

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



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de biologie et physiologie cellulaire

MEMOIRE DE MASTER EN BIOLOGIE

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

THEME

**Effet de l'inhibition de facteur de transcription NF-KB sur les
dommages hépatiques induits par le sepsis chez la souris**

Présenté par :

M^{lle} KHIDAS Fatma

et

M^{lle} MANSOUR Hanane

Soutenu le : 04/07/2024

Devant le jury composé de :

Mr BENYAHIA N.	MAA	USDB1	Président.
M^{me} CHALAL N.E.	MCA	USDB1	Examinatrice.
M^{me} AISSANI ELFERTAS R.	MCB	USDB1	Promotrice.
M^{me} RAHIM I.	MCA	USDB1	Co-Promotrice.

Promotion 2023 /2024

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

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

Nous remercions infiniment notre promotrice **Dr. Aissani El-Fertas Radia**, d'avoir accepté de nous encadrer, pour son soutien moral et ses conseils très importants durant toute la période de notre formation. Qu'elle trouve ici nos sentiments de gratitude et l'expression de notre vive reconnaissance.

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

Nous tenons à exprimer notre respect aux membres du jury.

Nous commençons d'abord par le **Dr. Benyahia Noureddine**. Qui a accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme président de Jury. Qu'il soit assuré de notre respectueuse considération.

Nos vifs remerciements vont aussi au **Dr. Chalal Nour El houda**. Pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de juger et d'examiner ce modeste travail.

Nous adressons, nos sincères remerciements à M^{me} le **Pr. SAADI LEILA**, professeur et chef d'option BMC à l'USDB pour la confiance et l'aide qu'elle nous a accordé.

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

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

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

À ma très chère mère Baya

La prunelle de mes yeux, 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.

À mon très cher Père Mohamed

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

À mes très chères sœurs : **Meriem** ainsi que son mari **Yacine Rabeh**, et **Soumia**. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

À mes très chers frères : **Samir** que dieu l'accorde dans son vaste paradis, **Mohamed**, **Ibrahim**, **Youcef** et **Ismail**, que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

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

À ma binôme **Hanane**, ensemble nous avons vécu des très belles expériences, Je suis tellement heureuse de terminer ce parcours avec toi.

FATMA

Du profond de mon cœur je dédie ma réussite à tous ceux qui me sont chers

A celui dont je porte le nom avec une grande fierté, à l'homme le plus précieux du monde,

À mon cher père Lounes, Que dieu ait pitié de lui et accorde un paradis.

À mon ange dans la vie, qui m'a soutenu dans ses prières et ses supplications, à celle qui a veillé la nuit pour éclairer mon chemin, à celle qui a porté la responsabilité de mère et de père ensemble, à la femme la plus merveilleuse qui existe, ***À ma très chère mère naima***.

À mes très chères sœurs : Soumia et Ghania ainsi que son mari Mourad et leur fils
Mouhamed yanis.

À mon frère et mon soutien dans la vie Mouhamed. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

À mon fiancé salim qui m'a soutenu et m'a donné toute confiance pour terminer mes études,
je vous souhaite bonne chance et bonne santé.

À mes très chères amies : HASNAOUI Nour el houda, EL METENNANI Soumya ines,
HANECHÉ soumia, DJENOUNE Selma, pour son soutien moral.

Sans oublier ma binôme **Fatma**, pour tous les moments passés ensemble et pour votre patience tout au long de ce recherche.

HANANE

Le sepsis est un problème majeur de santé publique, caractérisé par une exacerbation de la réponse immunitaire de l'hôte face à l'agent infectieux, un stress oxydatif et une défaillance d'organes. Malgré les avancées thérapeutiques, la mortalité liée à cette affection reste élevée. Notre recherche vise à mettre en évidence l'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par le sepsis et le rôle du PDTC, inhibiteur du NF- κ B, dans leur prévention.

Pour induire un sepsis polymicrobien, nous avons utilisé la technique de ligature et perforation caecale (CLP) chez des souris BALB/c, traitées par une dose de 200 mg/kg de PDTC. Les souris ont été sacrifiées 24 heures après le traitement, et leurs organes (foie et rate) ont été prélevés pour des analyses biochimiques et histologiques.

Nos résultats montrent que le stress oxydatif induit par le sepsis se manifeste par une augmentation du taux de MDA (marqueur pro-oxydant) et une diminution de la catalase (marqueur antioxydant). Le PDTC, en exerçant un effet antioxydant, rétablit l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants en réduisant le MDA et en augmentant la catalase. Les analyses histologiques révèlent des dommages oxydatifs et métaboliques au niveau du foie (cholestase, stéatose hépatique non alcoolique aiguë), associés à une activation de la réponse immunitaire et inflammatoire, caractérisée par une forte infiltration leucocytaire dans le foie, et la rate. Le PDTC prévient les dommages oxydatifs, métaboliques et inflammatoires induits par le sepsis.

Nos résultats ouvrent des perspectives prometteuses pour l'utilisation thérapeutique du PDTC dans le traitement du sepsis, et confirment le rôle clé du stress oxydatif dans la physiopathologie de cette maladie.

Mots clés : Sepsis, stress oxydatif, PDTC, NF- κ B, foie, inflammation.

Sepsis is a major public health problem, characterized by an exacerbation of the host immune response to the infectious agent, oxidative stress and organ failure. Despite therapeutic advances, mortality related to this condition remains high. Our research aims to highlight the involvement of oxidative stress in sepsis-induced liver alterations and the role of PDTC, an NF- κ B inhibitor, in their prevention.

To induce polymicrobial sepsis, we used the cecal ligation and puncture (CLP) technique in BALB/c mice, treated with a dose of 200 mg/kg of PDTC. The mice were sacrificed 24 h after treatment, and their organs (liver and spleen) were harvested for biochemical and histological analyses.

Our results show that sepsis-induced oxidative stress is manifested by an increase in MDA (pro-oxidant marker) and a decrease in catalase (antioxidant marker). PDTC, by exerting an antioxidant effect, restores the balance between pro-oxidants and antioxidants by reducing MDA and increasing catalase. Histological analyses reveal oxidative and metabolic damage in the liver (cholestasis, acute non-alcoholic hepatic steatosis), associated with an activation of the immune and inflammatory response, characterized by a strong leukocyte infiltration in the liver and spleen. PDTC prevents sepsis-induced oxidative, metabolic and inflammatory damage.

Our results open promising perspectives for the therapeutic use of PDTC in the treatment of sepsis, and confirm the key role of oxidative stress in the pathophysiology of this disease.

Keywords : Sepsis, oxidative stress, PDTC, NF- κ B, liver, inflammation.

تعفن الدم هو مشكلة صحية عامة كبرى، ويتميز بتفاقم الاستجابة المناعية للمضيف للعامل المعدي، والإجهاد التأكسدي وفشل الأعضاء. وعلى الرغم من التقدم العلاجي، فإن الوفيات المرتبطة بهذه الحالة لا تزال مرتفعة. يهدف بحثنا إلى تسليط الضوء على تورط الإجهاد التأكسدي في التغيرات الكبدية الناجمة عن الإنتان ودور PDTC وهو مثبط NF-KB، في الوقاية منها.

لتحفيز تعفن الدم متعدد الميكروبات، استخدمنا تقنية ربط وثقب cecal (CLP) في الفئران BALB/c، وتم علاجها بجرعة قدرها 200 ملغم/كغم من PDTC. تمت التضحية بالفئران بعد 24 ساعة من العلاج، وتم جمع أعضائها (الكبد والطحال) لإجراء التحاليل البيوكيميائية والنسجية.

تظهر نتائجنا أن الإجهاد التأكسدي الناجم عن تعفن الدم يتجلى في زيادة مستوى MDA (علامة مؤيدة للأكسدة) وانخفاض في الكاتالاز (علامة مضادة للأكسدة). PDTC، من خلال ممارسة تأثير مضاد للأكسدة، يستعيد التوازن بين المواد المؤكسدة و المضادة للأكسدة عن طريق تقليل MDA وزيادة الكاتالاز. تكشف التحليلات النسيجية عن تلف تأكسدي والتمثيل الغذائي (ركود صفراوي، مرض الكبد الدهني غير الكحولي الحاد)، المرتبط بتنشيط الاستجابة المناعية والالتهابية، التي تتميز بتسلل كريات الدم البيضاء القوية إلى الكبد والطحال. يمنع PDTC الاضرار المؤكسدة والتمثيل الغذائي والالتهابات التي يسببها تعفن الدم.

تفتح نتائجنا آفاقاً واعدة للاستخدام العلاجي لـ PDTC في علاج تعفن الدم، وتؤكد الدور الرئيسي للإجهاد التأكسدي في الفيزيولوجيا المرضية لهذا المرض.

الكلمات المفتاحية: تعفن الدم، الإجهاد التأكسدي، PDTC، الكبد، الالتهاب.

