



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université de BLIDA 1



**Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie**

Département de Biologie Et Physiologie Cellulaire

**MEMOIRE**

**De :** Fin d'Etude en Vue de l'Obtention Du Diplôme de Master

**Option :** BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE.

**Sous le sujet de recherche :**

**Etude du sepsis monomicrobien induit par une entérobactérie pathogène opportuniste  
chez les souris Blanches.**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> : GASMI HADJER  
HANANE**

**M<sup>elle</sup> : BOUGUERRA**

**Soutenue le :18 /07/2019**

**Devant le jury composé de :**

<b>M<sup>me</sup> BENAZOUZ F.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB1</b>	<b>Présidente.</b>
<b>M<sup>me</sup> CHERRALLAH A.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB1</b>	<b>Examinatrice.</b>
<b>M<sup>me</sup> AISSANI ELFERTAS R.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB1</b>	<b>Promotrice.</b>
<b>M<sup>me</sup> RAHIM I.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB1</b>	<b>Co-Promoteur.</b>



## Remerciements

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.

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

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

Nos vifs remerciements vont aussi aux membres du jury : Mme **BENAZOUZ Fella**, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury.

A Mme **Cherrallah Amira** pour l'honneur que vous nous faites en acceptant d'examiner ce modeste travail.

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

Nous avons croisé durant ce parcours sinueux, des personnes formidables au grand cœur, qui nous ont apporté aide et soutien sans rien demander en retour. La liste est bien longue et très éclectique; des étudiants (Toute la promo de BCM, Romeissa et Sabiha de la microbiologie), des enseignants (Mesdames Tounsi, Benazouz, Cherrallah, Zerouti, Zatra, Djellouli, Djazouli, Messieurs. Grandi, Medrouh, Djazouli) des ingénieurs de laboratoire (Hania, Abderrahman, Souad, Karima, Tayeb) des médecins (Dr. Kouchkar, Dr. Benhamed) et des responsables (Pr. Menouiri, Pr. Benrima, Mme Menouiri)..... Nous vous oublierons jamais.

**Merci.**

## *DEDICACE*

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

*À mon père adoré, à mes sœurs et mes frères, qui ont toujours été à mes côtés. Et à toute Ma famille.*

*A ma grand-mère qu'elle reste à jamais gravée dans mon cœur et mon esprit. Que Dieu l'accueille dans son vaste paradis.*

*À tous mes proches et mes chères amies et collègues, pour leur présence et leur fidélité, en particulier Fella, Manel et Kenza.*

*À tous ceux que j'aime.*

HADJER.

*Dédicace :*

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

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

*A mes frères Merzak et Abdelrrachid et sœurs : Sérine, Samia et Rima*

*Pour leur Soutien et pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral et financier.*

*A mes nièces et neveux Wail Mahdi, Israa, Firas Sadik*

*À mon fiancé : Ghenam Fares et son Parents*

*A mes amie : Fella Messoum, Kenza Rahmani , Wissem Hanni.*

*Et à tous ceux qui m'ont aidé*

*HANANE .*

## **Résumé :**

Le sepsis est un problème majeur de santé publique, associant une exacerbation de la réponse de l'hôte vis-à-vis de l'agent infectant, un stress oxydatif et une défaillance d'organes. Malgré les progrès thérapeutiques, la mortalité due à cette affection reste trop élevée. Notre travail de recherche présente un intérêt fondamental dans la compréhension des mécanismes complexes de la physiopathologie du sepsis dans le but de développer une thérapie ciblée. En effet, nous avons élaboré un modèle murin de sepsis monobactérien à *S. marcescens* d'origine clinique.

La caractérisation préalable de *S. marcescens* montre qu'elle exprimait différents facteurs de virulence en plus de sa résistance aux aminopénicillines (AMC, AMX), aux C1G (CZ) et aux polymyxines (Cs), cette souche était résistante au système du complément, formait un biofilm de forte intensité et possédait un pouvoir hémolytique évalué à 70%. Cependant, elle ne produisait pas de prodigiosine et la visualisation de la capsule polysaccharidique, nous a été difficile, après contre coloration à l'encre de chine. La dose létale 50 (DL50), testée sur des souris BALB/c était comprise entre  $10^7$ - $10^8$  CFU. Nous avons donc choisi la concentration de  $10^6$  CFU pour induire le sepsis chez des souris BALB/c et Swiss par une injection intrapéritonéale. Ces dernières ont été traitées par une dose de 30mg/Kg de mélatonine. Les souris ont été sacrifiées 24h après traitement et le cœur, la rate et le mésentère ont été prélevés pour une étude biochimique et histologique.

Les résultats du dosage biochimique montrent que le sepsis induit un stress oxydatif cardiaque caractérisé par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MPO, MDA) et une diminution de marqueur anti-oxydant (GSH) chez les souris BALB/c mais pas chez les souris Swiss. Toutefois une augmentation de la catalase, une enzyme anti-oxydante, a été observée chez les souris BALB/c septique. La mélatonine exerce un effet antioxydant et rétablit l'équilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant en diminuant la MPO, le MDA et la catalase et en augmentant la GSH chez les souris BALB/c septique.

Les résultats histologiques montrent des dommages oxydatifs myocardiques, associés à une activation de la réponse immunitaire et inflammatoire caractéristique avec une forte infiltration leucocytaire observée au niveau de la rate et du mésentère. La mélatonine prévient les dommages oxydatifs et inflammatoires induits par sepsis.

Nos résultats ouvrent des perspectives très prometteuses quant à l'utilisation thérapeutique de la mélatonine comme traitement du sepsis. En outre, nous affirmons le rôle clé du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis.

**Mots clés :** Sepsis, *Serratia marcescens*, stress oxydatif, mélatonine, cœur, rate.

## **Abstract :**

Sepsis is a major public health problem, involving an exacerbation of the host's response to the infecting agent, oxidative stress, and organ failure. In spite of the therapeutic progress, the mortality due to this affection remains too high. Our research work is of fundamental interest in understanding the complex mechanisms of the physiopathology of sepsis in order to develop a targeted therapy. Indeed, we have developed a monobacterial murine model of sepsis by *S. marcescens* of clinical origin.

The preliminary characterization of *S. marcescens* shows that it expressed different virulence factors in addition to its resistance to aminopenicillins (AMC, AMX), C1G (CZ) and polymixins (Cs), this strain was resistant to the complement system, formed a high intensity biofilm and had a haemolytic capacity of 70%. However, it did not produce prodigiosin and the polysaccharide capsule visualisations have been difficult, after a counterstaining with China-ink. The lethal dose 50 (LD50), tested on BALB/c mice was between  $10^7$ - $10^8$  CFU. We therefore chose the concentration of  $10^6$  CFU to induce sepsis in BALB/c and Swiss mice by intraperitoneal injection. The latter were treated with a dose of 30 mg/kg of melatonin. The mice were sacrificed 24h after treatment and the heart, spleen and mesentery were removed for a biochemical and histological study.

The results of the biochemical assay show that sepsis induces cardiac oxidative stress characterized by an increasing production of prooxidant markers (MPO, MDA) and a decrease of anti-oxidant marker (GSH) in BALB / c mice but not in Swiss mice. However, an increasing in catalase, an antioxidant enzyme, was observed in BALB/c septic mice. Melatonin exerts an antioxidant effect and restores the prooxidant / antioxidant balance by decreasing MPO, MDA and catalase and increasing GSH in septic BALB/c mice.

The histological results show myocardial oxidative damage, associated with a characteristic activation of the immune and inflammatory response with high leucocyte infiltration observed at the spleen and mesentery. Melatonin prevents oxidative and inflammatory damage caused by sepsis.

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

**Key words:** Sepsis, *Serratia marcescens*, oxidative stress, melatonin, heart, spleen.

## المخلص :

تعفن الدم هو مشكلة صحية كبيرة وعامة متعلقة بتفاقم استجابة المضيف للعامل المصاب والإجهاد التأكسدي، وفشلا لأعضاء. على الرغم من تقدم العلاج فإن الوفيات الناجمة عن هذا التأثير ل تزال مرتفعة للغاية. البحث العلمي الذي قمنا به يعرض الهدف الاساسي لفهم الآليات المعقدة للفيزيولوجية المرضية للانتان الدموي من أجل تطوير علاج مستهدف.

في الواقع لقد قمنا بتطوير نموذج لفئران نتنة ومتعفنة دمويا ببكتيريا أحادية سيراسيا مرسيننس من أصل عيادي.

الوصف السابق لسيراسيا مرسيننس يوضح عوامل السمية والضراوة المختلفة لها بالإضافة عن ذلك مقاومتها للمينوبيينسلين، والبوليمكسينات، فإذن هذه السلسلة قاومت نظام المتمم وشكلت بيوفيلم عالي الكثافة كما ان لها القدرة على الانحلال بنسبة 70%.

ومع ذلك لم تنتج بروديجيوسين مع التصوير الصعب لكبسولة السكريد وذلك باستعمال التلوين بالحبر الصيني.

الجرعة المميتة للفئران بالبوسي للحث على الانتان ما بين 107-108 فاخترنا تركيز 106 والتي تم اختبارها على الفئران عن طريق الحقن داخلا الصفاق. ثم علاج هذه الخيرة بجرعة 30ملغ / كغ من الميلاونين. تم التضحية بالفئران بعد 24 ساعة من العلاج وتمت إزالة القلب والطحال والمساريق من اجل دراسة كيميائية ونسجية.

تظهر نتائج الفحص الكيميائي الحيوي أن التسمم يؤدي إلى الاجهاد مؤكسد للقلب يتميز بزيادة في العلامات المؤيدة للأكسدة كالميلوبيغوكسيداز، ملونديهالدهيد وانخفاض في علامة مضادة الاكسدة كالغلوتاتيو غدوي في الفئران بالبوسي ولكن ليس في الفئران السوسية وأيضاً لوحظت زيادة في الكاتلاز، إنزيم مضاد الأكسدة في الفئران الانتانية بالبوسي.

يمارس الميلاونين تأثيراً مضاداً للأكسدة ويستعيد التوازن بين مضادات الأكسدة / مضادات الأكسدة عن طريق تقليل ميلوبيغوكسيداز، ملونديهالدهيد والكاتلاز مع الزيادة في غلوتاتيو غدوي في الفئران الانتانية بالبوسي .

تظهر النتائج النسيجية تلف المؤكسد لعضلة القلب، المرتبط بتفعيل الاستجابة المناعية والالتهابية المتميزة بتسلل كريات الدم البيضاء المرصودة في الطحال والمساريق. يمنع الميلاونين الأكسدة والالتهابات التي يسببها الانتان.

الكلمات المفتاحية: تعفن الدم سيراتيا مرسيننس، الإجهاد التأكسدي الميلاونين، القلب الطحال



**Abréviations :**

**VP :** Voges-Proskauer

**ONPG :** orthonitrophényl- $\beta$ -galactoside

**ADH :** Arginine dihydrolase

**TDA :** Tryptophan Deaminase

**URE :** uréase

**H<sub>2</sub>S :** hydrogène sulfuré

**CA-SFM :** Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**AM :** ampicilline

**AMX :** amoxicilline

**Cs :** Colistine

**CZ :** céfazoline

**C1G :** Céphalosprines de première génération

**C2G :** Céphalosprines de deuxième génération

**LPS :** lipopolysaccharide

**QS :** Quorum Sensing.

**AHL :** N-acylhomosérine lactone

**PFT :** Pore Forming Toxin

**SDS :** dodécylsulfate de sodium

**PBS :** phosphate buffered saline

**MPO :** myéloperoxydase

**ROS :** reactive oxygen sepecies

**MDA :** malondialdéhyde

**SOD :** superoxyde dismutase.

**GPx :** la glutathion peroxydase

**GSH :** glutathion réduit

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

**PRRs :** Patterns Recognition Receptors.

**TLRs :** Toll-like receptors

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

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

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

**IL-8** : interleukine -8

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

**VCAM-1** : vascular cell adhesion molecule 1

**iNOS** : oxyde nitrique synthase inductible

**Cox-2** : cyclooxygenase 2

**Bcl2** : B cell lymphoma 2

**RNS** : reactive nitrogen sepecies

**O $2^{\bullet-}$**  : l'anion superoxyde

**NO $\bullet$**  : oxyde nitrique

**ONOO $-$**  : peroxyinitrites

**iNOS** : NO Synthases inductibles cytosolique

**i-mtNOS** : Synthases inductibles mitochondriale

**SRIS** : syndrome de réponse inflammatoire systémique

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

**CIVD** : coagulation intravasculaire disséminée

**PAMPs** : Pathogen-Associated Molecular Patterns

**MyD88** : Myeloid differentiation 88

**ADCC** : Cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps

**LB** : Luria Bertani

**MH** : Mueller hinton

**EDTA** : Ethylénediamine-tétraacétique

**CAT** : catalase

**TBA** : acide thiobarbiturique

**NMBA** : 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid

**MGG** : May-Gründwald-Giemsa

## Liste des figures :

<b>Figure 1.</b> Diagramme comparatif des définitions de sepsis décrite par les conférences de consensus de 1991, 2001 et 2016.....	3
<b>Figure 2 :</b> Voies de signalisation des TLRs chez les mammifères.....	5
<b>Figure 3 :</b> Altération des fonctions immunitaires au cours du sepsis.....	7
<b>Figure 4 :</b> Activités anti-inflammatoires de la mélatonine au cours du sepsis.....	13
<b>Figure 5 :</b> Protocole expérimental chez les souris swiss et BALB/c.....	20
<b>Figure 6 :</b> Culture sur gélose Muller Hinton de <i>Serratia marcescens</i> par la méthode d'ensemencement en quatre quadrants.....	25
<b>Figure 7 :</b> Mise en évidence de la capsule de <i>Serratia marcescens</i> par la méthode de contre coloration à l'encre de chine.....	27
<b>Figure 8 :</b> Comparaison de la structure des clusters de gènes codant les expolysaccharides de la capsule et du LPS chez deux souches <i>Serratia marcescens</i> d'origine cliniques.....	28
<b>Figure 9 :</b> Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain sur nos souches.....	29
<b>Figure 10 :</b> Culture de <i>Serratia marcescens</i> sur gélose Muller Hinton.....	30
<b>Figure 11 :</b> Résultat de la recherche de la formation de biofilm par au cristal violet sur microplaque de 96 puits.....	31
<b>Figure 12 :</b> Activité hémolytique d'une souche d' <i>E. coli</i> .....	32
<b>Figure 13:</b> Taux de survie des souris BALB/c au sepsis induit par différentes doses de <i>Serratia marcescens</i> .....	33
<b>Figure 14 :</b> Effet des différents traitements sur le poids des souris.....	34
<b>Figure 15 :</b> Effet des différents traitements sur le poids du cœur et de la rate.....	35
<b>Figure 16 :</b> Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang.....	36
<b>Figure 17 :</b> Résultats de frottis sanguin, coloration MGG.....	37
<b>Figure 17 (Suite) :</b> Résultats de frotti sanguin.....	38
<b>Figure 18 :</b> Activité myéloperoxydase au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c.....	40
<b>Figure 19 :</b> Taux de malondialdéhyde au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c.....	41
<b>Figure 20 :</b> Activité catalase au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c.....	43
<b>Figure 21 :</b> Taux de Glutathion réduit au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c.....	44

