

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

Etude de quelques paramètres de stress oxydatif chez des patients Algériens atteints de sepsis.

Présenté par :

M^{me} CHOUCYOU Chaima

M^{me} NEMLA Asma

Soutenu le : 14 septembre 2022

Devant le jury composé de :

M^{me} ZEROUTI K.	MCB	USDB 1	Présidente
M^{me} SOUR S.	MCA	USDB 1	Examinatrice
M^{me} RAHIM I.	MCA	USDB 1	Promotrice
M^{me} BOUAROUDJ C.	MCB	CHU Isaad Hassani Beni Messous Alger	Co-promotrice

Promotion 2021 /2022

La rédaction de ce manuscrit venant clore l'aventure que constitue un mémoire, nous tenons donc à exprimer nos sincères remerciements à tous ceux qui ont joué un rôle dans sa concrétisation.

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

Nous tenons à remercier notre Co-promotrice **Dr BOUAROU DJ Chafika** d'avoir accepté 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.

Nos vifs remerciements vont aussi aux membres du jury : **Dr ZEROUTI K** et **Dr SOUR S** nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury et d'examiner ce modeste travail.

Nous remercions particulièrement vont au **Pr Harraoubia Mohamed Salah**, chef de service des urgences médicochirurgicales du CHU ISSAD HASSANI BENI MESSOUS, les médecins les résidents et les infirmiers pour leur gentillesse et leur aide pendant la réalisation de ce travail, Merci pour leur aide précieuse, leur sympathie et leurs encouragements.

Nos vifs remerciements aussi le **Dr Hetit Sabah** du service Gastrologie du CHU ISSAD HASSANI BENI MESSOUS, le **Pr Djerdjouri B** et le **Dr Tounsi N.** du laboratoire de pharmacologie cellulaire et moléculaire de l'USTHB, le personnel du laboratoire central d'analyse médicale du CHU ISSAD HASSANI BENI MESSOUS, pour leur gentillesse et leur aide précieuse pendant la réalisation de ce travail. Nous n'oublions pas de remercier les volontaires témoins utilisés dans cette étude.

En fin, nous voulons témoigner notre gratitude et notre profond respect à notre chef d'option le **Pr. SAADI Leila** et tous les enseignants du Département de BMC pendant les cinq années de notre parcours.

Nous tenons à remercier profondément et sincèrement tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Nous remercions aussi toute la promotion de BCM (Nous ne vous oublierons jamais).

Dédicace

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail de fin d'étude à mes chers parents ; qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et mon éclairer le chemin par leurs conseils judicieux.

J'espère qu'un jour, je pourrais leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour nous, que Dieu leur prête bonheur et longue vie.

Je dédie aussi ce travail :

A mon marie Rachid Ben Hatit pour ses encouragements permanents, et son soutien.

A ma chère tante Sabah Hetit pour son soutien et encouragement.

A mes frères Ahmed et Mouhamed et sœurs Amina et Nour El Houda pour leurs soutien et pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral et financier.

À tous mes proches et mes chères amies et collègues, pour leur présence et leur fidélité, en particulier mon binôme Chaima merci pour tout.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire

A tous nos professeurs qui nous ont enseigné et à tous ceux qui nous sont chers.

ASMA

Dédicace

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

A l'homme, ma précieuse offre de Dieu, a qui je dois ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère.

A mes chers frères (ils sont un trésor de Dieu) pour leur soutien et encouragement.

A mon cher époux, pour sa patience et son soutien pendant toute la durée de ce travail, qui n'a jamais cessé de me conseiller et de m'encourager, et à qui je voudrais exprimer mon amour et reconnaissance.

Que Dieu vous protège et vous accorde succès et bonheur.

A mon adorable petit frère Youcef qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille. A mes grands-mères, mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie. A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements.

Je n'oublierai pas mon binôme Asma pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet

CHAIMA

Le sepsis est un problème de santé avec un taux de mortalité avoisinant les 6 millions chaque année dans le monde. La physiopathologie complexe et ambiguë du sepsis constitue, à l'heure actuelle, un défi majeur pour les chercheurs afin de le définir, cerner sa physiopathologie, le diagnostiquer à un stade précoce et développer une thérapie. En effet, nous avons étudié l'implication du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis chez des patients Algériens septiques. Pour répondre à ces objectifs une étude des caractéristiques épidémiologiques cliniques, hématologiques, et biochimiques de 14 patients Algériens septiques, a été complétée avec une étude de paramètres de stress oxydatif (marqueurs pro-oxydants « MDA et NO » et antioxydants « GSH »).

Les résultats épidémiologiques montrent une prédominance du sepsis chez les personnes âgées (>40 ans) de sexe masculin. Ces patients présentaient plus de 2 symptômes caractéristiques du sepsis dont une hyperthermie, hyperleucocytose, une hypotension sévère, une thrombopénie, une augmentation de la fréquence cardiaque et respiratoire, et un dysfonctionnement d'organes (rein et poumons principalement).

Les résultats cliniques montrent que ces patients avaient un système immunitaire fragilisé avec au moins une pathologie chronique (Diabète, HTA, asthme, cardiopathie, insuffisance rénale, ...etc).

Les résultats biochimiques montrent que les patients septiques présentaient une réponse inflammatoire excessive caractérisée par des taux sériques élevés de CRP, procalcitonine, une altération hépatique (augmentation des taux sériques de bilirubine et de transaminases (ALAT/ASAT)), une altération rénale (augmentation de taux sérique de créatinine et d'urée) et une altération métabolique (hyperglycémie et hyperlactatémie). Ces déséquilibres sont associés à un stress oxydatif caractérisé par une augmentation des pro-oxydants (99.3% MDA et 162.37% NO) et une diminution d'anti-oxydants (82.73% GSH) au niveau du sérum.

Nos résultats suggèrent que les marqueurs de stress oxydant pourraient être utilisés comme marqueurs de diagnostic chez les patients septiques.

Mots clés : Sepsis, stress oxydatif, patients, dysfonctionnement d'organes, inflammation.

Sepsis is a health problem with a mortality rate of almost 6 million every year in the world. The complex and ambiguous pathophysiology of sepsis is, at present, a major challenge for researchers in order to define it, identify its pathophysiology, diagnose it at an early stage and develop therapy. Indeed, we studied the involvement of oxidative stress in the pathophysiology of sepsis in Algerian septic patients. To meet these objectives, a study of the epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of 14 Algerian septic patients was completed with a study of oxidative stress parameters (pro-oxidant markers «MDA and NO» and antioxidants «GSH»).

Epidemiological results show a predominance of sepsis in older (>40 years) males. These patients had more than two symptoms characteristics of sepsis including hyperthermia, leukocytosis, severe hypotension, thrombocytopenia, increased heart rate and respiratory rate, and organ dysfunction (mainly kidney and lung).

Clinical results show that these patients had compromised immune systems with at least one chronic condition (diabetes, hypertension, asthma, heart disease, insufficiency renal, etc.). Biochemical results show that septic patients had a response excessive inflammatory characterized by elevated serum levels of CRP, procalcitonin, a hepatic impairment (increased serum bilirubin and transaminase levels (ALAT/ASAT)), renal impairment (increased serum creatinine and urea levels), and metabolic alteration (hyperglycemia and hyperlactate). These imbalances are associated with oxidative stress characterized by an increase in pro-oxidants (99.3% MDA and 162.37% NO) and a decrease in anti-oxidants (82.73% GSH) at the serum level.

Our results suggest that oxidizing stress markers could be used as diagnostic markers in septic patients.

Keywords : Sepsis, oxidative stress, patients, organ dysfunction, inflammation.

تعفن الدم مشكلة صحية حيث يبلغ معدل الوفيات حوالي 6 ملايين كل عام في جميع أنحاء العالم. تمثل الفيزيولوجيا المرضية المعقدة والغامضة لتعفن الدم تحديًا كبيرًا للباحثين لتعريفها وتحديدتها وتشخيصها في مرحلة مبكرة وتطوير العلاج. في الواقع درسنا مشاركة الإجهاد التأكسدي في الفيزيولوجيا المرضية لتعفن الدم لدى مرضى الإنتان الجزائريين. ولتحقيق هذه الأهداف أنجزت دراسة عن الخصائص الوبائية، والسريية، والدموية والكيميائية الحيوية لـ 14 مريض جزائري من مرضى التعفن، بدراسة معايير الإجهاد التأكسدي (العلامات المؤيدة للأكسدة «MDA و NO» ومضادات الأكسدة «GSH»).

تظهر النتائج الوبائية هيمنة تعفن الدم لدى الذكور الأكبر سنًا (< 40 عامًا). كان لدى هؤلاء المرضى أكثر من 2 أعراض مميزة لتعفن الدم بما في ذلك ارتفاع الحرارة، وكثرة كريات الدم البيضاء، وانخفاض ضغط الدم الحاد، وقلة الصفائح الدموية، وزيادة معدل نبضات القلب والجهاز التنفسي، وفشل الأعضاء (بشكل أساسي الكلوي والرئة).

أظهرت النتائج السريية أن هؤلاء المرضى يعانون من ضعف في جهاز المناعة مع مرض مزمن واحد على الأقل (السكري، ارتفاع ضغط الدم، الربو، أمراض القلب، الفشل الكلوي، إلخ).

تظهر النتائج البيوكيميائية أن مرضى تعفن الدم لديهم استجابة التهابية مفرطة تتميز بارتفاع مستويات البروتين سي التفاعلي والبروكالسيتونين والاختلال الكبدي في مصل الدم (زيادة مستويات البيليروبين في الدم وترانس أميناز (ALAT / ASAT))، واختلال كلوي (زيادة مستويات الكرياتينين والبوريا في الدم)، والتغيير الأيضي (ارتفاع السكر في الدم وفرط لاكتات الدم). ترتبط هذه الاختلالات بالإجهاد التأكسدي الذي يتميز بزيادة المؤكسدات (MDA 99.3% و NO 162.37%) وانخفاض في مضادات الأكسدة (HSG 82.73%) في مصل الدم.

تشير نتائجنا إلى أنه يمكن استخدام علامات الإجهاد التأكسدي كعلامات تشخيصية عند مرضى تعفن الدم.

الكلمات المفتاحية: تعفن الدم، الإجهاد التأكسدي، المرضى، فشل الأعضاء، الالتهاب.

ALAT/GPT: Alanine-Amino-Transférase/GlutamoPyruvate Transférase

APACHE II: Acute physiology and chronic health evaluation II

ASAT/GOT : Aspartate-Amino-Transférase/GlutamoOxaloacétate Transférase

CAT : Catalase

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

Cox-2 : Cyclooxygenase 2

CRP : Protéine C réactive

DAMPs : Alarmines, *Damage- Associated Molecular Patterns*

EDTA : Ethylénediamine-tétraacétique

GPx : Gluthathion peroxydase

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

ICAM-I : Intercellular adhesion molecule 1

IL-1 β : Interleukine -1 β

IL-8 : Interleukine -8

iNOS : oxyde nitrique synthase inductible

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

L'IL-12 : Interleukine -12

L'IL-6 : Interleukine -6

MDA : Malondialdéhyde

MODS: Multiple organ dysfunction Syndrome

MPO: Myéloperoxydase

NF- κ B: Nuclear factor-kappa B

NO : Monoxyde d'azote

NO \bullet : Oxyde nitrique

NO₂⁻ : Nitrites

NO₃⁻ : Nitrates

O₂^{•-} : Anion superoxyde

ONOO⁻ : Peroxynitrites

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PCT : Procalcitonine

PMN : Polymorphonucléaires

PRRs: Patterns Recognition Receptors.

qSOFA: QuickSOFA

RNS: Reactive nitrogen sepecies

ROS: Reactive oxygen sepecies

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- α : Tumer necrosis factor α

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1

Tableau I. Caractéristiques épidémiologiques des patients septiques comparés aux contrôles.....	24
Tableau II. Répartition des patients selon les tranches d'âge.....	24
Tableau III. Caractéristiques cliniques des patients septiques comparés aux contrôles.	26
Tableau IV. Caractéristiques microbiologiques et cliniques des patients Algériens septiques comparés aux contrôles.	28
Tableau V. Caractéristiques hématologiques des patients septiques comparés aux contrôles.	29
Tableau VI. Paramètres biochimiques d'altération métabolique et d'organes (rénale et hépatique).	30

Figure 1. Diagramme comparatif des définitions du sepsis décrites par les conférences de consensus de 1991 et 2016 05

Figure 2. Altération des fonctions immunitaires au cours du sepsis 08

Figure 3. Implication des ROS dans la pathogenèse du sepsis.....13

Figure 4. Représentation schématique du stress oxydatif chez les patients septiques.....11

Figure 5. Répartition des patients septiques comparés au groupe contrôle dans quatre tranches d'âge.....25

Figure 6. Paramètres hématologiques chez les patients septiques comparés au groupe contrôle.....29

Figure 7. Paramètres d'altération rénale des patients atteints de sepsis comparés aux contrôles.....31

Figure 8. Paramètres d'atteinte hépatique des patients septiques comparés aux contrôles....32

Figure 9. Taux de peroxydes lipidiques Malondialdéhyde au niveau des sérums des patients septiques vs contrôle.....33

Figure 10. Taux de nitrites totaux (NO₂⁻) au niveau des sérums des patients septiques vs contrôle.....34

Figure 11. Taux de Glutathion "GSH" au niveau des sérums des patients septiques vs contrôle.....35

Tableaux des annexes :

Annexes 01 : Appareillage

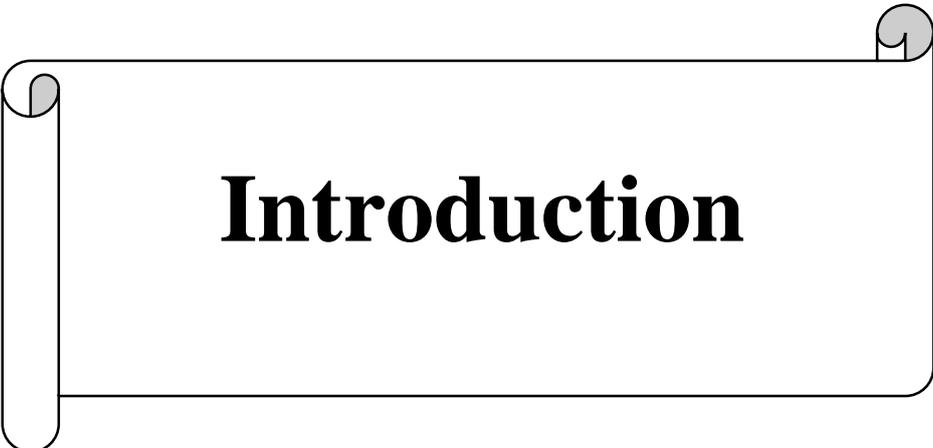
Annexes 02 : Tableau I Questionnaire des données.

Annexes 03 : Figure 1 : Résultat de dosage du taux de malondialdehyde (MDA) sur microplaque de 96 puits(Originale).

Annexes 04 : Figure 2 : Résultat de dosage du glutathion réduit sur microplaque de 96 puits (Originale).