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

AMP : peptides antimicrobiens

BSA : Bovine Serum Albumin

CAT : Catalase

CLP : Cecal Ligation Puncture

COX2 : cyclooxygenase 2

CXCL10 : Ligand de chimiokine motif CXC 10

CXCL8 : Ligand de chimiokine motif CXC 8

EDTA : Ethylènediamine-tétraacétique

FNS : Formule d'énumération sanguine

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HLA-DR : Antigène Leucocytaire Humain-Antigène D

HO• : Radicaux hydroxyles

IKB α : NF-kappa-B inhibitor alpha

IL-1 : Interleukine -1

IL-10 : Interleukine -10

IL-6 : Interleukine -6

IL-8 : Interleukine -8

iNOS : Oxyde Nitrique Synthase

LPS : Lipopolysaccharide

MDA : Malondialdéhyde

MYD88 : Myeloid Differentiation primary response 88

NF- κ B : Nuclear Factor κ B

•NO : L'oxyde nitrique radicalaire

O₂⁻ : L'anion superoxyde

ONOO⁻ : peroxydinitrite non radicalaire

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PDTC : Pyrrolidine-Di-Thio-Carbamate

PRRs : Pattern Recognition Receptors

RNS : Reactive Nitrogen species

ROS : Reactive oxygen Species

SIRS : Syndrome de Réponse inflammatoire Systémique

SOD : SuperoxydeDismutase

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

TBA : Acide thiobarbiturique

TBARS : Espèces réactives de TBA

TLRs : ToolLike Receptors

TNF α : Tumor Necrosis Factor (facteur de nécrose tumorale)

Figure 1 : Classification des conditions infectieuses ou non-infectieuses liées à un sepsis.	03
Figure 2 : Phases hyper-inflammatoire et d'immunosuppression au cours du sepsis.	06
Figure 3 : Génération et effets des espèces réactives de l'oxygène et l'azote (RNS).	08
Figure 4. Etapes critiques de CLP induite chez la souris.	12
Figure 5. Effet des différents traitements sur le poids des souris BALB/c.	16
Figure 6. Effet des différents traitements sur le poids du foie et de la rate.	17
Figure 7. Taux de malondialdéhyde hépatique chez les souris BALB/c.	18
Figure 8. Activité catalase hépatique chez les souris BALB/c.	19
Figure 9. Taux de protéines hépatiques chez les souris BALB/c.	20
Figure 10. Taux d'érythrocytes et de plaquettes sanguins chez les souris BALB/c.	21
Figure 11. Taux de granulocytes et de Mid sanguins chez les souris BALB/c.	22
Figure 12. Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang.	23
Figure 13. Micrographie d'une coupe transversale du foie de souris BALB/c.	25
Figure 14. Micrographie d'une coupe transversale de la rate de souris BALB/c.	27
Figure 15. Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants du PDTC dans l'altération hépatique induit par sepsis.	29

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

Le score de Glasgow : est un test qui permet d'évaluer l'état de conscience d'un patient à un instant donné et de suivre son évolution. Il se base sur trois paramètres : ouverture des yeux, réponse verbale et réponse motrice.

L'hépatite hypoxique ou hépatite ischémique : résulte d'une faible concentration d'oxygène dans le sang, une diminution du flux sanguin due à une baisse de la pression artérielle et/ou à une augmentation de la pression veineuse, ou un manque de transporteurs d'oxygène. Il en résulte une nécrose hépatocytaire.

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

La cholangite sclérosante secondaire (CSS) : est une maladie chronique du foie qui affecte les voies biliaires, caractérisée par une inflammation, une fibrose et une destruction des voies biliaires, une formation de sténose. Elle est associée à une progression rapide vers la cirrhose du foie.

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

Synthèses bibliographiques

I. Généralité sur le Sepsis.....	02
II. Physiopathologie du sepsis.....	04
II. 1. Phase hyper inflammatoire.....	04
II. 2. Phase d'immuno- suppression.....	05
II. 3. Dysfonctionnement hépatique associé au sepsis.....	06
III. Stress oxydatif et sepsis.....	07
IV. Thérapie.....	08

Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	10
I. 1. Matériel non biologique.....	10
I. 2. Matériel biologique.....	10
II. Méthodes.....	11
II. 1. Modèle murin de sepsis polymicrobien.....	11
II. 2. Protocole pharmacologique.....	12
II. 3. Etude biochimique.....	13
II. 3. 1. Préparation de l'homogénat tissulaire.....	13
II. 3. 2. Dosage des protéines.....	13
II. 3. 3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif.....	13
II. 3. 3. 1. Dosage d'un paramètres pro-oxydants : Le malondialdéhyde (MDA).....	13
II. 3. 3. 2. Dosage d'un paramètres antioxydants : la catalase.....	14
II. 3. 4. Etude hématologique par FNS.....	14
II. 3. 5. Etude histologique.....	15
II. 3. 6. Etude statistique.....	15

Résultats et Discussion

I.1. Résultats.....	16
I.1.1. Effet du sepsis et du PDTC sur le poids des souris et des organes (foie, rate).....	16
I.1.2. Effet du sepsis et du PDTC sur le taux de MDA hépatique.....	18
I.1.3. Effet du sepsis et du PDTC sur l'activité catalase hépatique.....	19

I.1.4.	Effet du sepsis et du PDTC sur le taux de protéines hépatiques.....	20
I.1.5.	Effet du sepsis et du PDTC sur le taux d'érythrocytes et de plaquettes sanguins.....	20
I.1.6.	Effet du sepsis et du PDTC sur le taux de granulocytes et de Mid sanguins.....	21
I.1.7.	Effet de sepsis et du PDTC sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins.....	22
I.1.8.	Etude histologique.....	23
Discussion		28
Conclusion		30
Références bibliographiques		
Annexes		

Introduction

Le sepsis est la cause la plus fréquente de décès par dysfonctionnement de plusieurs organes. Il peut être d'origine bactérienne, virale ou fongique (**Delaloye et al., 2014**). Plus de 50 millions des personnes en sont touchées chaque année dans le monde, entraînant potentiellement 11 millions de décès par an (**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. En effet, le sepsis affecte plusieurs systèmes (redox, immunitaire, coagulation, métabolique...) et organes (poumon, cœur, foie, rein...) (**Pang et al., 2019 ; Danielski et al., 2020**). Le stress oxydatif est souvent constaté lors du sepsis. Il est la conséquence d'un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants, ce qui contribue au processus septique et peut entraîner des lésions organiques telles que les lésions hépatiques (**Hotchkiss et al., 2003 ; Guo et al., 2021**).

De nombreuses recherches sont en cours afin de mieux définir, diagnostiquer et cerner la physiopathologie de cette affection et la traiter de manière appropriée (**Laroye et al., 2017 ; Salomão et al., 2019**). Des études ont montré que le Pyrrolidine-Di-Thio-Carbamate PDTC, un inhibiteur du facteur NF- κ B, exprime une activité antioxydante en piégeant les radicaux, ce qui pourrait être très intéressante dans le cadre du traitement du sepsis (**Brennan et al., 1995 ; Muller et al., 1997**).

Dans le cadre du projet de fin d'études, il nous a été proposé d'étudier à l'aide d'un modèle murin de sepsis polymicrobien, l'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par sepsis et l'effet du PDTC sur ces derniers. Les objectifs de cette étude sont :

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

Synthèse bibliographique

I. Généralité sur le Sepsis

Le sepsis est un problème de santé mondial et continue d'être la principale cause de décès par infection, avec un taux de mortalité supérieur à 40% (**Napolitano, 2018 ; Qiu et al., 2019 ; Rudd et al., 2020**). En 2020, **Rudd et al.** ont rapporté environ 48,9 millions de cas de sepsis et 11,0 millions de décès liés au sepsis.

Le sepsis est défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) impliquant de multiples changements physiologiques, pathologiques et chimiques provoqués par une infection (**Majno, 1991 ; Kumar, 2018**), et est décrit comme un dysfonctionnement potentiellement mortel de plusieurs organes causé par une réponse déséquilibrée de l'organisme à une infection (**Singer et al., 2016**). Il fut décrit par Hippocrate comme dangereux, odorant, et correspondant à une décomposition biologique du corps (**Majno, 1991 ; Funk et al., 2009**).

En 1914, Schottmueller a découvert que le sepsis est une réponse de l'hôte provoquée par des agents pathogènes circulant dans le sang entraînant une inflammation systémique excessive (**Hawiger et al., 2015**). En 1992, un groupe consensus a suggéré le terme « sepsis sévère » pour désigner un sepsis compliqué par une défaillance organique aiguë, et le terme « choc septique » pour décrire un sepsis associé à une hypotension réfractaire à la réanimation liquidienne (**Bone et al., 1992**).

La définition de la SRIS (syndrome de réponse inflammatoire systémique) est basée sur la présence d'au moins deux des critères suivants : température $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$, fréquence respiratoire $> 20/\text{mn}$, fréquence cardiaque > 90 battements par minute et numération leucocytaire $> 12\,000/\text{mm}^3$ ou $< 4\,000/\text{mm}^3$ (**Figure 1**) (**Dulhunty et al., 2008**).