<b>Figure 22</b> : Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss contrôle.....	46
<b>Figure 23</b> : Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss contrôle.....	46
<b>Figure 24</b> : Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques.....	47
<b>Figure 25</b> . Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques.....	47
<b>Figure 26.</b> Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques.....	48
<b>Figure 27.</b> Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques.....	48
<b>Figure 28</b> :Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss septiques traitées par la mélatonine.....	49
<b>Figure 29</b> : Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss septiques traitées par la mélatonine.....	49
<b>Figure 30</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles.....	50
<b>Figure 31</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles.....	51
<b>Figure 32</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles.....	51
<b>Figure 33</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques.....	52
<b>Figure 34</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques.....	52
<b>Figure 35</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques.....	53
<b>Figure 36</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques.....	53
<b>Figure 37</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine.....	54
<b>Figure 38</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traités par la mélatonine.....	54
<b>Figure 39</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine.....	55
<b>Figure 40</b> : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine.....	55

<b>Figure 41</b> : Micrographie du mésentère des souris BALB/c et Swiss.....	56
<b>Figure 42</b> : Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants de la mélatonine dans le modèle de cardiomyopathie septique.....	59

**Tableaux annexes**

**Annexe 1** : Tableau I. Les scores SOFA ..... i  
Annexes 1 (Suite) : Tableau II: Récepteurs TLRs chez l’homme et agonistes.....ii  
Annexe 2 : Appareillage .....iii  
Annexe 2 (Suite) : Tableau III: liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes .....iv  
Annexe 2 (Suite) : Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine ..... v  
Annexe 3 : Tableau VIII caractères biochimiques et culturels d’identification des espèces de  
genre *Serratia* ..... xi

## Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1: Rappels Bibliographiques</b>	
<b>I. Sepsis .....</b>	<b>2</b>
<b>I. 1. Définition du sepsis .....</b>	<b>2</b>
<b>I. 2. Physiopathologie du sepsis.....</b>	<b>3</b>
<b>I. 2. 1. Réponse immunitaire au cours du sepsis .....</b>	<b>4</b>
<b>I. 2. 2. Reconnaissance du pathogène .....</b>	<b>4</b>
<b>I. 2. 3. Déclenchement de la réponse immuno-inflammatoire.....</b>	<b>5</b>
<b>I. 2. 4. Immunodépression .....</b>	<b>6</b>
<b>I. 3. Dy fonctionnement cardio-vasculaire associé au sepsis.....</b>	<b>6</b>
<b>I. 4. Stress oxydatif et sepsis.....</b>	<b>8</b>
<b>I. 5. Model de sepsis .....</b>	<b>8</b>
<b>II. Serratia marcescens.....</b>	<b>9</b>
<b>II. 1. Pouvoir pathogène de S.marcecsens .....</b>	<b>9</b>
<b>III. Mélatonine.....</b>	<b>10</b>
<b>III. 1. Biosynthèse de la Mélatonine .....</b>	<b>10</b>
<b>III. 2. Mécanisme d'action de la Mélatonine.....</b>	<b>11</b>
<b>III. 3. Effets physiologique de la Mélatonine.....</b>	<b>11</b>
<b>III. 3. 1. Effets sur le système immunitaire .....</b>	<b>11</b>
<b>III. 3. 2. Effets anti-oxydants et anti-mitotique .....</b>	<b>12</b>
<b>III. 3. 3. Effets régulateurs de l'homéostasie Mitochondriale.....</b>	<b>12</b>
Rôle thérapeutique de la Mélatonine dans le sepsis.....	12
<b>Chapitre 2. Matériel et Méthodes</b>	
<b>I. Matériel.....</b>	<b>14</b>
<b>I. 1. Matériel non biologique .....</b>	<b>14</b>
<b>I. 2. Matériel biologique .....</b>	<b>14</b>
<b>II. Méthodes.....</b>	<b>15</b>
<b>II .1 Caractérisation microbiologique de l'agent infectant .....</b>	<b>15</b>
<b>II. 1. 1. Identification biochimique .....</b>	<b>15</b>
<b>II. 1. 2. Etude du profil de résistance aux antibiotiques .....</b>	<b>15</b>

II.1. 3. Etude du profil de virulence de l'agent infectant.....	16
II. 1. 3. 1. Recherche de la capsule polysaccharidique et de la prodigiosine .....	16
II. 1. 3. 2. Recherche du pouvoir hémolytique .....	17
II. 1.3. 3. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain.....	17
II.1. 3. 4. Recherche de la formation de Biofilm .....	18
II. 1. 3. 5. Test de pathogénicité .....	18
II. 1. 3. 6. Dénombre des bactéries dans la rate .....	18
<b>II. 2. Etude de l'effet de la mélatonine sur le stress oxydatif induit par sepsis .....</b>	<b>19</b>
II. 2. 1. Modèle murin de sepsis monomicrobien .....	19
II. 2. 2. Protocole pharmacologique .....	19
II. 2. 3. Etude biochimiques.....	20
II. 2. 3. 1. Préparation de l'homogénat tissulaire.....	20
II. 2. 3. 2. Dosage des protéines.....	20
II. 2. 3. 3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif .....	20
III. 3. 3. 1. Dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) .....	21
III. 3. 3. 2. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) .....	21
III. 3. 3. 3. Dosage de l'activité catalase .....	22
III. 3. 3. 4. Dosage du taux de glutathion réduit (GSH) .....	22
II. 2. 4. Etude histologique .....	22
II. 2. 5. Etude de formules sanguines par coloration au May-Gründwald-Giemsa (MGG) .....	23
<b>II. 3. Etude statistique.....</b>	<b>23</b>
 <b>Chapitre 3. Résultats et Discussion</b>	
<b>I. Caractéristiques microbiologique de l'agent inducteur.....</b>	<b>24</b>
I. 1. Profil de résistance aux antibiotiques .....	26
I. 2. Profil de virulence .....	26
<b>II. Etude d'un modèle murin de sepsis monobactérien à <i>S. marcescens</i> et de l'effet de la mélatonine sur ce sepsis .....</b>	<b>34</b>



<b>II. 1.</b> Effet de <i>S. marcescens</i> et de la mélatonine sur le poids des souris et des organes (cœur, rate).....	34
<b>II. 2.</b> Effet de <i>S. marcescens</i> et de la mélatonine sur le taux de leucocytes et lymphocytes sanguins.....	36
<b>II. 3.</b> Effet de <i>S.marcescens</i> et de la mélatonine sur l'activité MPO, marqueur de l'infiltration des neutrophiles.....	39
<b>II. 4.</b> Effet de <i>S.marcescens</i> et de la mélatonine sur le taux de MDA, marqueur de peroxydation lipidique .....	41
<b>II. 5.</b> Effet de <i>S.marcescens</i> et de la mélatonine sur l'activité catalase .....	42
<b>II. 6.</b> Effet de <i>S.marcescens</i> et de la mélatonine sur le taux de glutathion réduit (GSH) .....	43
<b>III. Résultats de l'étude histologique.....</b>	<b>45</b>
<b>III. 1.</b> Effet de <i>S.marcescens</i> et de la mélatonine sur l'histologie cardiaque.....	45
<b>III. 2.</b> Effet de <i>S.marcescens</i> et de la mélatonine sur l'histologie de la rate .....	50
<b>III. 3.</b> Effet de <i>S.marcescens</i> et de la mélatonine sur l'histologie du mésentère.....	56
<b>Discussion générale .....</b>	<b>57</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>60</b>
<b>Références Bibliographiques.</b>	

## **Introduction :**

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

Au niveau mondial, on estime 31,5 millions de cas de sepsis, avec un potentiel de 6 millions de décès par an ; il serait la deuxième cause de décès dans le monde selon « The National Center for Health Statistics and the Centers for Disease Control and Prevention ». Historiquement appelé « gangrène (ou pourriture) des hôpitaux », le sepsis tue une personne dans le monde toute les 5 secondes, particulièrement les individus fragilisés et immunodéprimés (**Wheeler et al., 2009 ; Fleischmann et al., 2016 ; Singer et al., 2016**).

Le sepsis peut être causé par des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites. Toutes les bactéries, avec ou sans potentiel de virulence ou même commensales de la flore humaine, peuvent induire un sepsis. C'est le cas de *S. marcescens*, espèce de la famille des *Enterobacteriaceae*, à l'origine de nombreuses infections nosocomiales et communautaires chez l'homme, telles que les bactériémies, les infections urinaires et pulmonaires (**Cristina et al., 2019**). Plusieurs cas épidémiques de *S. marcescens* ont été enregistrés ces dernières années dans le monde. Ces épidémies sont souvent difficiles à contrôler, persistantes parfois pendant des mois voire des années, en raison de la multirésistance que présente cette espèce. Ainsi, les cas d'infections nosocomiales et de sepsis causés par *S. marcescens* sont de plus en plus fréquents (**Buetti et al., 2018 ; Redondo-Bravo et al., 2018 ; Cilli et al., 2019 ; Cristina et al., 2019**).

Malgré les progrès considérables qu'a réalisés la recherche fondamentale et appliquée, la physiopathologie du sepsis demeure complexe et ambiguë. Aucun traitement ne semble efficace pour traiter ce syndrome. Ainsi, le sepsis constitue, à l'heure actuelle, un défi pour définir, cerner la physiopathologie de cette affection et la traiter de manière appropriée (**Salomão et al., 2019**). C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail de recherche, dans lequel nous avons élaboré un modèle murin de sepsis monobactérien à *S. marcescens* d'origine clinique. Cette étude s'articule autour de trois volets :

- Le premier volet concerne la caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques et de la virulence potentielle de *S. marcescens*.
- Le deuxième comprend le développement d'un modèle murin de sepsis monobactérien à *S. marcescens*. Nous avons déterminé l'implication du stress oxydatif dans la physiopathologie du sepsis dans deux souches de souris blanches Swiss et BALB/c.
- Enfin le troisième volet consiste à évaluer les effets antioxydants et anti-inflammatoires de la mélatonine sur le sepsis induit par *S. marcescens*.

## Synthèse Bibliographique :

### I. Sepsis

Le sepsis est un problème de santé mondial et continue d'être la principale cause de décès par infection. Le taux de mortalité associé au sepsis demeure élevé (>40%) et aucun traitement ne semble efficace (Napolitano, 2018 ; Qiu et al., 2019).

#### I. 1. Définition du sepsis

Le terme sepsis vient du grec σήψη, qui signifie putréfaction ou putridité. Il fut décrit par Hippocrate comme dangereux, odorant, et correspondant à une décomposition biologique du corps (Funk et al., 2009).

Le sepsis est un syndrome physiopathologique complexe, défini comme étant un dysfonctionnement organique, menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte vis-à-vis de l'infection. Sa physiopathologie complexe, caractérisée par une réaction inflammatoire excessive, un stress oxydatif, et un désordre de plusieurs systèmes (immunitaire, coagulation, métabolique...), constitue un défi supplémentaire, pour les chercheurs, afin de poser une définition adéquate et de développer une thérapie efficace (Singer et al., 2016).

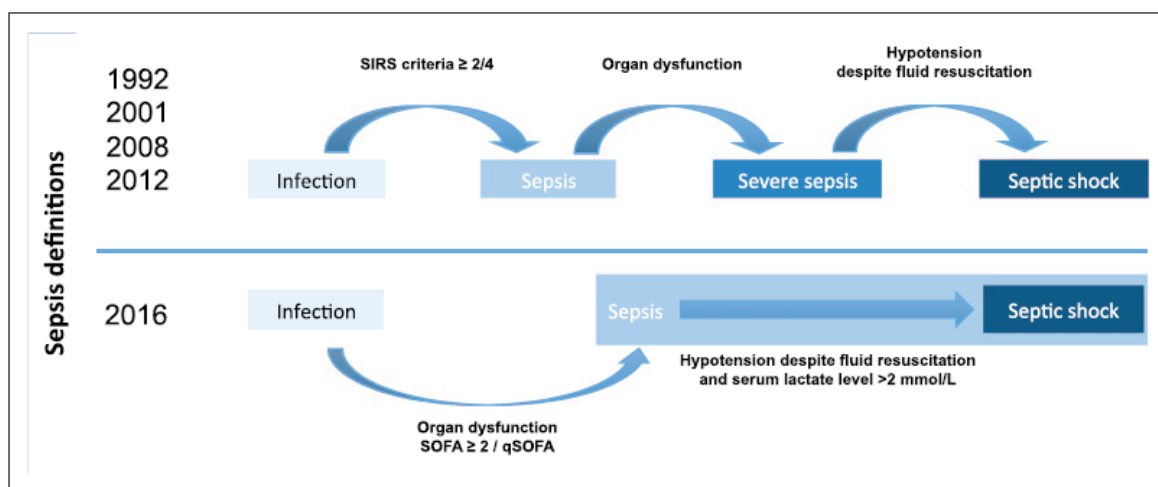
La définition du sepsis a connue deux mises à jours en 2001 et en 2016, depuis la toute première élaborée en 1991 lors d'une conférence de consensus (Bone et al., 1992 ; Levy et al., 2001, Singer et al., 2016).

