratation</b> | 3 bains d'éthanol 100° | 45 sec x3    |
|                       | 3 bains de Toluène     | 45 sec x3    |

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

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