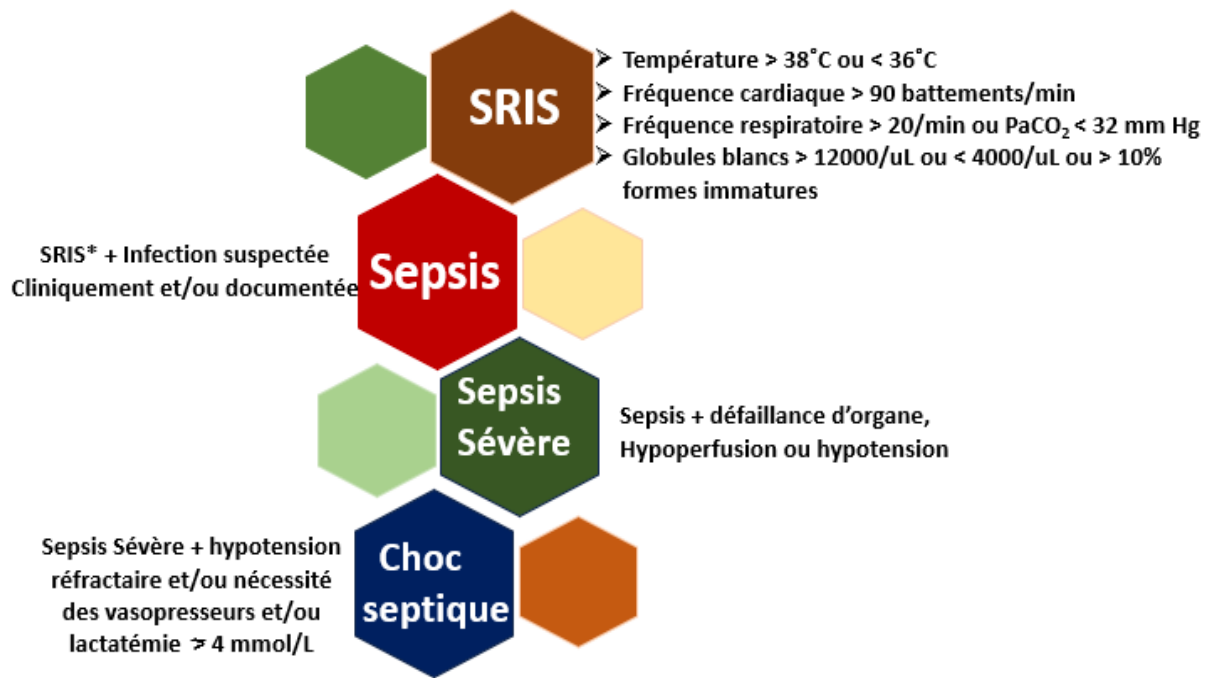


Figure 1 : Classification des conditions infectieuses ou non-infectieuses liées à un sepsis.

(Bone et *al.*, 1992)

La nouvelle définition précise que le sepsis se réfère à la réaction incontrôlée de l'organisme à une infection et à la défaillance d'un organe pouvant être mortelle, soulignant l'importance du mécanisme et de la gravité de la défaillance d'organe causée par une infection, nécessitant une intervention et une identification rapides dans le traitement clinique (Shankar-Hari, 2016 ; Rhodes, 2017). Les nouveaux critères cliniques du sepsis incluent une infection suspectée ou confirmée avec un dysfonctionnement d'organe identifié par une augmentation aiguë de deux points ou plus du score SOFA (the Sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment) (Annexes 1) (Singer et *al.*, 2016).

Le choc septique est défini comme un sous-ensemble cliniquement distinct de cas de sepsis où, malgré une réanimation liquidienne appropriée, les patients présentent une hypotension nécessitant des vasopresseurs pour maintenir une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mm Hg et une concentration sérique élevée de lactate supérieure à 2 mmol/L (Singer et *al.*, 2016).

II. Physiopathologie du sepsis

Des études ont montré que le sepsis se manifeste lorsque la réaction initiale adéquate de l'hôte à une infection est amplifiée puis dérégulée (**Cohen, 2002**), entraînant un déséquilibre entre les réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Il a été signalé que la réponse immunitaire innée, qui, contrairement à la réponse immunitaire adaptative, peut réagir immédiatement aux agents pathogènes envahisseurs, joue un rôle crucial dans l'initiation de la physiopathologie du sepsis (**Hansen et al., 2011**).

La physiopathologie du sepsis est considérée comme une phase initiale hyper inflammatoire qui persiste pendant plusieurs jours suivie d'une phase immunosuppressive plus prolongée (**Hotchkiss et al., 2013**).

II. 1. Phase hyper inflammatoire

La réponse innée aux infections bactériennes et fongiques est avant tout médiée par les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs cellulaires nommés *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), chargés de la reconnaissance de motifs microbiens conservés mais au spectre étroit, connus sous le nom de Pathogene Associated Molecular patterns (PAMPs ou MAMPs) (**Medzhitov et Janeway., 2000**). Les interactions entre PAMPs et PRRs vont enclencher des cascades de signaux intracellulaires dans les cellules immunitaires (**Figure 2**) (**Medzhitov et al., 1997**).

Les TLR membres de la famille des PRR jouent un rôle central dans la réponse immunitaire innée (**Annexes 1**) (**Sadik et al., 2015**). Ils sont exprimés sur diverses cellules immunitaires, notamment les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules B ainsi que les cellules endothéliales (**Akira et al., 2006**). Ce dernier fonctionne dans des voies dépendantes ou indépendantes du MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) (**Gay, 2019**).

L'activation de ces deux voies de signalisation conduit à la libération des molécules pro-inflammatoires dépendantes de l'activation de NF- κ B, [cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, etc.), chimiokines (CXCL8 et CXCL10), espèces réactives de l'oxygène ou génération de ROS, et peptides antimicrobiens ou AMP), molécules d'adhésion, de métalloprotéinases matricielles (MMP), de cyclooxygénase 2 (COX2) et d'oxyde nitrique inductible Synthase (iNOS)] (**Baeuerle et al., 1997 ; Hettmann et al., 1999 ; Kumar 2019b, 2020c, 2021**).

Ainsi, un cycle vicieux est instauré et une libération massive de cytokines à l'échelle systémique qualifiée d'« Orage ou tempête cytokinique » ou d'état d'hyper inflammation systémique est

observée (**Poujol, 2016**). Les cytokines et les chimiokines libérées activent les cellules endothéliales qui expriment des molécules d'adhésion à leurs surfaces. Les polynucléaires neutrophiles circulants peuvent, ainsi, infiltrer les tissus, suivis par le recrutement et l'activation des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques. Ces dernières seront responsables de l'apprêtement antigénique ; elles participent à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B (**Grimaldi, 2014**).

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

Certaines études cliniques ont démontré que l'activation du NF- κ B dans diverses cellules est en corrélation avec la gravité du sepsis et des lésions organiques, ainsi qu'à la létalité elle-même (**Schwartz et al., 1996 ; Arnalich et al., 2000**).

Les patients qui ne survivent pas montrent une activation de NF- κ B plus importante et plus prolongée que les survivants (**Bohrer et al., 1997 ; Arnalich et al 2000**).

II. 2. Phase d'immuno- suppression

Il a été suggéré que la phase hyper inflammatoire soit suivie ou coïncide avec un état prolongé d'immunosuppression (**Hotchkiss et al., 2006 ; Germain., 2012**). Cet état, appelé immunoparalysie induite par le sepsis (**Hotchkiss et al., 2010**), se caractérise par une altération des réponses immunitaires innées et adaptatives, et pourrait jouer un rôle important dans le développement des lésions tissulaires, de la défaillance organique multiple et de la mort induite par sepsis (**Figure 2**) (**Akira et al., 2006**).

Cette phase se distingue par une baisse de nombre de lymphocytes T (auxiliaires et cytotoxiques) en raison de l'apoptose et d'une réponse réduite aux cytokines inflammatoires (Eckle et al., 1991). Des études post mortem des patients en soins intensifs décédés de sepsis ont montré une diminution globale des lymphocytes T CD4+ et CD8+, en particulier dans les organes lymphoïdes comme la rate. Des recherches ont aussi révélé une réduction de la production de cytokines essentielles telles que l'IL-6 et le TNF en réaction à l'endotoxine (Biemond et al., 1995 ; Hotchkiss et al., 2001).