Initialement, le sepsis était défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) associé à une infection, qui évolue en sepsis sévère (sepsis et dysfonctionnement d'un organe) puis en choc septique (sepsis et hypotension sévère). Le SRIS est attesté par la présence d'au moins deux critères parmi les 4 suivants : (i) température >38°C ou <36°C, (ii) rythme cardiaque >90 battements/minute, (iii) rythme respiratoire >20 cycles/minute ou pression artérielle en CO<sub>2</sub> <4,3kPa, (iv) nombre de globules blanc >12 000 cellules/μL ou <4 000 cellules/μL ou présence d'au moins 10% de granuleux immatures (Singer et al., 2016).

Selon la dernière mise à jour datant de 2016, l'association entre l'inflammation et l'infection ainsi que les critères de SIRS ont été abandonnés. Le sepsis est actuellement considéré comme étant un dysfonctionnement mortel d'organes causé par une réponse dysrégulée de l'hôte à l'infection (Singer et al., 2016). Il est aggravé en choc septique, caractérisé par des anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques particulièrement profondes augmentant le risque de mortalité.

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 mmol/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 de sepsis décrite par les conférences de consensus de 1991, 2001 et 2016 (**Napolitano, 2018**).

## I. 2. Physiopathologie du sepsis

Les réponses immune et inflammatoire déclenchées par les agents infectieux lors du sepsis, sont excessives et maintenues par des stimuli à la fois infectieux et non infectieux. En plus de la défaillance viscérale engendrée, un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire et un défaut d'apport en oxygène dans les tissus (hypoxie) est aussi observé. Il s'en suit la formation de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et éventuellement à la mort (**Bougle et Annane, 2007 ; Tesniere et al., 2008 ; Cimolai et al., 2015**).

### I. 2. 1. Réponse immunitaire au cours du sepsis

L'activation du système immunitaire lors d'une infection débute par une phase pro-inflammatoire contrebalancée par une phase anti-inflammatoire qui permet le retour à l'homéostasie. Le

déclenchement de la réponse immunitaire et l'hyperinflammation au cours du processus du sepsis est caractérisé par plusieurs phases (**Poujol, 2016**).

### **I. 2. 1. Reconnaissance du pathogène**

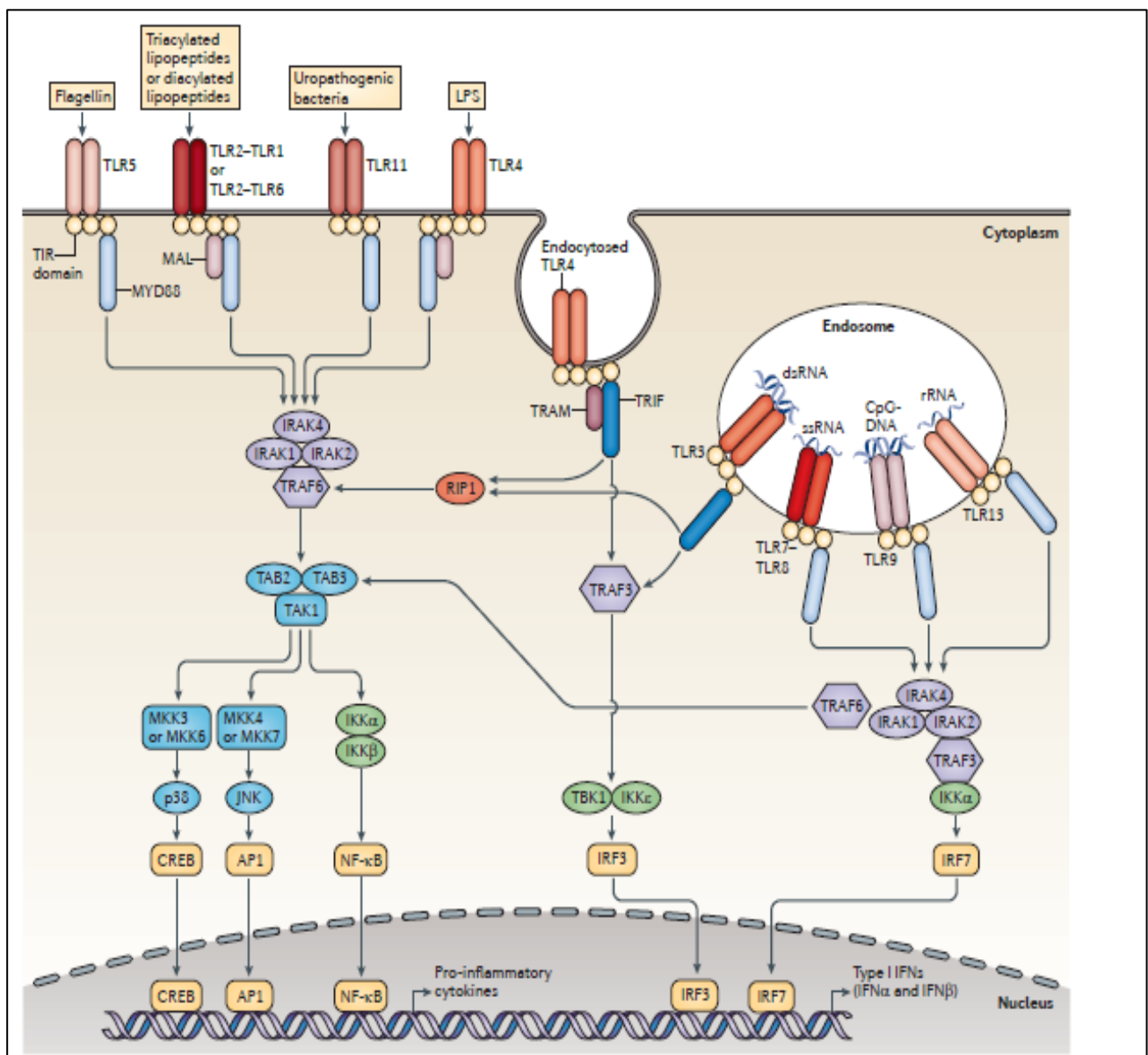
Tout syndrome septique débute par la reconnaissance de motifs hautement conservés spécifiques des pathogènes ou « PAMPs » (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) par des récepteurs de l'immunité innée, les « PRR » (*Patterns Recognition Receptors*). Il résulte de cette interaction une réaction inflammatoire locale au niveau de l'organe infecté visant à limiter la dissémination du germe infectieux (**Bosmann et Ward, 2013 ; Grimaldi, 2014**).

Les PRRs de type TLRs, chez l'homme, ainsi que leur agonistes sont résumés dans le **Tableau II** de l'**annexe 1**.

Les Toll-like receptors ou « TLR » sont les récepteurs PRRs les plus décrits chez l'homme. Ils sont exprimés par les cellules immunitaires (monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques, LT, LB...) et par les cellules épithéliales (**O'Neill et al., 2013**). Leur activation initie une signalisation intracellulaire dépendante ou indépendante du MyD88 et (**Figure 2**).

Quel que soit la voie empruntée, il résulte de cette stimulation l'activation de différents facteurs de transcription dont le NF- $\kappa$ B. Ce dernier contribue à l'expression de médiateurs clé de la réponse inflammatoire, dont notamment l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et les interférons de type I. Ces deux cytokines vont induire, d'une part, la production de nouveaux médiateurs inflammatoires (Cytokines, chimiokines, NO...) et ainsi contribuer au développement des réponses immunitaires innée et adaptative (**Poujol, 2016**). D'autre part, elles induisent l'expression de peptides antimicrobiens destinés à l'élimination du pathogène.

Plusieurs travaux de recherche ont démontré le rôle clé du NF- $\kappa$ B dans la pathogénèse, le dysfonctionnement d'organe et la létalité au cours du sepsis. Il fut démontré que le niveau d'activation du NF- $\kappa$ B est positivement 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**).



**Figure 2 :** Voies de signalisation des TLRs chez les mammifères (O'Neill *et al.*, 2013).

### I. 2. 2. Déclenchement de la réponse immuno-inflammatoire

Une fois le pathogène reconnu une cascade de phénomènes inflammatoires localisés visant à éradiquer le pathogène est déclenchée. Les médiateurs inflammatoires induits suite à cette réponse sont nombreux et les cytokines pro-inflammatoires comptent parmi les plus importants. Celles qui sont particulièrement étudiées dans le cadre des syndromes septiques sont le  $TNF\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12 et l'INF $\gamma$  (Grimaldi, 2014).

La libération de ces cytokines stimule la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Les polynucléaires neutrophiles circulants peuvent infiltrer les tissus, suivis par le recrutement et l'activation des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques. Ces dernières seront responsables de l'apprêtement antigénique ; elles participent à l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B (**Grimaldi, 2014**).

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

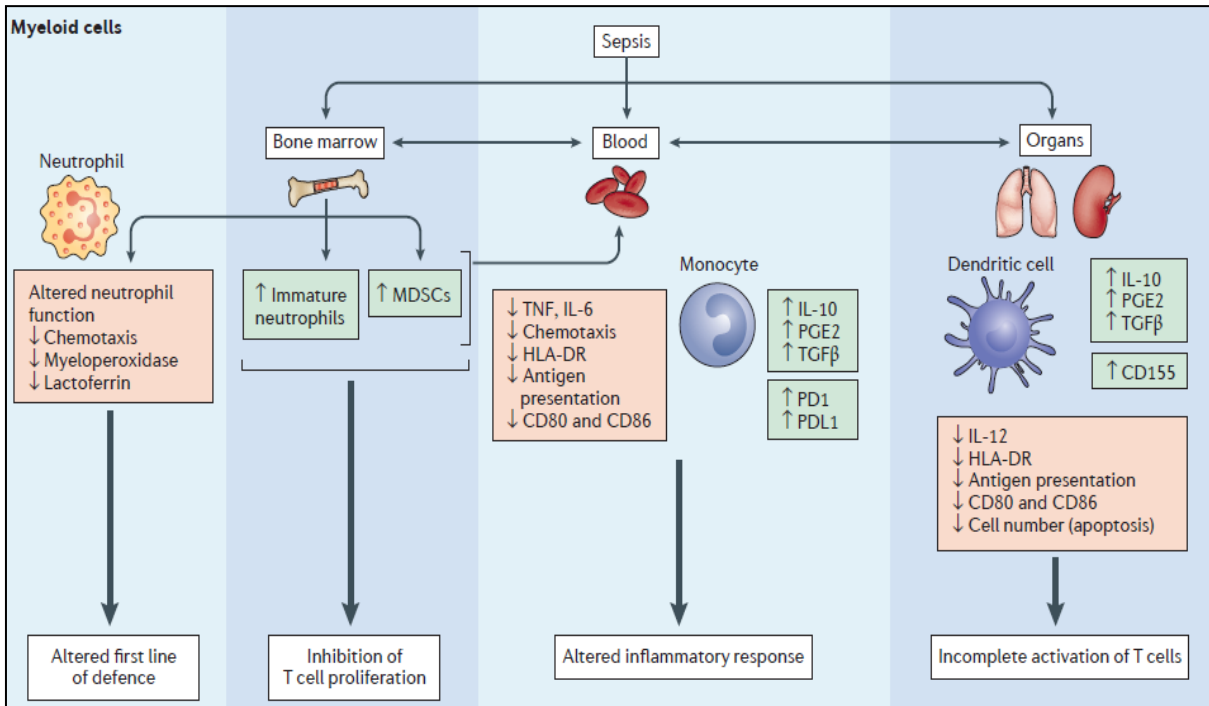
Lors que les mécanismes de régulation négative de ces phénomènes tardent à se mettre en place, la sécrétion massive de cytokines à l'échelle systémique est qualifiée de « Orage cytokinique » et on observe un état d'hyper-inflammation systémique (**Pougol, 2016**).

### **I. 2. 3. Immunodépression**

La réponse de l'hôte durant les syndromes septiques est une succession de phases hyper inflammatoires et de phases d'immunodépression. La deuxième phase observe des altérations des cellules immunitaires innées et adaptatives (apoptose, altérations fonctionnelles et modifications phénotypiques), qui ne seront plus capables de combattre l'infection. Des études récentes indiquent que la réponse globale de l'hôte est la résultante des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, déclenchées de manière simultanée plutôt que successives (**Grimaldi, 2014 ; Pougol, 2016**). La **figure 3** résume le processus physiopathologique du sepsis.

### **I. 3. Dysfonctionnement cardiovasculaire associé au 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 ; Merx et Weber, 2007 ; Greer, 2015**).



I.  
4.

**Figure 3 : Altération des fonctions immunitaires au cours du sepsis**

**(Venet et Monneret, 2017)**

La réponse immunitaire innée est modifiée après une septicémie 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.



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

Les ROS sont présents dans la cellule à des doses raisonnables ; leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/ pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Cependant cette homéostasie rédox peut être rompue, soit par une production excessive de ROS (pro-oxydantes) soit par une diminution des capacités anti-oxydantes. On parle alors de stress oxydant (**Migdal et Serres, 2011**).

Comme dans tout phénomène important, un dérèglement dans ces réactions d'oxydations peut créer un dysfonctionnement au niveau des cellules et la survenue de nombreuses pathologies telles que le choc septique (**Baraka-Vidot, 2015**).

Plusieurs études ont montré qu'au court du choc septique une forte production de ROS est observée au niveau cardiaque. Ces ROS sont impliquées dans la pathogenèse et les manifestations du choc septique (**Khadour et al., 2002 ; Durant et al., 2004**).

