

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 Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

*Thème*

*Effet de l'inhibition du facteur de transcription NF- $\kappa$ B sur les dommages pulmonaires induits par sepsis chez la souris*

Présenté par :

Melle. KOUDJIL Khaoula et Melle. DIBOUNE Amel

Devant le Jury :

Mme BELKHITER S.	MCB	SNV, Blida1	Présidente
Mme ZEROUTI K.	MCB	SNV, Blida1	Examinatrice
Mme RAHIM I.	MCA	SNV, Blida1	Promotrice
Mme AÏSSANI –EL FERTAS R.	MCB	SNV, Blida 1	Co-promotrice

2023-2024

Nous tenons à remercier en premier lieu ALLAH 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.

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

Nous adressons, nos sincères remerciements à notre co-promotrice **Dr. AÏSSANI EL-FERTAS Radia**, qui nous a enseigné la rigueur scientifique. Nous la remercions pour son aide précieuse et les conseils qu'elle nous a prodigués tout au long de ce parcours.

Nous tenons également à présenter nos vifs remerciements à **Dr. BELKHITHER S.**, présidente du jury, et à **Dr. ZEROUTI K.**, examinatrice du jury, qui nous ont fait l'honneur d'examiner et d'évaluer ce modeste travail.

Nous adressons, nos sincères remerciements au **Pr. SAADI Leila** professeur et chef d'option BMC à l'USDB1 pour la confiance et l'aide qu'elle nous a accordé. A tous les enseignants du Département biologie spécialement ceux ont contribué à notre formation tout au long de 5 dernières années.

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 (Mes dames, **Zatra, Rouaki, Tounsi** Monsieur. **Bounaama**) des ingénieurs de laboratoire (Mes dames **Sabah et Fatima**) des médecins (Pr. **Kouchekar**) et des responsables (Pr. **Meguatli, Dr. Boudjema**).....Nous vous oublierons jamais.

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

À mon père adoré Yahya, à mes sœurs Khalida et Faiza et mes frères Abdou, Khaled et Bilalle, qui ont toujours été à mes côtés. Et à toute Ma famille.

A ma grand-mère qu'elle reste à jamais gravée dans mon cœur et mon esprit.

À tous mes proches et mes chères amies, Hasna. Ikram, Rima, Lina et Wahiba, cyrine, ahlem pour leur présence et leur fidélité.

A mon binôme Khaoula pour le soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet,

À tous ceux que j'aime.

**Amel**

Je dédie ce travail à ma mère Aisha, la prunelle de mes yeux .Tu as été une source inépuisable de force, de soutien et d'amour tout au long de ma vie. Bien que tu ne sois plus parmi nous, ton esprit continue de m'inspirer chaque jour.

Ce mémoire est dédié à ta mémoire, en hommage à tout ce que tu m'as appris et à tout ce que tu as sacrifié pour moi.

À mon père adore Khalifa, à mes sœurs Houria, Sawssene, Hanane, Nawel, Khadidja, Aya, Ghnima, mes frère Abdelnour, Elhadj, mes cousines Fatiha, Yamina, Hanane, Ahlem, Houria, Saliha) et ma grande tante Khaira.

À tous mes proches et mes chères amies Ines, Hanane, Cyrine, Kheira, Ahlem pour leur présence et leur fidélité.

A mon binôme Amel pour le soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Avec amour éternel, **Khaoula.**

Chaque année, près de 50 millions de personnes sont touchées par le sepsis, un problème de santé mondial qui se manifeste par un dysfonctionnement d'organe potentiellement mortel, provoqué par une réponse dérégulée de l'organisme à une infection. De 25% à 50% des patients atteints de sepsis développent le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme grave de lésions pulmonaires aiguës (ALI).

Notre recherche vise à comprendre les mécanismes complexes de la physiopathologie du sepsis afin de concevoir une thérapie ciblée. Nous avons analysé, à l'aide d'un modèle murin de sepsis polymicrobien, l'impact du stress oxydatif sur les lésions pulmonaires causées par le sepsis, ainsi que le rôle du dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC), un inhibiteur du NF- $\kappa$ B, dans la prévention de ces lésions.

Le sepsis polymicrobien a été induit par une 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 poumons et la rate ont été prélevés pour des études biochimiques et histologiques.

Les données biochimiques montrent que le sepsis provoque un stress oxydatif dans les poumons, avec une augmentation du taux de MDA (marqueur pro-oxydant) et une diminution de la catalase (marqueur antioxydant). Le PDTC, restaure l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants en diminuant le MDA et en augmentant la catalase.

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

Nos résultats offrent des perspectives très prometteuses pour l'utilisation thérapeutique du PDTC dans le traitement du sepsis. De plus, nous confirmons que le stress oxydatif joue un rôle essentiel dans la physiopathologie du sepsis.

**Mots clés :** Sepsis, CLP, stress oxydatif, PDTC, NF- $\kappa$ B, poumon, rate.

Every year, 50 million people are affected by sepsis, a global health problem that is manifested by a potentially fatal organ dysfunction caused by an unregulated response of the body to an infection. 25% to 50% of patients with sepsis develop acute respiratory distress syndrome (ARDS), a severe form of acute lung damage (ALI).

Our research aims to understand the complex mechanisms of sepsis pathophysiology in order to design a targeted therapy. We analyzed, using a murine model of polymicrobial sepsis, the impact of oxidative stress on pulmonary lesions caused by septicemia, as well as the role of PDTC, a NF- $\kappa$ B inhibitor, in the prevention of these lesions.

Polymicrobial sepsis was induced by caecal ligation and perforation (CLP) in BALB/c mice treated with a dose of 200 mg/kg of PDTC. The mice were slaughtered 24 hours after treatment, and their lungs and spleen were taken for biochemical and histological studies. Biochemical data show that sepsis causes oxidative stress in the lungs, with an increase in the level of MDA (pro-oxidant marker) and a decrease in catalase (marker antioxidant). PDTC restores the balance between pro-oxidants and antioxidants by decreasing MDA and increasing catalase.

Histological results show oxidative damage in the lungs and activation of characteristic immune and inflammatory responses with leukocyte infiltration into the spleen. PDTC prevents oxidative and inflammatory damage caused by sepsis. Our results offer very promising prospects for the therapeutic use of PDTC in the treatment of sepsis. In addition, we confirm that oxidative stress plays an essential role in the pathophysiology of sepsis.

**Keywords:** Sepsis, CLP, oxidative stress, PDTC, NF- $\kappa$ B, lung, spleen.

يتأثر سنويا حوالي 50 مليون شخص بالانتان، الذي يعتبر مشكلة صحية عالمية حيث يسبب اضطراب معظم أعضاء الجسم غالبا ما يؤدي الى الموت، والذي يكون سببه رد فعل غير منتظم من الجسم على العدوى. من 25% الى 50% من المرضى المصابين ب متلازمة الضائقة التنفسية الحادة (SDRA) ، وهي أخطر شكل من الأضرار الشائعة على الرئة (ALI)

تهدف ابحاثنا في فهم الآليات المعقدة لفيزيولوجيا الإنتان من أجل تطوير علاج مستهدف. بالفعل، قمنا من ناحية بتحليل تأثير الإجهاد التأكسدي على إصابات الرئة الناجمة عن الإنتان باستخدام نموذج الفئران للإنتان متعدد الميكروبات، ومن ناحية أخرى قمنا بفحص دور (PDTC) (dithiocarbamate de pyrrolidine) في الوقاية من هذه الإصابات.

تم تحفيز الإنتان متعدد الميكروبات من خلال ربط وتنقيب الأعور (CLP) (Puncture and CecalLigation) في فئران (BALB /c) وتم علاجها بجرعة 200 ملغ/كغ من (PDTC) تم التضحية بالفئران بعد 24 ساعة من العلاج وتم أخذ الرئة والطحال والمِسْران من أجل دراسة بيو كيميائية وتشريحية.

تبين بيانات الاختبار البيو كيميائي، يتبين أن الإنتان يسبب إجهادًا تأكسديًا في الرئتين، مع زيادة مستوى (MDA) (مؤشر مؤكسد) وانخفاض في (CAT) (مؤشر مضاد للأكسدة). يعيد (PDTC) توازن النسبة بين المؤكسدات (MDA) ومضادات الأكسدة عن طريق خفض (CAT) وزيادة

تظهر النتائج التشريحية أضرارًا تأكسدية في الرئتين، مرتبطة بتفعيل الاستجابة المناعية والالتهابية المميزة مع تسلل الأضرار. كثيف لخلايا الدم البيضاء في الرئة والطحال. يمنع (PDTC) الأضرار التأكسدية والالتهابية التي يسببها الإنتان التأكسدية والالتهابية التي يسببها الإنتان.

النتائج التي حصلنا عليها تقدم آفاقًا واعدة جدًا لاستخدام (PDTC) في علاج الإنتان. بالإضافة إلى ذلك، نعتقد أن الإجهاد التأكسدي يلعب دورًا أساسيًا في الفيزيولوجيا المرضية للإنتان.