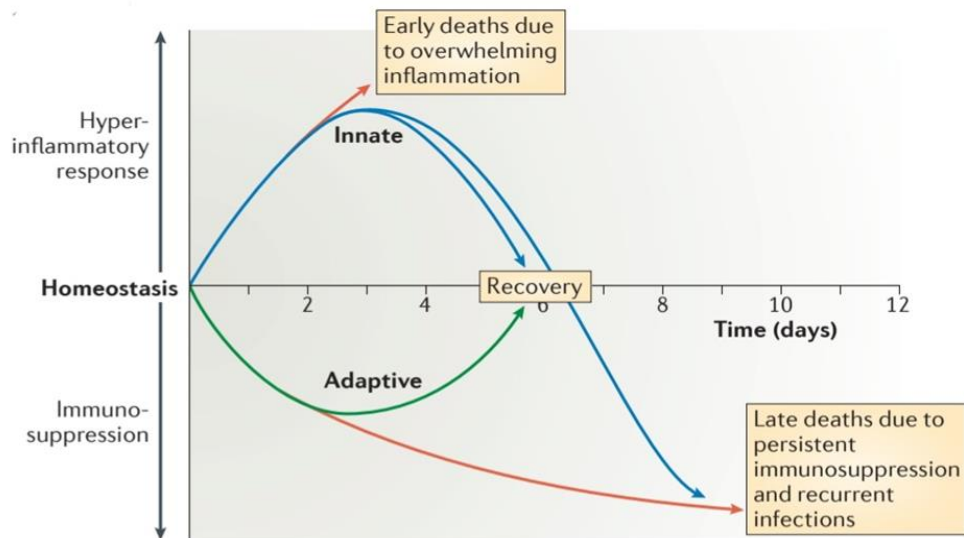


Figure 2 : Phases hyper-inflammatoire et d'immunosuppression au cours du sepsis (Hotchkiss et al., 2013).

II. 3. Dysfonctionnement hépatique associé au sepsis

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme et l'homéostasie immunologique. Cet organe est impliqué dans plus de 200 fonctions, telles que la détoxification, le stockage, la production d'énergie, la conversion des nutriments, l'équilibre hormonal, et la coagulation. Ces fonctions physiologiques cruciales font du foie un organe essentiel à la survie de l'hôte après une blessure grave telle que le sepsis. Des recherches ont démontré que le dysfonctionnement et l'insuffisance hépatique, les complications particulièrement graves du sepsis, contribuent directement à l'évolution de la maladie et à la mort (Canabal et al., 2008).

Au cours du sepsis, le foie est endommagé par des agents pathogènes, des toxines ou des médiateurs inflammatoires. La lésion évolue d'un dysfonctionnement hépatocellulaire actif à des lésions puis à une insuffisance hépatique. Le dysfonctionnement hépatique consiste en des altérations des fonctions hépatocellulaires, telles qu'une diminution de la synthèse ou une diminution de la fonction de clairance (Jarrar et al., 2001).

Les données cliniques et expérimentales suggèrent que le dysfonctionnement hépatique est un signe précoce de sepsis et ce dysfonctionnement précoce est un facteur de risque indépendant et spécifique pour de mauvais résultats chez les patients atteints de sepsis (**Kramer et al., 2007**).

Les lésions hépatiques induites par le sepsis comprennent l'hépatite hypoxique, la cholestase et la cholangite sclérosante secondaire chez les patients gravement malades (**Strnad et al., 2017**).

III. Stress oxydatif et sepsis

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les oxydants (ROS / RNS) et les antioxydants (**Azzi, 2007 ; Prauchner, 2017**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) importantes dans la pathogenèse du sepsis comprennent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles ($HO^{\bullet}$). Le $O_2^{\bullet-}$ et le $HO^{\bullet}$ sont des radicaux libres car ils ont un électron non apparié dans le dernier orbital d'une de leur molécule. Les espèces réactives de l'azote (RNS) comprennent l'oxyde nitrique radicalaire ($\bullet NO$) et le peroxynitrite non radicalaire ($ONOO^-$) (**Meo et al., 2016**).

Au cours de la réponse inflammatoire, les neutrophiles et les macrophages activés génèrent des quantités importantes de ROS et RNS (**van Berlo et al., 2010**).

ROS et RNS produites peuvent provoquer des modifications chimiques réversibles ou irréversibles (oxydation, nitrosylation et nitrosation) dans les protéines, les lipides et l'ADN, entraînant une diminution des fonctions biochimiques (**Valko et al., 2007**). Les ROS contribuent notamment au dysfonctionnement des cellules immunitaires lors d'un sepsis (**Figure 3**) (**Kehrer, 2000**).

En général, la quantité excessive de ROS et RNS produits pendant le sepsis endommage les cellules et les organes (**Zakkar et al., 2009**).

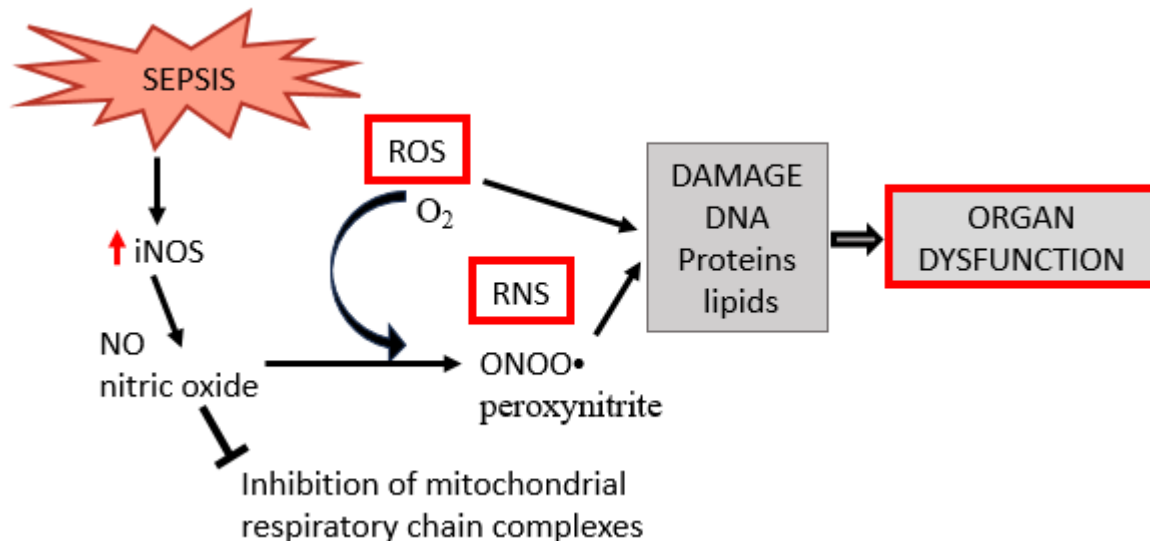


Figure 3 : Génération et effets des espèces réactives de l'oxygène et l'azote (RNS)

(Brown et al., 2004).

IV. Thérapie

Le traitement du sepsis et du choc septique repose généralement sur un traitement antibiotérapie afin d'éliminer le foyer infectieux et sur le traitement symptomatique des défaillances d'organes (remplissage vasculaire, catécholamines et corticoïdes).

Malgré l'amélioration des connaissances de la physiopathologie du sepsis aucune nouvelle thérapie efficace n'a vu le jour depuis plusieurs années. De nombreux essais cliniques ont été réalisés mais ceux-ci n'ont donné lieu à aucune mise sur le marché. Néanmoins, la recherche se poursuit avec de nouveaux essais cliniques qui visent à stimuler le système immunitaire (immunothérapie) pendant la phase tardive de la maladie (Rello et al., 2001).

Les principes fondamentaux de la gestion du sepsis incluent le contrôle de l'infection, l'administration d'antibiotiques et le soutien hémodynamique. Cependant, la corrélation entre le niveau d'antioxydants et les résultats du sepsis justifie également l'utilisation de substances antioxydantes pour le traitement du sepsis. Plusieurs molécules et différentes stratégies ont été utilisées dans une pléthore d'études ces dernières années avec des résultats parfois contradictoires (Mantzaris et al., 2017).

Le pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC) est une substance hydrosoluble de faible poids moléculaire qui possède des propriétés antioxydantes. Des études ont montré que le PDTC inhibe l'activation de NF-κB dans des modèles de choc septique chez le rat et la souris en

empêchant la dégradation de l'IkBa induite par le LPS, ce qui entraîne une inhibition ultérieure de la translocation de la sous-unité NF-kB vers le noyau et donc une réduction de l'expression de l'oxyde nitrique synthase de type II, du TNF- α et d'autres médiateurs (**Liu et al.,1997 ; Liu et al.,1999 ; Lauzurica et al., 1999**).

La réduction de la mortalité chez les souris septiques traitées avec le PDTC a été associée à un double effet : l'effet antioxydant direct et l'inhibition de NF-kB (**Meisner et al., 2000**).

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogies de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Blida 1, de Mars à juin 2024.

Ce travail de recherche a porté sur :

- L'étude de l'implication du stress oxydatif dans les dommages hépatiques induits par sepsis polymicrobien, *in vivo*.
- Le rôle de PDTC dans la prévention du stress oxydatif, de la réponse inflammatoire et des altérations hépatiques induits par sepsis polymicrobien.

I. Matériel

I. 1. Matériel non biologique

Dans notre travail, nous avons établi un protocole expérimental dans lequel nous avons utilisé une molécule synthétique : le Pyrrolidine dithiocarbamate « PDTC » ($C_5H_{12}N_2S_2$, Sigma). Il s'agit d'un inhibiteur sélectif du NF- κ B qui possède également des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Wild et al., 1999 ; Stuhlmeier et al., 2000).