#### **I. 5. Modèle de sepsis**

L'objectif central de tous les modèles de sepsis est de reproduire fidèlement une pathogenèse cliniquement pertinente, similaire à la maladie observée chez l'homme. Plusieurs caractéristiques cliniques de sepsis humaine sont utilisées pour valider la pertinence de modèles animaux (**Buras et al., 2005**).

Les modèles animaux peuvent fournir des informations importantes sur les mécanismes de la réponse de l'hôte aux agents pathogènes. Sur la base de l'agent d'initiation, les modèles de sepsis peuvent être divisés en trois catégories (**Buras et al., 2005**) :

- ✓ Administration exogène d'une toxine (LPS, les endotoxines ou le zymosan) ;
- ✓ Administration exogène d'un agent pathogène viable (comme une bactérie) ;
- ✓ Altération de la barrière protectrice endogène de l'animal (induisant une perméabilité du côlon, permettant une translocation bactérienne).

Le modèle de péritonite est celui qui est le plus souvent utilisé. Il s'agit d'une ligature et ponction cœcale (CLP). Ce modèle, décrit il y a plus de trente ans, consiste à exposer le cæcum pour le ligaturer puis le perforer avec une aiguille. Ce modèle comporte à la fois une infection bactérienne mais également une atteinte ischémique du tube digestif (**Bouroche, 2012**).

Le modèle monobactérien est aussi utilisé pour induire le sepsis, par injection d'une dose sublétales d'une suspension bactérienne en intra-péritonéale ou en intraveineuse. Une variété d'espèces bactériennes est utilisée pour induire le sepsis particulièrement le gram négatif à leur tête

*Escherichia coli*. Théoriquement toutes les bactéries à Gram négatif pathogène opportunistes pour l'homme peuvent être utilisées dans des modèles murins de sepsis. Nous citons : *Klebsiella pneumoniae* (Toky et al., 2003), *Serratia marcescens* (Iwaya et al., 2005), *Salmonella* (Mthur et al., 2012). Dans ce qui suit, nous allons décrire brièvement les caractéristiques microbiologiques et infectieuses de *Serratia marcescens*, la bactérie que nous avons utilisée dans le modèle de sepsis que nous avons développé dans notre travail de recherche.

## II. *Serratia marcescens*

*Serratia marcescens* est un bacille Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, retrouvée aussi bien dans l'environnement (plantes, sols, eaux...) qu'en étroite association avec les tissus épithéliaux de l'homme. Cette bactérie est un pathogène opportuniste qui cause des infections nosocomiales ou communautaires, particulièrement chez les immunodéprimés. Parmi les infections causées par *S. marcescens*, nous retrouvons les endophtalmies, les endocardites, les infections urinaires et respiratoire, les infections du tissu mou et la sépticémie (Golemi-Kotra., 2008 ; Krzymi-Ska et al., 2010).

### II. 1. Pouvoir pathogène de *S. marcescens*

Le mécanisme de la pathogenèse infectieuse est complexe et multifactorielle et différentes étapes de l'infection peuvent être observées. Les facteurs de virulence potentiellement impliqués dans le pouvoir pathogène de *Serratia marcescens* ont, essentiellement, une activité enzymatique (protéases, métalloprotéases, gélatinase, protéase alcaline, nucléase, lécithinase) et cytotoxique (hémolysine) (Golemi-Kotra, 2008 ; Mahlen, 2011).

L'hémolysine Sh1A de *Serratia marcescens* est largement décrite dans la littérature. Elle provoque l'hémolyse des érythrocytes et conduit à la libération de médiateurs inflammatoires, tels que l'histamine et les leucotriènes. Sh1A s'intègre dans la membrane des érythrocytes et provoque la lyse osmotique par la formation des canaux (Grimont et Grimont, 2006 ; Golemi-Kotra, 2008).

Les adhésines fimbriaires de type 1, la capsule polysaccharidique et l'antigène O du LPS sont autant de facteurs de virulence, souvent retrouvés chez *S. marcescens*, et qui jouent un rôle important dans la résistance aux défenses de l'hôte (LeÂopold et al., 2003).

Certaines souches de *S. marcescens* produisent un pigment naturel appelé « Prodigiosine » donnant une coloration rouge aux colonies sur gélose. Il fut rapporté que les souches produisant la prodigiosine sont généralement environnementales, possédant moins de pouvoir de pathogénicité et résistant moins aux antibiotiques. Toutefois, il est important de noter que l'espèce *S. marcescens* est naturellement résistante à la colistine (un antibiotique de la famille des polymyxines). Les souches

cliniques peuvent héberger des plasmides présentent souvent une résistance supplémentaire à divers antibiotiques (**Grimont et Grimont, 2006**).

Le « Quorum Sensing » (QS) est un système de communication bactérienne de cellule à cellule qui contrôle la production de facteurs de virulence chez de nombreuses bactéries dont *S. marcescens*. La formation de biofilms chez *S. marcescens* est dépendante du QS. Ce phénomène est lié à la libération par cette bactérie d'auto-inducteurs de type Homosérine Lactones (AHL), qui induisent l'expression de plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans la formation de biofilms (**Abbas et Elsherbini, 2018 ; Zhou et al ., 2019**).

### **III. Mélatonine**

La mélatonine est une hormone, découverte en 1917 par McCord et Allen, puis a été purifiée par Lerner en 1958 à partir de glandes pinéales bovines. La mélatonine ou « (N-acétyl-5-méthoxytryptamine » est une indole amine endogène largement répandue dans le monde animal et végétal (**Favero et al ., 2017**).

Chez les vertébrés, la mélatonine en circulation est en grande partie dérivée de la glande pinéale, bien qu'il existe d'autres organes comme le tractus gastro-intestinal, les follicules pileux épithéliaux, la peau, la rétine, les plaquettes et les lymphocytes produisant cette molécule (**Favero et al ., 2017**)

#### **III. 1. Biosynthèse de la mélatonine**

La mélatonine est obtenue à partir d'un acide aminé : le tryptophane. Celui-ci est tout d'abord transformé en sérotonine. Cette transformation comporte deux étapes : le L-tryptophane après avoir été capté par les cellules parenchymateuses épiphysaires selon un mécanisme de transport actif, subit dans un premier temps l'action du tryptophane hydroxylase, entraînant ainsi la production du L-5-Hydroxytryptophane (5-HTP) par hydroxylation. Puis ce dernier est transformé en sérotonine (5-Hydroxytryptamine ou 5-HT) par action de la 5-HTP décarboxylase. Au sein des pinéalocytes, la sérotonine subit alors l'action de la sérotonine N-acétyl-transférase (NAT) aboutissant ainsi à la N-acétylsérotonine. Enfin l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) permet d'obtenir la mélatonine (**Jeanty et al., 2011 ; Ménard, 2011**). La mélatonine sanguine se lie à 70% à l'albumine. La demi-vie d'absorption est de 0,4 heure et les taux augmentent dans le plasma au bout de 30 min à 3 heures (**Villette, 2017**).

### III. 2. Mécanisme d'action de la mélatonine

Comme les autres hormones, la mélatonine exerce ses effets cellulaires sur les tissus cibles en se liant à des récepteurs spécifiques. Deux classes distinctes de récepteurs de la mélatonine ont été rapportées jusqu'à présent (Naji *et al.*, 2004).

#### ➤ Les récepteurs membranaires

Les sites de liaison à la mélatonine dans l'organisme humain sont au nombre de 3 : MT1, MT2 et MT3. Les deux sous-types MT1 et MT2 sont des récepteurs couplés aux protéines G et appartiennent à un groupe de sites pharmacologiques, tandis que MT3 a été caractérisé comme enzyme participant à la protection contre le stress oxydatif, et appartient à un groupe de sites de basse affinité (Villette, 2017). La mélatonine exerce ses principaux effets *via* ses récepteurs de haute affinité MT1 et MT2 (MTR), exprimés au niveau du système nerveux central et au niveau des tissus périphériques (Hardeland *et al.*, 2006; Benleulmi, 2014).

#### ➤ Les récepteurs nucléaires :

La mélatonine, dotée d'une forte lipophilie, traverse facilement les membranes cellulaires (Ambroise-Thomas, 1998). Son récepteur nucléaire est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires RZR / ROR, constitué de trois sous-types ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) (Wang *et al.*., 2015). Le ROR $\alpha$  est largement exprimé dans les tissus périphériques, en particulier le foie et les muscles (Naji *et al.*, 2004). Les récepteurs nucléaires orphelins suggèrent que les effets immuno-modulateurs et anti-tumoraux dus à l'action intracellulaire des Mélatonine dépendent de la signalisation nucléaire (Wang *et al.*, 2015). Ceci aurait pour effet la régulation de l'expression d'enzymes anti-oxydantes, telles que la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GRd) et le superoxyde dismutase (SOD), et la régulation négative des enzymes pro-oxydantes, telles que les NOS, en particulier les iNOS (Sarti *et al.*., 2013).

### III. 3. Effets physiologiques de la mélatonine

#### III. 3. 1. Effets sur le système immunitaire

Les récepteurs mélatoninergiques sont exprimés par les lymphocytes et semblent être impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire (Devavry, 2011). Il a été rapporté que la mélatonine était produite au niveau des lymphocytes (Carrillo-Vico *et al.*, 2005) et que cette production était fortement liée à la sécrétion de l'interleukine-2 (Carrillo-Vico *et al.*, 2004). La figure 10 illustre le mode d'action intracrine, autocrine et paracrine de la mélatonine sur le système immunitaire.

#### III. 3. 2. Effets anti-oxydants et anti-mitotiques

La mélatonine inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires en réduisant la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF-kB et AP-1 et elle inhibe directement la iNOS et la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Ceci a pour effet d'atténuer le stress oxydatif et de réduire l'inflammation. La mélatonine préserve l'énergie cellulaire notamment en prévenant les mitochondries du stress nitro-oxydatif (**Figure 4**) (**Devavry, 2011**).

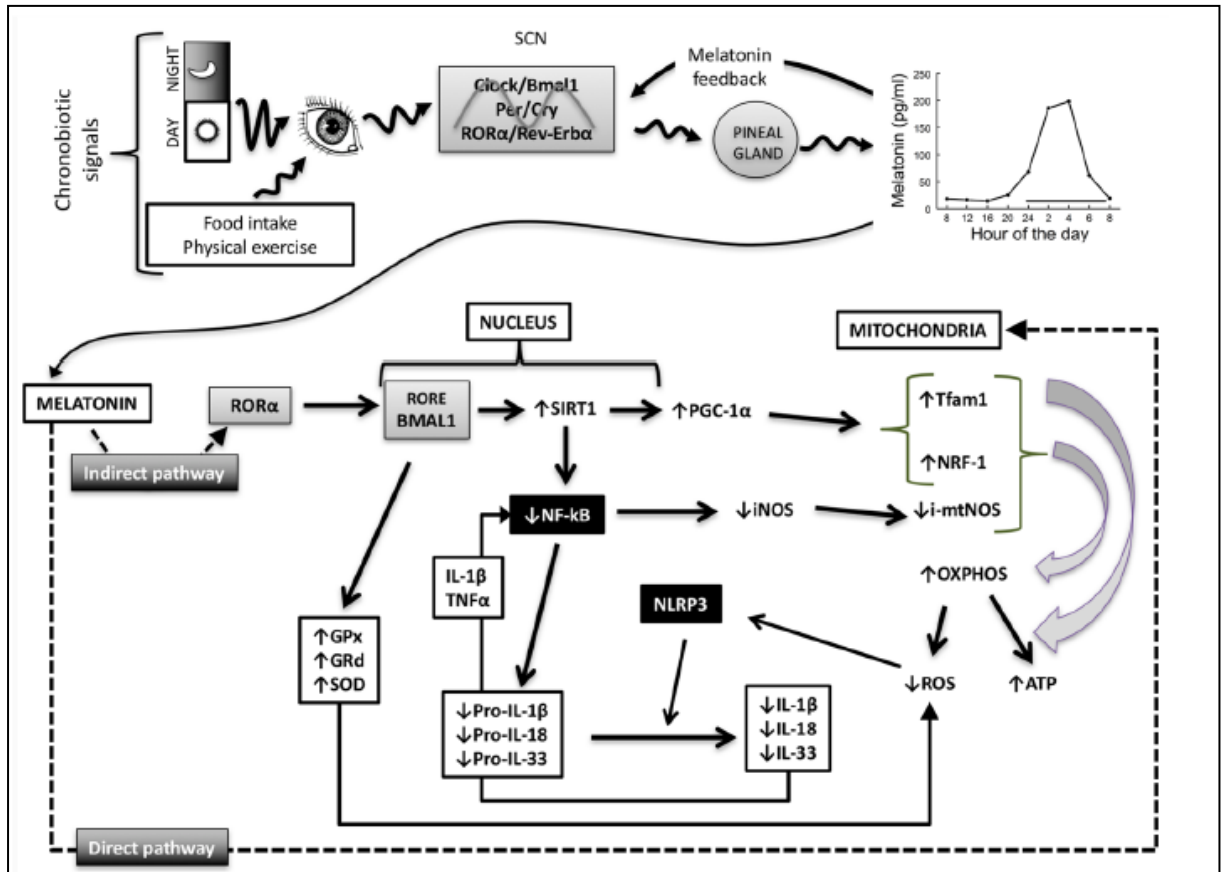
### **III. 3. Effets régulateurs de l'homéostasie mitochondriale**

La mélatonine s'accumule dans les mitochondries à des concentrations élevées, où elle élimine les ROS et les RNS. Elle protège également la cardiolipine de l'oxydation et prévient les complexes des chaînes respiratoires, ainsi que l'ADNmt des attaques des radicaux libres, protégeant ainsi le pore de transition de perméabilité membranaire (mPT), empêchant l'apoptose cellulaire (**Sarti et al., 2013**).