Introduction	01
Chapitre I : Rappels Bibliographiques	
I. 1 Sepsis.....	04
Définition du sepsis.....	04
I. 2. Physiopathologie du sepsis	06
I. 2. 1. Réponse immunitaire au cours du sepsis.....	06
I. 2. 1. 1. Phase hyper-inflammatoire.....	06
I. 2. 1. 2. Phase Immunodépression	07
I. 3. Dysfonctionnement d'organes au cours du sepsis	08
I. 4. Stress oxydatif et sepsis	10
I. 4. 1. Définition du stress oxydatif	10
I. 4. 2. Systèmes pro-oxydant/Antioxydant	11
I. 4. 3. Rôle du Stress oxydant dans le sepsis	13
I. 5. Thérapies du sepsis.....	13
Chapitre II. Matériel et Méthodes	
II.1. Matériel	16
II. 1. 1. Matériel non Biologique	16
II. 1. 2. Matériel Biologique	16
II. 1. 3. Patients	16
II. 2. Méthodes	17
II. 2. 1. Prélèvements sanguins	17
II. 2. 2. Hémoculture	17
II. 2. 3. Etude de la réponse inflammatoire des patients septiques	18
II. 2. 3. 1. Dosage des paramètres Hématologiques (FNS)	18
II. 2. 3. 3. Dosage de la protéine C réactive (CRP) et de la procalcitonine (PCT)	19
II. 2. 4. Dosages des paramètres biochimiques	19
II. 2. 4. 1. Dosage de la créatinine et de l'urée/BUN plasmatiques	19
II. 2. 4. 2. Dosage de la bilirubine	20
II. 2. 5. Dosage des marqueurs de stress oxydatif	20
II. 2. 5. 1. Dosage des paramètres pro-oxydants	20
II.2. 5. 2. Dosage des paramètres anti-oxydants	22

II. 3. Etude statistique	22
Chapitre III. Résultats et Discussion	
III. 1. Résultats	24
1. Caractéristiques épidémiologiques des patients	24
2. Caractéristiques cliniques des patients	25
3. Caractéristiques microbiologiques et cliniques des patients Algériens	28
4. Réponse inflammatoire des patients septiques	29
5. Caractéristiques biochimiques et dysfonctionnement d'organes	30
6. Evaluation du stress oxydatif chez les patients septiques	33
6.1 Taux de MDA plasmatique, marqueur de peroxydation lipidique.....	33
6.2 Taux de NO plasmatique, marqueur de l'activité NO synthase.....	34
6.3 Taux de Glutathion plasmatique, GSH	34
III. 2. Discussion	36
Conclusion	39
Références bibliographiques	
Annexes	



Introduction

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

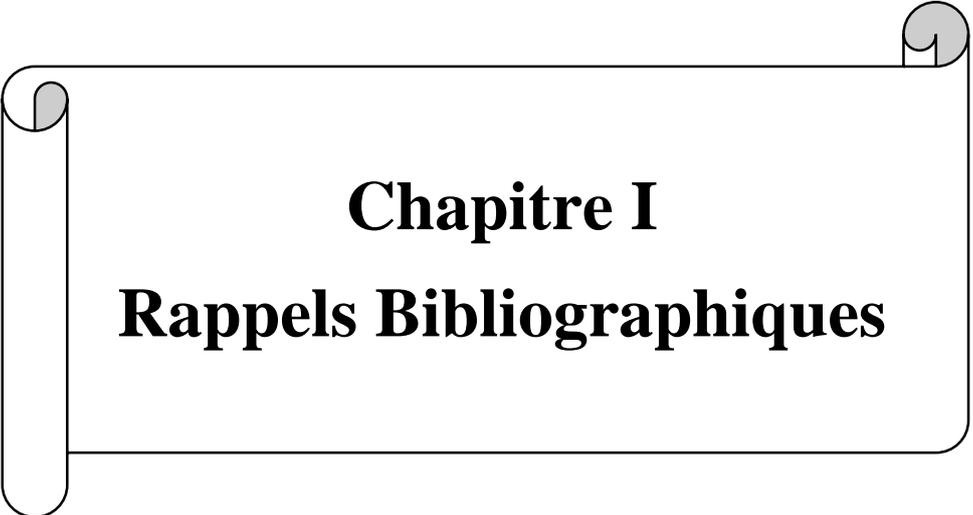
La mortalité élevée des patients revient à la complexité de la physiopathologie du sepsis et à l'absence d'un traitement efficace pour ce syndrome. Ceci constitue, à l'heure actuelle, un défi majeur pour les chercheurs afin de définir, diagnostiquer et cerner la physiopathologie de cette affection et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

Le sepsis est une réponse inflammatoire excessive et délétère pour plusieurs systèmes (redox immunitaire, coagulation, métabolique ...) et organes (poumon, cœur, foie, rein,...) (**Pang et al., 2019 ; Danielski et al., 2020**).

Le stress oxydatif en faveur d'une surproduction des espèces réactives de l'oxygène/nitrogène (ROS/RNS) (**Sid et al., 2013**). Les ROS/RNS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions cellulaires associées à diverses pathologies, comme le sepsis (**Moukette et al., 2015 ; Jadeja et al., 2017**).

Dans le cadre du projet de fin d'études, il nous a été proposé d'étudier l'implication du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis. Ainsi, nos objectifs étaient de :

- Déterminer les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, hématologiques, et microbiologiques des patients septiques Algériens.
- Evaluer la réponse immuno-inflammatoire systémique au cours du sepsis par dosage de l'FNS la CRP et la procalcitonine.
- Etudier les altérations et les dommages d'organes (hépatique, rénale, pulmonaire, etc.) induits par sepsis chez les patients septiques Algériens..
- Evaluer le statut redox sérique des patients Algériens septique par dosage des marqueurs de stress oxydatif, pro-oxydants (MDA et NO) et antioxydants (GSH).



Chapitre I
Rappels Bibliographiques

I. 1. Sepsis

Le sepsis constitue une préoccupation majeure de santé publique, avec un taux de mortalité supérieur à 40% (**Singer et al., 2016**). On estime que le sepsis affecte plus de 30 millions de personnes dans le monde chaque année, entraînant potentiellement 6 millions de décès (**Fleischmann et al., 2016**). En 2017, 48,9 millions de cas de sepsis ont été enregistré dans le monde et 11 millions de décès ont été signalé, ce qui représente une augmentation de l'indice annuel de 1,63%. La mortalité était plus élevée chez les hommes que chez les femmes (164,2/100 000 contre 134,1/100 000) (**Rudd et al., 2020**).

1. Définition du sepsis

Le terme sepsis vient du grec σήψη, qui signifie putréfaction ou putridité. Il a été décrit pour la première fois par le philosophe islamiste Ibn Sīnā comme une putréfaction du sang et des tissus avec fièvre (**Majno, 1991**).

Le sepsis est un syndrome physiopathologique complexe, défini comme un dysfonctionnement d'organe menaçant le pronostic vital qui est causé par une réponse inappropriée de l'hôte à l'infection. Sa physiopathologie complexe se caractérise par une réponse inflammatoire excessive, un stress oxydatif et une perturbation de multiples systèmes (système immunitaire, coagulation et métabolique,...etc), Ce sont des complications qui posent un défi supplémentaire aux chercheurs pour définir et développer correctement une thérapie efficace. (**Singer et al., 2016**).

La définition du sepsis a connu deux mises à jour en 2001 et en 2016, depuis la toute première élaborée en 1991 lors d'une conférence de consensus (**Bone et al., 1992 ; Levy et al., 2001 ; Singer et al., 2016**).

Le sepsis était défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) lié à une infection qui évoluait vers un sepsis sévère (sepsis et dysfonctionnement d'organes) puis vers un choc septique (sepsis et hypotension sévère). Le SRIS est démontré par au moins deux des 4 critères suivants : (i) température > 38 °C ou < 36 °C, (ii) fréquence cardiaque > 90 battements/min, (iii) fréquence respiratoire > 20 cycles/min ou artériel Pression de CO₂ <4,3 kPa, (iv) nombre de leucocytes >12 000 cellules/μL ou <4 000 cellules/μL ou présence d'au moins 10 % de granules immatures (**Singer et al., 2016**).

Selon la dernière mise à jour de 2016, l'association entre inflammation et infection et les critères du SIRS ont été abandonnés. Le sepsis est actuellement considérée comme un dysfonctionnement organique mortel causé par une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection (**Singer et al., 2016**). Elle est exacerbée dans le choc septique, caractérisé par des anomalies

circulatoires, cellulaires et métaboliques particulièrement profondes qui augmentent le risque de décès.

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*) (**Tableau I, annexe 1**). Le choc septique est identifié, en plus des critères cliniques de sepsis, par une exigence de vasopresseur pour maintenir une pression artérielle supérieure ou égale à 65 mm Hg et un taux de lactate sérique supérieur à 2 mmoles/L (>18 mg/dL) (**Singer et al., 2016**).

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

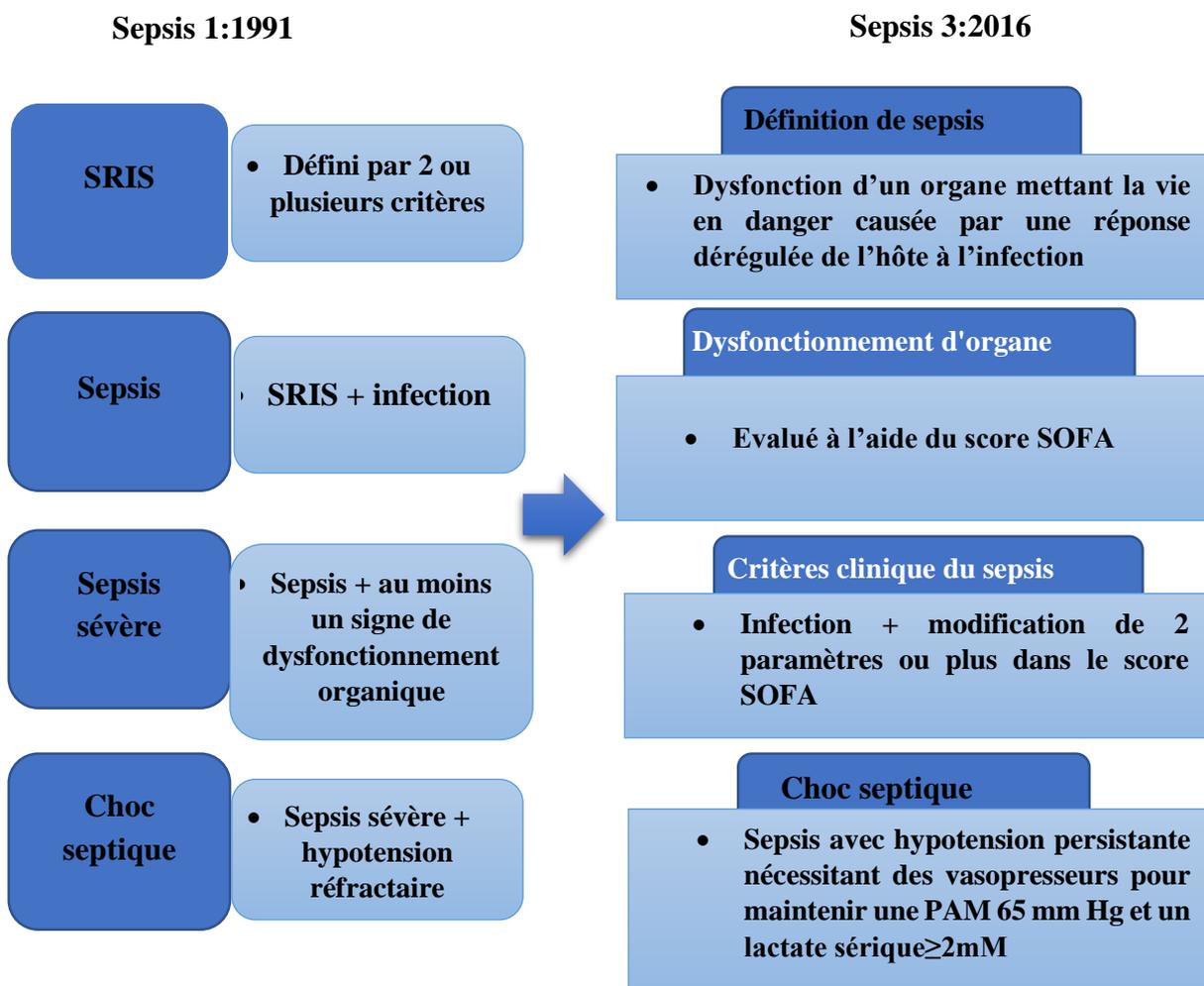


Figure 1. Diagramme comparatif des définitions du sepsis décrites par les conférences de consensus de 1991 et 2016 adaptée de (**Napolitano, 2018**).

2. Physiopathologie du sepsis

Au cours du sepsis, les réponses immunitaire et inflammatoire sont excessivement activées par les agents infectieux et maintenues par des stimuli à la fois infectieux et non infectieux (Delile, 2017).

En plus de provoquer une insuffisance viscérale, il existe un dysfonctionnement endothélial et un apport insuffisant d'oxygène aux tissus (hypoxie). Elle est secondaire à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) avec thrombose microvasculaire et mort éventuelle. (Bougle et Annane, 2007 ; Tesniere et al., 2008 ; Cimolai et al., 2015).

2-1-Réponse immunitaire au cours du sepsis

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

2-2.1. Phases hyper-inflammatoires

Au cours du syndrome septique, le système immunitaire inné reconnaît par les récepteurs « PRR » (*Patterns Recognition Receptors*) des motifs hautement conservés spécifiques des pathogènes ou « PAMPs » (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou des motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires ou « DAMPs » (*Alarmines, Damage-Associated Molecular Patterns*). Il résulte de cette interaction une réaction inflammatoire qui débute par une phase pro-inflammatoire contrebalancée par une phase anti-inflammatoire excessive, maintenue et non équilibrée.

L'activation des PRR par les PAMPs/DAMPs initie une signalisation intracellulaire qui résulte en une activation de différents facteurs de transcription dont le NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*). Ce dernier régule l'expression de médiateurs pro/anti-inflammatoires, dont notamment les cytokines : l'IL-1 β , le TNF α , IL 12, IL 18, l'INF γ et IL10 ; les chimiokines : IL-8 ; des molécules d'adhérence : ICAM-I, VCAM-1 ; des enzymes : iNOS, Cox-2, SOD et les facteurs de coagulation : facteur tissulaire. Ces médiateurs vont induire, d'une part, la production de nouveaux médiateurs inflammatoires et contribuer, d'autre part, au développement et au maintien des réponses immunitaires innée et adaptative (Figure 2) (Grimaldi, 2014).

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

Les cytokines et chimiokines libérées activent les cellules endothéliales qui expriment des molécules d'adhésion à leur surface. Ainsi, les neutrophiles circulants peuvent infiltrer les tissus

et par la suite recruter et activer des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques. Ces derniers sont responsables de la préparation des antigènes, ils sont impliqués dans l'activation la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B (**Grimaldi, 2014**).

Les lymphocytes T effecteurs migrent vers le site infectieux et participent, de par leurs activités helper et cytotoxiques à l'amplification de la réponse immune et à l'élimination des pathogènes et des cellules infectées (**Figure 2**) (**Grimaldi, 2014**).

Les réponses inflammatoires caractéristiques du sepsis comprennent également l'activation du système du complément, du système de coagulation et de l'endothélium vasculaire, dont les fonctions sont étroitement interconnectées et trans-régulées (**Van der Poll et al., 2017**).

Une forte activation de ces derniers contribue au dysfonctionnement endothélial, au défaut d'apport en oxygène dans les tissus (hypoxie), la formation de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), aux défaillances d'organes et éventuellement à la mort (**Bougle et Annane, 2007 ; Tesniere et al., 2008 ; Cimolai et al., 2015**).