La verrerie, les appareillages, les solutions et réactifs utilisés dans cette étude se trouvent dans **Annexes 2**.

I. 2. Matériel biologique

Nous avons réalisé une étude *in vivo* en utilisant un modèle murin de sepsis polymicrobien induit par CLP (Cecal Ligation and Puncture).

Nous avons mené notre recherche sur des souris mâles de type BALB/c (n= 20), 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. Elles étaient nourries avec un aliment granulé (contenant 49,80% de glucides, 34,50% de protéines, 10% de lipides et un complexe minéral vitaminé de 5,70%) et accès à l'eau du robinet à volonté.

Toutes les expériences ont été réalisées en respectant 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. Méthodes

II. 1. Modèle murin de sepsis polymicrobien

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

Le modèle de CLP est le plus couramment employé car il offre une représentation plus précise de la complexité du sepsis humain, avec des agents pathogènes endogènes simulant une lésion traumatique conduisant à une péritonite chez l'homme (**Rittirsch et al., 2009**).

Les souris sont anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine/ acépromazine (à des doses de 10mg/Kg/i.p et 2mg/Kg/i.p respectivement, administré par voie intra-péritonéale ou IP). 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, permettant d'exposer correctement le cæcum (**Figure 4 A-C**). Une fois exposé, le cæcum est soigneusement ligaturé sous la valve iléo-cæcale avec une suture de soie 4-0, afin d'obtenir la même sévérité du sepsis, puis perforé trois fois avec une aiguille de calibre 22. Une petite quantité de fèces est délicatement pressée à travers le site de ponction. Ensuite, le cæcum est replacé dans la cavité péritonéale et l'incision abdominale est ensuite suturée (**Figure 4 D-I**).

Une fois la procédure chirurgicale terminée, les souris sont immédiatement ramenées dans leurs cages, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture.

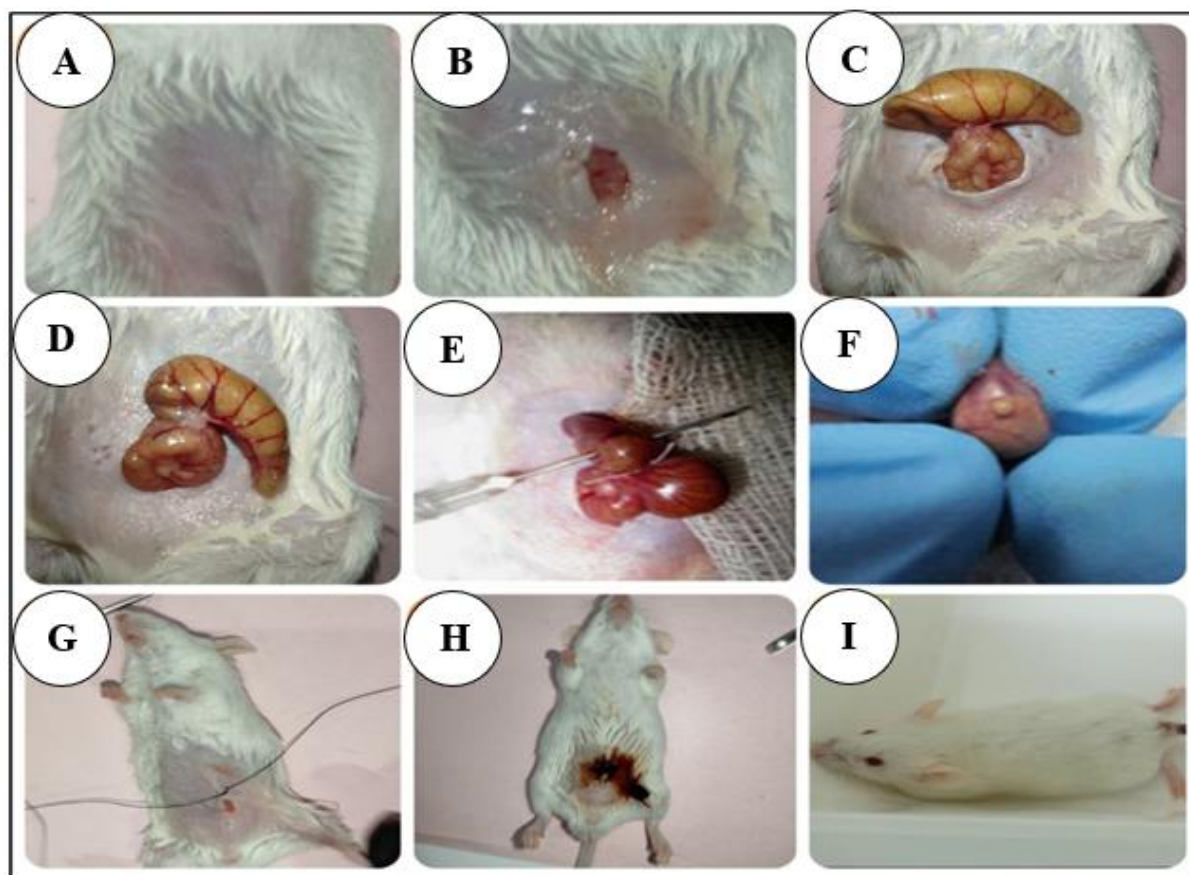


Figure 4. Etapes critiques de CLP induite chez la souris. **A** : Désinfection de la zone abdominale après rasage. **B** : Incision abdominale médiane de 1 cm. **C** : Exposition du cæcum. **D** : Ligature du cæcum sous la valve iléo-cæcale. **E** : Ponction cæcale avec une aiguille de calibre 22. **F** : Libération d’une petite quantité de fèces des sites de ponction. **G** et **H** : Suture et désinfection de l’incision abdominale par du Bétadine. **I** : Réanimation de la souris après CLP.

II. 2. Protocole pharmacologique

Les souris BALB/c ont été réparties en quatre lots :

1. **Lot Contrôle** (n=5) : n’ayant reçu aucun traitement.
2. **Lot PDTC** (n=5) : ayant reçu 200 mg/kg/*ip* de PDTC
3. **Lot septique** (CLP) (n=5) : ayant subi un CLP.
4. **Lot septique traité à la pyrrolidinedithiocarbamate (CLP-PDTC)** (n=5) : ayant reçu une dose de 200 mg/kg/*i.p* de PDTC 30 min avant CLP.

Les animaux ont été sacrifiés 24 h après la CLP. Les organes (foie et rate) ont été immédiatement récupérés, rincés 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 pour déterminer la formule d'énumération sanguine (FNS).

II. 3. Etude biochimique

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

Les tissus hépatiques ont été homogénéisés à une température de 4°C et à une vitesse de 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. Suite à trois cycles de congélation-décongélation, les homogénats sont centrifugés pendant 20 minutes à 10000g/4°C. Les surnageants sont récupérés, puis divisés et conservés à une température de -20 C° jusqu'à leur utilisation (**Blandizzi et al., 2005**).

II. 3. 2. Dosage des protéines

La méthode de Bradford est utilisée pour mesurer la concentration des protéines hépatiques en se basant sur l'interaction du bleu de coomassie G250 avec les protéines, formant un complexe de couleur bleue qui absorbe fortement à 595 nm.

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

II. 3. 3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif

2 marqueurs biochimiques de stress oxydatif ont été analysés dans les homogénats hépatiques, parmi lesquels :

- Les marqueurs pro-oxydants : le malondialdéhyde (MDA).
- Les marqueurs antioxydants : la catalase (CAT).

II. 3. 3. 1. Dosage d'un paramètre pro-oxydant : Le malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est utilisé comme indicateur direct de la peroxydation lipidique. Son dosage repose sur la détermination, par spectrophotométrie à 532nm, de l'intensité de la couleur rose générée suite à la réaction de deux molécules d'acide

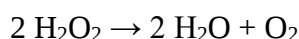
thiobarbiturique (TBA) avec les peroxydes lipidiques ou les espèces réactives de TBA (TBARS), incluant le MDA (**Lefèvre et al., 1998**).

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

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

II. 3. 3. 2. Dosage d'un paramètres antioxydants : la 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 réalisé, en suivant la cinétique de transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et oxygène. 5µL d'homogénat tissulaire sont mélangés à 995 µL de tampon phosphate 50mM, pH 7.4. Ensuite, la réaction est déclenchée par l'ajout de 500 µL de H₂O₂ à 30 mM. La cinétique de la réaction est suivie pendant 2 minutes à 25°C. L'activité de la catalase est mesurée en observant la diminution de l'absorbance à 240nm et elle est exprimée en U/min/mg de protéines (**Aebi, 1984**).

Une unité de catalase correspond à K/6,93x10³. K = (2,3/t) (log A1/A2) où t : temps en seconde ; A1 : Absorbance à temps zéro et A2 : Absorbance à 2 minutes.

II. 3. 4. Etude hématologique par FNS

Un hémogramme ou numération-formule sanguine (NFS) est un test hématologique qui permet une évaluation quantitative (nombre) et qualitative (formule) des composants sanguins tels que : 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 également prescrit dans le cadre du suivi d'un traitement médicamenteux (**Berthélémy, 2014**).