#### **1.6 Rôle thérapeutique de la mélatonine dans le sepsis**

Les effets bénéfiques de la mélatonine sur la septicémie semblent être liés à une inhibition du stress oxydatif, du stress nitrosatif, du dysfonctionnement mitochondrial et de l'inflammation (**Wei Hu et al., 2017**). Plusieurs études rapportent cet effet protecteur :

- La mélatonine inhibe les effets inflammatoire du LPS lors du choc septicémique sévère et d'atteintes d'organes (**Wei Hu et al., 2017**).
- Les récepteurs de la mélatonine améliore le pronostic vital après une septicémie polymicrobienne chez le rat et la souris (**Fink et al., 2014**).
- Chez les rats septiques, la mélatonine augmente l'activité du cytochrome c oxydase du myocarde et le taux de lactate dans le sang. Ceci va améliorer la fonction systolique cardiaque et abaisser le taux de mortalité (**Zhang et al., 2013**).



**Figure 4 :** Activités anti-inflammatoires de la mélatonine au cours du sepsis (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2017).

La mélatonine est libérée de manière rythmique et est contrôlée par l'horloge centrale, et qui à son tour exerce un rétrocontrôle sur cette l'horloge. Les effets de la mélatonine comprennent le renforcement de l'activité de SIRT1 (dépendante de BMAL1) et l'inhibition de l'activité NF-κB par sa liaison au récepteur RORα. En outre, la mélatonine agit directement sur les mitochondries, stimulant la production d'ATP et l'inhibition des radicaux libres. Ces effets maintiennent l'intégrité mitochondriales en empêchant l'ouverture du MPT. Ainsi, la mélatonine empêche l'activation de l'inflammasome NLRP3.

## **Matériel et Méthodes :**

Notre étude a été réalisée au niveau des laboratoires de pédagogies de la FSB de l'université de Blida 1 (laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire), le laboratoire de pharmacologie cellulaire et signalisation de la FSB-USTHB et le laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC d'Alger, durant une période de 5 mois du 15 février au 03 juillet 2019.

Notre travail a porté sur :

- ✓ l'étude de l'implication du stress oxydatif dans les altérations myocardique et spléniques induits par un sepsis monomicrobien à *Serratia marcescens*
- ✓ le rôle de la mélatonine dans la prévention du stress oxydatif et les altérations myocardiques et spléniques induits par sepsis monomicrobien.

Une étude microbiologique d'identification et de caractérisation de *S. marcescens* était nécessaire avant de procéder au protocole expérimental.

### **I. Matériel**

#### **I. 1. Matériel non biologique :**

La verrerie, les appareillages, les solutions et réactifs utilisés dans cette étude sont résumés dans l'**annexe 1**.

Nous avons utilisé une molécule synthétique de mélatonine fournie par FAGRON, Iberica S.A.U. Espagne.

#### **I. 2. Matériel biologique**

Dans notre travail, nous avons réalisé un modèle animal de sepsis monobactérien en utilisant deux souches de souris blanches (Swiss et BALB/c) et une bactérie à Gram négatif *Serratia marcescens*.

##### **➤ Animaux**

Le modèle murin de sepsis a été réalisé sur des souris males, âgées de 10 à 12 semaines (20-25g), fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie et l'animalerie de la FSB de l'USTHB. Deux souches de souris ont été utilisées :

- Des souris Swiss, *Mus musculus* (n=21)
- Des souris BALB/c (n=39)

Les souris ont été acclimatées à l'animalerie de l'Université Saad Dahleb de Blida 1, dans un environnement où la température moyenne était de 25 °C et l'humidité était ambiante. Le régime

alimentaire se limitait à un aliment granulé (glucides 49,80% ; protéines 34.50% ; lipides 10% et complexe minéral vitaminé : 5.70%) et à de l'eau du robinet.

Toutes les expériences ont été menées conformément au Comité d'Ethique de l'Université de Blida 1, et à la législation algérienne de la protection des animaux d'expérimentations utilisées à des fins scientifiques [loi n°12- 235/2012; Décret exécutif n° 10-90].

### ➤ **Agent infectant**

Le sepsis a été induit par une bactérie à Gram négatif, *Serratia marcescens*, isolée chez un homme de 64 ans, atteint d'un cancer du pancréas. La souche a été identifiée par galerie API20E, à partir d'un prélèvement de biofilm sur prothèse biliaire.

## **II. Méthodes**

### **II. 1. Caractérisation microbiologique de l'agent infectant**

#### **II. 1. 1. Identification biochimique**

La souche que nous avons utilisé, afin d'induire, le sepsis a été assignée à l'espèce *Serratia marcescens* sur la base d'une identification par galeries API 20E (Biomérieux) utilisées pour les entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif ; ce système d'identification comporte vingt tests biochimiques standardisés et miniaturisés qui sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant une durée d'incubation de 24h à 37°C se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition d'un réactif. La codification de ces réactions en un profil numérique permet, en se référant à un catalogue analytique, de déterminer l'identité des souches bactériennes.

#### **II. 1. 2. Etude du profil de résistance aux antibiotiques**

L'antibiogramme a été réalisé par la technique de diffusion sur milieu gélosé selon les normes préconisées par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM-2013). Le principe de cette méthode consiste à tester la sensibilité d'une souche bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé.

Cette méthode consiste à préparer une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique stérile à 0,9 %, à partir d'une culture de 24 heures sur gélose non sélective. La densité de cette suspension est ajustée entre 0,08 et 0,10 à 625 nm, ce qui correspond à  $10^8$  cellules/ml. La suspension est ensuite diluée à  $10^7$  cellules/ml etensemencée par écouvillonnage sur une gélose Mueller Hinton de 4 mm d'épaisseur. Les disques d'antibiotiques sont ensuite déposés sur la géloseensemencée, en les séparant d'un espace de 30 mm les uns des autres ; ceux utilisés pour *S. marcescens* sont résumés



dans le **tableau III** en **annexe 2**. Après prédiffusion pendant 15 minutes à température ambiante, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

La lecture est réalisée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle précise. Les résultats sont interprétés selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2010). Trois catégories de souches sont définies en fonction du diamètre des zones d'inhibition : Sensible (S), Intermédiaire (I) et Résistant (R).

Les résultats de l'antibiogramme sont validés en utilisant une souche de référence sensible (*E. coli* K12 BM21) aux antibiotiques.

### **II.1. 3. Etude du profil de virulence de l'agent infectant**

Afin de déterminer le profil de virulence de *S. marcescens*, nous avons recherché plusieurs facteurs de virulence liés à sa pathogénicité et donc à son pouvoir infectieux. Nous avons recherché sur le plan phénotypique : la capsule, la production de prodigiosine et d'hémolysine, la formation de biofilm ainsi que l'effet bactéricide du sérum humain. Par ailleurs, nous avons réalisé des tests de pathogénicité en déterminant la dose létale dans un modèle murin.

#### **II. 1. 3. 1. Recherche de la capsule polysaccharidique et de la prodigiosine**

La présence de la capsule a été recherchée par coloration à l'encre de Chine. Sur une lame, une goutte de suspension bactérienne est mélangée à une goutte d'encre de Chine. Le résultat est obtenu après une observation au microscope photonique. Si la bactérie est encapsulée, l'encre de Chine diffuse à travers la paroi et colore le cytoplasme en noir : la capsule apparaît alors comme un halo lumineux autour de la bactérie. Si la bactérie est non encapsulée, elle apparaîtra en noir dans sa totalité (**Wiskur et al., 2008**).

La prodigiosine est un pigment rouge issu du métabolisme de *Serratia marcescens*. Les souches productrices de ce pigment apparaissent sous forme de colonies rouges, après ensemencement dans la gélose Luria Bertani à 30°C pendant 24h (**Hardjito et al., 2002**).

#### **II. 1. 3. 2. Recherche du pouvoir hémolytique**

L'hémolysine est une cytolysine active sur les membranes plasmiques des cellules eucaryotes. La recherche de cette toxine s'est faite en utilisant du sang humain selon le protocole, légèrement modifié, de **Srinivasan et al. (2017)**.

Le sang frais est collecté dans un tube contenant du citrate comme anticoagulant. Les érythrocytes sont séparés du plasma riche en plaquettes par centrifugation à 3500 rpm pendant 15 min à 4°C puis lavés 3 fois avec du tampon PBS, pH 7.2. Les érythrocytes lavés sont alors

resuspendus dans du tampon PBS à une concentration finale de 2% et conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation.

La souche est cultivée dans du milieu LB puis incubée une nuit à 30°C. 500µL d'érythrocytes à 2% sont ajoutés au même volume de cette culture bactérienne, puis incubés à 37 °C pendant 2 h. Après centrifugation, l'activité hémolytique est mesurée dans le surnageant par spectrophotométrie à 405 nm (La densité optique est proportionnelle à l'hémoglobine libérée).

Le contrôle positif consiste à incuber les érythrocytes avec de l'eau distillée, alors que le contrôle négatif consiste à incuber les érythrocytes avec du PBS. Le pourcentage de lyse a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\frac{A_{405}(\text{échantillon}) - A_{405}(\text{Ctr négatif}) \times 100}{A_{405}(\text{Ctr positif}) - A_{405}(\text{Ctr négatif})}$$

A<sub>405</sub> : Absorbance à 405nm ; Ctr : control.

### II. 1.3. 3. Recherche de l'effet bactéricide du sérum humain

L'effet bactéricide du sérum humain par activation du complément a été étudié par une méthode décrite par **Fierer et al. (1972)** ; il s'agit de la méthode d'inoculation en « spot » sur milieu solide.

Une culture bactérienne en phase de croissance exponentielle diluée à 1/500 estensemencée par étalement sur gélose MH. Après absorption à température ambiante pendant 15 minutes, 50 µL de sérum sont déposés au centre de la boîte de culture. La présence ou l'absence de croissance bactérienne, observée à l'endroit du dépôt du sérum après incubation toute la nuit à 37°C, témoigne de la résistance ou de la sensibilité de la souche testée. La souche *E. coli* K12-BM21 sensible au sérum est utilisée comme témoin de l'activité du sérum.

Le sérum utilisé est préparé à partir du sang humain d'individus sains. Le sang est prélevé dans des tubes secs, puis incubés à température ambiante pendant 2 à 4 heures pour permettre la coagulation. Le caillot formé est enlevé avant de centrifuger le contenu des tubes à 120 000 rpm pendant 5 minutes. Le sérum obtenu est stérilisé par passage dans des microfiltres de 0.45µm, aliquoté puis conservé à -20°C.

### II.1. 3. 4. Recherche de la formation de Biofilm

Les biofilm sont recherchés à partir d'une culture d'une nuit à 30 °C dans du LB. Une dilution au 1/100 est réalisée (dans 200µL de LB), puis déposée dans une microplaque de 96 puits et incubée une nuit à 30 °C. Les biofilms sont colorés au cristal violet (0,1%) ; Le colorant est solubilisé avec de l'acide acétique glacial (33%) et mesuré par spectrophotométrie à 570-590nm (**Lin et al., 2010 ; Shanks et al., 2013**).

### **II. 1. 3. 5. Test de pathogénicité**

La virulence des souches de *S. marcescens* a été évaluée *in vivo* sur des souris infectées par voie intra-péritonéale. Les souris utilisées ont été des mâles de type BALB/c de 20-25g provenant de l'Institut Pasteur d'Algérie.

La culture de la souche bactérienne a été faite sur milieu LB à 30°C. Les souris ont reçu une injection de doses croissantes de bactéries en phase de croissance logarithmique, allant de  $10^6$  à  $10^8$  CFU dans 0.1 ml d'eau physiologique stérile. Un lot de 6 souris a été utilisé pour chaque concentration bactérienne et un lot témoin n'a reçu aucune injection. L'observation du nombre de morts s'est faite sur 7 jours et la DL50 a été calculée selon la méthode de **Reed et Muench, (1938)**.

### **II. 1. 3. 6. Dénombre des bactéries dans la rate**

La charge bactérienne dans les différents organes (Foie, rate, ganglions lymphatiques...) peut être déterminée en cultivant les homogénats tissulaires sur gélose. Ces organes sont théoriquement stériles, et la positivité d'une culture de leur homogénat indique une infection profonde du système. Il s'agit d'une méthode fiable pour estimer la virulence bactérienne.

Dans notre étude, nous avons recherché la présence bactérienne dans la rate de souris, après une injection en I. P. d'une dose  $10^6$  CFU dans 0.1 ml d'eau physiologique stérile de *S. marcescens*.

Après une homogénéisation de la rate (Protocole décrit dans la section **II. 2. 3. 1.**), une gamme de dilution de l'homogénat est réalisée de  $10^2$  à  $10^6$  tampon phosphate (50mM, pH 7.2). Chaque dilution estensemencée sur gélose nutritive, en déposant un spot de 20µL (2 boîtes de Pétri sontensemencées pour chaque dilution). Après absorption à température ambiante pendant 15 minutes, les géloses sont incubées à 37°C pendant 24h. Le nombre CFU dans chaque boîte est obtenu après dénombrement de toutes les colonies bactériennes. La charge bactérienne est calculée selon la formule suivante : Moyenne des CFU x dilution x 50 (**Barquero-Calvo et al., 2013**).

## **II. 2. Etude de l'effet de la mélatonine sur le stress oxydatif induit par sepsis :**

### **II. 2. 1. Modèle murin de sepsis monomicrobien :**

Les injections intraveineuses ou intrapéritonéales de bactéries vivantes, sont souvent utilisées pour induire le sepsis dans les modèles murins. *E. coli* est généralement utilisé pour mimer le sepsis à Gram négatif, alors que les Staphylocoques sont utilisés pour celui des Gram positif (**Lewis et al., 2016**).

Dans notre travail de recherche, nous avons développé un modèle de sepsis monobactérien original sur deux souches de souris blanches Swiss et BALB/c. Notre modèle est le premier modèle murin de sepsis monomicrobien utilisant *S. marcescens*. Le choix de *S. marcescens* revient à

l'augmentation de la fréquence des infections nosocomiales et néonatale à *S. marcescens* dans les unités de soins intensifs, en plus de sa multirésistance limitant le choix thérapeutique (**Cristina et al., 2019**).