الكلمات المفتاحية: الإنتان، الإجهاد التأكسدي، (PDTC),(CLP),(NF-κB) , الرئة، الطحال

**ACCP:** American College of Chest Physicians.

**ADN :** Acide désoxyribonucléique.

**ALI:** Lésions pulmonaires aiguës.

**ARNm:** Acide ribonucléique messenger

**ATP:** Adénosine triphosphate.

**BAFF:** B-cell activating factor

**Bcl-2:** B-cell lymphoma 2

**BSA:** Bovine Serum Albumin.

**CAT :** Catalase.

**CeO<sub>2</sub> :** Oxyde de cérium.

**CINC :** *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant.*

**CLP :** Cecal Ligation and Puncture .

**Cox-2 :** Cyclooxygenase 2.

**DAMPs :** Damage or danger-associated.molecular patterns.

**FNS :** Formule de numération sanguine.

**GMPc :** Guanosine monophosphate cyclique

**GPx :** La glutathion peroxydase.

**GSH :** Glutathion.

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

**HOCl:** Acide hypochloreux.

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

**IKK:** Related Tank-binding kinase.

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

**iNOS :** Oxyde nitrique synthase inductible.

**JAK2: Janus kinase 2**

**L: Lymphocyte.**

**LPO: Peroxydation lipidiques.**

**MAMPs: Microbe-associated molecular patterns.**

**MAPK: Mitogen-activated protein kinase**

**MDA: Malondialdéhyde.**

**MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome.**

**MPO: Myéloperoxydase.**

**mTOR: Protéine mammalian target of rapamycin**

**NaCl : Chlorure de sodium**

**NADP (H) : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate**

**NETs: Neutrophil extracellular traps.**

**NF-κB: Nuclear factor-kappa B.**

**NO: Monoxyde d'azote.**

**Notch: Notch signaling pathway**

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

**ONOO: Seroxynitrite.**

**PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns.**

**PDTC: Dithiocarbamate de pyrrolidine.**

**PKG : Protein kinase G.**

**PRRs : Patterns Recognition Receptors.**

**RANKL: Eceptor activator of nuclear factor- κB ligand**

**RNS: Reactive nitrogen sepecies.**

**ROS: Reactive oxygen sepecies.**

**SCCM: Society of Critical Care Medicine.**

**SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë.**

**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- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$ .**

**VCAM-1 : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires**

**WBC: Globules blancs du sang**

<b>Figure 1.</b> Etapes critiques de CLP induite chez la souris.....	<b>13</b>
<b>Figure 2.</b> Protocole expérimental chez les souris BALB/c.....	<b>14</b>
<b>Figure 3.</b> Effet des différents traitements sur le poids des souris BALB/c .....	<b>19</b>
<b>Figure 4.</b> Effet des différents traitements sur le poids du poumon et la rate.....	<b>19</b>
<b>Figure 5.</b> Taux de malondialdéhyde pulmonaire chez les souris BALB/c .....	<b>21</b>
<b>Figure 6.</b> Activité catalase pulmonaire chez les souris BALB/c .....	<b>22</b>
<b>Figure 7.</b> Taux de protéines pulmonaires chez les souris BALB/c .....	<b>23</b>
<b>Figure 8.</b> Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang.....	<b>24</b>
<b>Figure 9.</b> Taux de granulocytes et de Mid dans le sang.....	<b>25</b>
<b>Figure 10.</b> Taux d'érythrocytes et de plaquettes sanguins chez les souris BALB/c.....	<b>26</b>
<b>Figure 11.</b> Les dommages pulmonaires induits par CLP chez les souris BALB/C et l'effet du PDTC sur ces dommages.....	<b>28</b>
<b>Figure 12.</b> Micrographie d'une coupe transversale de la rate de souris BALB/c.....	<b>30</b>
<b>Figure 13.</b> Effet de PDTC dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis.....	<b>32</b>

**INTRODUCTION**..... 1

**Rappels bibliographiques**

**I. Sepsis**..... 3

**I. 1. Définition du sepsis** ..... 3

**I. 2. Physiopathologie du sepsis** ..... 4

**I. 3. Dysfonctionnement pulmonaire associé au sepsis** ..... 5

**II. Stress oxydatif au cours du sepsis**..... 6

**III. Thérapies du sepsis**..... 7

**III. 1.2. Thérapie du sepsis par le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC)**..... 8

**III.1.1.Activation de la voie de signalisation NF-κB**.....8

**III.1.2 Inhibition de NF-κB par le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC)**

**Matériel et méthodes**

**I. Matériel**..... 11

**I.1. Matériel non biologique**..... 11

**I. 2. Matériel biologique** ..... 11

**II. Méthodes** ..... 11

**II. 1. Modèle murin de sepsis polymicrobien par CLP (Ligature et ponction caecale)** 11

**II.2. Protocole pharmacologique** ..... 13

**II. 3. Etude biochimique**..... 14

**II. 3. 1. Préparation de l'homogénat tissulaire** ..... 14

**II. 3. 2. Dosage des protéines** ..... 14

**II. 3. 3. Dosage des marqueurs pro-oxydants** ..... 15

**II. 3. 3. 1. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)**..... 15

**II. 3. 4. Dosage des paramètres antioxydants** ..... 15

**II. 4. Etude hématologique par FNS** ..... 16

**II. 5. Etude histologique** ..... 16

**II.6. Etude statistique** ..... 17

**Résultats et discussion**

**I.Résultats**..... 19

**I.1. Effet du sepsis et du PDTC sur le poids des souris et des organes (poumon et rate)**  
..... 19

**I.2. Effet du sepsis et du PDTC sur le taux de MDA pulmonaire** ..... 21

<b>I.3. Effet du sepsis et du PDTC sur l'activité catalase pulmonaire .....</b>	<b>22</b>
<b>I.4. Effet du sepsis et du PDTC sur le Taux de protéines pulmonaire .....</b>	<b>23</b>
<b>I.5. Effet du sepsis et du PDTC sur le taux de leucocytes et de lymphocytes sanguins : .....</b>	<b>24</b>
<b>I.6. Effet du sepsis et du PDTC sur le taux des granulocytes et de Mid sanguins .....</b>	<b>24</b>
<b>I.7. Effet du sepsis et du PDTC sur le taux d'érythrocytes et de plaquettes sanguins .</b>	<b>25</b>
<b>I.8. Etude histologique.....</b>	<b>27</b>
<i>Effet du sepsis et du PDTC sur l'histologie pulmonaire .....</i>	<i>27</i>
<i>Effet du sepsis et du PDTC sur l'histologie de la rate .....</i>	<i>29</i>
<b>II. Discussion générale .....</b>	<b>31</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>References bibliographiques</b>	

# **Introduction**

Le sepsis et le choc septique constituent des problèmes de santé majeurs, touchant des millions de personnes chaque année dans le monde et provoquant fréquemment des décès. Les dernières données ont enregistré 11 millions de cas de décès par sepsis parmi 48,9 millions cas incidents, dans le monde (**Rudd et al., 2020**).

Le sepsis est un dysfonctionnement organique potentiellement mortel, résultant d'une réponse dérégulée de l'organisme à une infection (**Dellinger et al., 2012 ; Rhodes et al., 2016**). Le poumon est l'un des organes les plus vulnérables au sepsis (**Mikkelsen et al., 2013**), ce qui conduit souvent à des lésions pulmonaires, une des principales causes d'insuffisance respiratoire aiguë (**Mokra et al., 2015 ; Butt et al., 2016**).

La réponse inflammatoire excessive en réponse à l'infection et le stress oxydatif associé sont souvent responsable de dysfonctionnement d'organes associé au sepsis et à son évolution en une forme plus grave comme le choc septique (**Mokra et al., 2015 ; Butt et al., 2016**). L'implication du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dont l'induction d'une réponse inflammatoire exacerbée et du stress oxydatif au cours du sepsis a été largement démontré (Garcia et al., 2014 ; Rahim et al., 2017). Ainsi, l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B pourrait être utilisée comme une stratégie thérapeutique potentielle prévenir le sepsis et les lésions pulmonaires aiguës qui sont associée à cette affection. Ainsi, le Pyrrolidine-Di-Thio-Carbamate « PDTC » pourrait constituer une molécule thérapeutique efficace du sepsis puisqu'il exerce un effet inhibiteur du NF- $\kappa$ B en plus de ses activités antioxydantes et scavenger des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**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 pulmonaires induites par sepsis et l'effet du PDTC sur ces derniers. Les objectifs de cette étude sont :

- L'évaluation du statut redox pulmonaire 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 pulmonaires induits par sepsis par une étude histologique.

# **Rappels bibliographiques**

## **I. Sepsis**

### **I. 1. Définition du sepsis**

Le sepsis est un problème de santé mondial qui touche entre 47 et 50 millions de personnes chaque année, avec au moins 11 millions de morts par an, avec 1 décès causé par le sepsis survient toutes les 2,8 secondes- **(Sepsis Global Alliance, 2023)**.

En 1991, durant une conférence organisée par la Society of Critical Care Medicine (SCCM) avec l'American College of Chest Physicians (ACCP), un consensus fut adopté en définissant le sepsis comme une réponse systémique à l'infection. La notion de « syndrome de réponse inflammatoire systémique » ou SRIS fut introduite. Elle est basée sur des critères très simples, à savoir des changements mineurs dans au moins deux des quatre variables: la température (hypo ou hyperthermie), la fréquence cardiaque (Tachycardie), la fréquence respiratoire (tachypnée) et le nombre de globules blancs du sang (hyperleucocytose ou leucopénie) **(Bone, 1992)**.