L'hémogramme a été réalisé à l'aide d'un automate.

II.3.5. Etude histologique

L'étude histologique a été réalisée sur le foie et la rate, qui ont été découpés puis fixés dans du formol tamponné à 4% pendant 24h. Les pièces ont ensuite 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 réalisées à l'aide d'un microtome (Américain Optical) et colorées à l'hématoxyline-éosine (H-E) (**Annexe 3**) (**Martoja et Martoja., 1967**).

II.3.6. Etude statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism v.6.0 et les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM).

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.

Résultats et discussion

Dans cette étude, nous avons démontré l'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par le sepsis, caractérisé par un déséquilibre entre les paramètres pro et anti-oxydants. Le foie assure des fonctions métaboliques, hormonales et de défense, jouant un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie systémique. En cas de sepsis, il élimine les bactéries et intervient dans les réponses inflammatoires et dans la coagulation (**Yan et al., 2014**).

Les mécanismes de surveillance immunitaire et d'élimination bactérienne se déroulent principalement dans les sinusoides hépatiques, où différentes cellules immunitaires rencontrent des micro-organismes, des antigènes et des facteurs humoraux, induisant des réponses inflammatoires (**Jenne et al., 2013 ; Brunt et al., 2014**). Ces réponses peuvent entraîner des dommages hépatiques, une anergie des mécanismes de défense, des lésions, une défaillance hépatique et une mortalité (**Yan et al., 2014 ; Woźnica et al., 2018**).

Le dysfonctionnement hépatique survient souvent tôt lors du sepsis, apparaissant chez les animaux environ 1h30 après CLP et moins de 24 heures après l'apparition de la maladie chez les patients (**Recknagel et al., 2012**). Les PAMPs, MAMPs et DAMPs activent les récepteurs PRRs (TLRs), entraînant la phosphorylation des inhibiteurs de NF- κ B. Ce dernier transloque alors dans le noyau pour réguler la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et le sepsis (**Vijay, 2018 ; Kumar et al., 2020**).

L'activation de NF- κ B augmente l'expression de gènes codant pour des molécules d'adhésion, des chemokines (IL-8), des cytokines (IL-1, IL-2, TNF- α , IL-12) et des protéines de présentation de l'antigène, ainsi que des protéines impliquées dans le sepsis et les défaillances d'organes comme la COX-2 et l'iNOS, stimulant ainsi la production de NF- κ B par rétro-contrôle positif de l'inflammation (**Figure 14**) (**Bouglé et al., 2007**).

Parallèlement, un stress oxydatif s'installe, déclenchant le recrutement de neutrophiles polynucléaires et une cascade d'événements immunomodulateurs qui produisent des ROS et RNS, propageant les lésions (**Mittal et al., 2014**). De plus, les ROS/RNS activent le NF- κ B, amplifiant la réponse inflammatoire et le stress oxydatif (**Rubattu et al., 2019**).

Le PDTC, un composé thiol avec des effets antioxydants et anti-inflammatoires inhibant la voie NF- κ B (**Schreck et al., 1992 ; Lee et al., 2017**), améliore les fonctions hépatiques, diminue la peroxydation lipidique et augmente la catalase (**Figure 14**) (**Hagar et al., 2009**).

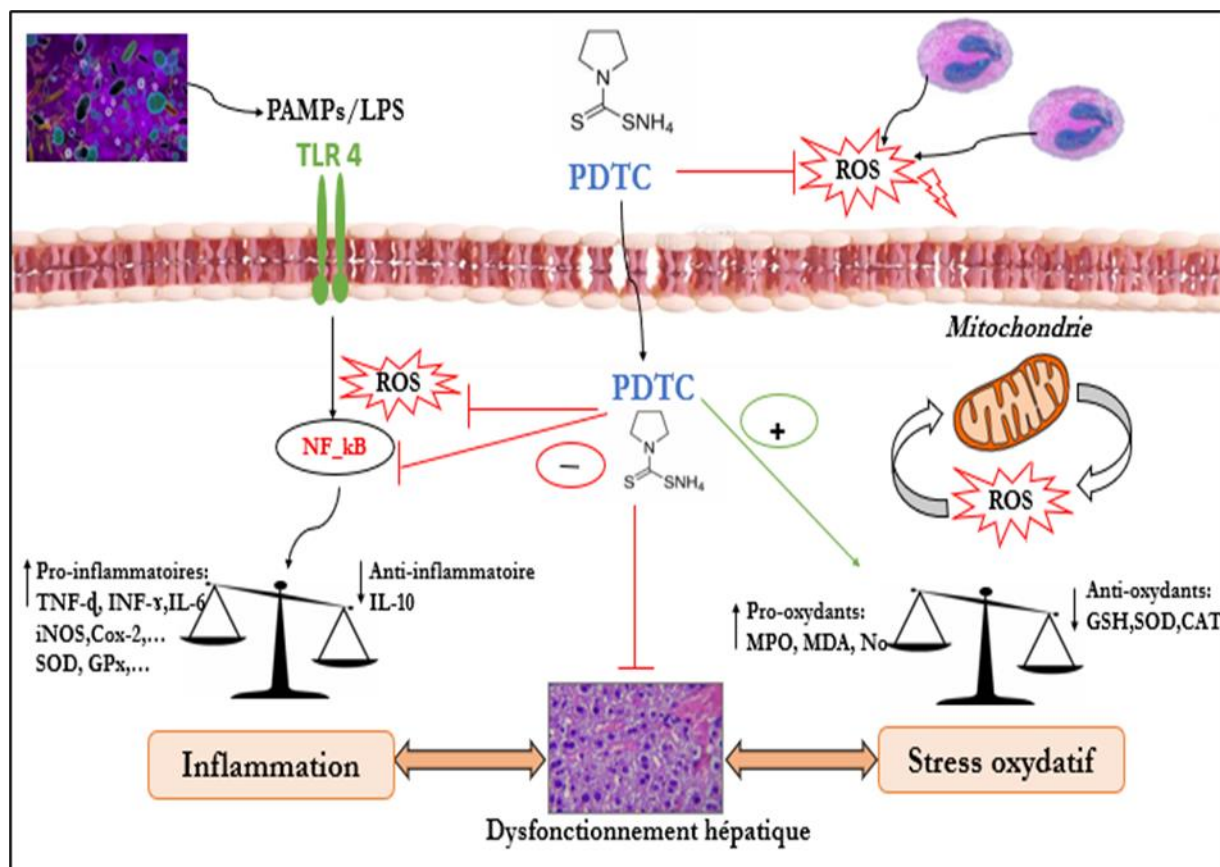


Figure 15. Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants du PDTC dans l'altération hépatique induit par sepsis.

Conclusion

L'étude de l'effet du sepsis et du PDTC sur notre modèle de souris BALB/c suggère :

- L'implication du stress oxydatif dans les altérations hépatiques induites par le sepsis, caractérisée par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MDA) et une diminution des marqueurs antioxydants enzymatiques (catalase).
- Une réponse inflammatoire excessive associée à ce stress oxydatif, se manifestant par une infiltration leucocytaire hépatique, des dommages oxydatifs hépatiques, une cholestase, une stéatose hépatique non alcoolique aiguë et une dilatation des sinusoides hépatiques. En revanche, une immuno-paralysie systémique caractérisée par une leucopénie, une lymphopénie, une granulopénie et une neutropénie ont été noté chez les souris septiques.
- Une activation de la réponse immuno-inflammatoire, caractérisée par une forte infiltration leucocytaire dans le foie, et la rate des souris septiques.
- Le PDTC prévient le stress oxydatif, rétablit l'équilibre redox, inhibe la réponse inflammatoire et exerce un effet immuno-régulateur chez les souris septiques.

Nos résultats ouvrent des perspectives prometteuses pour l'utilisation thérapeutique du PDTC comme traitement du sepsis. Ils confirment également le rôle essentiel du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis. En perspectives, il serait intéressant de :

- Élucider les mécanismes par lesquels le PDTC exerce son effet immuno-régulateur.
- Rechercher des paramètres de diagnostic précoce du sepsis.
- Étudier l'implication du stress oxydatif et l'effet du PDTC chez des patients septiques.
- Rechercher d'éventuelles corrélations entre les paramètres du stress oxydatif, le dysfonctionnement d'organes et le pronostic des patients septiques.