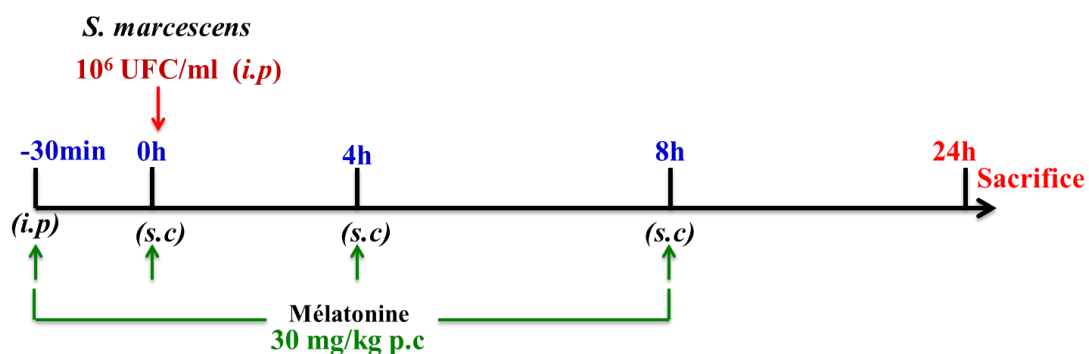
## II. 2. 2. Protocole pharmacologique :

Les souris blanche Swiss et BALB/c ont été réparties en trois lots (**Figure 5**) :

1. Lots contrôle (n=7) : n'ayant reçu aucun traitement.
2. Lots septiques (n=7) : ont reçu en intrapéritonéale 100 µL d'une suspension de *S. marcescens*, à dose sub létale de  $10^6$  UFC/ml, préparée dans de l'eau physiologique stérile.
3. Lots septique traités à la mélatonine (n=7) : ont reçu 3 doses de 30 mg/kg de mélatonine, dissoute dans 0,25% d'éthanol/eau physiologique stérile, réparties comme suit (**Ortiz et al., 2014**) (**Figure 5**):
  - Une première dose 30 min avant l'injection de *S. marcescens* (i.p),
  - Une deuxième dose au même moment de l'injection de *S. marcescens* (s.c),
  - Une troisième dose 4 h après l'injection *S. marcescens* (s.c).

Les animaux ont été sacrifiés 24 h après l'injection bactérienne et les cœurs, les rates et les mésentères ont été rapidement prélevés, lavés dans une solution froide de NaCl à 0,9 % et préparés pour l'étude biochimique et histologique.

Le sang a été prélevé par ponction cardiaque sur tube EDTA afin de déterminer la formule d'énumération sanguine (FNS) et de réaliser un frottis sanguin.



**Figure 5** : Protocole expérimental chez les souris swiss et BALB/c. *i.p.*, voie intrapéritonéale. *s.c.*, voie sous-cutanée. UFC, Unité Formant Colonie.

## II. 2. 3. Etude biochimiques

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

Les tissus cardiaques et spléniques ont été homogénéisés à 4°C, à 800 rpm en utilisant un homogénéisateur SS2 avec un pilon en Téflon, dans 10 volumes de tampon phosphate (50mM, pH

7.2) contenant 0,5% de Triton x100. Après trois cycles de congélation-décongélation, les homogénats sont centrifugés 20 min à 10000g/4°C. Les surnageants sont récupérés puis aliquotés et conservés à -40 C°, jusqu'à utilisation (**Blandizzi et al., 2005**).

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

La concentration des protéines cardiaques est mesurée par la méthode colorimétrique de Bradford. Cette méthode est basée sur l'interaction du bleu de coomassie G250 avec les protéines, formant un complexe de couleur bleu qui absorbe fortement à 595 nm. La concentration protéique est proportionnelle à l'intensité de l'absorption, elle est déterminée à partir d'une courbe étalon établie au préalable avec la protéine BSA à 0.1% (**Bradford, 1976**).

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

Nous avons recherchés plusieurs marqueurs biochimiques du stress oxydatif, à partir des homogénats de tissus cardiaque en dosant:

- Les marqueurs pro-oxydants : la myéloperoxydase (MPO, enzyme marqueur de l'infiltration des neutrophiles), et le malondialdéhyde (MDA, marqueur de la peroxydation lipidique),
- Les marqueurs antioxydants : la catalase (CAT, enzyme du système antioxydant cellulaire), et le glutathion réduit (GSH, du système antioxydant non enzymatique).

### **III. 3. 3. 1. Dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO)**

La MPO est une peroxydase caractéristique des granules primaires des Polynucléaires Neutrophiles (PN) (**Serteyn et al., 2003**). Nous avons donc recherché l'infiltration des tissus par les PN en dosant l'activité peroxydase de la MPO. Cette dernière oxyde l'orthodianisidine (substrat chromogène) en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et en milieu acide. L'orthodianisidine oxydée absorbe fortement à 460 nm. De ce fait, L'activité MPO est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 460nm (**Krawisz et al., 1984**).

Pour ce faire, sur une plaque 96 puits 20µL d'homogénat cardiaque sont mélangés avec milieu réactionnel contenant : 67µL de PBS 80mM pH5.4, 56µL de PBS 0.22M pH 5.4 et 10µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0.0017%. La réaction est déclenchée par l'addition de 13µL d'ortho à 18,4mM. La cinétique de la réaction est suivie pendant 10 min à 30°C. L'activité MPO est exprimée en µmoles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformées/min/mg de protéines.

### **III. 3. 3. 2. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)**

Le malondialdéhyde (MDA) est un index direct de la peroxydation lipidique. La méthode est basée sur la détermination, par spectrophotométrie à 532nm, de l'intensité de la couleur rose,

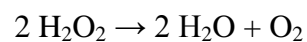
produite après réaction de deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) avec les peroxydes lipidiques ou les espèces réactives de TBA (TBARS) entre autre le MDA (**Lefèvre et al., 1998**).

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

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

### **III. 3. 3. 3. Dosage de l'activité catalase**

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



Le dosage de l'activité catalase a été effectué, par suivi de la cinétique de transformation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et oxygène.

50µl d'homogénat tissulaire sont mélangés à 950 µL de tampon phosphate 50mM, pH 7.0. La réaction est déclenchée par l'addition de 500 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM. La cinétique de la réaction est suivie pendant 2 min à 25°C. L'activité de la catalase est mesurée par une diminution de l'absorbance à 240nm, elle est exprimée en U/min/mg de protéines (**Aebi, 1984**).

Une unité de catalase correspond à K/6,93x10<sup>3</sup>.  $K = (2,3/t) (\log A1/A2)$  où t : temps en seconde ; A1 : Absorbance à temps zéro et A2 : Absorbance à 2 minutes.

### **III. 3. 3. 4. Dosage du taux de glutathion réduit (GSH)**

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

Pour ce faire, 60µL d'homogénat tissulaire sont mélangés avec 60µL d'acide sulfosalicylique 5% à 4°C puis vortexés et incubés pendant 1heure à 4°C. Après centrifugation à 3000g, pendant 10min/4°C, 50µL de surnageant sont mélangés au milieu réactionnel contenant 200µL de tampon phosphate 0.2M, pH 8 et 10µL de réactif d'Ellman 0.01M. Le mélange est incubé pendant 5 min à

l'abri de la lumière avant la lecture de la densité optique à 405 nm. La concentration tissulaire en GSH est exprimée en  $\mu\text{moles/mg}$  de protéines (**Padmondabhan et al., 2006**).

#### **II. 2. 4. Etude histologique**

Le cœur, la rate des souris furent découpés puis fixés dans du formol tamponné à 4% pendant 24h. Les pièces ont été déshydratées par passage successifs dans des bains d'alcools à degrés croissants (70°, 90° et 100°) suivis d'un bain de toluène.

Des blocs ont été confectionnés, après imprégnation des fragments fixés à la paraffine. Des coupes de 5 $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été faites à l'aide d'un microtome (Américain Optical) et colorées à l'hématoxyline-éosine (**Martoja et Martoja, 1967**).

Le mésentère fixé dans du formol à 4% pendant 24h est lavé à l'aide d'une solution de PBS pH 7.4. Il est étalé sur lame puis coloré à l'hématoxyline- éosine.

Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope muni de caméra numérique. Les protocoles histologiques sont décrits en détail dans l'**annexe 2**.

#### **II. 2. 5. Etude de formules sanguines par coloration au May-Gründwald-Giemsa (MGG)**

L'étude fine des Formules sanguines se fait au microscope après coloration au May-Gründwald-Giemsa (MGG).

Une goutte de sang, prélevé sur tube EDTA, est étalée uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche de cellules. Le frottis est ensuite séché rapidement à l'abri des poussières. Il est ensuite fixé par May-Grünwald pendant 3 min puis coloré par Giemsa pendant 15 min et lavé à l'eau courante. Les lames sont séchées puis observées au microscope grossissement Gx100 et Gx400.

#### **II. 3. Etude statistique**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Le logiciel GraphPad Prism v. 6.0 est utilisé pour analyser les données.

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

## **Résultats et Discussion :**

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche fondamentale des mécanismes à l'origine du processus physiopathologique du sepsis, et lié aux infections par des germes nosocomiaux pathogènes opportunistes. Pour ce faire nous avons élaboré un modèle murin de sepsis monobactérien à *S. marcescens*. L'interprétation et la discussion des résultats se feront comme suit :

1. Nous décrirons, d'abord, des caractères microbiologiques de la souche *Serratia marcescens*, objet de notre étude. Son profil de résistance aux antibiotiques, de virulence et de pathogénicité seront discutés.
2. Ensuite nous procéderons à l'analyse des propriétés biochimiques et histologiques du modèle murin de sepsis induit par *Serratia marcescens*, chez des souris Swiss et BALB/c.
3. Enfin nous discuterons l'effet de la mélatonine sur la prévention du stress oxydatif et des altérations myocardiques et spléniques induits par ce sepsis.

### **I. Caractéristiques microbiologique de l'agent inducteur**

*Serratia marcescens* est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est ubiquitaire, retrouvé aussi bien dans l'environnement (eau, sol, plantes) en tant que saprophyte, qu'associée à la flore microbienne de l'homme en tant que commensal. *S. marcescens* est aussi un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales et communautaires, particulièrement chez l'individu jeune ou âgé et les immunodéprimés. Les taux de mortalité causées par *S. marcescens* atteignent 41% dans certains pays comme l'Amérique du nord (**Grimont et Grimont, 2006 ; González-Juarbe et al., 2015**).

*S. marcescens* peut causer des infections graves chez les patients en soins intensifs telles que les pneumonies, les bactériémies et les infections urinaires, oculaires et sur sites opératoires. Peu d'informations sont disponibles concernant le pouvoir pathogène de cette bactérie (**González-Juarbe et al., 2015**). Si l'antibiorésistance et ses mécanismes chez cette espèce sont largement étudiés, très peu d'informations sont disponibles concernant la virulence de *S. marcescens*. Toutefois, il semblerait que la virulence de cette souche soit liée principalement à l'expression d'adhésines fimbriaires, de l'hémolysine et d'enzymes.

La bactérie utilisée dans le modèle murin de sepsis correspond à l'espèce *S. marcescens*. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette souche a été isolée à partir d'une prothèse biliaire d'un patient atteint d'un cancer du pancréas. Une autre espèce a été identifiée sur la même prothèse, il s'agit de *Morganella morganii*.



L'identification biochimique a été réalisée par le système miniaturisé API 20<sup>E</sup>. *S. marsescens* est une bactérie oxydase négative, catalase positive, elle est positive pour la réaction de Voges-Proskauer (VP +) et L'orthonitrophényl-β-galactoside (ONPG +), elle ne possède pas d'Arginine dihydrolase (ADH -), ni de Tryptophan Deaminase (TDA -), ni d'uréase (URE -), elle ne produit pas d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S -) (Grimont et Grimont, 2006). L'ensemble des caractères biochimiques et culturaux d'identification de l'espèce *Serratia marsescens* sont résumés dans le **tableau VIII en annexe 3**.

*S. marsescens* se développe en aéro-anaérobie, sur des milieux ordinaires d'isolement pour les entérobactéries (Trypticase Soja, MacConkey, Hektoen, Luria Bertani.....). Au cours de notre étude, la souche de *S. marsescens* utilisée a été cultivée dans le bouillon Luria Bertani afin d'optimiser l'expression des facteurs de virulence. Sur gélose Muller Hinton, les colonies étaient d'un diamètre d'environ 3 mm, opaques, circulaires et convexes. Elles présentaient aussi le phénotype « Swarming » mouvement caractéristique de cette espèce (**Figure 6**).



**Figure 6** : Culture sur gélose Muller Hinton de *Serratia marsescens* par la méthode d'ensemencement en quatre quadrants (**Originale**).

### **I. 1. Profil de résistance aux antibiotiques**

*S. marsescens* a été soumise à un antibiogramme dont la lecture a été faite en suivant les recommandations du Comité d' Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-

SFM, 2013). Les résultats indiquent que cette souche est résistante à 4 molécules d'antibiotiques appartenant à 2 familles :

- $\beta$ -lactamines : ampicilline (AM), amoxicilline (AMX), céfazoline
- Polypeptide : colistine (Cs)

Le profil de résistance aux antibiotiques de *S. marcescens* est donc le suivant : PR : AM, AMC, CZ, Cs.

Le phénotype de résistance que nous avons obtenu est un phénotype sauvage, puisque *S. marcescens* est présente une multirésistance naturelle à de nombreux antibiotiques particulièrement aux  $\beta$  lactamines. En effet, comme toutes les entérobactéries, *S. marcescens* présente une résistance naturelle à la pénicilline G, aux macrolides, à la clindamycine et aux glycopeptides. De plus, elle résiste naturellement aux polymyxines, aux aminopénicillines et aux C1G et C2G par production d'une céphalosporinase d'origine chromosomique inductible AmpC (**Hejazi et Falkiner, 1997 ; Mahlen, 2011**).