Plusieurs travaux de recherche ont démontré le rôle clé du NF- κ B dans la pathogenèse, le dysfonctionnement d'organe et la létalité au cours du sepsis. Il fut démontré que le niveau d'activation du NF- κ B est positivement corrélée à la gravité du sepsis montrant une augmentation de son activité chez les patients septiques décédés par rapport aux survivants (**Arnalich et al., 2000 ; Fan et al., 2001**).

2-2.2. Phases d'immunodépression

La deuxième phase de la réponse de l'hôte dans le syndrome septique est la phase d'immunosuppression. Il s'agit d'une immunosuppression caractérisée par une altération des cellules immunitaires innées et adaptatives (apoptose, altérations fonctionnelles et modifications phénotypiques), qui ne pourront plus combattre l'infection. Des études indiquent que le sepsis est associé à une forte déplétion des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et B et des cellules dendritiques (DC) qui subissent une apoptose ainsi qu'une reprogrammation des cellules présentatrice de l'antigène (monocytes/macrophages) (**Figure 2**) (**Boomer et al., 2011 ; et al., 2013**).

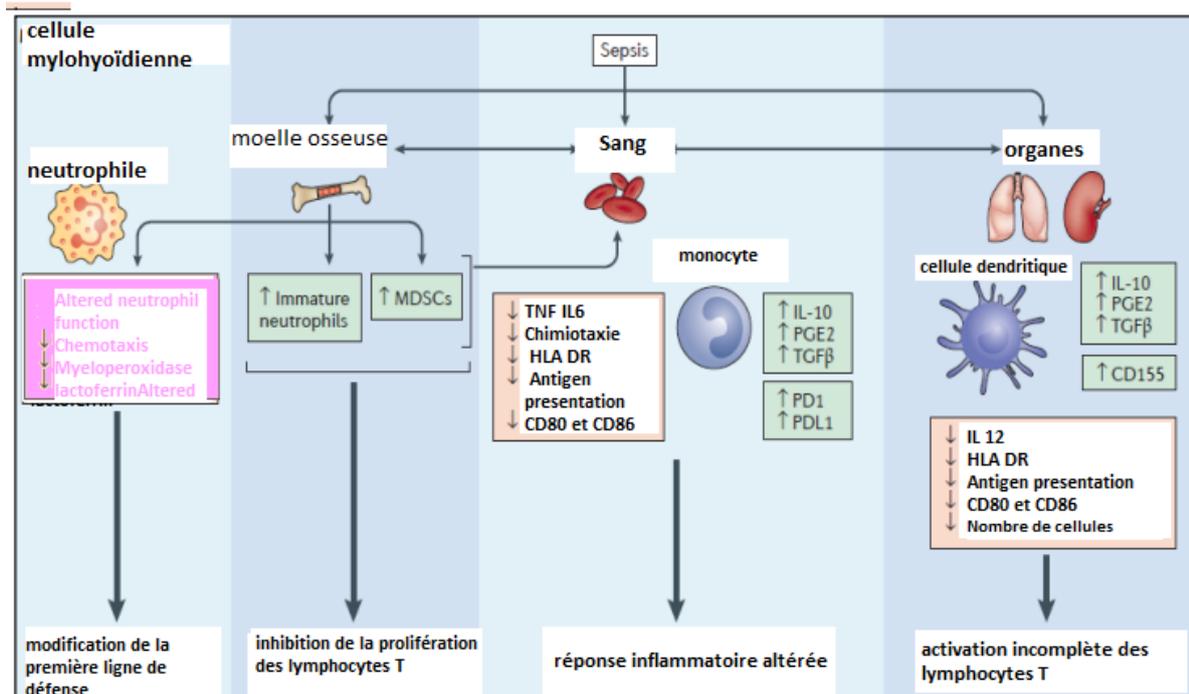


Figure 2. Altération des fonctions immunitaires au cours du sepsis (Venet et Monneret., 2017). La réponse immunitaire innée est modifiée après sepsis chez les patients ainsi que dans les modèles murins. Ces altérations immunitaires se produisent non seulement dans le sang, mais également dans la moelle osseuse et dans les organes distants du site initial de l'infection. Ces altérations incluent (i) une libération excessive, par la moelle osseuse, de neutrophiles immatures et de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (ii) des altérations fonctionnelles des neutrophiles matures, (iii) des altérations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques, (iv) ces altérations concernent des fonctions effectrices diminuées, la production accrue de médiateurs anti-inflammatoires et une augmentation de l'expression des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires. Ces modifications sont délétères pour l'hôte, elles entraînent une diminution de la réponse de première intention contre l'infection et une modification des fonctions des lymphocytes T.

3. Dysfonctionnement d'organes au cours du sepsis

L'une des principales causes de la mortalité chez les patients atteints de sepsis est le dysfonctionnement organique (Williams et al., 2017). La littérature suggère qu'environ 33 % des patients atteints de sepsis ont au moins un organe défaillant (insuffisance rénale pulmonaire, hépatique) (Tableau III, annexe 6).

✓ Défaillance pulmonaire au cours du sepsis

Le poumon est un organe vital assurant les échanges gazeux chez les vertébrés, ce qui l'expose à des agents pathogènes aériens, des allergènes et à d'autres substances toxiques qui peuvent être à l'origine d'infections ou d'inflammation pulmonaires (Kumar, 2020).

Il sert également d'organe immunitaire crucial, qui abrite à la fois des cellules immunitaires innées et adaptatives pour induire une puissante réponse immunitaire (**Kumar, 2020**).

Ainsi, le poumon est l'organe le plus vulnérable lors du syndrome septique. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme sévère de lésions pulmonaires aiguës (ALI *Acute Lung Injury*), survient chez 25% à 50% des patients atteints de sepsis (**Sevransky et al., 2009**). Le SDRA/ALI est l'un des facteurs pronostiques les plus critiques de mortalité chez les patients atteints de sepsis.

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

Le SDRA/ALI est aussi associé à de graves lésions tissulaires et, dans les cas graves, des lésions pulmonaires irréversibles pouvant entraîner la mort (**Bernard, 2017 ; Kumar et al., 2020**).

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

✓ *Défaillance hépatique e au cours du sepsis*

Le foie joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme (**Woźnica et al., 2018**). Lors d'infections systémiques, il régule les défenses immunitaires via la clairance bactérienne, la production de protéines de phase aiguë (APP) et de cytokines, et l'adaptation métabolique à l'inflammation (**Sun et al., 2020**).

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

comme une lésion irréversible des hépatocytes. L'insuffisance hépatique est définie comme des dommages sévères et durables du foie et une perte de fonction dans 80 à 90 % des cellules hépatiques (Yan *et al.*, 2014).

Les incidences de dysfonctionnement hépatique et d'insuffisance hépatique associés au sepsis varient de 34 % à 46 % et de 1,3 % à 22 %, respectivement, chez tous les patients atteints de sepsis (Yan *et al.*, 2014). L'incidence moyenne de dysfonctionnement hépatique chez les patients atteints de sepsis est de 39,9 %, inférieure et presque identique à l'incidence de dysfonctionnement cardiovasculaire. Une insuffisance hépatique survient chez 8,5% des patients atteints de sepsis (Yan *et al.*, 2014).

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

✓ *Défaillance cardiovasculaire au cours du sepsis*

La défaillance cardio-circulatoire survient dans 40 % des cas de sepsis, et fait passer la mortalité de 20-30 % dans le sepsis sans dysfonction cardiovasculaire à 40-70 % dans le choc septique. Il s'agit d'une complication fréquente du sepsis et du sepsis sévère. La dépression cardiaque pendant le sepsis est multifactorielle ; le NO, les cytokines, les endotoxines, le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose comptent parmi les plus importants facteurs (Genaud *et al.*, 2001 ; Greer, 2015).

4. Stress oxydatif et sepsis

4.1. Définition de stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants en faveur d'une surproduction des espèces réactives de l'oxygène/nitrogène (ROS/RNS) (Sid *et al.*, 2013). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008). Les ROS/RNS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions cellulaires (Moukette *et al.*, 2015 ; Jadeja *et al.*, 2017). La génération excessive de ROS/RNS épuise les antioxydants endogènes, qui par la suite, ne parviennent pas à piéger

tous les ROS conduisant à des lésions cellulaires associées à diverses pathologies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, infectieuses et neurodégénératives (Jadeja *et al.*, 2017)

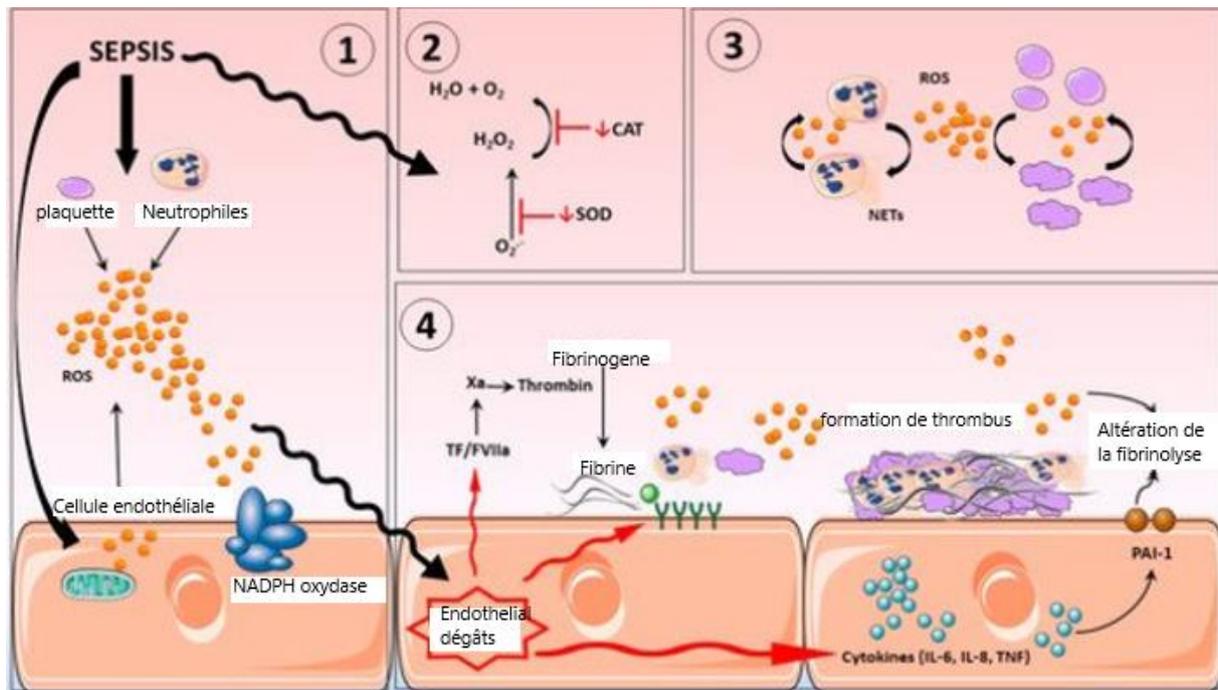


Figure 3. Implication des ROS dans la pathogenèse du sepsis (Gando *et al.*, 2013).

(1). Le sepsis induit la libération de ROS par les neutrophiles, les cellules endothéliales et les plaquettes. La majorité de la production excessive de ROS est générée par les mitochondries et la NADPH oxydase présentes dans les cellules endothéliales, les plaquettes et les neutrophiles. (2). La surproduction de ROS entraîne l'épuisement des systèmes antioxydants endogènes telles que : la SOD et la catalase. (3). La libération de ROS à partir de cellules inflammatoires activées telles que les neutrophiles accentue davantage les réponses inflammatoires, conduisant à une production supplémentaire de ROS ce qui maintient les réponses inflammatoires et la production excessive des ROS. (4). Des dommages de l'endothélium vasculaire augmentent la production de cytokines inflammatoires via les réponses au stress médiées par les ROS et activent le système de coagulation et l'expression des molécules d'adhésion, ce qui entraîne une élévation du dépôt de fibrine, une altération de la fibrinolyse et, par conséquent, la formation de thrombus. ROS : espèces réactives de l'oxygène. CAT : catalase. SOD : superoxyde dismutase. TF : facteur tissulaire. NETs : *Neutrophil extracellular traps* ou pièges extracellulaires des neutrophiles.

4.2. Systèmes pro-oxydant/antioxydant

A l'état quiescent, l'homéostasie redox est maintenue grâce à un équilibre de la balance des systèmes antioxydants/ pro-oxydants. Cet équilibre permet de contrôler la production de ROS/RNS à des doses raisonnables, ce qui est essentiel pour de nombreuses fonctions

physiologiques telles que la signalisation cellulaire, la mort cellulaire programmée et la défense de l'organisme (Ye *et al.*, 2015 ; Belaïch et Boujraf ., 2016).

Cependant cette homéostasie redox peut être rompue, soit par une production excessive de ROS/RNS (pro-oxydantes) soit par une diminution des capacités anti-oxydantes. On parle alors de stress oxydatif (Migdal et Serres., 2011).

Les ROS/RNS sont générés par de sources endogènes et exogènes à partir de l'oxygène (O_2) et de l'azote (N). Ainsi, les principales sources endogènes des ROS/RNS sont la chaîne respiratoire mitochondriale, la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase et la NOSynthase. Les ROS/RNA exogènes résultent de la pollution, de la fumée de cigarette, de l'alcool, de certains Médicaments, des solvants industriels, et les radiations. (Hrycay et Bandiera., 2015).

L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ constitue la première espèce réactive résultant d'une réaction réduction électronique de l'oxygène. La dégradation de ces radicaux superoxydes $O_2^{\bullet-}$ est contrôlée par des systèmes de défense antioxydants, qui s'adaptent au taux de radicaux présents.

Ainsi, la production des radicaux superoxydes est régulée par des métalloenzymes, les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent leur dismutation en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas en soi un radical mais une molécule, il est lui-même toxique et capable de donner naissance, *via* des réactions de type « réaction de Fenton » à la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, le radical hydroxyle $\bullet OH$. La quantité de peroxyde d'hydrogène est régulée par l'enzyme héminique, la catalase (CAT) et par le glutathion peroxydase (GPx) qui catalysent sa réduction par le glutathion (GSH) en eau et oxygène (Bouguirne, 2012 ; Shah *et al.*, 2014).

Les RNS englobent principalement le radical monoxyde d'azote ($\bullet NO$) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$). Le $\bullet NO$ est synthétisé par la NO synthase à partir de la L-arginine, en présence d'oxygène. Le $\bullet NO$ forme avec l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ un puissant oxydant, le peroxydinitrite ($ONOO^-$) (Figure 4) (Shah *et al.*, 2014 ; Phaniendra *et al.*, 2015).