Références bibliographiques

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*. Academic press. 105,121-126.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, et al. (2000) Predictive value of NF- κ B activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect Immun*; 68:1942-5.
- Azzi A. (2007). Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 362, 230–232.
- Baeuerle PA, Baichwal VR. (1997). NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* 65, 111–137.
- Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, et al. (2006). Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*; 34:886.
- Barthélemy D. (2014). *Devanciers d'Aquila: Première publication intégrale du texte des fragments du Dodécaprophéton*. Brill, 10.
- Biemond BJ, Levi M, Cate HT, et al. (1995). Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor I—release during experimental endotoxaemia in chimpanzees: effect of interventions in the cytokine and coagulation cascades. *Clin Sci*, 88(5) : 587–559.
- Blandizzi C, Fornai M, Colucci R, Natale G, Lubrano V, Vassalle C, Del Tacca M. (2005). Lansoprazole prevents experimental gastric injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs through a reduction of mucosal oxidative damage. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(26), 4052.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* ; 101 : 1644–55.
- Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, et al. (1997). Role of NF- κ B in the mortality of sepsis. *J Clin Invest*; 100:972-985.
- Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, et al. (1996). Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med*; 24:392 – 7.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Brennan P, O'Neill LA. (1995). Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor kappa B activation in three different cell lines : evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals. *Biochim Biophys Acta*;1260:167-75.
- Brunt EM, et al. (2014). Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology* 64, 907–920.
- Bruck, Rafael, Ron Schey, Hussein Aeed, Ayala Hochman, Olga Genina, Mark Pines. (2004). A Protective Effect of Pyrrolidine Dithiocarbamate in a Rat Model of Liver Cirrhosis. *Liver International* 24(2):169-76.
- Canabal JM, Kramer DJ. (2008). Management of sepsis in patients with liver failure. *Curr Opin Crit Care*; 14(2):189–197.
- Choi SI, Kim TI, Kim KS, Kim BY, Ahn SY, Cho HJ, et al. (2009). Decreased catalase expression and increased susceptibility to oxidative stress in primary cultured corneal fibroblasts from patients with granular corneal dystrophy type II. *Am J Pathol* ; 175:248–61.
- Cohen. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420 (6917), 885–891.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 52:601–623.
- Danielski LG, Giustina AD, Bofante S, Barichello T, Petronilho F. (2020). The NLRP3 inflammasome and its role in sepsis development. *springer*, 43(1), 24-31.
- Danielski LG, Giustina AD, Bofante S, Barichello T. Petronilho F. (2020). The NLRP3 inflammasome and its role in sepsis development. *springer*, 43(1), 24-31.
- Delaloye J, Calandra T. (2014). Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*; 5:161–9.
- Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. (2001). Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*; 29(7),S42–S47.
- Dizier S. et al. (2015). Early hepatic dysfunction is associated with a worse outcome in patients presenting with acute respiratory distress syndrome : a post-hoc analysis of the ACURASYS and PROSEVA studies. *PLoS ONE* 10(12), e0144278 .
- Dulhunty JM, Lipman J, Finfer S, (2008). Sepsis Study Investigators for the ANZICS Clinical Trials Group. Does severe non-infectious SIRS differ from severe sepsis ? Results from a multi-centre Australian and New Zealand intensive care unit study. *Intensive Care Med* ; 34 :1654–61.

- Eckle I, Seitz R, Egbring R, et al. (1991). Protein C degradation in vitro by neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 372(11): 1007–1013.
- Fink MP, Warren HS. (2014). Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat. Rev. Drug Discov*, 13, 741–758
- Gay NJ. (2019). Role of self-organising myddosome oligomers in inflammatory signalling by toll-like receptors. *BMC Biol.* 17 :15.
- Germain RN. (2012). Maintaining system homeostasis: the third law of Newtonian immunology. *Nature Immunology*, 13(10), 902–906.
- Grimaldi DA. (2014). Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression postinfectieuse. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes – Paris.
- Hansen JD, Vojtech LN, and Laing KJ. (2011). Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Developmental and Comparative Immunology*, 35 (9), 886–897.
- Hagar, Hanan H. (2009). An Insight into the Possible Protective Effect of Pyrrolidine Dithiocarbamate against Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress and Acute Hepatic Injury in Rats. *Saudi Pharmaceutical Journal* 17(4):259-67.
- Hawiger J, Veach R.A, Zienkiewicz J. (2015). New paradigms in sepsis : From prevention to protection of failing microcirculation. *J. Thromb Haemost*, 13, 1743–1756.
- Hettmann T, DiDonato J, Karin M, Leiden JM. (1999). An essential role for nuclear factor- κ B in promoting doublepositive thymocyte apoptosis. *J. Exp. Med.* 189, 145–158.
- Hotchkiss RS, Karl IE. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*; 348:138-50.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. (2013). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* 13, 260–268.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nature Reviews Immunology*, 6(11) : 813–822.
- Hotchkiss RS, Opal S. (2010). Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. *The New England Journal of Medicine*, 363(1) : 87–89,.

- Hotchkiss, Richard S, Guillaume Monneret, Didier Payen. (2013). Sepsis-Induced Immunosuppression: From Cellular Dysfunctions to Immunotherapy . *Nature Reviews Immunology* 13 (12): 862-74.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. (2001). Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J Immunol*; 166(11): 6952–6963.
- Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, et al. (2004). Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res*; 64:1071–8.
- Jarrar D, Wang P, Chaudry IH. (2001). Hepatocellular dysfunction—basic considerations. In *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Zuckschwerdt.
- Jenne CN , Kubes P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nat. Immunol*, 14, 996–1006.
- Kanda H, Nimura Y, Yasui A, et al. (1996). Hepatic blood flow after acute biliary obstruction and drainage in conscious dogs. *Hepatogastroenterology* ;43 :235—40.
- Koga, Yasutaka, Motoki Fujita, Takashi Nakahara, Takeshi Yagi, Takashi Miyauchi, Kotaro Kaneda, Yoshikatsu Kawamura, Yasutaka Oda, Ryosuke Tsuruta. (2016). Splenic Volume in Severe Sepsis Is Associated with Disease Severity and Pneumococcal Infection. *Acute Medicine & Surgery*, 3 (4): 339-44.
- Kramer L, Jordan B, Druml W, et al. (2007) Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients—a prospective multicenter study. *Crit Care Med*; 35(4):1099–1104.
- Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Sivastava CK, Metha S, Jyoti A. (2018). Evaluation of oxidative stress and antioxidant status : Correlation with the severity of sepsis. *Scandinavian journal of immunology*, 87(4), e12653.
- Kumar V. (2018). Targeting macrophage immunometabolism : Dawn in the darkness of sepsis. *Int. Immunopharmacol*, 58, 173–185.
- Kumar V. (2019b). Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, 332:16–30.

- Kumar V. (2020c). Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. *Int Immunopharmacol*, 89:107087.
- Kumar V. (2021). Going, toll-like receptors in skin inflammation and inflammatory diseases. *EXCLI J* 20 :52–79.
- Lauzurica P, MartõÁnez-MartõÁnez S, Marazuela M, et al. (1999). Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNF-a. *Eur J Immunol*; 29: 1890-900.
- Laroye C, Gibat S, Reppel L, Bensoussan D. (2017). mesenchymal stromal/ stem cells : à new treatment for sepsis and septic shock. *Concise review*, 35(12), 2331-2339.
- Lee, Eun Hye, Seon Sook Kim, Su Ryeon Seo. (2017). Pyrrolidine Dithiocarbamate (PDTTC) Inhibits Inflammatory Signaling via Expression of Regulator of Calcineurin Activity 1 (RCAN1). *Biochemical Pharmacology* 143 (novembre):107-17.
- Lefevre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J. P., Therond, P., & Torreilles, J. (1998). Evaluation of lipid peroxidation by assaying the thiobarbituric acid-reactive substances. In *Annales de biologie clinique* . 5(63),305-19.
- Levy MM, Artigas A, Phillips GS, et al. (2012). Outcomes of the surviving sepsis campaign in intensive care units in the USA and Europe : a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis*; 12(12): 919–924.
- Liu SF, Ye X, Malik AB. (1997). In vivo inhibition of nuclear factor-kB activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol*; 159: 3976-83.
- Liu SF, Ye X, Malik AB. (1999). Pyrrolidine dithiocarbamate prevents I kB degradation and reduces microvascular injury induced by lipopolysaccharide in multiple organs. *Mol Pharmacol*; 55: 658-67.
- Liu SF, Ye X, Malik AB. (1999). Inhibition of NF-kB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*; 100: 1330-7.
- Liu SF, Malik AB. (1999). Pyrrolidine dithiocarbamate prevents I-kappa B degradation and reduces microvascular injury induced by lipopolysaccharide in multiple organs. *Mol. Pharmacol*, 55, 658– 667.

- Lorente LE, Martín MA M, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez AL, Labat LO, Díaz CE, Solé-Violán JO, Ferreres JO, María Borreguero-León JU, Jiménez AL, MoreraFumero AR. (2013). Prognostic Value of Malondialdehyde Serum Levels in Severe Sepsis: A Multicenter Study. PLoS One ; 8(1) : e53741.
- Lorente LE. (2015). New Prognostic Biomarkers of Mitochondrial Oxidative Stress in Septic Patients. Archives of Critical Care Medicine ; 1 (2), e3125.
- Macdonald J, Galley HF, Webster NR. (2003). Oxidative stress and gene expression in sepsis. Br J Anaesth; 90:221 – 32.
- Majno G. (1991). The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). J. Infect. Dis.163, 937–945.
- Mantzaris, Konstantinos, Vasiliki Tsolaki, et Epaminondas Zakynthinos. (2017). Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2017: 1-10.
- Marshall JC. (2014). Why have clinical trials in sepsis failed? Trends Mol. Med, 20, 195–203.
- Medzhitov R, Janeway Jr, C. (2000). Innate immunity. New England Journal of Medicine, 343(5), 338-344.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 388(6640), 394-397.
- Meisner M, Schmidt J, Schywalsky M, Tschaikowsky K. (2000). Influence of pyrrolidine dithiocarbamate on the inflammatory response in macrophages and mouse endotoxin shock. Int J Immunopharmacol; 22: 83-90.
- Meo SD, Reed TT, Venditti P, and Victor VM. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016 (1),1245049.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K , Reddy SP, Malik AB. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. Antioxidants & Redox Signaling 20 (7): 1126-67.
- Molina VI, Dessauer BE, Rodrigo RA ,Carvajal CR. (2017). Oxidative stress biomarkers in pediatric sepsis : a prospective observational pilot study. REDOX REPORT; 22(6), 330–337.