La souche que nous avons utilisé ne semble pas avoir de résistance acquise, du moins pas aux antibiotiques que nous avons testé. L'apparition de la résistance est la conséquence d'une pression de sélection exercée par les antibiotiques utilisés en continu. Ce phénotype est dû à des modifications génétiques soit aux mutations chromosomiques, soit par acquisition de gènes étrangers portés sur des éléments mobiles transférables (**Gazengel, 2013**). Il est important de rappeler que cette souche a été isolée chez un patient atteint de cancer du pancréas. Ce patient était en aplasie et présentait une neutropénie fébrile due aux cycles de chimiothérapie qu'il subissait. Cet état d'immunodépression contribue fortement au développement d'infection à germes pathogènes opportunistes endogènes appartenant à la flore commensale comme *S. marcescens* (**Goyette, 2012**). Les germes commensaux endogènes sont par définition sensibles aux antibiotiques à large spectre.

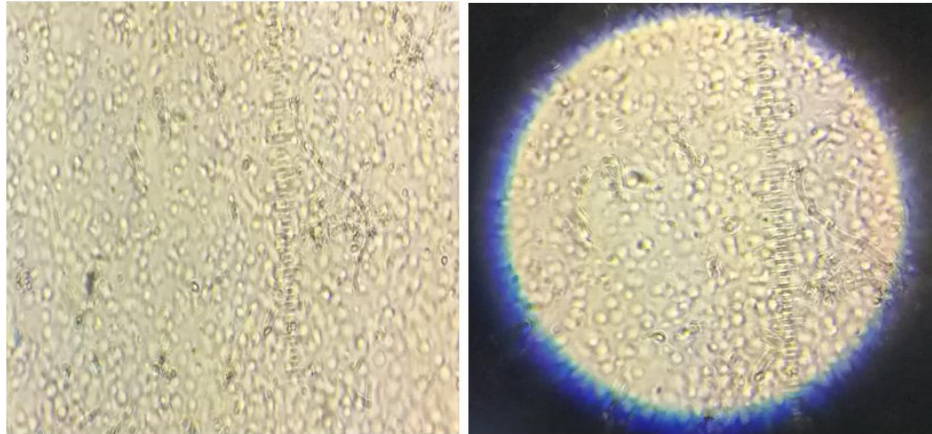
## **I. 2. Profil de virulence**

L'étude de la virulence chez *S. marcescens* a concerné la recherche deux types de facteurs parmi les entérobactéries :

- Les facteurs de virulence communs et qui comprenaient la résistance au système du complément (sérum humain), le pouvoir hémolytique et la formation de biofilm.
- Les facteurs de virulence spécifiques et qui comprenaient la capsule, la production de prodigiosine et le mouvement swarming.

La recherche de la capsule chez *S. marcescens* fut très laborieuse essentiellement du fait de microscopes défectueux. En effet, après de nombreuses tentatives, il nous semble avoir aperçu, sous

microscope photonique (grossissement x 40 et x 100), après contre coloration à l'encre de Chine un halo lumineux autour du cytoplasme (**Figure 7**).



**Figure 7** : Mise en évidence de la capsule de *Serratia marcescens* par la méthode de contre coloration à l'encre de chine (G x 100) (**Originale**).

Cependant, une nouvelle recherche en testant d'autres protocoles est nécessaire pour confirmer la présence de la capsule. Etant non ionique, cette dernière est difficilement colorée, seule la contre coloration peut la révéler. **Hughes et Smith (2007)** décrivent un procédé intéressant utilisant le rouge Congo et la solution de Maneval.

La solution de Maneval possède des propriétés importantes qui améliorent la mise en évidence de la capsule. Le chlorure de fer contenu dans la solution constitue un bon fixateur, associé au phénol il augmente la pénétration du colorant dans le cytoplasme. L'acide acétique glacial diminue le pH, et l'acidité générée contribue au virement de la couleur rouge du rouge Congo au bleu. C'est ce qui crée le contraste entre le cytoplasme (en bleu) et la capsule (halo lumineux) (**Hughes et Smith, 2007**).



Les résultats montrent que *S. marsecens* est résistante au système du complément. En effet, cette bactérie pousse à l'endroit du dépôt du sérum humain et aucune zone d'inhibition n'a été observée. *S. marsecens* utilisée dans notre étude est de phénotype « R » (**Figure 9**).



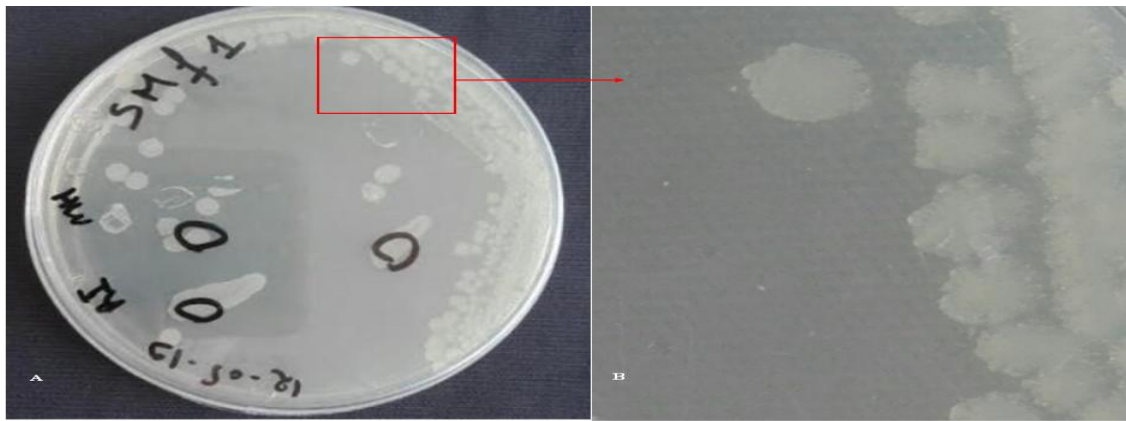
**Figure 9** : Résultats de la recherche de l'effet bactéricide du sérum humain sur nos souches (Originale).

A : phénotype sensible au sérum (S) ; B : phénotype résistant au sérum (R).

Il y a très peu d'informations concernant ce facteur de virulence, toutefois, **Anderson et al. (2017)** ont observé une diminution significative du taux de survie et de répllication en présence de sérum humain, chez des mutants dans les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (*pfkA*). Il est pertinent de rapporter que ceci fut aussi associé à une perte de la capsule chez ces mutants, une capsule qui est connue pour conférer la résistance au système du complément et à la phagocytose chez les entérobactéries.

La résistance au système du complément est l'apanage des bactéries pathogènes invasives qui causent des infections profondes du système (speticémie). Cette résistance pourrait s'expliquer par la présence de structures bactériennes telles que la capsule, le LPS et les protéines de la membrane externe (**Doorduyn et al ., 2016**).

La prodigiosine, pigment rouge produit par certaine souche de *S. marsecens*, n'a pas été détectée comme nous pouvons le voir sur la **Figure 10**. Les colonies sont blanches, convexes et à bordures irrégulières. De plus, le mouvement « Swarming » est observé. Il s'agit d'un mouvement de translation coordonné qui entraine la formation de dendrites à partir du point d'ensemencement.

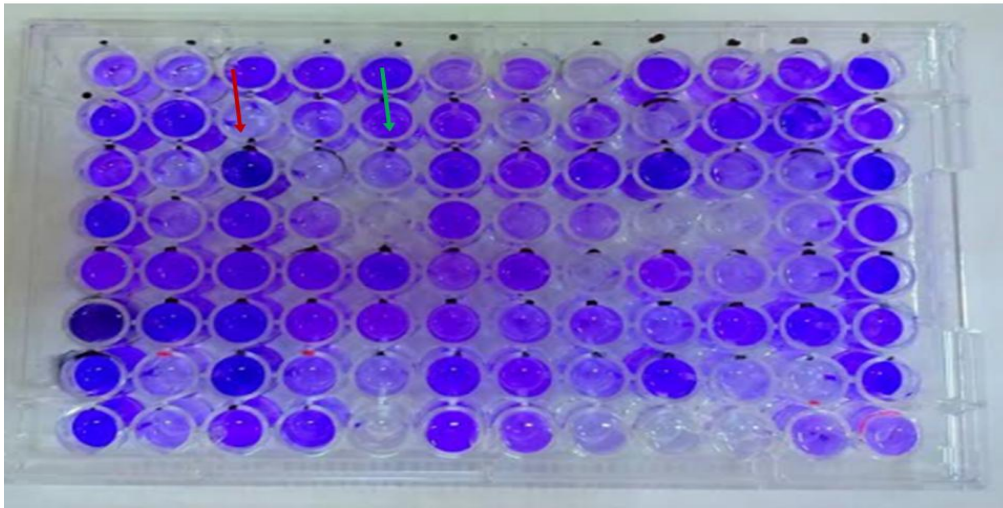


**Figure 10** : Culture de *Serratia marcescens* sur gélose Muller Hinton (**Originale**).

(A) Ensemencement par la technique des 4 quadrants ; (B) Grossissement de la zone en rouge pour la visualisation du mouvement « Swarming »

La Prodigiosine est un métabolite secondaire de couleur rouge produit principalement par la bactérie *Serratia marcescens*. Cette molécule présente des activités antitumorales, immunosuppressives, antibiotiques, antifongiques et antipaludiques. La production de ce pigment est dépendant de nombreux facteurs, qui limitent de façon importante sa mise en évidence en laboratoire. Parmi ces facteurs nous retrouvons essentiellement le milieu de culture, leur pH et la température d'incubation. Il fut rapporté que les souches produisant la prodigiosine sont généralement environnementales, possédant moins de pouvoir de pathogénicité et étant plus sensibles aux antibiotiques (**Darshan et Manonmani, 2015**).

Les résultats de la recherche de la formation de biofilm montrent que *S. marcescens* forme un biofilm de forte intensité. En effet, la densité optique du cristal violet retenu par les bactéries adhérentes était de 1.38 (**Figure 11**)



**Figure 11** : Résultat de la recherche de la formation de biofilm par au cristal violet sur microplaque de 96 puits (**Originale**).

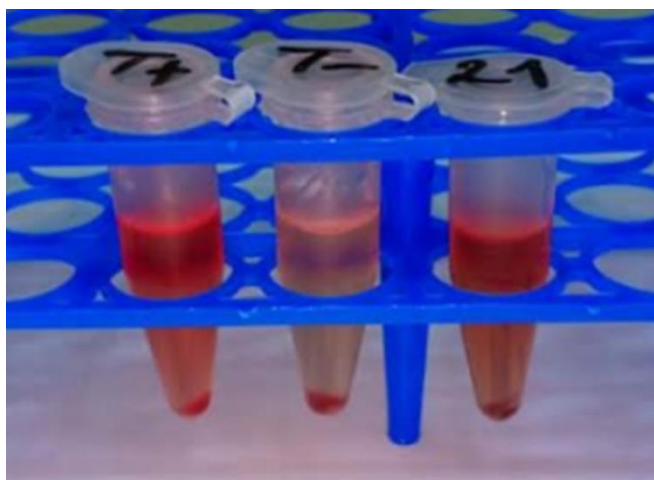
**Flèche rouge** : biofilm de forte intensité ; **Flèche verte** : Biofilm de faible intensité

De nombreuses études mettent l'accent sur le problème que constitue le développement d'une telle structure dans la pathogénèse des infections. En effet, ce mode d'organisation promeut la persistance des bactéries dans l'organisme et favorise donc la survenue et la récurrence des infections. Plusieurs études rapportent la formation de biofilm par *Serratia marcescens* notamment, **Shanks et al. (2007)** et **(2013)**. La formation de biofilm semble être dépendante de la signalisation cellulaire par Quorum Sensing (QS). En effet, Lorsque les bactéries atteignent une masse critique (Le quorum), les molécules de signalisation, N-acylhomosérine lactone (AHL), sont libérées ce qui permet à *S. marcescens* de répondre à son environnement (**Wei et al., 2006**).

**Coulthurst et al. (2006)** indiquent, par exemple, que le système Smal/Smar de *S. marcescens* régule la motilité par essaimage (Swarming), l'activité hémolytique, la formation de biofilm, la production de chitinase et la caséinase. Ce système régule également la production de la prodigiosine et la biosynthèse des carbapénèmes (**Thomson et al., 2000**).

Le quorum sensing semble jouer un rôle important dans la pathogénèse et la régulation de la production de biofilm chez *S. marcescens*. En effet, **Shanks et al. (2007)** ont rapporté que le gène *oxyR*, codant un facteur de transcription, permet à cette espèce de résister au stress oxydatif induit au cours d'une infection. La réponse au stress oxydatif est dépendante du QS et jouerait un rôle essentiel dans la formation de biofilm chez *S. marcescens* (**Pinna et al., 2011**).

*S. marcescens* semble avoir un important pouvoir hémolytique. Le pourcentage d'hémolyse était de 77% (**Figure 12**). Ceci est probablement dû à la production d'une hémolysine de la famille des « PFT » de type ShlA.