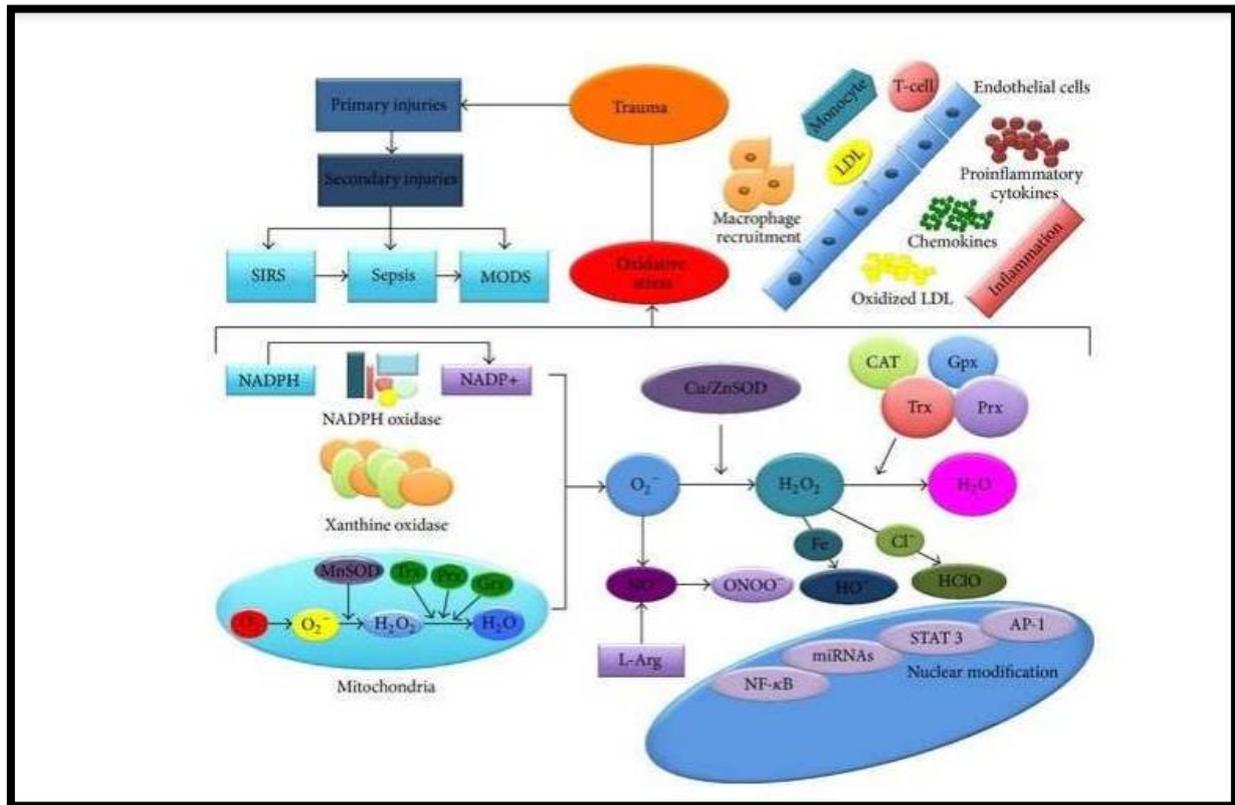


Figure 4. Représentation schématique du stress oxydatif chez les patients septiques.

4.3. Rôle du stress oxydant dans le sepsis

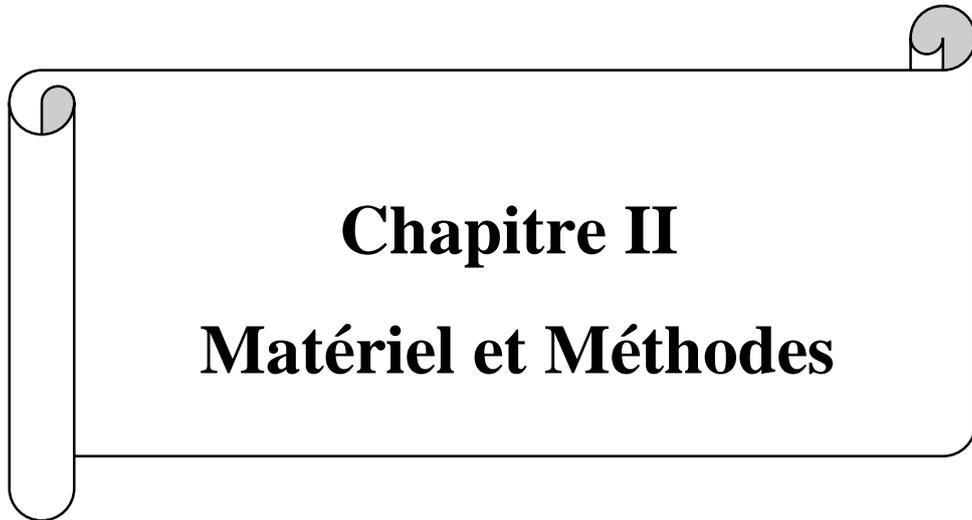
Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont décrit le stress oxydatif chez les patients atteints de sepsis, avec des preuves de production de ROS/RNS associée à des dommages d'organes, et une déplétion antioxydante (**Spanidis et al., 2015; Yamaguchi et al., 2018; Pahlavani et al., 2019**). Le niveau de stress oxydatif semble corrélé avec la sévérité de sepsis. Il est significativement plus élevé chez les patients atteints de SRIS avec défaillances d'organes que chez ceux n'ayant pas de défaillances d'organes et pourrait contribuer à la survenue de multiples défaillances d'organes (**Motoyama et al., 2003; Huet et al., 2007**). De plus, le stress oxydatif semble jouer un rôle dans le maintien de la réponse inflammatoire systémique *via* l'activation des réponses inflammatoires par les voies redox (**Arnalich et al., 2000**).

5. Thérapies du sepsis

Depuis plus de vingt ans, malgré les progrès considérables accomplis dans la compréhension de la physiopathologie du sepsis, aucune nouvelle thérapie n'a vu le jour. Le traitement de sepsis repose essentiellement sur la neutralisation des germes grâce à l'antibiothérapie, l'éradication du foyer infectieux responsable de la dissémination, un

traitement symptomatique et le maintien des fonctions vitales grâce aux supports nécessaires **(Chrétien, 2018)**.

Le sepsis nécessite une prise en charge hospitalière qui repose sur l'association d'antibiotiques et un traitement de la porte d'entrée si elle est identifiée (plaie, ablation du corps étranger en cause, chirurgie...). Dans un premier temps, des antibiotiques à large spectre, c'est-à-dire actifs sur de nombreux types de bactéries, sont donnés. Une fois le type d'infection identifié sur les prélèvements, les antibiotiques peuvent être modifiés pour une efficacité plus ciblée. En cas de sepsis sévère, des perfusions pour faire remonter la tension ainsi qu'une prise en charge si besoin des défaillances d'organes sont nécessaires. Dans le choc septique, en plus des médicaments appelés drogues vasoactives, comme la dopamine, la dobutamine, l'adrénaline ou la noradrénaline, sont également apportés par perfusion **(Chrétien, 2018)**.



Chapitre II
Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du service des urgences médico-chirurgicales (UMC) du CHU ISSAD HASSANI BENI MESSOUS d'Alger, et au niveau du laboratoire de pharmacologie cellulaire et signalisation de la FSB-USTHB durant une période de 3 mois du 06 Mars au 09 juin 2022.

Notre travail a porté sur :

- ✓ l'étude des caractéristiques épidémiologiques, cliniques, hématologiques, biochimiques et microbiologiques des patients septiques Algériens
- ✓ l'étude de l'implication du stress oxydatif dans la pathogenèse du sepsis chez des patients Algériens.

II. Matériel

II. 1. Matériel non biologique

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

II.2. Matériel biologique

- Sang périphérique.

III.3. Patients

A. Sélection des patients

L'étude a été menée sur un total de 22 sujets, classés comme :

- 8 **Contrôles sains** dont 5 hommes et 3 femmes âgés de 45 à 73 ans ;
- 14 **Patients septiques** dont 9 hommes et 5 femmes âgés de 35 à 84 ans admis en unité de soins intensif du service UMC du CHU BENI MESSOUS et n'ayant subi aucun traitement (Antibiothérapie, Corticothérapie, ...) ont été inclus dans notre étude. Les patients ayant subi un traitement avant le prélèvement sanguin ont été exclus de cette étude.

Les données épidémiologiques (âge, sexe), cliniques (Température, Fréquence cardiaque et respiratoire, la Pression Artérielle Moyenne PAM, la Saturation en oxygène veineux central ScvO₂, l'indice de Kirby), Antécédents personnels, organes défaillants, survie, score SOFA (dysfonctionnement d'organes), Score Glasgow (état de conscience), Score APACHE II (sévérité de maladie et mortalité), microbiologique (hémoculture), Hématologique (FNS, CRP et procalcitonine) et biochimique (dysfonctionnement d'organes : créatinine, urée, ALAT

ASAT, Bilirubine ; Altération métabolique : Glycémie, Lactatémie) ont été récolte à partir d'un questionnaire (**Tableau 2, Annexe 3**) communiqué aux médecins soignants. Toutes ces données ont été colligées dans une base de données Excel.

II. 2. Méthodes

II. 2. 1. Prélèvements sanguins

Des prélèvements sanguins par ponction veineuse ou à partir d'une voie veineuse périphérique, et dans des conditions d'asepsie très rigoureuses ont été réalisés sur :

-Tube héparine afin de doser les paramètres biochimiques et les paramètres de stress oxydatif
Le sang a été centrifugé à 3000 g pendant 10 min à 4°C et le sérum a été récupéré puis conservé à -40°C jusqu'à utilisation.

- Tube EDTA afin de déterminer la formule d'énumération sanguine (FNS).

- 2 types de flacons d'hémoculture ont été utilisés : flacons classiques et flacons BACT/ALERT®.

II. 2. 2. Hémoculture

L'hémoculture permet de mettre en évidence le passage de microorganismes dans le sang. Permet donc de poser un diagnostic de septicémie, d'identifier le(s) germe(s) responsable(s) et de réaliser un antibiogramme pour orienter le médecin dans la prescription d'un traitement antibiotique efficace (**M Odou, 2017**).

Il est classique d'associer deux flacons pour un même prélèvement, un flacon aérobie et un flacon anaérobie.

Le milieu d'hémoculture est un bouillon nutritif conditionné en flacon. La composition du milieu favorise le développement de la plupart des bactéries rencontrées en pathologie humaine (germes aérobies, anaérobies et microaérophile). Il contient le polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) à une concentration de 0,03 % qui joue le rôle d'anticoagulant, neutralise l'activité bactéricide du sérum humain et inhibe l'action de certains antibiotiques (streptomycine kanamycine, gentamicine et polymixine B).

Après ensemencement du sang dans les flacons d'hémoculture (1 flacon classique et 1 flacon BACT/ALERT®), les flacons, accompagnés d'une fiche de renseignements cliniques, sont

rapidement acheminé au laboratoire de bactériologie, où ils sont immédiatement incubés à 37°C.

Les flacons classiques sont incubés à l'étuve pendant 10 jours au maximum alors que ceux de l'automate **BACT/ALERT® 3D** sont subcultivés après une alerte de l'appareil indiquant une culture positive (7 jours au maximum).

L'incubation à l'étuve est systématiquement interrompue par des subcultures sur Gélose au sang cuit (GSC) en J1 (1^{er} jour), J3 (3^{ème} jour) et J 10(10^{ème} jour) avant de rendre un résultat négatif.

Après incubations, une goutte des milieux positifs estensemencée à l'aide d'une pipette pasteur sur milieu GSC, un milieu solide riche pour les germes exigeants. Les boîtes de pétri destinées à l'isolement des germes aérobies sont incubées à 37°C pendant 24h à l'étuve alors que les celles des germes aéro-anaérobies facultatifs sont incubés à 37°C à l'étuve dans une jarre à bougie sous 3 à 5 % de CO₂ et saturée d'humidité. Dans le cas d'une suspicion de bactéries anaérobies strictes une jarre spécifique fermée hermétiquement créant l'anaérobiose est utilisée.

II. 2. 3. Etude de la réponse inflammatoire des patients septiques

La réponse inflammatoire des patients septiques a été estimée par mesure des paramètres inflammatoires parmi : le nombre de leucocytes, le taux de CRP et de procalcitonine (PCT).

II. 2. 3. 1. Dosage des paramètres hématologiques (FNS)

L'hémogramme ou numération-formule sanguine (NFS) est un examen hématologique qui permet d'obtenir une évaluation quantitative (numération) et qualitative (formule) des éléments figurés du sang : les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes (**Cloutier et al., 2014**). Il est souvent requis devant une suspicion d'anémie, une altération de l'état général, en cas d'hémorragie, de thromboses, d'infection persistante ou de cancer. Il est aussi prescrit dans le cadre de la surveillance d'un traitement médicamenteux (**Berthélémy, 2014**).

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

II.2.3.2. Dosage de la protéine c réactive (CRP) et de la procalcitonine (PCT)

La protéine C réactive (CRP) est une protéine de phase aiguë synthétisée principalement par le foie et joue un rôle important dans les réactions inflammatoires par activation du complément. Elle est utilisée comme marqueur biologique d'infection ou d'inflammation.

La procalcitonine (PCT) est une pro-hormone stockée, après sa synthèse, dans des granules de sécrétion dans tous les types cellulaires de l'organisme. Elle est libérée des granules par un stimulus pro-inflammatoire notamment : les cytokines IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , et les bactéries. Elle est donc couramment utilisée dans le diagnostic d'une infection aiguë et à définir la durée du traitement antimicrobien (**Westwood et al., 2015**).

Ces paramètres ont été mesurés par kits commerciaux.

II. 2. 4. Dosage des paramètres biochimiques

Le sepsis est caractérisé par un dysfonctionnement d'organes (rein, foie, poumons, ...). Afin d'estimer la défaillance d'organes et la sévérité du sepsis nous avons ciblé les paramètres de dysfonctionnement rénale (créatinine, Urée), les paramètres de dysfonctionnement hépatique (Bilirubine, ALAT/ASAT).

De profondes modifications du métabolisme cellulaire (glucidique, lipidique et protéique) sont aussi induites par sepsis. Les conséquences du sepsis sur les métabolismes glucidiques sont traduites par une hyperglycémie associée à un maintien de l'oxydation du glucose et une élévation nette de son utilisation non oxydative conduisant ainsi à une hyperlactatémie (**Orban et al., 2009**).

II. 2. 4. 1. Dosage de la créatinine et de l'urée plasmatiques

La créatinine et l'urée sont des marqueurs utilisés en pratique quotidienne pour évaluer la fonction rénale, en particulier la filtration glomérulaire (**Delanaye et al., 2010 ; Fernandes et al., 2018**). La créatinine est le produit final du métabolisme de la créatine chez les mammifères, qui est effectué par les muscles squelettiques pour libérer de l'énergie. Le rein étant la seule voie d'élimination de la créatinine (**Huang et al., 2016 ; Fernandes et al., 2018**).

L'urée est synthétisée par le foie dans le cycle de l'urée à partir de l'ammoniac. Elle nous indique l'état de perfusion du rein, et utilisée comme indicateurs d'une altération de la fonction excrétrice du rein et/ou l'augmentation du catabolisme et l'équilibre électrolytique.

Le dosage de la créatinine et de l'urée dans notre étude a été réalisé par automate.

II. 2. 4. 2. Dosage de la bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Ce composé liposoluble est capable de piéger les radicaux peroxyde, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Algeciras-Schimmich *et al.*, 2007).

Le dosage de la bilirubine totale et de la bilirubine conjuguée (directe) permet de mettre en évidence et d'effectuer le suivi des maladies hépato-biliaires.

Le dosage de la bilirubine totale et directe (conjuguée) a été réalisé par automate.