En 2001, la définition du sepsis est révisée en intégrant de nouveaux indicateurs cliniques et biologiques, améliorant ainsi le diagnostic. Suite à cela, le sepsis est classé comme un syndrome clinique allant de sepsis au sepsis sévère, suivi d'un Syndrome de dysfonctionnement d'organes multiples (MODS, Multiple Organ Dysfunction Syndrome) **(Dellinger, 2004)**.

En 2016 et en raison d'un manque de spécificité, le sepsis a été redéfini pour la 3ème fois. Cette définition repose sur la pathobiologie et la physiopathologie de la réponse de l'hôte à l'infection, décrite comme « non homéostatique ». Les changements les plus importants sont l'élimination des termes « SRIS » et « sepsis sévère » **(Carneiro, 2017)**.

Le sepsis est défini par le dysfonctionnement d'au moins un organe qui pourrait être mortel en raison d'une réponse dérégulée de l'hôte à une infection. **(Singer et al., 2016)**. En cas de changement dans l'évaluation séquentielle de la défaillance d'un organe liée au sepsis (SOFA) **(Annexe 1)**, où deux points ou plus sont liés à un taux de mortalité hospitalière supérieur à 10 %, la défaillance d'un organe est désormais envisagée. Le choc septique est une complication du sepsis qui se manifeste par une instabilité circulatoire, cellulaire et métabolique et un risque de décès plus élevé que le sepsis lui-même **(Carneiro et al., 2017)**.

## **I. 2. Physiopathologie du sepsis**

Le sepsis, défini comme un syndrome, englobe divers processus physiopathologiques. Il résulte de l'interaction entre des produits microbiens et un hôte prédisposé à cause de facteurs génétiques ou autres. Ces interactions déclenchent la libération de nombreux médiateurs, conduisant à des dysfonctionnements cellulaires et organiques. Différentes réponses et voies sont impliquées dans cette pathologie telles que la réponse immunitaire innée, les cascades inflammatoires, les voies procoagulantes et antifibrinolytiques, les altérations du métabolisme cellulaire et de la signalisation, ainsi que le dysfonctionnement de l'immunité acquise (**Cohen, 2002;Engl, et al., 2006**).

La réponse normale à l'infection est complexe et implique la production de médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, ainsi que l'activation des phagocytes circulants et résidents. Les microorganismes sont reconnus par les récepteurs spécifiques de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs, *Pattern Recognition Receptor*), portés par les cellules immunitaires innées, qui détectent et se lient aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) ou aux motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) ou alarmines (**Chen et al., 2010**). Il s'en suit une phagocytose.

Un grand nombre de gènes sont activés lors du processus de phagocytose suite à l'activation de nombreuses voies de signalisation (**Nau et al., 2002**), dont la voie du NF- $\kappa$ B (**Van der Poll et al., 2017**). Cette dernière a pour conséquence la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages impliqués dans la réponse inflammatoire de l'hôte, citons le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et les chimiokines, ainsi que des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), les ROS (espèces réactives de l'oxygène) et les RNS (espèces réactives du nitrogène) dont le NO.

Cela entraîne le recrutement de cellules inflammatoires en premier lieu les neutrophiles. La réponse globale est régulée par une combinaison de médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (**Barriere et al.,1995; Van der Poll et al., 1995**). L'homéostasie est restaurée si les médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires s'équilibrent et que l'infection initiale est surmontée (**Bone et al., 1996; Schulte et al., 2013**). Lorsque la libération de médiateurs pro-inflammatoires en réponse à une infection dépasse les limites de l'environnement local, une réponse plus généralisée, appelée sepsis, se produit. Cette production incontrôlée de médiateurs pro-inflammatoires est connue sous le nom de tempête de cytokines (**Parrish et al., 2008 ;Rittirsch et al., 2008**). Les patients passent souvent d'un état pro-inflammatoire à un état immunosuppresseur après un certain temps (**Schulte et al., 2013**).

Les patients atteints de sepsis sévère deviennent hyposensibles aux stimuli pro-inflammatoires, avec une augmentation de l'apoptose des lymphocytes et des cellules dendritiques (**Hotchkiss et al., 2006**). Une diminution des populations lymphocytaires et une réponse réduite des monocytes peuvent augmenter le risque d'infections nosocomiales, entraînant une mortalité importante chez les patients gravement atteints. L'apoptose induite par sepsis peut contribuer à la perte de cellules dans les voies gastro-intestinales et respiratoires, comme elle peut également contribuer au dysfonctionnement des organes et à l'immunosuppression.

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

Environ 40 % des patients atteints de sepsis développent un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), avec un taux de mortalité de 40 à 50 %. La pathogenèse des lésions pulmonaires aiguës (ALI) liées au sepsis est complexe et implique l'inflammation, la coagulation, le stress oxydatif et des facteurs génétiques. La libération de cytokines pro-inflammatoires et des anomalies de la coagulation systémique accélèrent la maladie, provoquant une réaction inflammatoire en cascade, un dysfonctionnement immunitaire et l'aggravation des lésions pulmonaires (**Mikkelsen, et al., 2013 ; Baisheng et al, 2023**).

Les ALI endommagent principalement les alvéoles à travers les voies NF- $\kappa$ B, JAK2/STAT3, mTOR, Notch et MAPK, perturbant l'échange gazeux et provoquant une exsudation inflammatoire. Les monocytes reconnaissent les PAMPs *via* les récepteurs TLR et libèrent des médiateurs inflammatoires et des chimiokines, pouvant se différencier en macrophages M1 et M2 (**Baisheng et al, 2023**).

Les macrophages alvéolaires, les polynucléaires et autres cellules effectrices sont activés par les facteurs inflammatoires des phagocytes et les cellules endothéliales pulmonaires, libérant des radicaux libres d'oxygène, transformés en substances toxiques endommageant directement les cellules épithéliales alvéolaires. Les lésions pulmonaires, l'œdème, l'ischémie et l'hypoxie entraînent un dysfonctionnement mitochondrial et une accumulation de radicaux libres, augmentant la perméabilité vasculaire et causant des dommages cellulaires (**Baisheng et al, 2023**).

Enfin, l'activation du système de coagulation et les dommages des cellules endothéliales vasculaires provoquent une thrombose et un dépôt de fibrine, déséquilibrant le système anticoagulant et aggravant les lésions et le dysfonctionnement pulmonaires (**Baisheng et al, 2023**).

## **II. Stress oxydatif au cours du sepsis**

Le stress oxydatif est reconnu depuis longtemps comme un facteur contribuant à la pathogenèse du sepsis (**Prauchner, 2016**). Il résulte d'un déséquilibre entre les défenses antioxydantes et la production rapide d'espèces réactives, entraînant une surproduction d'oxydants dans les cellules (**Jones, 2008**).

La surproduction de NO, un facteur associé au sepsis, entraîne une hypotension caractéristique de ce syndrome. La NO synthase inductible (iNOS) est responsable de cette surcharge. Ainsi, les inhibiteurs de l'iNOS (aminoguanidine et L-canavanine) et les anti-inflammatoires pourraient améliorer l'issue du sepsis (**Parratt et al., 1998; Sjakste, et al., 2004**). D'autres espèces réactives, comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxyde d'azote (ONOO), l'acide hypochloreux (HOCl) et le radical hydroxyle ( $\bullet OH$ ), contribuent également à la pathogenèse du sepsis. (**Carlos, 2016 ; Parihar , et al, 2008**).

Ces espèces réactives attaquent directement les cellules endothéliales, augmentant la perméabilité vasculaire, aggravant l'hypotension et réduisant la pression osmotique colloïdale du plasma. Elles affectent aussi la consommation d'oxygène des cellules, accélérant ainsi la défaillance multiviscérale (**Parihar et al., 2008**). De plus, l'activation oxydative de la protéine kinase 1 alpha dépendante du GMPc (PKG) cause la dilatation et la perméabilité des vaisseaux sanguins ainsi que la diminution du débit cardiaque, pouvant entraîner une ischémie des organes en réduisant leur perfusion et leur apport d'oxygène (**Rudyk et al., 2013**).

La xanthine oxydase catalyse la formation d'acide urique avec coproduction d'anion superoxyde dans des conditions ischémiques suivies de reperfusion. Indirectement, les espèces réactives activent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, augmentant l'expression d'iNOS (**Abraham, 2003; MacDonald, et al., 2003; Morgan, Liu, 2011; Yadav, et al., 2013**).

Le sepsis est caractérisé par des marqueurs de stress oxydatif, tels que des niveaux élevés de malondialdéhyde (MDA), des groupes protéiques carbonylés accrus, une diminution des niveaux de GSH et une augmentation du rapport superoxyde dismutase (SOD)/catalase (CAT), entraînant une accumulation de  $H_2O_2$  dans les cellules (**Chanock, et al., 1994; Robinson, 1994**). Le stress oxydatif mitochondrial semble aussi réduire la capacité respiratoire des tissus gravement touchés, en raison du découplage partiel de la phosphorylation oxydative, entraînant de faibles niveaux d'ATP intracellulaire et une augmentation des niveaux de lactate (**Crouser, et al., 2004 ; Carré et al., 2010**). Enfin, la libération d'ions calcium des réserves intracellulaires

et le déclenchement de la mort cellulaire programmée sont liés à l'échec énergétique cellulaire (Brealey, et *al.*, 2002 ; Svistunenko et *al.*, 2006 ; Galley, 2011).