- Muller JM, Rupec RA, Baeuerle PA. (1997). Study of gene regulation by NF-kappa B and AP-1 in response to reactive oxygen intermediates. *Methods*;11:301-12.
- Murphy MP. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417:1–13.
- Napolitano LM. (2018). Sepsis 2018 : Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect*; 19(2):117-125.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Pang D, Bahir D, Carcillo J, Kguyen T, Aneja R, et al. (2019). Role of damage-associated molecular patterns and uncontrolled inflammation in pediatric sepsis-induced multiple organ dysfunction syndrome. *Relaped*, 8(1), 25-31.
- Perez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Diez-Marques ML, Canela A, Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Puyol M, et al. (2008). Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. *Free Radic Biol Med* ;45:1243–51.
- Potruch A, Schwartz A, Ilan Y. (2022). The role of bacterial translocation in sepsis: a new target for therapy. *Therap Adv Gastroenterol*; 15:17562848221094214.
- Poujol FA. (2016). Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et clinique des altérations lymphocytaire induites lors des syndromes septiques, Université Claude Bernard –Lyon 1.
- Prauchner, CA. (2017). Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns*, 43, 471–485.
- Protzer U, Maini MK, Knolle PA. (2012). Living in the liver : hepatic infections. *Nat Rev Immunol*; 12(3):201–213.
- Qin, Jin-dong, Zhi-hong Cao, Xue-feng Li, Xiao-lin Kang, Yan Xue, Yue-ling Li, Dong Zhang, Xin-Yuan Liu, Yong-zhi Xue. (2014). Effect of Ammonium Pyrrolidine Dithiocarbamate (PDTC) on NF-κB Activation and CYP2E1 Content of Rats with Immunological Liver Injury. *Pharmaceutical Biology* 52(11):1460-66.
- Qiu C, Wu J, Pei F, Wang L, Mei M, Guan X , Ouyang B. (2018).Correlation between oxidative stress factors and prognosis of patients with sepsis. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*; 31 (7):847-851.
- Qiu C, Wu J, Pei F, Wang L, Mei M, Guan X, Ouyang B. (2019). Correlation between oxidative stress factors and prognosis of patients with sepsis. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* ; 31 (7) :847-851.

- Recknagel P. et al. (2012). Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3 kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med.* 9(11), e1001338.
- Rello J, Paiva JA, Baraibar J, Barcenilla F, Bodi M, Castander D, Correa H, Diaz E, Garnacho J, Llorio M, et al. (2001). International Conference for the Development of Consensus on the Diagnosis and Treatment of Ventilator-associated Pneumonia. *Chest* 120, 955–970.
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, et al. (2017). Surviving Sepsis Campaign : International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock : 2016. *Intensive Care Med*, 43, 304–377.
- Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl M A, Ward, PA. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature protocols*, 4(1), 31-36.
- 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.
- Sadik NA, Shaker OG, Ghanem HZ, Hassan HA, Abdel-Hamid AH. (2015). Singlenucleotide polymorphism of Toll-like receptor 4 and interleukin-10 in response to interferon-based therapy in Egyptian chronic hepatitis C patients. *Arch Virol.* 160(9) :2181–2195.
- Salomao R, Ferreira BL, Salomao MC, Santos SS, Azenedo LCP, Baunialti MKC. (2019). Sepsis : evalvivng concepts and challenges. *Brazilian journal of medical and biological research*, 52(4).
- Salvemini D, Cuzzocrea S. (2002). Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med*; 33:1173.
- Schreck R, Meier B, Männel DN, et al. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med*; 175(5): 1181–1194.
- Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, et al. (1996). NF-κB is activated in alveolar macrophages from patients with the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*; 24:1285-92.
- Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al. (2016). Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* ; 315 : 775–87.

- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315, 801–810.
- Slatter DA, Paul RG, Murray M, Bailey AJ. (1999). Reactions of lipid-derived malondialdehyde with collagen. *J Biol Chem*, 274:19661–19669.
- Strnad, Pavel, Frank Tacke, Alexander Koch, Christian Trautwein. (2017). Liver — Guardian, Modifier and Target of Sepsis . *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14 (1): 55-66.
- Stuhlmeier KM. (2000). Activation and regulation of Hsp32 and Hsp70. *Eur J Biochem*;267:1161–7.
- Sun J, Zhang J, Wang X, et al. (2020). Gut-liver crosstalk in sepsis-induced liver injury. *Crit Care*. 24(1):614.
- Teke, Zafer, Faruk Onder Aytekin, Cagatay Aydin, Burhan Kabay, Cigdem Yenisey, Suzan Sacar, Nilufer Genc Simsek, Koray Tekin. (2007). Effects of Pyrrolidine Dithiocarbamate on Healing of Colonic Anastomoses in the Cecal Ligation and Puncture Model of Intraperitoneal Sepsis in Rats. *World Journal of Surgery*, 31(1):200-209.
- Toufekoula RH, Papadakis VA, Tsaganos TH, Routsis CH, E Orfanos ST, Kotanidou AN, Carre DI, Raftogiannis MA, Baziaka FO, Giamarellos-Bourboulis EV. (2013). Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram C – negative bacteria: experimental and clinical evidence. *Critical Care*, 17, 1-11.
- Tracy Jr, TF, Bailey PV, Goerke ME, et al. (1991). Cholestasis without cirrhosis alters regulatory liver gene expression and inhibits hepatic regeneration. *Surgery* ;110 :176—82.
- Valko M, et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Van Berlo D, et al. (2010). Neutrophil-derived ROS contribute to oxidative DNA damage induction by quartz particles. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1685–1693.
- Victor VM, De la Fuente M. (2003). Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-κB. *Free Radic Res*; 37:19 – 27.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. (1996). Working group on sepsis-related problems of the European society of intensive care medicine: the SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med*; 22(7): 707–710.

- Weiss SL, Deutschman CS. (2014). Elevated malondialdehyde levels in sepsis something to 'stress' about ? Critical Care. 18(2), 1-2.
- Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT. (1999). Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. J Biol Chem;274:33627–36.
- Zakkar M, et al. (2009). Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 29, 1851–1857.

Annexes

Annexe 1

Tableau I. Les scores SOFA (the Sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment).Adapté de Singer et al ; Vincent et al (**Vincent et al., 1996 ; Singer et al., 2016**).

Système	Scor				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /FiO ₂ , mm Hg(kpa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) Avec assistance respiratoire	<100 (13.7) Avec assistance respiratoire
Coagulation					
Plaquettes, ×10 ³ /ul	≥150	<150	<100	<50	<20
Foie					
Bilirubine, mg/dl (umol/L)	<10.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovasculaire	MAP≥70 mm Hg	MAP≥70 mm Hg	Dopamine<5 Ou dobutamine	Dopamine 5.1-15 ou epinephrine≤0.1 ou norepinephrine≤0.1	Doppamine> 15 ou epinephrine>0.1 ou norepinephrine>0.1
Système nerveux central					
Scor sur l'échelle de coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Rénal					
Créatinine, mg/dl(umol/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)
Débit urinaire, ml/d				<500	<200

FI02, fraction de l'oxygène inspire (Fraction of inspired oxygen). **MAP**, moyenne de pression artérielle (Meanarterial pressure), **PaO2**, Pression partielle d'oxygène (partial pressure of oxygen).

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

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

Annexes 2

Matériel non biologique

Appareillages :



Centrifugeuse



Spectrophotomètre



PH mètre



Bain marie



Homogénéisateur



Agitateur



Balance de précision



Microscope optique

Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine

A. Fixation La fixation

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

B. Déshydratation et inclusion

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

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

Etapes	Réactifs	Durée
Fixation	Formol tamponné à 4%	1h
Déshydratation	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
Inclusion	3 bains de xylène	3h x3
	3 bains de paraffine	3hx3

Une fois totalement imprégné, le tissu est placé dans un moule contenant de la paraffine fondue (portée à 56/58°C), la chaleur provoque l'évaporation du solvant et les espaces ainsi

libérés sont remplis par la paraffine, après refroidissement, on procède alors au démoulage ; on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.

C. Coupes histologiques et coloration H-E

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

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

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

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

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

Tableau IV. Etapes de coloration hématoxyline- éosine.

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