D'autres marqueurs de dysfonctionnement hépatiques telles que les transaminases ALAT/GPT (Alanine-Amino-Transférase/GlutamoPyruvate Transférase) et ASAT/GOT (Aspartate-Amino-Transférase/GlutamoOxaloacétate Transférase), marqueurs de lésion du parenchyme hépatique, ont été également dosés dans le sérum des patients par automate.

Le dosage de la glycémie et de la lactatémie, marqueur de désordres de métabolisme glucidique, dans notre étude a été réalisé par automate.

II. 2. 5. Dosage des marqueurs de stress oxydatif

Afin d'étudier le rôle du stress oxydatif dans la pathogenèse du sepsis nous avons dosé quelques marqueurs du stress oxydatif dans le sérum des patients parmi :

- Des marqueurs pro-oxydants : le malondialdéhyde (MDA, marqueur de la peroxydation lipidique), et le NO (marqueur de l'activité NO synthase).
- Le marqueur antioxydant : le glutathion réduit (GSH, du système antioxydant non enzymatique).

II. 2. 5. 1. Dosage des paramètres pro-oxydants

- **Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)**

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

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

La réaction est arrêtée par un refroidissement rapide à 0°C et une centrifugation à 3000g pendant 10 min et à 4°C. La densité optique est mesurée à 532 nm et les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles/mg}$ de protéine.

- **Dosage du taux de monoxyde d'azote (NO)**

L'oxyde nitrique ou le monoxyde d'azote (NO), est un radical libre ubiquitaire. Il est synthétisé à partir de la L-arginine par les NO synthases (NOS). Le NO est un gaz instable qui est rapidement métabolisé en nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-). Ainsi, ce dosage est réalisé de manière indirecte par la détermination des taux de nitrites (NO_2^-) et des nitrates (NO_3^-), deux produits de dégradation oxydative du NO après une réaction rapide avec l'oxygène ou l'anion superoxyde (**Grand et al.,2001**).

Le dosage des métabolites de NO a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Griess (1879), basée sur une réaction de diazotation en deux étapes :

Les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une fonction amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque (rose) qui absorbe à 540 nm (**Sun et al., 2003**).

La réaction de Griess permet de mesurer uniquement les taux de nitrites. Les nitrates sont préalablement réduits en nitrites pour être quantifiés. La concentration ainsi mesurée représente la somme des nitrites et des nitrates (**Grand et al., 2001**).

La réduction des nitrates a été réalisée par trichlorure de vanadium (VCl_3 , agent réducteur) sur des sérum préalablement déprotéinisés (**Sun et al., 2003**).

70 μL D'échantillon et 70 μL de méthanol sont mélangés puis vortexés pendant 5 min. Le mélange est ensuite centrifugé à 9000g pendant 10 minutes/4°C. Dans une microplaque de 96 puits, 50 μL de surnagent sont ajoutés à 50 μL de réducteur VCl_3 puis 50 μL de Griess. La plaque est incubée à 37 °C pendant 45 minutes à labri de la lumière et la lecture est effectuée à 540 nm.

Les concentrations en nitrites sont déterminées à l'aide d'un courbe étalon établi au préalable avec une solution de NaNO₂ 100µM.

La concentration en NO sérique est exprimée en µM de nitrites/ mg de protéines.

II. 2. 5. 2 -Dosage des paramètres anti-oxydants

- **Dosage du taux de Glutathion réduit (GSH)**

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

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

3- Dosage des protéines

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

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

II.6. Etude statistique

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

Le test t de Student avec correction de Welch est utilisé pour comparer les différences entre les groupes de patients contrôles et septiques, avec $p < 0,05$ étant considéré comme statistiquement significatif.



Chapitre III. Résultats et Discussion

III. 1. Résultats

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'une recherche fondamentale des mécanismes impliqués dans la pathogénèse du sepsis. L'interprétation et la discussion des résultats se feront comme suit :

- Nous décrirons, d'abord, les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, hématologiques et biochimiques des patients Algériens atteints de sepsis.
- Ensuite nous déterminerons l'implication du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire dans la pathogénèse du sepsis des patients Algériens atteints de sepsis.

1. Caractéristiques épidémiologiques des patients

Les caractéristiques épidémiologiques (Age et sexe- ratio) ont été colligées après une analyse rigoureuse de dossiers des patients atteints de sepsis ou de choc septique. Ils sont représentés dans les tableaux I et II et la figure 5.

Tableau I. Caractéristiques épidémiologiques des patients septiques comparés aux contrôles.

Groupes / Paramètres	Contrôle Sains (n=8)	Sepsis (n=14)
Age (min-max ans)	58±3.02 (45-73)	63.7±6.7 (35-84)
Age Médian	58	63
Sexe ratio H/F	5/3	9/5

H/F : Homme/femme.

Tableau II : Répartition des patients selon les tranches d'âge.

Age%(cas) / Groupes	[20-39]	[40-59]	[60-79]	[80-89]	Totale
Contrôle Sains	0% (0)	62.5% (5)	37.5%(3)	0%(0)	8
Sepsis	7.14%(1)	35.71%(5)	35.71% (5)	21.43% (3)	14

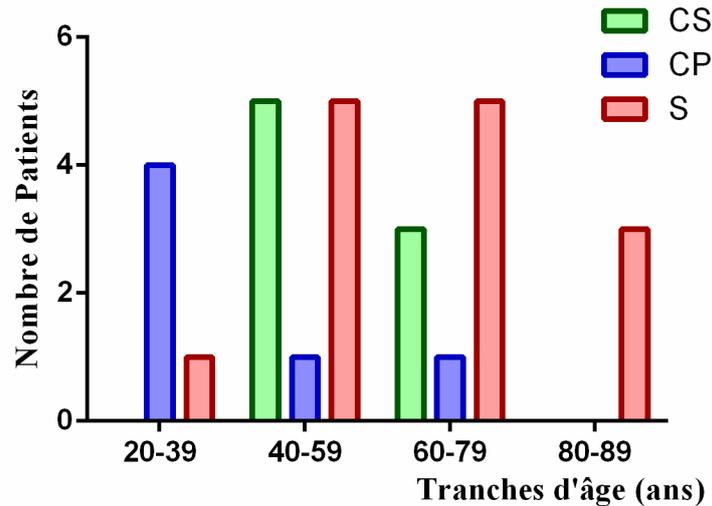


Figure 5. Répartition des patients septiques comparés au groupe contrôle dans quatre tranches d'âge.

Les résultats épidémiologiques montrent la moyenne d'âge des patients septiques Algériens est de 63.7 ± 6.7 ans, avec une prédominance du sepsis chez les patients âgés de plus de 40 ans. Nos résultats montrent également une prédominance du sepsis chez les patients de sexe masculin avec sexe ratio H/F de 9/5. Nos résultats sont accord avec les résultats de **Kumar et al.** (2018), **Kumar et al.** (2019), **Qiu et al.** (2019), et **Acuña-Fernández et al.** (2020). Néanmoins, les résultats de **Qiu et al.** (2019) n'ont pas montré de prédominance masculine (sexe ratio 13/12).

2. Caractéristiques cliniques des patients

Les caractéristiques cliniques (Température, fréquences cardiaque et respiratoire, pression artérielle moyenne et les scores Glasgow, APACHE II et SOFA) des patients Algériens sont représentés dans le tableau III.

Tableau III. Caractéristiques cliniques des patients septiques comparés aux contrôles.

Groupes Paramètres	Contrôle Sains (n=8)	Sepsis (n=14)
Température (°C)	37.03 ± 0.03	37.4 ± 0.5
FR (rpm)	16.51 ± 0.001	23.4 ± 2.01***
FC (bpm)	72.36 ± 6.50	107.4 ± 6.50***
PAS (mm Hg)	120.50 ± 5.30	108.4 ± 10*
PAD (mm Hg)	70.44 ± 3.60	62.9 ± 6.2
PAM	103.81±4.73	93.1 ± 8.6
ScVO2(%)	--	91.6 ± 1.8
Kirby's index (PaO2/FiO2)	--	328.1 ± 56.6
SOFA	--	8,5 ± 1.9
APACHE II	--	20,8 ±3.7
Glasgow	15	11,8 ± 1.7(6-15)**

T°C>38°→ Hyperthermie ; 36.1°<T°C<37.8°→Température normale ; T°C<35°→ Hypothermie. **FR** : Fréquence respiratoire ; **FC** : Fréquence cardiaque ; **rpm** : respiration/min ; **bpm** : battements/min, **PaO₂** : pression partielle d'oxygène ; **FiO₂** : La fraction inspirée en Oxygène, **ScvO₂** : Saturation en oxygène veineux central ; **PAS** : pression artérielle systolique ; **PAD** : pression artérielle diastolique ; **PAM** : pression artérielle moyenne ; **APACHE II** : *acute physiology and chronic health evaluation II* ; **SOFA**: *sequential organ failure assessment* ; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs contrôle.

Glasgow coma : **GC** : 13-15→ patient conscient, **GC** : 8-12→ patient avec un traumatisme crânien, **GC**≤7 : patient comateux.

Kirby's index (PaO₂/FiO₂) : 300-500→ valeur normale ; **Kirby's index (PaO₂/FiO₂)** <300 : lésion pulmonaire aiguë (ALI, acute lung injury) ; **Kirby's index (PaO₂/FiO₂)** <200 : SDRA (syndrome de détresse respiratoire aiguë).

Les résultats cliniques montrent que la majorité des patients Algériens septiques présentaient les symptômes caractéristiques de sepsis avec une hyperthermie (39.1 ± 0.3°C) observés chez 35,7% des cas (5cas) alors que 50% des cas (7cas) présentaient une Température normale (37.1 ± 0.2°C). Cependant si dans la majorité des cas de sepsis on observe une hyperthermie, il existe dans environ 10 à 20 % des cas une réponse hypothermique à l'infection (**Young et Bellomo., 2014**). Nos données ont montré que parmi 14.3% de nos patients étaient en hypothermie (34.1 ± 0.1°C) (**Tableau III**).

La fièvre est un symptôme courant des maladies infectieuses et du sepsis. Elle résulte de la réponse inflammatoire excessive résultant de la tempête cytokinique (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 et IFN-γ) (**Schortgen, 2012**).

De plus, une augmentation de 41.73% de la fréquence respiratoire et de 48.42% de la fréquence cardiaque associée à une hypotension chez 64.3% des cas (35.7% étaient hypertendus) ont été observés chez les patients septiques comparés au groupe contrôle. Parmi

les patients septiques 78.6% présentaient une tachycardie ($FC > 80$ bpm) tandis que 21.4% présentaient une fréquence cardiaque normale (60-80 bpm). Aussi, 50% des patients septiques présentaient une tachypnée ($FR > 20$ rpm), contre 42.9% avec une FR normale (13-20 rpm) et 7.1% avec une bradypnée ($FR \leq 12$ rpm). Nos résultats sont en accord avec les résultats des travaux de **Kumar et al.** (2018), **Kumar et al.** (2019), et **Acuña-Fernández et al.** (2020) qui ont noté une hyperthermie, une augmentation de la fréquence cardiaque et respiratoire chez les patients septiques (**Tableau III**). Néanmoins, **Kumar et al.** (2019) ont observé une augmentation de la pression artérielle moyenne chez les patients septiques comparés au groupe contrôle.

La saturation en oxygène veineux central « SvO_2 » indique la portion d'oxygène restant lié à l'hémoglobine après l'extraction cellulaire de l'oxygène, elle reflète la quantité d' O_2 non extraite par les tissus après satisfaction des besoins métaboliques de l'organisme. L'indice de Kirby est un indicateur d'hypoxémie (diminution de la quantité d'oxygène dans le sang) qui pourrait résulter d'une atteinte pulmonaire. Ces derniers sont utilisés pour définir une éventuelle altération pulmonaire pouvant conduire à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Nos résultats indiquent que 4 patients septiques étaient en détresse respiratoire « SDRA » (indice de Kirby < 200) alors qu'un patient présentait des signes de lésions pulmonaire « ALI » (Indice de Kirby < 300).

Le score SOFA (*sepsis-related organ failure assessment*) décrit le dysfonctionnement d'organes pendant que le score APACHE II (*acute physiology and chronic health evaluation*) évalue la sévérité et la mortalité des patients septiques admis en unité de soins intensifs (USI) alors que le Score Glasgow reflète l'état de conscience et informe sur le pronostic. Ces scores sont calculés à partir des données cliniques (oxygénation, échelle Glasgow...) et biochimiques (Natrémie, Kaliémie, hématicrite, créatinine...).

Les scores SOFA et APACHE II augmentent alors que le score Glasgow diminue chez les patients septiques. Le score Glasgow variait d'un patient à un autre, la moitié des patients étaient conscients ($GC > 13$), alors que 5 patients présentaient des troubles de consciences ($12 > GC > 8$) et 2 étaient dans un état comateux ($GC \leq 7$) (**Tableau III**). Ces résultats suggèrent que les patients septiques présentent un dysfonctionnement d'au moins un organe ce qui indique la sévérité du sepsis chez ces derniers en faveur d'un mauvais pronostic (**Kumar et al., 2018 ; Kumar et al., 2019 ; Qiu et al., 2019 ; Acuña Fernández et al., 2020**).

3. Caractéristiques microbiologiques et cliniques des patients Algériens

Les caractéristiques microbiologiques et cliniques (survie, ATCD, organes défaillants) des patients Algériens sont mentionnées dans le tableau IV.

Tableau IV. Caractéristiques microbiologiques et cliniques des patients Algériens septiques comparés aux contrôles.

Paramètres		Sepsis (n=14)
ATCD	Diabète	46.3% (9)
	HTA	57.14% (8)
	Insuffisance rénale	14.3% (2)
	Cardiopathie	21.42% (3)
	Asthme	28.6% (4)
	Anémie sévère	7.14% (1)
	Cirrhose	7.14% (1)
	Pancréatite	7.10% (1)
Hémoculture *	Négative	90% (9)
	Positive	10% (1)
Organes défaillants	Poumon	14.3% (2)
	Rein	35.7% (5)
	Poumon+Rein	35.7% (5)
	Foie+Rein	7.10% (1)
Survie	Oui	28.57 % (4)
	Non	71.43% (10)

ATCD : Antécédents. * : l'hémoculture a été réalisée pour seulement 10 patients sur 14.

Nos résultats montrent que 46.3% des patients septiques étaient diabétiques, pendant que 57.14% étaient hypertendus, 28.6% étaient asthmatiques, 21.42% étaient cardiopathes et 14.3% présentaient une insuffisance rénale. De plus, 7.14% présentaient soit une anémie sévère, une pancréatite ou une cirrhose hépatique. Toutefois, 11 patients septiques présentaient plus qu'un ATCD. Parmi les 14 patients septiques nous avons enregistré 10 cas de décès contre 4 cas qui ont survécu (**Tableau IV**).

L'hémoculture était positive pour seulement un patient sur 10 pour lesquelles cet examen a été réalisé. Ce dernier présentait une infection systémique de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les organes majoritairement touchés par le sepsis sont les poumons et les reins. Dans 35.7% des cas sont soit les reins seules qui sont défaillants ou bien les reins plus les poumons. Dans 14.3% des cas seuls les poumons étaient défaillants, alors que dans 7.10% des cas sont les reins et le foie qui étaient défaillants (**Tableau IV**).

4. Réponse inflammatoire des patients septiques

La réponse anti-infectieuse lors du sepsis est caractérisée par une réponse inflammatoire excessive et délétère. L'ampleur de cette réponse pourrait être déterminée au niveau systémique par la mesure des paramètres inflammatoires parmi : le nombre de leucocyte, le taux de CRP et de procalcitonine (PCT).