### **III. Thérapies du sepsis**

De nombreuses preuves suggèrent que les antioxydants peuvent être bénéfiques en tant que co-thérapie pour le traitement du sepsis. Parmi eux, les antioxydants ciblant les mitochondries semblent particulièrement prometteurs en raison de leur capacité à s'accumuler dans la membrane mitochondriale interne. D'autres composés utiles incluent les vitamines C et E, ainsi que des oligo-éléments tels que les sels de sélénium (sélénite) et certains composés organosélénés (ebselen et disélénure de diphenyle), qui peuvent protéger les mitochondries des dommages oxydatifs, réguler négativement l'activation de NF- $\kappa$ B et prévenir la surexpression précoce de la NADPH oxydase et de l'iNOS dans le contexte du sepsis (Prauchner et *al.*, 2016).

Les composés naturels à petites molécules, tels que la curcumine, l'émodine, le salidroside et la diosmine, peuvent prévenir et traiter le sepsis en modulant diverses voies de signalisation, notamment les voies NF- $\kappa$ B, TLR4, MAPK, NLRP3, AMPK et PI3K/AKT. La plupart de ces substances ciblent des protéines spécifiques pour inhiber les voies responsables de l'inflammation, ce qui prévient les lésions et les défaillances d'organes et peut réduire les dommages causés par le sepsis au cœur, au foie, aux reins, au tractus intestinal et aux poumons (Jingqian et *al.*, 2023).

Une dose unique de nanoparticules de CeO<sub>2</sub> a été associée à une amélioration de la survie des animaux, à une réduction des lésions hépatiques, à une augmentation des dépôts d'oxyde de cérium dans le foie et à une diminution des signes d'inflammation systémique après sepsis. Grâce à la technologie actuelle, ces particules sont envisageables pour le traitement. Leur stabilité dans diverses conditions environnementales suggère qu'elles pourraient être utiles pour traiter le sepsis. Des études supplémentaires sont indispensables pour explorer l'efficacité potentielle des nanoparticules de CeO<sub>2</sub> dans le traitement du sepsis (Vellaisamy et *al.*, 2015).

#### **III. 1. Thérapie du sepsis par le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC)**

##### **III. 1. 1. Activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B**

Le NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription qui régule de nombreux processus cellulaires. Cette voie est largement reconnue comme une voie de signalisation pro-inflammatoire prototypique, activée par diverses cascades de signalisation et impliquée dans de multiples interactions

cellulaires. Le NF- $\kappa$ B contrôle la réponse pro-inflammatoire principalement par les voies de signalisation du TNF $\alpha$  et de l'IL-1 (Laurent, 2009 ; Biswas et al., 2016). Il existe deux voies distinctes pour l'activation de NF- $\kappa$ B :

- **La voie canonique** : Les TLR et les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 déclenchent cette voie, entraînant l'activation de RelA, qui régule l'expression des gènes pro-inflammatoires et la survie cellulaire (Laurent, 2009).
- **La voie alternative (non canonique)** : les LT, CD40L, BAFF et RANKL activent cette voie, mais pas le TNF- $\alpha$ , ce qui conduit à l'activation des complexes RelB/p52. Cette voie régule les gènes nécessaires à l'organogenèse lymphatique et à l'activation des cellules B (Laurent, 2009).

Ces voies se distinguent par les sous-unités IKK recrutées. La voie canonique dépend de l'IKK $\beta$ , qui régule l'activation par la phosphorylation de l'I $\kappa$ B et nécessite la sous-unité IKK $\beta$  mais pas IKK $\alpha$ . En revanche, la voie alternative nécessite IKK $\alpha$  pour la phosphorylation et l'activation du p100, le précurseur de p52, indépendamment des sous-unités IKK $\beta$  et IKK $\gamma$  (Laurent, 2009).

### III.1.2 Inhibition de NF- $\kappa$ B par le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC)

L'incapacité à inhiber plusieurs médiateurs représente un obstacle majeur dans le traitement du sepsis et du choc septique. Inhiber *in vivo* l'activation du NF- $\kappa$ B pourrait constituer une stratégie utile pour traiter le choc septique en utilisant le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC) (Shu et al., 1999). Le PDTC est un composé thiol doté de propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Aditi et al., 2016).

Des études ont démontré *in vivo* l'effet du PDTC sur l'inhibition de l'activation du NF- $\kappa$ B et sur l'expression des médiateurs pro-inflammatoires. L'activation du NF- $\kappa$ B stimule l'expression des gènes pro-inflammatoires et pro-oxydants tels que le TNF- $\alpha$ , COX-2, CINC et ICAM-1. Le PDTC empêche l'activation de NF- $\kappa$ B ainsi que l'expression de TNF- $\alpha$ , COX-2, et ICAM-1. Il réduit également les concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$ , de 6-céto-prostaglandine F1 $\alpha$  et de CINC induites par le LPS. L'inhibition de l'expression de ces médiateurs prévient l'augmentation de l'activité de la myéloperoxydase (marqueur d'infiltration de neutrophile) dans le cœur, les poumons et le foie.

Le PDTC inhibe donc l'activation de NF- $\kappa$ B ainsi que l'expression de ces gènes pro-inflammatoires et leurs produits. Ainsi, bloquer l'activation de NF- $\kappa$ B pourrait être une stratégie efficace dans le traitement du sepsis et du choc septique (**Shu et al., 1999**).

# **Matériel et méthodes**

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogies de la Faculté de la Nature et de la Vie de l'université de Blida, de Février à juin 2024. Notre travail a porté sur :

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

## **I. Matériel**

### **I.1. Matériel non biologique**

La verrerie, les appareillages, les solutions et réactifs utilisés dans cette étude sont résumés dans l'**annexe 2**.

Le Pyrrolidine dithiocarbamate « PDTC » ( $C_5H_{12}N_2S_2$ , Sigma), un composé possédant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires a été utilisé dans notre étude.

### **I. 2. Matériel biologique**

Dans notre étude, nous avons réalisé un modèle murin de sepsis polymicrobienne par (CLP) Cecal Ligation and Puncture en utilisant des souris BALB/c.

Ce travail a été réalisé sur 20 souris mâles de type BALB/C de poids ( $25\pm 2g$ ), âgées de 10 à 12 semaines (26-33g), fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA, Kouba, Alger). Les souris ont été acclimatées à un environnement où la température moyenne était de 25 °C et l'humidité était ambiante, dans l'animalerie de l'Université Saad Dahleb de Blida 1. 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.

La législation Algérienne sur la protection des animaux d'expérimentation utilisés à des fins scientifiques a été respectée pour toutes les expériences. [Loi n°12-235/2012; décret exécutif n° 10-90].

## **II. Méthodes**

### **II. 1. Modèle murin de sepsis polymicrobien par CLP (Ligature et ponction caecale)**

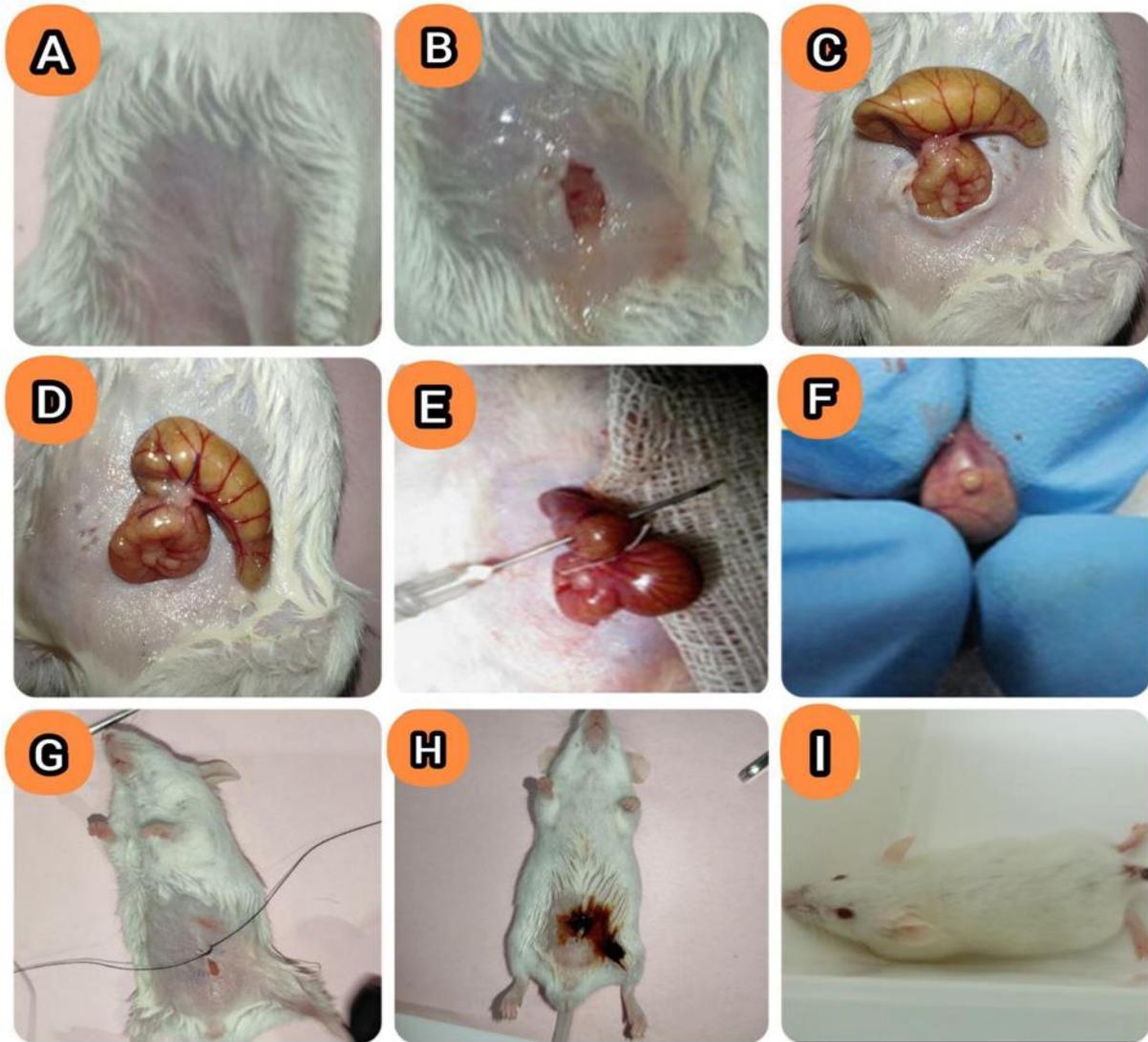
Pour induire un sepsis polymicrobien, les souris ont subi une CLP, qui est le modèle animal le plus couramment utilisé pour étudier la pathogénèse du sepsis chez l'homme. Il constitue la