Les résultats hématologiques (FNS) et biochimiques (CRP, PCT) des patients septiques comparés aux groupes contrôles sont représentés dans le tableau V et la figure 6.

Tableau V. Caractéristiques hématologiques des patients septiques comparés aux contrôles.

Groupes	Contrôle Sains (n=8)	Sepsis (n=14)
GB ($10^3/\text{mm}^3$)	6.99 ± 0.7	20.6 ± 3.7**
Neutrophiles ($10^3/\text{mm}^3$)	4.26 ± 0.4	52.03 ± 10.2**
Lymphocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	2.4 ± 0.4	19.2 ± 4.1*
Plaquettes ($10^6/\text{mm}^3$)	236.9 ± 15.01	110.4 ± 22.7**
CRP (mg/l)	3.3 ± 0.5	233.4 ± 40.7***
PCT ($\mu\text{g/l}$)	0,6 (0,1-1,5)	20.6 ± 6.5 (0,3-24)***

GB : Globule Blancs ; CRP : Protéine C réactive ; PCT : Procalcitonine. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs contrôle.

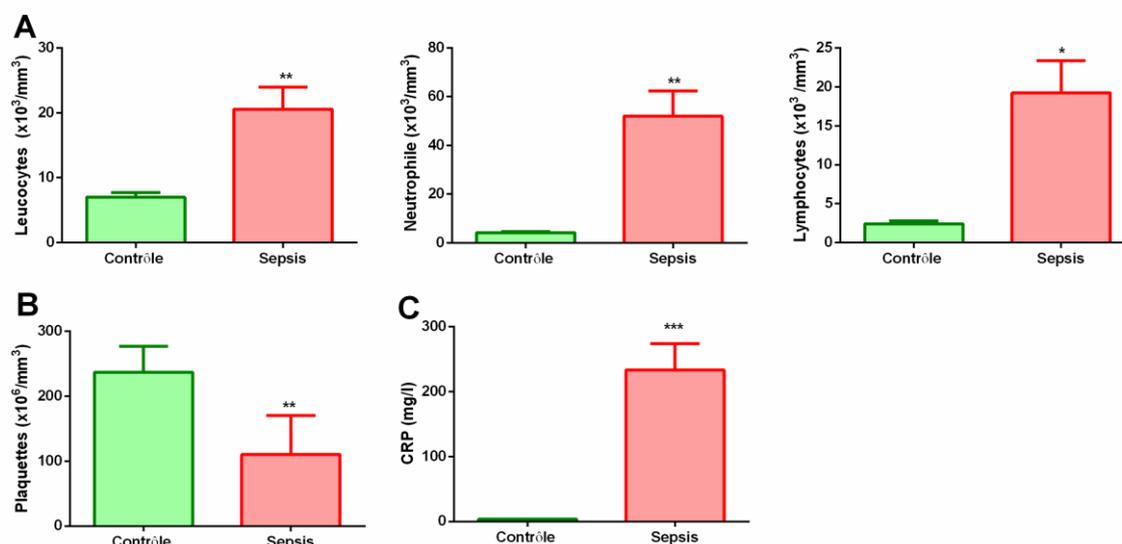


Figure 6. Paramètres hématologiques chez les patients septiques comparés au groupe contrôle. A : taux de leucocytes, de neutrophiles et de lymphocytes sanguins, B : taux de plaquettes sanguines, C : taux de Protéine C réactive "CRP". *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs contrôle

Les patientes Algériens septiques présentaient une réponse inflammatoire excessive caractérisée par une hyperleucocytose, une hyperneutrophilie, hyperlymphocytose et une

thrombopénie. Le taux de leucocytes sanguins augmente de 194.7% et en particulier les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes qui augmentent de 12 fois et de 8 fois respectivement chez les patients septiques comparés au groupe contrôle (**Tableau V, Figure 5**). Cependant, le taux de plaquettes diminuent de 53.4% chez les patients septiques comparés au groupe contrôle (**Tableau V, Figure 6**). Nos résultats sont comparables à ceux de Kumar et *al.* (2018), Kumar et *al.* (2019), et Acuña-Fernández et *al.* (2020) (**Tableau V, Figure 6**).

En outre, les taux de CRP et de la procalcitonine (PCT) augmentent fortement de 70.7 fois et de 34.3 fois respectivement chez les patients septiques ce qui suggère une réponse inflammatoire excessive chez ces derniers (**Qiu et al., 2019 ; Acuña-Fernández et al., 2020**).

5. Caractéristiques biochimiques et dysfonctionnement d'organes

Les sepsis est associé à un dysfonctionnement d'au moins un organe. Les paramètres de cytotoxicité rénale (créatinine et urée), hépatiques (bilirubine et transaminases ALAT/ASAT) et d'altération métaboliques (Glycémie, Lactatémie) ont été mesurés chez les patients septiques et comparés au groupe contrôle. Ces derniers sont représentés dans le tableau et les figures 6.

Tableau VI. Paramètres biochimiques d'altération métabolique et d'organes (rénale et hépatique).

Groupes Paramètres	Contrôle Sains (n=8)	Sepsis (n=14)
Bilirubine totale (mg/l)	6.1 ±1.35	91.5 ±37.1***
Bilirubine Directe (mg/l)	2.08 ±0.5	55.87 ±26.4***
Créatinine (mg/l)	9.89±1	30.94 ± 7.52***
Urée (g/l)	0.35±0.03	0.93 ± 0.16***
ASAT (U/l)	24.6±0.7	303.6±181.2***
ALAT (U/l)	19.2±1.8	174.6±110.1***
Glycémie	0.79±0.07	1.82±0.3**
Lactate (mmoles/l)	(0.55-2)	4.55±1.4 (0.2-12.4)***

ALAT/GPT: Alanine-Amino-Transférase/GlutamoPyruvate Transférase. **ASAT/GOT :** Aspartate-Amino-Transférase/GlutamoOxaloacétate Transférase. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs contrôle.

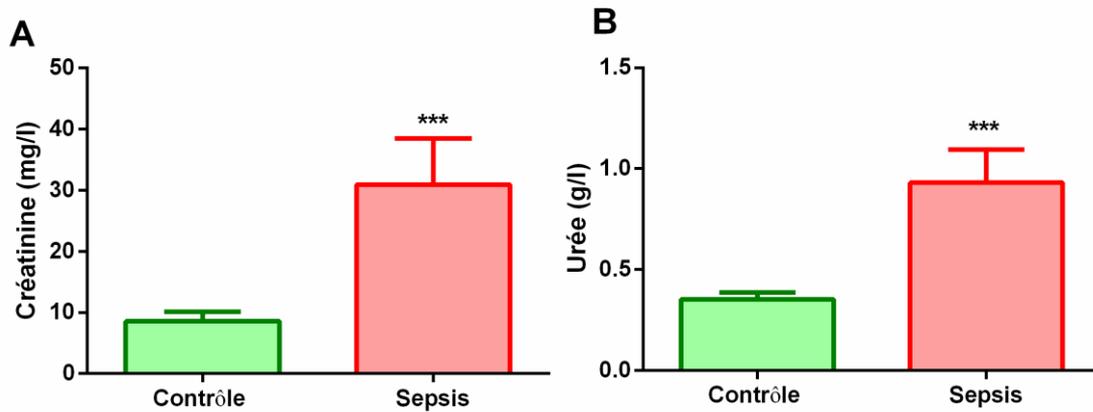


Figure 7. Paramètres d'altération rénale des patients atteints de sepsis comparés aux contrôles. A : Créatininémie ; B : taux d'Urée. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs contrôle.

Nos résultats montrent une augmentation significative de 3.13 fois et de 2.7 fois des taux de créatinine et d'urée respectivement chez les patients septiques comparés au groupe contrôle (Tableau VI, Figure 7). Ces résultats concordent avec les résultats de **Kumar et al. (2018)**, **Kumar et al. (2019)**, et **Qiu et al. (2019)** mais pas avec ceux d'**Acuña-Fernández et al. (2020)** qui ont observé une diminution de 23.65% et de 31% du taux de créatinine et d'urée plasmatique, respectivement chez les patients septiques comparés au groupe contrôle (**Acuña-Fernández et al., 2020**).

Ces résultats indiquent une altération des paramètres rénaux en faveur d'un dysfonctionnement rénale chez les patients septiques.

Les paramètres de cytotoxicité hépatique (bilirubine et transaminases ALAT/ASAT) sont représentés dans la figure 8.

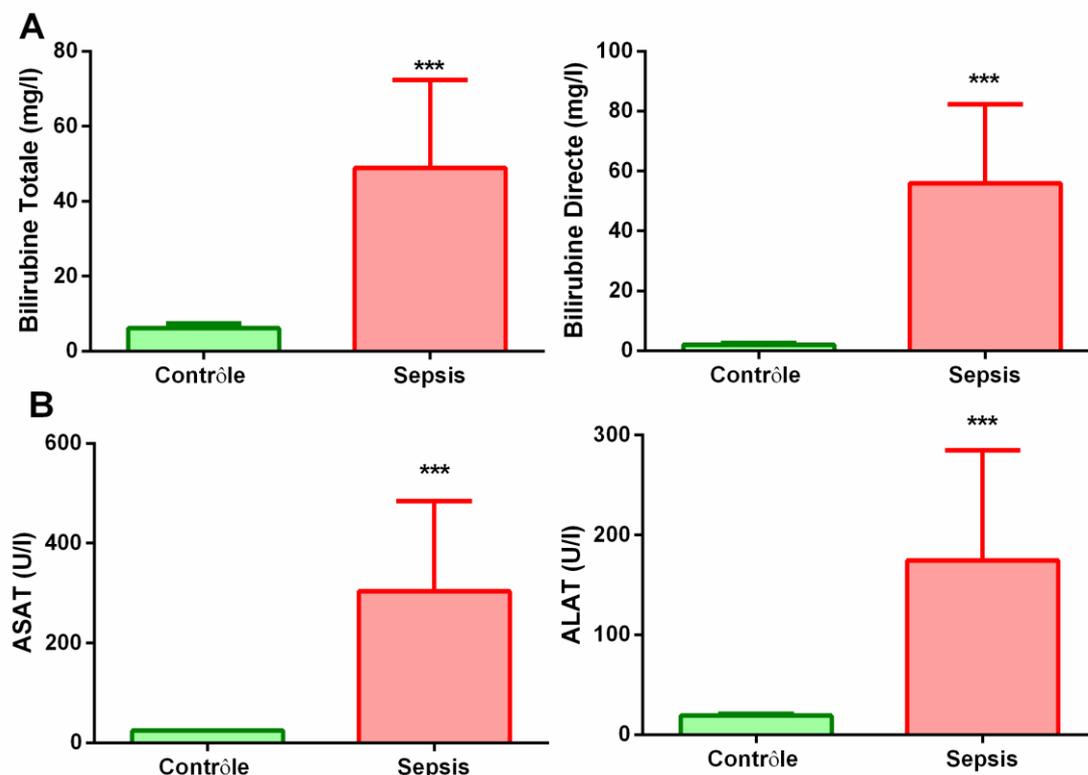


Figure 8. Paramètres d'atteinte hépatique des patients septiques comparés aux contrôles. A : taux de bilirubine, B : taux des transaminases ASAT et ALAT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs contrôle.

Les taux de bilirubine totale et de bilirubine directe augmentent significativement de 15 fois et de 26.9 fois, respectivement chez les patients septiques comparé au groupe contrôle (**Tableau VI, Figure 7**). Ces résultats concordent avec ceux de Kumar et *al.* (2018) et (2019) et ceux d'Acuña-Fernández et *al.* (2020) (Kumar et *al.*, 2018 ; Kumar et *al.*, 2019; Acuña-Fernández et *al.*, 2020).

Aussi, les taux des transaminases ASAT et ALAT augmentent de 12.3 fois et de 9.1 fois respectivement chez les patients septiques comparés au groupe contrôle (**Tableau VI, Figure 8**). Toutefois, le taux d'ALAT et d'ASAT restent inchangés selon Acuña-Fernández et *al.* (2020) alors que seul le taux d'ASAT augmente de 77.9% chez les patients septiques selon Qiu et *al.* (2019) (Qiu et *al.*, 2019 ; Acuña-Fernández et *al.*, 2020).

Ces résultats sont en faveur d'une altération hépatique chez les patients septiques comparés au groupe contrôle.

En outre, les patients septiques présentaient soit un seul organe altéré ou plusieurs en fonction de l'aggravation de la pathologie (Sepsis, choc septique ou MODS "*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*")

Une altération métabolique a été également observée chez les patients septiques comparés au contrôle. Cette dernière est représentée par une augmentation de 2.3 fois du taux de Glycémie et une lactatémie supérieur à 2 mmol/l (4.55 ± 1.4) (Tableau VI). Ces résultats sont similaires à ceux d'Acuña-Fernández et al. (2020) (Acuña-Fernández et al., 2020).

6. Evaluation du stress oxydatif chez les patients septiques

L'équilibre redox des patients septiques a été évalué par dosage des paramètres pro-oxydants (MDA et NO) et anti-oxydant (GSH) au niveau du plasma.

6.1. Taux de MDA plasmatique, marqueur de peroxydation lipidique

Le taux de MDA plasmatique, marqueur de peroxydation lipidique, est représenté dans la figure 9.

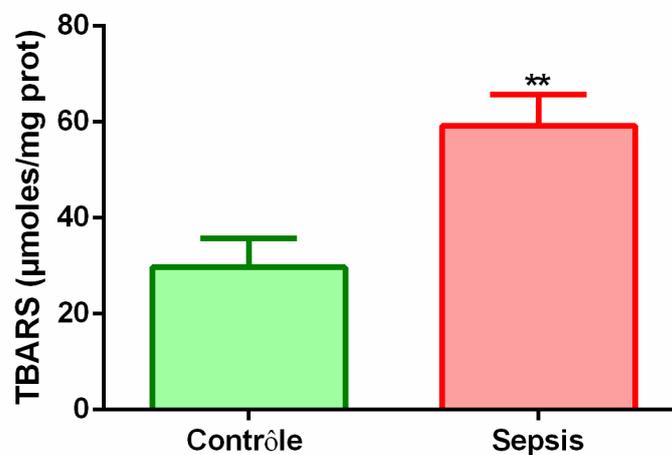


Figure 9. Taux de peroxydes lipidiques Malondialdéhyde au niveau des sérums des patients septiques vs contrôle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs contrôle.

Le taux de MDA sérique augmente significativement de 99,33% chez les patients septiques comparés au contrôle (59.2 ± 6.55 μmoles/mg de prot vs 29.7 ± 5.96 μmoles/mg de prot) (Figure 9).

Le sepsis est caractérisé par un stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre les oxydants en faveur d'une surproduction de ROS. La première cible des ROS sont les lipides, notamment

ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Pamplona et al, 2000).

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

6.2. Taux de NO sérique, marqueur de l'activité NO synthase

Le taux de NO, marqueur antioxydant, est représenté dans la figure 10.

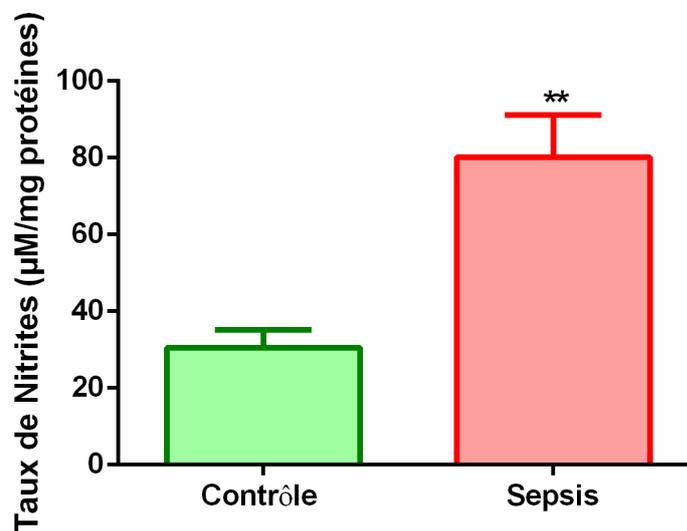


Figure 10. Taux de nitrites totaux (NO_2^-) au niveau des sérum des patients septiques vs contrôle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs contrôle.

Le taux de NO augmente significativement de 162,37% au niveau des plasmas des patients septiques comparés au contrôle ($80.19 \pm 10.93 \mu\text{M/mg}$ de prot vs $30.56 \pm 4.54 \mu\text{M/mg}$ de prot) (Figure 10).

Le NO constitue la principale espèce réactive de l'oxygène qui est synthétisé à forte concentration par la iNOS lors d'une réponse inflammatoire suite à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Qiu et al., 2019).

6.3. Taux de Glutathion sérique, GSH

Le taux de GSH sérique, marqueur antioxydant, est représenté dans la figure 11.

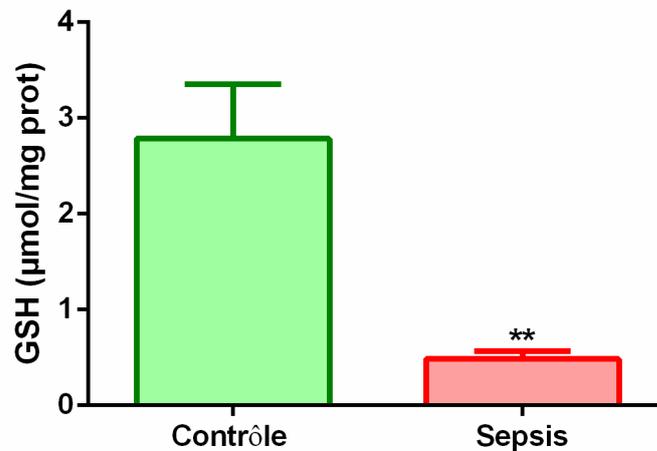


Figure 11. Taux de Glutathion "GSH" au niveau des sérums des patients septiques vs contrôle.*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001 vs contrôle.

Le taux de GSH diminue significativement de 82,73% dans le sérum des patients septiques comparé au groupe contrôle (0.48 ± 0.08 vs $2.78 \pm 0,57$ µmoles/mg de protéines) (**Figure 11**).

Le glutathion est un constituant important des mécanismes de protection intracellulaire contre divers stimuli nocifs, notamment le stress oxydatif. Ce tripeptide, constitue un cofacteur de la glutathion peroxydase (GPx), une enzyme antioxydante sélénium-dépendante qui dégrade le H_2O_2 en eau. Durant cette réaction deux molécules de GSH sont convertis en une molécule de glutathion disulfure GSSG. Le glutathion est consommé au cours de ce processus et doit être reconstitué afin que la cellule empêche l'accumulation de H_2O_2 à des niveaux toxiques. La reconstitution du glutathion n'est toutefois pas favorisée pendant les périodes d'hypermétabolisme prolongé et d'insuffisance calorique, qui accompagnent souvent des maladies graves telles que le sepsis entraînant l'épuisement des réserves de glutathion (**Sener et al., 2005**). De plus, le GSH a des effets sur l'immunité, il est souvent considéré comme anti-inflammatoire, car il inhibe la production et l'effet de plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires. Les patients septiques montrent une déplétion du taux de GSH, qui pourrait constitué un marqueur d'un mauvais pronostic (**Villa et al., 2002 ; Pravda, 2014**).

III. 2. Discussion

Dans notre étude nous avons démontré l'association du stress oxydatif à la physiopathologie du sepsis chez les patients. Ce stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre de la balance redox traduit par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MDA, NO) et une diminution d'anti-oxydant (GSH).

Le déséquilibre de la balance redox est dû à une surproduction de ROS qui sont hautement toxique entraînant des dommages tissulaires conduisant à un dysfonctionnement d'organes.

Nos résultats suggèrent une prédominance du sepsis chez les patients âgés de plus de 40 ans et de sexe masculin. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la majorité de ces patients présentaient un système immunitaire fragilisé (immunodéprimés) pour la plupart par des maladies chroniques (diabète, HTA, cardiopathies, insuffisance rénale, asthme, etc.).

Le sepsis est un syndrome physiopathologique complexe et ambigu, caractérisé par des déséquilibres de plusieurs systèmes : immunitaire, redox, coagulation, et métabolique. Sa complexité constitue un défi supplémentaire, pour les chercheurs, afin de poser une définition adéquate, cerner sa physiopathologie et de développer une thérapie efficace. Il résulte d'une réponse inflammatoire exacerbée contre une infection bactérienne, virale, parasitaire ou fongique. Les bactéries Gram-négatives sont les principaux agents pathogènes responsables du sepsis (**Lin et al., 2018**). Ainsi, seule un patient présentait une infection systémique à *P. aeruginosa*, un bacille à Gram négatif.

L'activation des PRRs (TLRs) par les PAMPs bactériens (LPS) résulte en une activation du facteur de transcription NF- κ B qui, à son tour, induit la transcription de plus de 200 gènes (**Martinet et al., 2009**) dont des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β), des chimiokines (IL-8), des molécules d'adhésion (ICAM-I, VCAM-1), des molécules nécessaires à l'activation des cellules T, des enzymes pro-oxydantes (iNOS, Cox-2), des enzymes antioxydantes (SOD, GPx), des molécules anti apoptotiques (Bcl2) et des facteurs de coagulation (facteur tissulaire) (**Leentjens et al., 2013**). Certains de ces produits exercent un feedback positif et activent la voie NF- κ B, intensifiant la réponse inflammatoire en cas de sepsis. Parmi eux, les cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 β , et le TNF α , participent à l'amplification de l'inflammatoire réponse (**Liu et Malik., 2006**).

Les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 sont directement impliquées dans la thermogénèse (**Lee et al., 2012**). Ainsi, si dans la majorité des cas de sepsis on observe une hyperthermie, il existe dans environ 10 à 20 % des cas une réponse

hypothermique à l'infection (**Young et Bellomo., 2014**). L'hyperthermie pourrait ralentir la croissance des micro-organismes (**Schortgen, 2012**). En effet, nous avons notés que 35,7% des patients septiques présentaient une hyperthermie alors que 14.3% avaient une hypothermie.

Nos résultats ont montré également une hémoculture négative pour 90% des cas. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) peut survenir soit à cause d'agents, soit dans une grande variété de circonstances où des processus stériles activent l'inflammation. Dans les deux cas des signaux de danger sont libérés et activent le système immunitaire. Cependant, en termes de pathogenèse moléculaire, le SIRS stérile reflète l'activation des voies immunitaires innées par les modèles moléculaires associés aux dommages de l'hôte (DAMP, *damage-associated molecular patterns*) (**Matzinger, 1994**).

Ainsi, les réponses cliniques à une provocation infectieuse et non infectieuse peuvent également être similaires (**Zhang et al., 2010**). La distinction entre le SRIS stérile et le sepsis dû à des agents pathogène repose essentiellement sur l'hémoculture et les examens cliniques. Les résultats de l'hémoculture peuvent être limités par le temps de la culture et par le risque de résultats faux négatif. Enfin, des inflammations infectieuses et non infectieuses peuvent coexister.

La réponse inflammatoire est associée à un déséquilibre redox, caractérisé par une hyperproduction de ROS/RNS. En revanche, les leucocytes activés pendant la réponse inflammatoire augmente la production des ROS (**Camicia et al., 2014**). Les ROS/RNS altèrent et endommagent les biomolécules (lipides, protéines, ADN) conduisant à une cytotoxicité ou à des dommages d'organes (**Halliwell, 2009**). Nos résultats ont montré une hyperleucocytose et une hyperneutrophilie chez les patients septiques. Les leucocytes activés produisent plus de ROS, parmi, les neutrophiles infiltrent le site inflammatoire et libèrent de la MPO (myéolperoxydase) qui génère l'acide hypochloreux HOCl à partir d'H₂O₂.

La mitochondrie est la principale source de ROS, l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en grande partie, produit par une fuite d'électrons transférés par la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I et III) (**Macdonald et al., 2003 ; Finaud et al., 2006**). Ainsi, une fonction mitochondriale altérée et une exagération de la réponse des cellules immunitaires conduit à une accumulation de ROS capables d'activer le NF-κB de manière dose-dépendante créant ainsi un cycle inflammatoire vicieux traduit par une réponse exacerbée et délétère (**Zhou et al., 2001; Horton, 2003 ; Mantzaris et al., 2017**).

Les RNS, principalement l'oxyde nitrique (NO•) est produit sous le contrôle de NF-κB après activation des deux NOSynthases inductibles cytosolique (iNOS) et mitochondriale (imtNOS).

Le NO• est le produit principal de ces enzymes, il provoque des effets délétères car il induit une vasodilatation systémique et une hypotension, et augmente les dommages cellulaires (**Mantzarlis et al., 2017**). De plus, le NO• réagit rapidement avec l'O₂•- donnant un produit très toxique le peroxy-nitrite ONOO- (**Beheshti et al., 2020**). Le peroxy-nitrite inhibe de manière irréversible les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I et III), l'ATP synthase, réduisant la production d'ATP et favorisant ainsi la mort cellulaire (**Cadenas et al., 2000; Escames et al., 2003; Garcia et al., 2017**). L'excès de ROS/RNS produites lors de sepsis déclenche la mort cellulaire apoptotique et nécrotique, en fonction de la gravité du stress oxydatif (**Saito et al., 2006**).

En plus de leur effet antimicrobien, ces ROS/RNS sont plus réactifs et oxyde des lipides et des hémoprotéines contribuant ainsi à l'amplification du stress oxydatif, du processus inflammatoire et au dysfonctionnement d'organes (**Nauseef, 2014 ; Ndrepepa, 2019**). Nos résultats ont montré une augmentation du taux de NO et de MDA dans le sérum des patients septiques.

L'effet cytotoxique des cytokines inflammatoires et des ROS/RNS affecte directement la fonction de plusieurs systèmes et d'organes conduisant à des lésions pulmonaires, à un dysfonctionnement hépatique et à une insuffisance rénale. Par conséquent, plusieurs organes seront affectés résultant en un syndrome de dysfonctionnement d'organes multiples (MODS) (**Rossaint et Zarbock., 2015**), ce qui conduit finalement à la mort des patients.

L'organisme dispose d'un système antioxydant et essaye de neutraliser cette surproduction de ROS. les ROS peuvent également activé le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2) qui régule plus de 500 gènes parmi des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GRd), et la superoxyde dismutase (SOD) en plus d'enzymes essentielles à la synthèse de glutathion (glutamate cysteine ligase) (**Kensler et al., 2007 ; Liu et al., 2017**).

La septicémie est un syndrome de réponse inflammatoire systémique causé par une infection, qui peut entraîner un dysfonctionnement et mortalité d'organes multiples.

Nos résultats épidémiologiques montrent une prédominance du sepsis chez les hommes âgés de plus de 40ans. Ces patients présentaient au moins 2 symptômes caractéristiques du sepsis dont une hyperthermie, une hyperleucocytose, une hypotension sévère, une baisse de taux de plaquettes (thrombopénie), une augmentation de la fréquence cardiaque (tachycardie) et de la fréquence respiratoire (tachypnée), et un dysfonctionnement d'au moins un organe (principalement les reins et les poumons).

Les résultats de l'hémoculture étaient négative pour la majorité des patients sauf un qui avait une hémoculture positive à *Pseudomonas aeruginosa*. Ces patients avaient un système immunitaire fragilisé avec au moins une pathologie chronique (diabète, HTA, asthmecardiopathie, insuffisance rénale,etc) .

Les scores SOFA, APACHE II des patients septiques suggèrent la sévérité du sepsis chez ces derniers en faveur d'un mauvais pronostic. En effet, parmi les 14 patients seulement 4 ont survécus au sepsis

Les résultats de notre étude montrent que les patients septiques présentaient une réponse inflammatoire excessive caractérisée par des taux sériques élevée de CRP et de procalcitonine.

De plus, les résultats biochimiques confirme la défaillance d'organes avec une augmentation des marqueurs hépatiques (bilirubine, transaminases ALAT et ASAT), une augmentation des marqueurs rénales (créatinine et urée) et une altération métabolique (Hyperglycémie et une hyperlactatémie).

En outre, les patients septiques présentaient un stress oxydatif caractérisé par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MDA, NO) et une diminution des marqueurs anti-oxydants (GSH) au niveau du sérum. Ceci suggère que les marqueurs de stress oxydant pourraient être utilisés comme marqueurs de diagnostic chez les patients septiques.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Rechercher d'éventuelles corrélations entre les paramètres du stress oxydant, le dysfonctionnement d'organes et le pronostic des patients septiques.
- Etudier l'effet de molécules anti-oxydantes comme la mélatonine, la vitamine C et E.

- Rechercher de nouvelles molécules thérapeutiques à effet pléiotrope : antibiotique, anti-inflammatoire et antioxydant.

- Acuña-Fernández C, Marín JS, Díaz-Casado ME, Rusanova I, Darias-Delbey B, Pérez-Guillama L, Florido-Ruiz J, Acuña-Castroviejo D. (2020) . Daily change in the expression of clock genes in sepsis and their relation with sepsis outcome and urinary excretion of 6-sulfatoximelatonin. *Shock* ; 53(5):550-559.
- Algeciras-Schimnich A, Cook WJ, Milz TC, Saenger AK, & Karon BS. (2007). Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-Stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clinical Biochemistry* ; 40 : 1311 – 1316.
- Arnalich F, García-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C. (2000). Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect. Immun*; 68:1942-1945.
- Bedirli A, Kerem M, pasaoglu H, Akyurek N, Tezcaner T, Elbey S, Memis L, Sakrak O. (2007). Bêta-Glucan attenuates inflammatory cytokine release and prevents acute lung injury in an experimental model of sepsis. *The european society for surgical research*, 27(4), 397-401.
- Beheshti F, Hosseini M, Hashemzahi M, Hadipanah MR, Mahmoudabady M. (2020). The Cardioprotective Effects of Aminoguanidine on Lipopolysaccharide Induced Inflammation in Rats . *Cardiovascular Toxicology* ; 20(5):474-481.
- Belaïch R, & Boujraf S. (2016). Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des Maladies Métaboliques* ; 10(1) : 38-42.
- Berthélémy, S. (2014). L'hémogramme ou numération-formule sanguine. *Actualités Pharmaceutiques*, 53(538), 53-55.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. (1992). American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*; 20:864–874.
- Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C., Takasu, O., Osborne, D. F., Walton, A. H., ... & Hotchkiss, R. S. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama*, 306(23), 2594-2605.
- Bouglé A, Annane D. (2007). Physiopathologie du choc septique. *Antibiotiques*; 9: 9-19.
- Bouguirne B. (2012). Conception et synthèse de la dérive phénolique hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Thèse de doctorat. Université Toulouse III.
- Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. (2014). Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus .*J Biomed Sci* ; 21(1): 23.
- 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.
- Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A. (2000). Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria . *Free Radic Res* ; 33:747-756.