base de la recherche sur le sepsis et reste la référence pour comprendre les nouvelles voies de la physiopathologie du sepsis et développer des approches thérapeutiques (**Alverdy et al., 2020**).

Le modèle CLP consiste à perforer le cæcum, ce qui permet la libération de matières fécales dans la cavité péritonéale, entraînant une réponse immunitaire due à une infection complexe (péritonite suivie de sepsis). Les souris subissant une CLP avec réanimation liquidienne présentent une première phase hyperdynamique (précoce) qui évolue vers une phase hypodynamique (tardive) (**Toscano, 2011**).

Pour réaliser la CLP, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (IP) d'un mélange de kétamine/acépromazine (10 mg/kg ; 2mg/Kg) puis placées sur une table d'opération aseptique dans un environnement stérile.

La première étape consiste à raser la partie inférieure de l'abdomen, puis à la désinfecter avec de l'alcool. Une incision médiane de 1 cm est pratiquée pour exposer le cæcum. Celui-ci est étroitement ligaturé avec une suture de soie, puis perforé trois fois avec une aiguille calibre 22. Une petite quantité de fèces est légèrement pressée à travers les sites de ponction. Le cæcum est ensuite replacé dans la cavité péritonéale et l'incision abdominale est suturée. Après CLP, les souris sont remises dans leurs cages en mettant à leur disposition de l'eau et de la nourriture (**Figure 1**).



**Figure 1** : Etapes critiques de CLP induite chez la souris BALB/c.

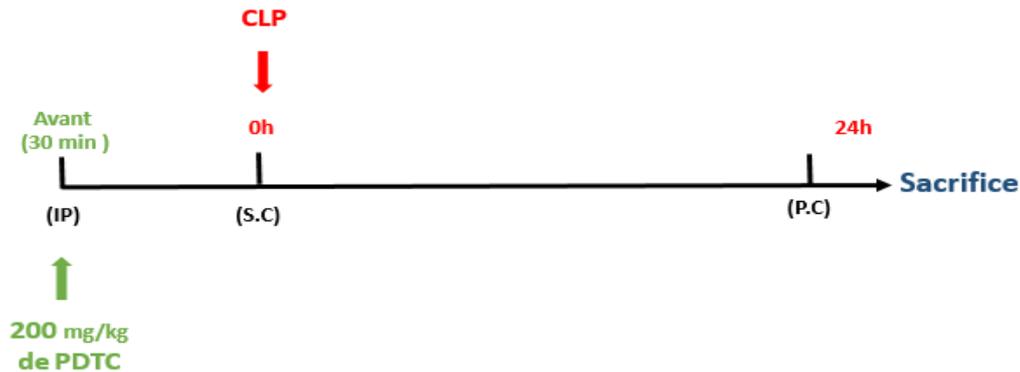
**A** : Désinfection de la zone abdominale après rasage. **B** : Incision abdominale médiane de 1 cm. **C** : Exposition du cæcum. **D** : Ligature du cæcum sous la valve iléo-cæcale. **E** : Ponction cæcale avec une aiguille de calibre 22. **F** : Libération d'une petite quantité de fèces des sites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

### II. 1. 2. Protocole pharmacologique

Les souris BALB/c ont été réparties en quatre lots (**Figure 2**):

- **Lot Contrôle** (n=5) : n'ayant reçu aucun traitement.
- **Lot PDTC** (n=5) : ayant reçu 200 mg/kg/ip de PDTC (**Jian-Wei et al.,2009**)
- **Lot septique (CLP)** (n=5) : ayant subi une CLP.
- **Lot septique traité par PDTC (CLP-PDTC)** (n=5) : ayant subi une CLP après 30 min de l'injection de 200 mg /kg de PDTC en intrapéritonéale.

Les animaux ont été sacrifiés 24 heures après CLP et les organes (les poumons et la rate) seront prélevés rapidement, lavés dans une solution froide de NaCl à 0,9 % et préparés pour l'analyse biochimique et histologique. Le sang a été prélevé par ponction cardiaque sur tube EDTA afin de déterminer la formule d'énumération sanguine (FNS).



**Figure 2.** Protocole expérimental chez les souris BALB/c. (IP): voie intrapéritonéale ; (SC): voie sous-cutané; (PC): poids corporel.

## II. 3. Etude biochimique

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

Les tissus pulmonaires ont été homogénéisés à 4°C et à une vitesse de 800 rpm à l'aide d'un homogénéisateur SS2 équipé d'un pilon en Téflon. Nous avons utilisé 10 volumes de tampon phosphate (50mM, pH 7,2) contenant 0,5% de Triton X-100. Les homogénats ont été centrifugés pendant 20 minutes à 10,000 g et 4°C. Après trois cycles de congélation-décongélation, le surnageant a été récupéré, aliquoté, puis conservé à -20°C jusqu'à son utilisation (Blandizzi et al., 2005).

### II. 3. 2. Dosage des protéines

La concentration des protéines dans les poumons est évaluée par la méthode colorimétrique de Bradford. Cette méthode repose sur la liaison du bleu de Coomassie G-250 aux protéines, formant un complexe bleu qui absorbe à 595 nm. L'intensité de l'absorption est proportionnelle

à la concentration en protéines, déterminée à partir d'une courbe standard établie avec de l'albumine sérique bovine (BSA) à 0,1% (**Bradford, 1976**).

### **II. 3. 3. Dosage des marqueurs pro-oxydants**

#### **II. 3. 3. 1. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)**

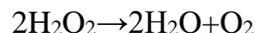
La MDA est souvent utilisé comme indicateur direct des dommages oxydatifs aux lipides, et est considéré comme un biomarqueur de peroxydation lipidique (**Toto et al., 2022**). Cette méthode repose sur la détermination de l'intensité de la couleur rose produite par la réaction de deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) avec les peroxydes lipidiques ou les espèces réactives de TBA, notamment le MDA, par spectrophotométrie à 532 nm (**Lefèvre et al., 1998**).

100 µL d'homogénat pulmonaire sont ajoutés à un mélange réactionnel comprenant : 375 µL d'acide acétique 20% (pH 3,5), 375 µL d'acide thiobarbiturique à 0,8%, et 50 µL de sodium dodecylsulfate à 8,1%. Le volume réactionnel est ajusté à 1,0 ml avec de l'eau distillée et chauffé à 95°C pendant une heure. La réaction est stoppée par un refroidissement rapide à 0°C, suivie d'une centrifugation à 3000g pendant 10 minutes à 4°C. La densité optique est mesurée à 532 nm et les résultats sont exprimés en µmoles de MDA par mg de protéine (**Rozenberg et al., 2006**).

### **II. 3. 4. Dosage des paramètres antioxydants**

#### **II. 3. 4. 1. Dosage de l'activité catalase**

La catalase est une enzyme ubiquitaire présente dans les peroxysomes et le cytosol, catalysant la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



L'activité catalase a été mesurée en suivant de transformation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et oxygène. Pour ce faire, 50 µL d'homogénat tissulaire ont été mélangés avec 950 µL de tampon phosphate 50 mM, à un pH de 7,0.

La réaction a été initiée par l'ajout de 500 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une concentration de 30 mM. La réaction a été suivie pendant 2 minutes à une température de 25°C. Selon Aebi (1984), l'activité de la catalase est évaluée en observant la baisse de l'absorbance à 240 nm, exprimée en U/min/mg de protéines. La valeur d'une unité d'activité catalase est calculée selon la formule de Aebi (1984):

Une unité de catalase correspond à  $K/6,93 \times 10^3$ .

$$K = (2,3/t) (\log A1/A2)$$

Où :

- t représente le temps en secondes,
- A1 et A2 représentent respectivement les absorbances initiale et finale mesurées à 240 nm.

Cette formule permet de convertir les changements d'absorbance en activité enzymatique catalase, exprimée en unités par minute par milligramme de protéines.

#### **II. 4. Etude hématologique par FNS**

La numération formule sanguine (NFS), également connue sous le nom d'hémogramme, est un examen hématologique réalisé après une prise de sang pour compter (numération) et classifier (formule) les différents composants du sang, tels que les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes (**Cloutier et al., 2014**).

Cet examen permet d'évaluer la santé globale du patient, de diagnostiquer diverses pathologies telles que l'anémie, une altération de l'état général, des hémorragies, des thromboses, des infections persistantes ou des cancers. Il est également 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. 5. Etude histologique**

Après avoir prélevé les poumons et la rate des souris, ils ont été fixés dans une solution de formol tamponnée à 4 % pendant 24 heures. Ensuite, les pièces ont été déshydratées par immersion successive dans des bains d'alcool de concentration croissante (70°, 90° et 100°), suivis d'un bain de toluène (**Martoja et Martoja, 1967**).

Des blocs ont été confectionnés, après imprégnation des fragments fixés à la paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Américain Optical) et colorées à l'hématoxyline-éosine (H-E) (**Annexe 3**) (**Martoja et Martoja., 1967**).

## **II.6. Etude statistique :**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard de la moyenne). Le logiciel GraphPadPrism v. 6.0 est utilisé pour analyser les données.

Les groupes expérimentaux sont comparés en utilisant le test ANOVA unidirectionnel avec un test *post hoc de Tukey*, avec une valeur de  $P < 0,05$  considérée comme statistiquement significative.

# **Résultats et discussion**

## **II. Discussion générale**

Dans cette étude, nous avons démontré l'influence du stress oxydatif sur les lésions pulmonaires causées par le sepsis, caractérisé par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MDA) et une diminution des antioxydants (CAT). Le poumon est particulièrement vulnérable lors du sepsis (**Vandini et al., 2015**). Une tempête de cytokines provoquée par le sepsis peut entraîner une inflammation pulmonaire sévère, conduisant à une lésion pulmonaire aiguë (ALI) ou à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Ces dommages sont irréversibles conduisant à une mortalité. Les lésions pulmonaires peuvent être directes (lésion épithéliale) ou indirectes (lésion des cellules endothéliales) (**Bellani et al., 2016; Englert et al., 2019**).

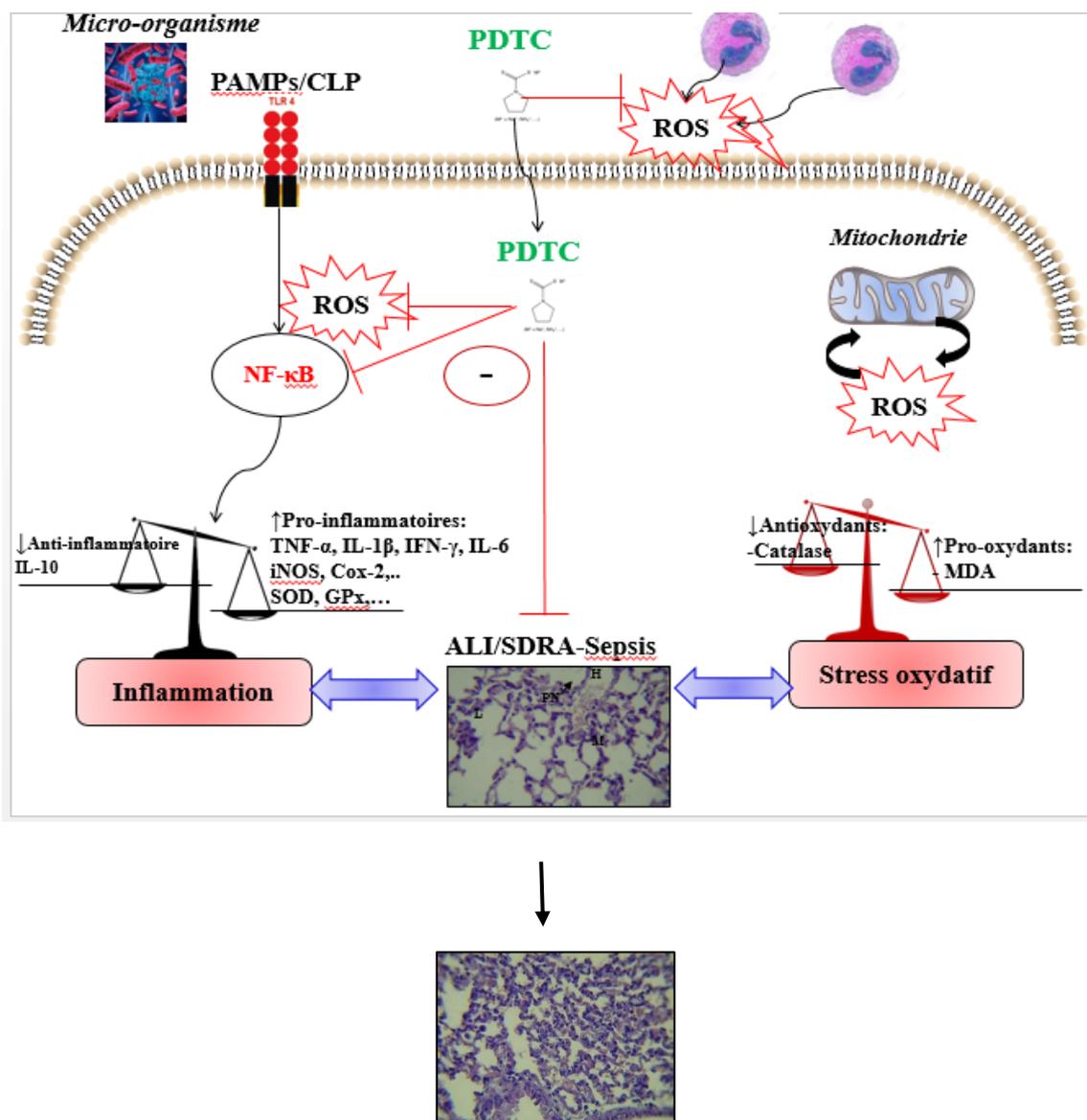
Le stress oxydatif et la réponse inflammatoire jouent un rôle important dans la physiopathologie du sepsis. Les PAMPs, MAMPs et DAMPs activent les récepteurs PRRs (TLRs) et déclenchant diverses voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire dont celle du NF- $\kappa$ B (**Vijay, 2018 ; Kumar et al., 2020**). Ce dernier est un facteur de transcription clé qui régule de nombreux gènes liés aux réponses immunitaires et inflammatoires, notamment les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines, les molécules d'adhésion et les enzymes pro-oxydantes (**Oeckinghaus et al., 2009**). Il peut être à l'origine d'un état hyper-inflammatoire observé lors du sepsis (**Liu et Malik, 2006**). Cette réponse provoque une accumulation de neutrophiles et de macrophages, la sécrétion de cytokines et le recrutement de lymphocytes, aggravant les lésions pulmonaires et augmentant la mortalité (**Idell, 2012 ; Chen et al., 2014; Wang et al., 2019**).

Le stress oxydatif au cours de cette réponse inflammatoire endommage directement les tissus (**Kvietys et Granger, 2012; Bedreag et al., 2015**). Cette réponse démesurée est liée à un déséquilibre redox, marqué par une augmentation de la production de ROS/RNS. Ces derniers endommagent les biomolécules, provoquant une toxicité et des dommages organiques, et activent le NF- $\kappa$ B, amplifiant ainsi l'inflammation et le stress oxydatif (**Zhou et al., 2001; Horton, 2003 ; Halliwell, 2009**).

Nos résultats montrent que le PDTC inhibe la réponse inflammatoire, le stress oxydatif et limite les lésions pulmonaires. Le PDTC, un composé thiol aux propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (**Narsale et al., 2016**), est utilisé comme inhibiteur de NF- $\kappa$ B et antioxydant dans divers modèles (**Thompson et al., 2010 ; Li et al., 2012**). Il atténue les

lésions pulmonaires, réduit l'infiltration cellulaire et la libération de cytokines inflammatoires (Cheng et al., 2010), améliore l'équilibre antioxydant (Yang et al., 2017) et réduit le dysfonctionnement mitochondrial.

Cette étude suggère un rôle protecteur du PDTC dans les lésions pulmonaires aiguës induites par CLP. Cependant, bien que les effets thérapeutiques du PDTC sur le syndrome septique soient prometteurs, la nature précise de son action nécessite des études supplémentaires pour mieux comprendre ses mécanismes chez les patients septiques.



**Figure 13.** Effet de PDTC dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis.

# **Conclusion et perspectives**

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

- L'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires 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 pulmonaire, une hémorragie et des dommages oxydatifs pulmonaire. 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 poumon, 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.