Camici G, Pozner R, and Larran˜aga G. (2014). Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis . Shock ; 42(4) : 286-294

Choudhury S, Kandasamy K, Maruti BS, Addison M, Kasa JK, Darzi S, Singh TU, Parida S, Dash JR, Singh V, Mishra SK. (2015). Atorvastatin along with imipenem attenuates acute lung injury in sepsis through decrease in inflammatory mediators and bacterial load. European Journal of Pharmacology, 765, 447-456.

Chrétien F. (2018). Sepsis / Septicémie. Institut Pasteur.

Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, Bugger H. (2015). Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. Int. J. Mol. Sci ; 16:1776317778.

Cloutier L, René A, Jutras A. (2014). La formule sanguine complète. Pratique clinique ; 1- 11.

Danielski LG, Giustina AD, Bonfante S, Barichello T, & Petronilho F. (2020). The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development. Inflammation ; 43 (1): 24- 31.

Delanaye P, Cavalier E, Maillard N, Krzesinski J, et al. (2010). La créatinine : d'hier à aujourd'hui. Ann Biol Clin; 68 (5) : 531-43.

Delile E. (2017). Impact de la délétion totale et endothéliale de PTP1B sur la dysfonction cardiovasculaire et l'insulino-résistance dans un modèle de sepsis sévère expérimental. Université de Rouen Normandie.

Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. FASEB J; 17:932-934.

Fan J, Ye RD, Malik AB. (2001). Transcriptional mechanisms of acute lung injury. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol ; 281:1037-1050.

Fernandes AR, Souza PS, Oliveira AE, Chaves AR. (2018). A New Method for the Determination of Creatinine in Urine Samples Based on Disposable Pipette Extraction. J Braz Chem Soc ; 29 (4): 695-700.

Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress. Sports medicine, 36(4), 327-358.

Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. (2016) . Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. Am J Respir Crit Care Med; 193(3): 259-72.

Gando, S.; Saitoh, D.; Ishikura, H.; Ueyama, M.; Otomo, Y.; Oda, S.; Kushimoto, S.; Tanjoh, K.; Mayumi, T.; Ikeda, T.; et al. Un essai randomisé, contrôlé et multicentrique des effets de l'antithrombine sur la coagulation intravasculaire disséminée chez les patients atteints de septicémie. Crit. Soins 2013, 17, R297.

García JA, Ortiz F, Miana J, Doerrier C, Fernandez-Ortiz M, Rusanova I, Escames G, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. (2017). Contribution of inducible and neuronal nitric oxide synthases to mitochondrial damage and melatonin rescue in LPS-treated mice. J Physiol Biochem ; 73:235-244.

- Genaud P, C. Vinsonneau, A. Cariou. (2001). Dysfonction myocardique et sepsis physiopathologie et perspectives thérapeutiques; 10 : 153-61.
- Grand F, Guitton J, Goudable J. (2001). Optimisation of the measurement of nitrite and nitrate in serum by the Griess reaction . *Ann Biol Clin* ; 59(5):559-65.
- Greer JR. (2015). Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis. *BJA Education* ; 15 (6): 316–321.
- Grimaldi DA. (2014). Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression post-infectieuse. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes – Paris.
- Halliwell B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* ; 46(5): 531-542.
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB et Rhee SJ. (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340, 107-115.
- Horton JW. (2003). Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* ; 189:75-88.
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 13(12), 862-874.
- Hrycaj EG, Bandiera SM. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol* ; 74: 35-84.
- Huang K, Li M, Li H, Li M, Jiang Y, and Fang X. (2016). Accurate quantification of creatinine in serum by coupling a measurement standard to extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Sci Rep* ; 6: 19283 .
- Huet O, Obata R, Aubron C, et al. (2007). Plasma-induced endothelial oxidative stress is related to the severity of septic shock . *Crit Care Med* ; 35(3):821-6.
- Jadeja RN, Devkar RV, Nammi S. (2017). Oxidative Stress in Liver Diseases: Pathogenesis, Prevention, and Therapeutics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* ; 2017 :8341286-2 .
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S.(2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway . *Annu Rev Pharmacol Toxicol* ; 47:89-116.
- Kirschvink N, Moffarts B, Lekeux P.(2008). The oxidant / antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*; 177:178-191.
- Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Srivastava VK, Saxena J, Mehta S, Jyoti A. (2019). Quantification of NETs formation in neutrophil and its correlation with the severity of sepsis and organ dysfunction . *Clin Chim Acta* ; 495:606-610.

Kumar V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. *Int Immunopharmacol.* 2020 Dec;89(Pt B):107087. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107087. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33075714; PMCID: PMC7550173.

Laroye C, Gibot S, Reppel L, Bensoussan D. (2017). Mesenchymal Stromal/Stem Cells: A New Treatment For Sepsis And Septic Shock? . *Stem Cells* ; 35(12):2331-2339.

Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. (2012). Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol* ; 12 (3):168- 179.

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.

Lefevre G, Beljean-Leumarie M, Beyerle F, Bowfont-Rousselot D, Cristol JP, Therond P, Torreilles J. (1998). Evaluation of lipid peroxydation by assaying the the thioharbituric-acidereactive substances. *Annales de bilogie clinique*, 56(3), 305-319.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. (2001). International Sepsis Definitions Conference. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit CareMed*; 31:1250–1256.

Lin WH, Chen CW, Huang YW, Chao L, Lin YS, Lin CF. (2015). Kallistatin protects against sepsis-related acute lung injury via inhibiting inflammation and apoptosis. *Scientific reports*, 5, 12463.

Lin J, Chen L, Lin J, et al. (2018). A novel approach for fast detection of sepsis with Gram-negative bacterial infection. *Microb Biotechnol* ; 11(6):1121-1123.

Liu X, Zhang X, Ding Y, Zhou W, Tao L, Lu P, Wang Y, Hu R. (2017). NuclearFactor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity byInhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal*;26:28-43.

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.

Macdonald J, Galley HF, Webster NR. (2003). Oxidative stress and gene expression in sepsis. *British Journal of Anaesthesia* ; 90(2) : 221-232.

Napolitano LM. (2018). Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect* ; 19(2):117-125.

Mantzarlis K, Tsolaki V, et Zakyntinos E. (2017). Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev* ; 2017 : 5985209.

Marnett LJ. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95.

Martinet O, Delabranche X, Aghajanian M, Hasselmann M. (2009) .SIRS, Sepsis, CARS, SDRA : comprendre différents aspects de l'inflammation en réanimation. *Nutrition Clinique et Métabolisme* ; 23(4): 185-191.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991–1045.

Migdal CA, Serres MI. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. Université Lyon 1, EA 41-69, Laboratoire de recherche dermatologique, pavillon R, Hôpital Édouard Herriot, Lyon Cedex 03, France.

Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, et al. (2003). Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*;31(4):1048-52.

Moukette B, Pieme CA, Nya Biapa PC, Ngogang JY. (2015). In vitro antioxidant and antilipoperoxidative activities of bark extracts of *Xylopiya aethiopia* against ion-mediated toxicity on liver homogenates. *J Complement Integr Med* ; 12(3):195-204.

Napolitano Lena M. Sepsis. (2018). Definitions and Guideline Changes. *SURGICAL INFECTIONS*; Vol: 19, Number 2.

Nauseef WM. (2014). Myeloperoxidase in human neutrophil host defence .*Cellular Microbiology* ; 16(8):1146-55.

Ndrepepa G. (2019). Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* ; 493:36-51.

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

Orban, T., Bradshaw, E. M., Raddassi, K., Elyaman, W., Orban, T., Gottlieb, P. A., Kent, S. C., & Hafler, D. A. (2009). Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *The Journal of Immunology*, 183(7), 4432-4439.

Padmanabhan, S., Delles, C., Marcano, A. C. B., Munroe, P. B., McClure, J. D., Brain, N. J., ... & Dominiczak, A. F. (2006). Variants of the human mu type glutathione-s-transferase (GSTM) gene family are associated with hypertension.

Pahlavani N, Sedaghat A, Bagheri Moghaddam A, Mazloumi Kiapey S, Navashenag J, Jarahi L, Reazvani R, Nourouzy A, Nematy M, Safarian M, Ghayour-Mobarhan M. (2019). Effects of propolis and melatonin on oxidative stress, inflammation, and clinical status in patients with primary sepsis: Study protocol and review on previous studies. *Clinical NutritionESPEN*, 33, 125-131.

Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A et Barja G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169-183.

Pang J, Zheng Y, Han Q, et al. (2019). The Role of ALDH2 in Sepsis and the To-Be- Discovered Mechanisms. *Adv Exp Med Biol* ; 1193:175-194.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. (2015).Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases . *Indian J Clin Biochem*; 30(1): 1- 26.

Poston, M. D., Hoover, D. B., Brown, S., Lawson, S. E., Bond, C. E., Downs, A. M., ... & Ozment, T. R. (2020). Cholinergic leukocytes in sepsis and at the neuroimmune junction in the spleen. *International immunopharmacology*, 81, 106359.

Poujol FA. (2016).Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et clinique des altérations lymphocytaire induites lors des syndromes septiques, Université Claude Bernard –Lyon 1

Pravda, J. (2014). Metabolic theory of septic shock. *World journal of critical care medicine*, 3(2), 45.

Qiu PE, Yang LU, and Jin ZH. (2019).Recent Advances in Studies of Molecular Hydrogen against Sepsis. *Int J Biol Sci.*; 15(6): 1261–1275.

Reinhart, K., Daniels, R., Kisson, N., Machado, F. R., Schachter, R. D., & Finfer, S. (2017). Recognizing sepsis as a global health priority—a WHO resolution. *New England Journal of Medicine*, 377(5), 414-417.

Rossaint J, Zarbock A. Pathogenesis of multiple organ failure in Sepsis, (2015). *Crit. Rev. Immunol.* 35 (4) : 277–291.

Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kisson N, Finfer S, Struzek CF, Machado FR,et al . (2020).Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* ; 395: 200–11.

Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E.(2006). Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free RadicRes* ; 40:619–630.

Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, Santos SS, Azevedo LCP, Brunialti MKC.(2019).Sepsis: evolving concepts and challenges ; 52(4): e8595.

Sano R et Reed JC. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1833: 3460–3470.

Schortgen F. (2012). Fever in sepsis. *Minerva Anesthesiol* ;78(11):1254-64.

Sener G, Toklu H, Kapucu C, et al. La mélatonine protège contre les lésions organiques oxydatives dans un modèle de septicémie chez le rat. *Surg Aujourd'hui* 2005; 35 : 52-9. 10.1007/s00595-004-2879-1 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

Sevransky, J. E., Martin, G. S., Shanholtz, C., Mendez-Tellez, P. A., Pronovost, P., Brower, R., & Needham, D. M. (2009). Mortality in sepsis versus non-sepsis induced acute lung injury. *Critical care*, 13(5), 1-6.

Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. (2014). Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus .*J Biomed Sci* ; 21(1): 23.

Sid B, Verrax J, Calderon PB. (2013). Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease . *Free Radical Research* ; 47(11): 894–904

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock(Sepsis3). *JAMA*; 315:801-810.

Spanidis Y, Goutzourelas N, Stagos D, Kolyva AS, Gogos C A, Bar-Or D, Kouretas D. (2015). Assessment of Oxidative Stress in Septic and Obese Patients Using Markers of Oxidation-reduction Potential. *in vivo* ; 29 (5): 595-600.

Strnad, P., Tacke, F., Koch, A., & Trautwein, C. (2017). Liver—guardian, modifier and target of sepsis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(1), 55-66.

Sun, X., Wray, C., Tian, X., Hasselgren, P. O., & Lu, J. (2003). Expression of uncoupling protein 3 is upregulated in skeletal muscle during sepsis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(3), E512-E520.

Sun, M., Dawulieti, J., Zhao, Y., Shao, D., Yan, H., Lao, Y. H., ... & Chen, L. (2020). Treatment of severe sepsis with nanoparticulate cell-free DNA scavengers. *Science advances*, 6(22), eaay7148.

Tesniere A, Pèned F, Mira JP. (2008). Immunité innée et sepsis: quand le danger vient de l'intérieur. Endogenous danger signal participate in immune system activation in sepsis; 17:379-386.

Van der poll T, Marol L. (2017). Coagulation and sepsis. *Thrombosis research*, 149, 38-44.

Venet, F. et G. Monneret (2017). Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nature Reviews | Nephrology*. 1-17.

Verdonka FR, Alice BL, and Alexandre ME. (2017). The new sepsis definition: limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis; Vol: 30-2.

Villa, P., Sacconi, A., Sica, A., & Ghezzi, P. (2002). Glutathione protects mice from lethal sepsis by limiting inflammation and potentiating host defense. *The Journal of infectious diseases*, 185(8), 1115-1120.

Westwood M, Ramaekers B, Whiting P, Tomini F, Joore M, Armstrong N, Ryder S,

Stirk L, Severens J & Kleijnen J. (2015). Procalcitonin testing to guide antibiotic therapy for the treatment of sepsis in intensive care settings and for suspected bacterial infection in emergency department settings: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess*; 19(96): 1-236.

Williams, M., & Baycroft, T., Wilkin, B. (2017). *Wartime Interaction: confrontation, collusion and cooperation/Interactions en temps de guerre: confrontation, connivence et coopération (1870-1970)*.

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

Yamaguchi J, Nagase M, Yamamoto Y, Sakurai A, Kubo A, Mitsuhaski H, Matsuoko M, Ihara S, Kinoshita K. (2018). Increased oxidative stress and renal injury in patients with sepsis. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 63(2), 137-143.

Yan J, Li S, Li S. (2014). The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol*, 33(6):498-510. Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1850 (8):1607–1621.

Young PJ, Bellomo R. (2014). Fever in sepsis: is it cool to be hot? *Critical Care*; 18(1) : 109. Zarjou A et Argaval A. (2011). Sepsis and acute kidney injury. *Journal of the American society of nephrology*, 22(6), 999-1006.

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*. 2010;464(7285):104–107.

Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. (2001). NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*; 31 (11): 1405-1416.

Annexe 1

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

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

FIO₂, fraction de l'oxygène inspire (Fraction of inspired oxygen). **MAP**, moyenne de pression artérielle (Mean arterial pressure), **PaO₂**, Pression partielle d'oxygène (partial pressure of oxygen). **a**, les doses de catecholamine sont données comme μg/kg/min pour au moins 1heure. **b**, les scores de l'échelle Galasgow Coma varie de 3 à 15, le score le plus élevé indique une meilleure fonction neurologique.

Annexe 2

✓ *Appareillage*



Bain marie



Test ELISA



pH-mètre

Annexe 3

Tableau II: Questionnaire des données.

		Sepsis (n=..)	Contrôle(n=..)
Genre (F/H)			
Age (an)			
ATCD			
Température (°C)			
Fréquence respiratoire (inspirations/min)			
Fréquence cardiaque (90 battements/min)			
Leucocytes (10³/ mm³)			
Neutrophiles (%)			
Lymphocytes (%)			
Plaquettes (10⁶/mm³)			
Créatinine (µmoles/L)			
Hémoculture (+/-)			
Pathogène	Gram+		
	Gram-		
	Mix		
	inconnu		
Site infectieux	Pulmonaire		
	Abdominale		
	Sanguin		
	urogénitale		
	Autres		
	inconnu		
Survivant/non survivant			