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

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

# **Références bibliographiques**

- Abdalsamih M. Taeb, MD1 ; Michael H. Hooper, MD, MSc1 ; et Paul E. Marik, MD. (2017).FCCM, FCCP1.Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Nutrition in Clinical PracticeVolume XX Number XMonth 201X1 13c.American Societyfor Parenteral and Enteral Nutrition.
- Abraham E. (2003). Nuclear factor-kB and its role in sepsis-associated organ failure. J Infect Dis;187(Suppl. 2):S364–9.
- Aditi A. Narsale Aditi A Narsale ,Melissa J Puppa ,Justin P Hardee ,Brandon N VanderVeen ,Reilly T Enos ,E Angela Murphy ,James A Carson.(2016),Short-term pyrrolidine dithiocarbamate administration attenuates cachexia-induced alterations to muscle and liver in ApcMin/+ mice doi: 10.18632/oncotarget.10699
- Administration of of nicotinamide riboside presents oxidative stress and organ injury in sepsis. Free radical biology and medicine, 123, 125-137.
- Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. (2009).The role of free radicals in sepsis development. Front Biosci Elite Ed; 1: 277-87
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. (2001) Épidémiologie du sepsis sévère aux États-Unis : analyse de l'incidence, des résultats et des coûts de soins associés. Soins critiques Med.;29(7):1303-1310. sies. Poitrine. 2014;145(6):1407-1418.
- Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM, et al. (2002).Effect of treatment with low dose of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. JAMA;288:862–71.
- Baisheng Sun , Mingxing Lei , Jiaqi Zhang , Hongjun Kang , Hui Liu , et Feihu Zhou , (2003).Lésion pulmonaire aiguë causée par un sepsis : comment ça se produit ? , ; 10 : 1289194.
- Barriere SL, Lowry SF. (1995). An overview of mortality risk prediction in sepsis. Crit Care Med. 1995;23(2):376-393.
- Bellani G., Laffey J. G., Pham T.(2016). Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. JAMA . ;315(8):788–800. doi: 10.1001/jama.2016.0291.
- Berthélémy, S. (2014). L'hémogramme ou numération-formule sanguine. Actualités Pharmaceutiques, 53(538), 53-55.

- Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Définitions du sepsis et de la défaillance d'organes et lignes directrices pour l'utilisation de thérapies innovantes en cas de sepsis. Le Comité de la Conférence de Consensus ACCP/SCCM. Poitrine.
- Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA (1989). Sepsis syndrome : une entité clinique valide. Groupe d'étude sur la méthylprednisolone sur la septicémie sévère. Critique. Soins Med. ; 17 : 389-393. est ce que je: 10.1097/00003246-198905000-00002.
- Bone RC. (1996). Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Ann Intern Med.;125(8):680-687.
- 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.
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. (2002). Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. Lancet;360:219–23.
- Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, et al.(2004) Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004;286:R491–7.
- Camicia G, Pozner R, and Larran~aga G. (2014). Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis . Shock ; 42(4) : 286-294.
- Cardoso-Sousa L, Aguiar E, Caixeta D, Vilela DA, Costa D, Silva T, Cunha TH, Faria P, Espindola F, Jardim A, Vieira AL, Oliveriara T, Goulart L, Sabino-Silva R, Mukhpoadhyay P. (2019). Effects of salbutamol and phlorizin on acute pulmonary inflammation and disease severity in experimental sepsis. Plos one, 14(9), e0222575
- Carneiro AH, Póvoa P, Gomes JA. (2017). Dear Sepsis-3, we are sorry to say that we don't like you. Rev Bras Ter Intensiva. .January-March;29(1):4–8. 10.5935/0103-507X.20170002.
- Carre´ JE, Orban J-C, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, et al.(2010). Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondria biogenesis. Am J Respir Crit Care Med;182:745–51.
- Chanock SJ, Benna ELJ, Smith RM, Babior BM. (1994); The respiratory burst oxidase. J Biol Chem;269:24519–22.

- Chen GY, Nunez G. (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.*;10(12):826-837.19. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature.* 2001;410(6832):1103-1107.
- 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.
- Cheng T, Zhang GY, Guo CJ, Zhang X. (2010); Effects of NF-kappaB inhibitor on titanium particulate-induced inflammation in a murine model. *J Surg Res.*;162:225–230. chez le rat blanc, par l'aspirine et la curcumine. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.
- Cinar IR, Sirin BU, Aydin PE, Toktay ER, Cadirci E, Halici I , Halici Z. (2019). Ameliorative effect of gossypin against acute lung injury in experimental sepsis model of rats. *Life Sciences.* 221, 327-334.
- Cloutier L, René A, Jutras A. (2014). La formule sanguine complète. *Pratique clinique* ; 1-11.
- Cohen J, Vincent JL, Adhikari NKJ et al. (2006). Sepsis : une feuille de route pour l'avenir.
- Crouser ED. (2004). Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*;4:729–41.
- 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.
- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J et al. (2004) Lignes directrices de la campagne Surviving Sepsis pour la gestion du sepsis grave et du choc septique. *Soins critiques Med . ; 32 ( 3 ):* 858-73. 10.1097/01.CCM.0000117317.18092.E4.
- Draper HH, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*; 186: 421-31.
- Du Q, Wang C, Zhang N, Li G, Zhang M, Li L, Zhang Q, Zhang J. (2014) In vivo study of the effects of exogenous hydrogen sulfide on lung mitochondria in acute lung injury in rats. *BMC anesthesiology.* 14:117.
- Englert J. A., Bobba C., Baron R. M. (2019) Integrating molecular pathogenesis and clinical translation in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *JCI Insight* ;4(2) doi: 10.1172/jci.insight.124061.

- Ertel W, Kremer JP, Kenney J, et al. (1995). Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*;85(5):1341-1347.
- Galley HF. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth* 2011;20:1–8.
- Guo Y, Qu Y, Yu J, Song L, Chen S, Qin Z, et al. (2022). Un hydrogel injectable à base de chitosane et de vitamine C améliore la survie cellulaire sous stress oxydatif . *Int J Biol Macromol* . 202 : 102-11. doi : 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.030.
- Halliwell B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* ; 46(5): 531-542.
- Hong GU, Zheng D, Zheng L, Ni RU, Wang GR, Fan GU, Lu Z, Peny TI. (2018).
- Hongfu Yang, Rongqing Sun, Ning Ma, Qilong Liu, Xiaoge Sun, Panpan Zi, Junsheng Wang, Ke Chao, and Lei Yu .(2017). Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B signal by pyrrolidine dithiocarbamate alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury.
- Horton JW. (2003). Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*; 189:75-88.
- Hotchkiss RS, Nicholson DW. (2006). Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 6(11):813-822.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. (1999). Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;96(25):14541-14546.
- Hunt A (2019) Sepsis : un aperçu des signes, des symptômes, du diagnostic, du traitement et de la physiopathologie Sepsis Global Alliance 2023“Sepsis.”
- Husain KD, Stromberg PE, Woolsey CA, et al. (2005). Mechanisms of decreased intestinal epithelial proliferation and increased apoptosis in murine acute lung injury. *Crit Care Med*.;33(10):2350-2357.
- Ibrahim Y, Moussa RA, Bayoumi A, Ahmed A. (2020). Tocilizoumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of sepsis via down regulation of NF $\kappa$ B/JNK: possible role of P-glycoprotein. *Inflammopharmacology*,28(1), 215-230.
- Jean-Louis Vincent , (2022). Nov Evolution of the Concept of Sepsis; 11(11): 1581. Published online 2022 Nov 9. doi: 10.3390/antibiotics11111581.
- K.J. Tracey, (2002). The inflammatory reflex, *Nature* 420 (6917) 853–859.
- Kagoya Y., Yoshimi A., Kataoka K., et al. (2014) Positive feedback between NF- $\kappa$ B and TNF $\alpha$  promotes leukemia-initiating cell capacity. *The Journal of Clinical Investigation* .;124(2):528–542. doi: 10.1172/JCI68101.

- Kingir ZE. (2018). Effects of dopagliflozin on experimental sepsis model in rats. Turkish journal trauma and emergency surgery, 25, 213-221.
- Kostakoglu U, Topcu AT, Atak M, Tumkaya LE, Mecantepe TO, Uydu HU. (2020) .The protective effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor against cecal ligation and puncture-induced sepsis via oxidative stress and inflammation. Life Sciences, 241,117051.
- Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Sivastava CK, Metha S, Jyoti A. (2018). Evaluation of oxidative stress and antioxidant status : Correlation with the severity of sepsis.Scandinavian journal of immunology 87(4), e12653.
- 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 paradigme change ? Pubmed, 23590272.
- Lefevre G, Beljean-Leumarie M, Beyerle F, Bowefont-Rousselot D, Cristol JP, Therond
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. (2014). SCCM/ESICM/ACCP/ sepsis de 2 cohortes indépendantes. JAMA.312(1):90-92.
- 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.
- Li ZY, Geng YQ, Shao YL, Zhang Y. (2012) Effect of NF-kappaB inhibitor PDTC on a herpetic stromal keratitis mouse model. Eye science. ;27:188–192.
- 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.
- Liu V, Escobar GJ, Greene JD et al. (2001). Décès à l'hôpital chez des patients atteints.
- Lorente LE, Martín MA M, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez AL, Labat LO, Díaz CE, Solé-Violán JO, Ferreres JO, María Borreguero-León JU, Jiménez AL, and MoreraFumero AR . (2013). Prognostic Value of Malondialdehyde Serum Levels in Severe Sepsis: A Multicenter Study. PLoS One ; 8(1) : e53741.
- Lorente LE. (2015).New Prognostic Biomarkers of Mitochondrial Oxidative Stress in Septic Patients. Archives of Critical Care Medicine; 1 (2)- e3125.
- M.E. Mikkelsen, et al., (2013).The epidemiology of acute respiratory distress syndrome in patients presenting to the emergency department with severe sepsis, Shock 40 (5) 375–381.
- MacDonald J, Galley HF, Webster NR. (2003). Oxidative stress and gene expression in sepsis. Br J Anaesth;90(2):221–32.

- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. (2003). L'épidémiologie du sepsis aux États-Unis de 1979 à 2000. *N Engl J Med.*;348(16):1546-1554. 1992;101(6):1644-1655.
- Morgan MJ, Liu Z-G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen and NF-kB signaling. *Cell Res*;21:103–15.
- Nau GJ, Richmond JFL, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA.*;99(3):1503-1508.
- Oeckinghaus A, Ghosh S.(2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 1: a000034
- P, Torrelles J. (1998). Evaluation of lipid peroxydation by assaying the the thioharbituric-
- Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S.(2008). Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*;34:6–17.
- Parratt JR.(1998). Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother*;41:31–9.
- Parrish WR, Gallowitsch-Puerta M, Czura CJ, Tracey KJ. (2008). Experimental therapeutic strategies for severe sepsis: mediators and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.*;1144(1):210-236.
- Poll T, Lowry SF. (1995). Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock.*;3(1):1-12.
- Pruitt JH, Copeland EM, Moldawer LL. (1995). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. *Shock.*;3(4):235-251.
- Rahim I. (2009). Modulation de la défaillance myocardique induite par *Escherichia coli* responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*; 31 (11):
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R et al. (2016). Campagne Survivre au Sepsis : Lignes directrices internationales pour la gestion du sepsis et du choc septique :. *Intensive Care Med* . 2017. mars ; 43 ( 3 ): 304-77. 10.1007/s00134-017-4683-6.
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R et al. (2016). Campagne Survivre au Sepsis : Lignes directrices internationales pour la gestion du sepsis et du choc septique :. *Intensive Care Med* . 2017. mars ; 43 ( 3 ): 304-77. 10.1007/s00134-017-4683-6.

- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.*;8(10):776-787.
- Robinson JM, Badwey JA.(1994); Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. *Immunol Ser* ;60:159–78.
- 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.
- Rudyk O, Phinikaridou A, Prsyazhna O, Burgoyne JR, Botnar RM, Eaton P. (2013).Protein kinase G oxidation is a major cause of injury during sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*;110:9909–13.
- Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. (2013). Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view.*Mediators Inflamm.*; (6):165974.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. (2016) Les définitions du troisième consensus international pour le sepsis et le choc septique (Sepsis-3). *JAMA.*;315(8):801-810. 8. Marik PE. Prise en charge précoce du sepsis sévère : concepts et controverses
- Sjakste N, Baumann L, Boucher JL, Dzintare M, Meirena D, Sjakste J, et al. (2004) Effects of g-butyrobetaine and mildronate on nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*;94:46–50.
- Svistunenko DA, Davies N, Brealey D, Singer M, Cooper CE.(2006). Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:262–72.
- T. van der Poll, F.L. van de Veerdonk, B.P. Scicluna, M.G. (2017) Netea, The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets, *Nat Rev Immunol.* 17 (7) 407–420.
- Thompson JS, Asmis R, Tapp AA, Nelson B, Chu Y, Glass J, (2010). Moneyhon M, Brown SA. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) blocks apoptosis and promotes ionizing radiation induced necrosis of freshly-isolated normal mouse spleen cells. *Apoptosis.* ;15:705 714.
- Timsit JF, Perner A. (2016) Sepsis : trouvez-moi, gérez-moi et arrêtez-moi ! *Soins intensifs Med . . décembre* ; 42 ( 12 ):1851–3. 10.1007/s00134-016-4603-1.
- Toby Lawrence, (2009).The Nuclear Factor NF-κB Pathway in Inflammation,; 1(6): a001651.doi: 10.1101/cshperspect.a001651).
- 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.

- Vandini S, et *al.* (2015). Immunological, viral, environmental, and Individual Factors Modulating Lung Immune Response to Respiratory Syncytial Virus. *Biomed Res Int.* ;2015:875723. doi: 10.1155/2015/875723.
- Vijay K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, present, and future. *Int Immunopharmacol.* 59:391–412. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.002.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL et *al.* (2015). Sepsis dans les unités de soins intensifs européennes : résultats de l'étude SOAP. *Soins critiques Med.*;34(2):344-353. recherche. *Lancet Infect Dis*;15(5):581-614. 10.
- Wang WA, Yang XI, Chen QI, Guo MI, Liu S, Liu J, Wang JI, Huang FE. (2020). Sinomenine attenuates septic-associated lung injury through the Nrf2-keap1 and autophagy. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 72(2), 259-270.
- Weiss SL et Deutschman CS. (2014). Elevated malondialdehyde levels in sepsis: something to 'stress' about? *Critical Care*. 18(2), 1-2.
- Yadav UCS, Ramana KV. (2013). Regulation of NF- $\kappa$ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev*. Article ID 690545.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. (2001). NF  $\kappa$ B and AP-1 mediate transcriptional

# **Annexes**

**Annexes I:**

**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 <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , 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 <sup>3</sup> /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≥7 0 mm Hg	MAP≥7 0 mm Hg	Dopamine< 5 Ou dobutamine	Dopamine 5.1-15 ou epinephrine≤0.1 ou norepinephrine≤0 .1	Dopamine> 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

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

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

Tableau 1 Reconnaissance des motifs microbiens par les récepteurs TLRs et Nods.		
Récepteur	Motif moléculaire (Mamp)	Pathogène
TLR1	Triacyl lipopeptides	Bactéries, mycobactéries
TLR2	Lipoprotéines	Bactéries
	Acide lipoteichoïque	Bactéries à Gram positif
	Lipoarabinomannane	Mycobactéries
	Glycolipides	Spirochètes
	Zymosan	Levures
	Protéines virales	Herpes simplex virus
	LPS « atypique »	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
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:**

• **Appareillages:**



**Centrifugeuse  
réfrigérée**



**Lecteur de  
microplaques  
ELISA**



**Homogénéisateur**



**Bain marrie**



**Agitateur**



**Balance de  
précision**



**PH mètre**



**Centrifugeuse**



**Spectrophotomètre**

• Liste des Listes de Réactifs et consommables:

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

Réactifs et solutions	Consommables
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 50m
Acide orthophosphorique 85%, Acide Acétique, HCl, TBA (Thiobarbituricacid), EDTA	Cuve de spectrophotmètre 1et 3mL, Cuve en quartz
BSA (Bovine serumalbumin)	Flacon en verre, Boite de pétri, Papier pH
Ethanol 100°, Formol,	Trousse de dissection

Annexes 3:

Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine

**1. Fixation**

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

Les fragments tissulaires sont mise dans des cassettes en plastiques puis fixées dans du formol tamponé pendant 24 heures.

**2. 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 (tableauIV).

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

<b>Étapes</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Durée</b>
<b>Fixation</b>	Formole tamponné à 4%	1h
<b>Deshydatation</b>	1 bain d'éthanol 70°	6h
	1 bain d'éthanol 80°	6h
	1 bain d'éthanol 95°	6h
	3 bains d'éthanol 100°	6hx3
<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.

### **3. Coupes histologiques et coloration H-E :**

Les coupes histologiques sont faites avec un microtome (LEICA) permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies et étalées sur des lames de verre préchauffées au bain-marie à 45°C, puis séchées une nuit à 40-45°C ou 1h à 60°C. Les coupes histologiques sont colorées à l'hématoxyline-éosine (H-E), une coloration topographique qui permet une vue d'ensemble de la morphologie des cellules afin de déterminer leur répartition, architecture et structure. C'est une coloration bichromatique composée d'un colorant nucléaire basique, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique acide, l'éosine. L'hématoxyline colore les noyaux en bleu violet tandis que l'éosine colore les cytoplasmes en rose (Fischer et al., 2008).

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée, après déparaffinage des coupes (physique à l'étuve 80°C pendant 5 min et chimique dans 2 bains de toluène pendant 3 min), en immergeant les lames

dans des bains d'éthanol de degré décroissant (100°,95°,80°,70°) puis dans l'eau distillée (**Tableau V**) (**Fischer et al., 2008**).

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

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

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

<b>Etapes</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Durée</b>
<b>Déparaffinage</b>	Etuve 100°C	5min
	3 bains de paraffine 3hx3	2min x3
	1 bain d'éthanol 100°	2min
	1 bain d'éthanol 95°	2min
	1 bain d'éthanol 80°	2min
	1 bain d'éthanol 70°	2min
	1 bain d'eau distillée	2min
<b>Coloration H-E</b>	Hématoxyline	10min
	Lavage eau	2min
	Eosine	1min
	Lavage eau	2min
<b>Déshydratation</b>	3 bains d'éthanol 100°	45sec x3
	3 bains de Toluène	45sec x4

#### **4. Observation microscopique :**

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