**Figure 12** : Activité hémolytique d'une souche d'*E. coli* (**Originale**).

**Témoin positif** : Erythrocytes + SDS ; **Témoin négatif** : Erythrocytes + PBS.

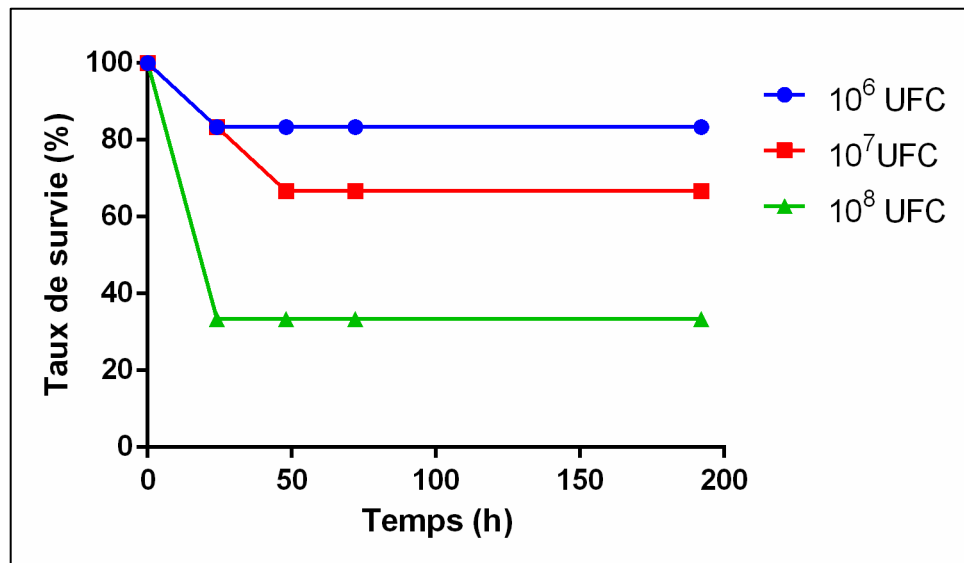
La quasi-totalité des souches de *S. marcescens* produisent des cytolysines dont les hémolysines qui causent la lyse des érythrocytes et la libération de médiateurs inflammatoires tels que les leucotriènes et l'histamine (**Konig et al., 1987 ; Marrè et al., 1989**). L'hémolysine produite par *S. marcescens* est nommée ShlA. Elle est produite sous forme inactive puis est transportée au périplasme par un système sec-dépendant. L'activation et la sécrétion de l'hémolysine ShlA sont effectuées par la protéine ShlyB (**Hertel, 2000 ; Franzon et Santos, 2004**). L'hémolysine de *S. marcescens* est un important facteur de virulence. Elle contribue fortement à la colonisation des épithéliums, à l'établissement de l'infection et sa sévérité, comme se fut rapporté dans des modèles murins d'infection ou des expériences de culture cellulaire (**Hertle et al., 1999 ; González-Juarbe et al., 2015**).

A la lumière des résultats obtenus dans ce volet, nous constatons que *S. marcescens* isolée chez les patients cancéreux, présente un potentiel de virulence certain. En plus des niveaux de résistance naturelle aux antibiotiques, il semblerait aussi que cette bactérie soit capable de survivre dans le sang du fait de sa résistance au puissant système du complément. De plus, par sa capacité à former un biofilm, *S. marcescens* est protégée contre les défenses de l'hôte (déjà affaiblies chez le cancéreux), elle peut persister et disséminer dans tout l'organisme hôte.

Ce potentiel de virulence a été mis à l'épreuve, pour l'espèce *S. marcescens*, en évaluant sa pathogénicité sur modèle murin utilisant des souris BLAB/C. La dose létale 50 ou « DL50 » a été



mesurée. Trois concentrations ont été testées :  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  CFU. Chaque lot se composait de 6 souris. Les résultats de l'estimation de la DL50 chez une souche de *S. marcescens* sont illustrés dans la **figure 13**.



**Figure 13** : Taux de survie des souris BALB/c au sepsis induit par différentes doses de *Serratia marcescens*  $10^6$ ,  $10^7$ , et  $10^8$  UFC/mL.

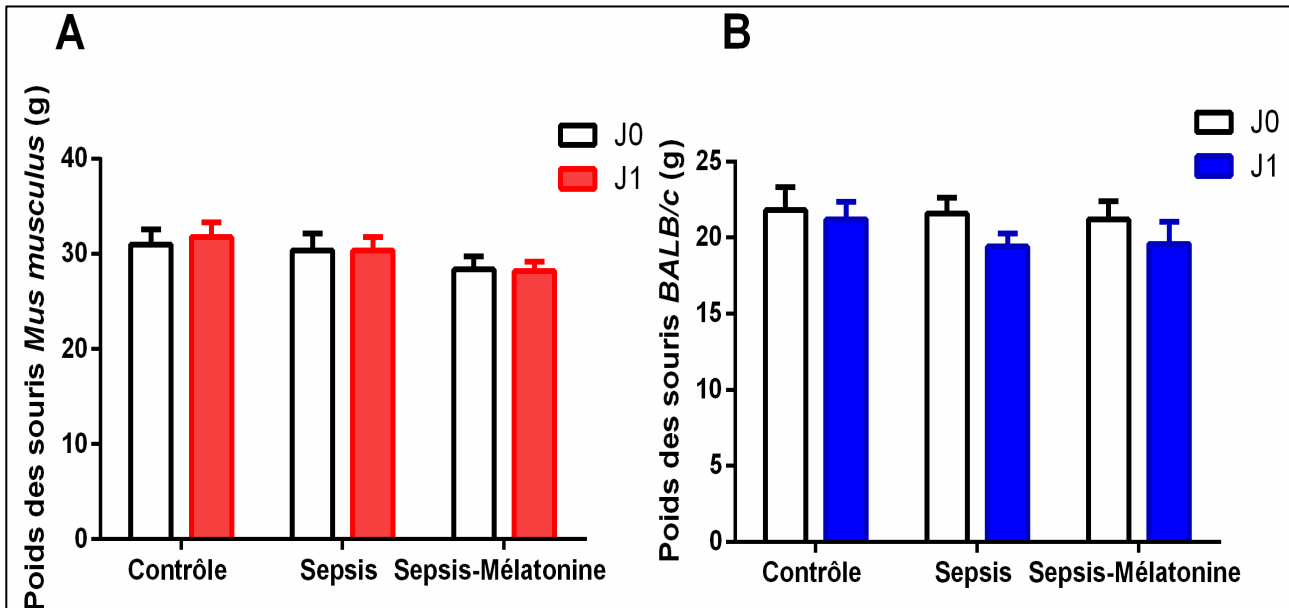
L'injection de différentes doses de *S. marcescens* montre une mortalité de 16,66% à  $10^6$  UFC/100 $\mu$ L, de 33,33% à  $10^7$  UFC/100 $\mu$ L et de 66,66% à  $10^8$  UFC/100 $\mu$ L après 24h. Le taux de mortalité augmente à 33,33% pour la dose de  $10^7$  UFC/100 $\mu$ L alors qu'aucun changement n'a été observé pour les 2 autres doses. La DL50 a été estimée entre  $10^7$  et  $10^8$  UFC/100 $\mu$ L. La DL50 que nous avons obtenu est plus faible comparés à celle de **Horri et al. (1998)**, **Lin et al. (2010)**, **Anderson et al. (2017)** et **Srinivasant et al. (2017)**. Ceci indique que notre souches pourrait être plus virulente, puisque des doses plus faible induisent une mortalité.

## II. Etude d'un modèle murin de sepsis monobactérien à *S. marcescens* et de l'effet de la mélatonine sur ce sepsis

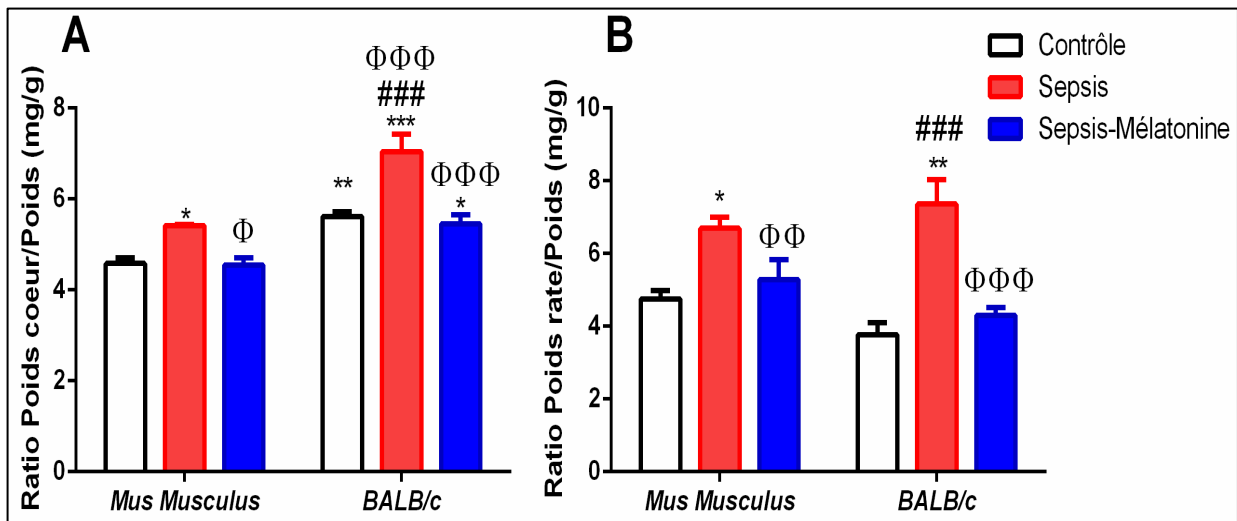
En se basant sur les résultats de la pathogénicité de *S. marcescens*, la dose que nous avons choisie pour induire le sepsis est une dose sub-létale de  $10^6$ UFC/mL qui induit une mortalité de 16,66%, un taux similaire de celui observé chez les patients septique.

## II. 1. Effet de *S. marcescens* et de la mélatonine sur le poids des souris et des organes (cœur, rate)

La perte de poids peut être le signe d'une maladie sous-jacente parfois grave telle que les maladies infectieuses dont le sepsis. Cette perte de poids pourrait être expliquée par la forte demande d'énergie exercée sur l'organisme pour combattre l'agent pathogène. Les résultats de l'effet du sepsis sur le poids des souris, du cœur et de la rate sont illustrés dans les figures 14 et 15.



**Figure 14 :** Effet des différents traitements sur le poids des souris. **A**, poids des souris *Mus musculus* à J0 et J1. **B**, poids des souris BALB/c à J0 et à J1.



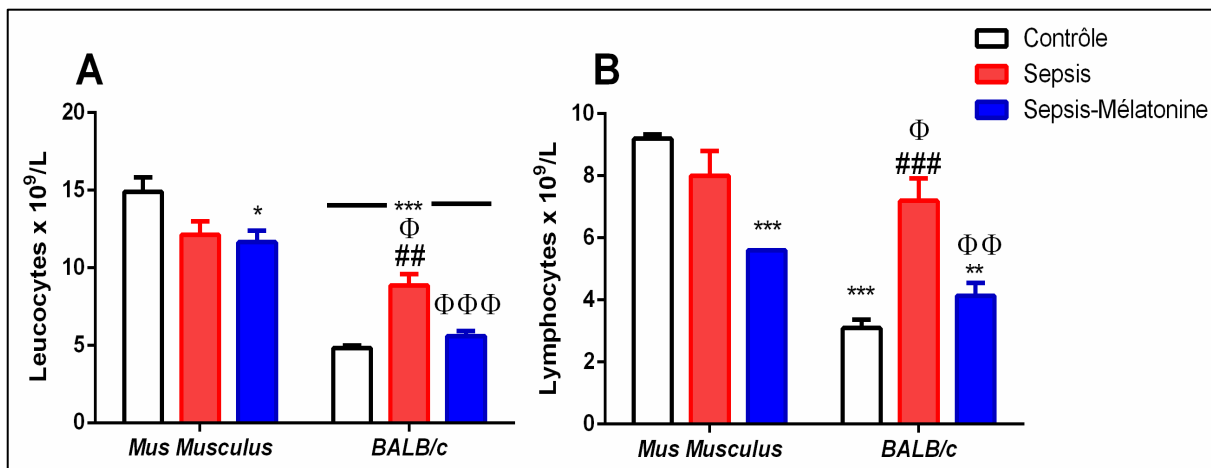
**Figure 15 :** Effet des différents traitements sur le poids du cœur et de la rate. **A**, ratio poids du cœur/ poids des souris. **B**, ratio poids de la rate/ poids des souris. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , et \*\*\* $P < 0.001$  versus Contrôle souris blanche; #### $P < 0.001$  versus contrôle BALB/c;  $\Phi P < 0.05$ ,  $\Phi\Phi P < 0.01$ , and  $\Phi\Phi\Phi P < 0.001$  versus sepsis.

Les résultats de notre étude montrent que le poids des animaux reste inchangés après 24h de traitement chez tous les lots de souris Swiss et BALB/c (**Figure 14**). Nos résultats sont différents des travaux de **Rozenberg et al. (2006)** et **Rahim (2009)** dans d'autres modèles de sepsis. Ces résultats pourraient être expliqués par le délai de traitement qui était court (24h) mais suffisant pour induire un sepsis.

Nous avons également observé une augmentation du poids du cœur et de la rate chez les souris septiques des deux souches Swiss et BALB/c. L'augmentation était plus élevée chez les souris BALB/c comparées aux souris Swiss (**Figure 15**). Les augmentations respectives des poids des cœurs et des rates des souris Swiss comparées aux BALB/c sont de 18, 12% vs 25,5% et de 41, 05% vs 95,22%. Ces résultats reflètent une hypertrophie cardiaque et une splénomégalie induite par le sepsis. Ces résultats concordent avec ceux de **Rozenberg et al. (2006)** et **Rahim (2009)** qui ont démontré, dans différents modèles de sepsis, une hypertrophie cardiaque après 24h. L'hypertrophie cardiaque suggère une dilatation et une altération des propriétés contractiles ventriculaires tandis que la splénomégalie de la rate, organe lymphoïde secondaire, suggère une augmentation du volume de la rate signe de réponse immunitaire et inflammatoire.

## II. 2. Effet de *S. marcescens* et de la mélatonine sur le taux de leucocytes et lymphocytes sanguins

Les souris BALB/c présentaient des taux de leucocytes et de lymphocytes basaux inférieurs de 67,8% et de 66,3% comparées aux souris Swiss. Les taux respectifs de leucocytes et de lymphocytes de souris BALB/c contre les souris Swiss étaient de  $4,8 \pm 0,4 \times 10^9/L$  vs  $14,9 \pm 2,1 \times 10^9/L$  et de  $9,2 \pm 0,3 \times 10^9/L$  vs  $3,1 \pm 0,6 \times 10^9/L$  (**Figure 16**).

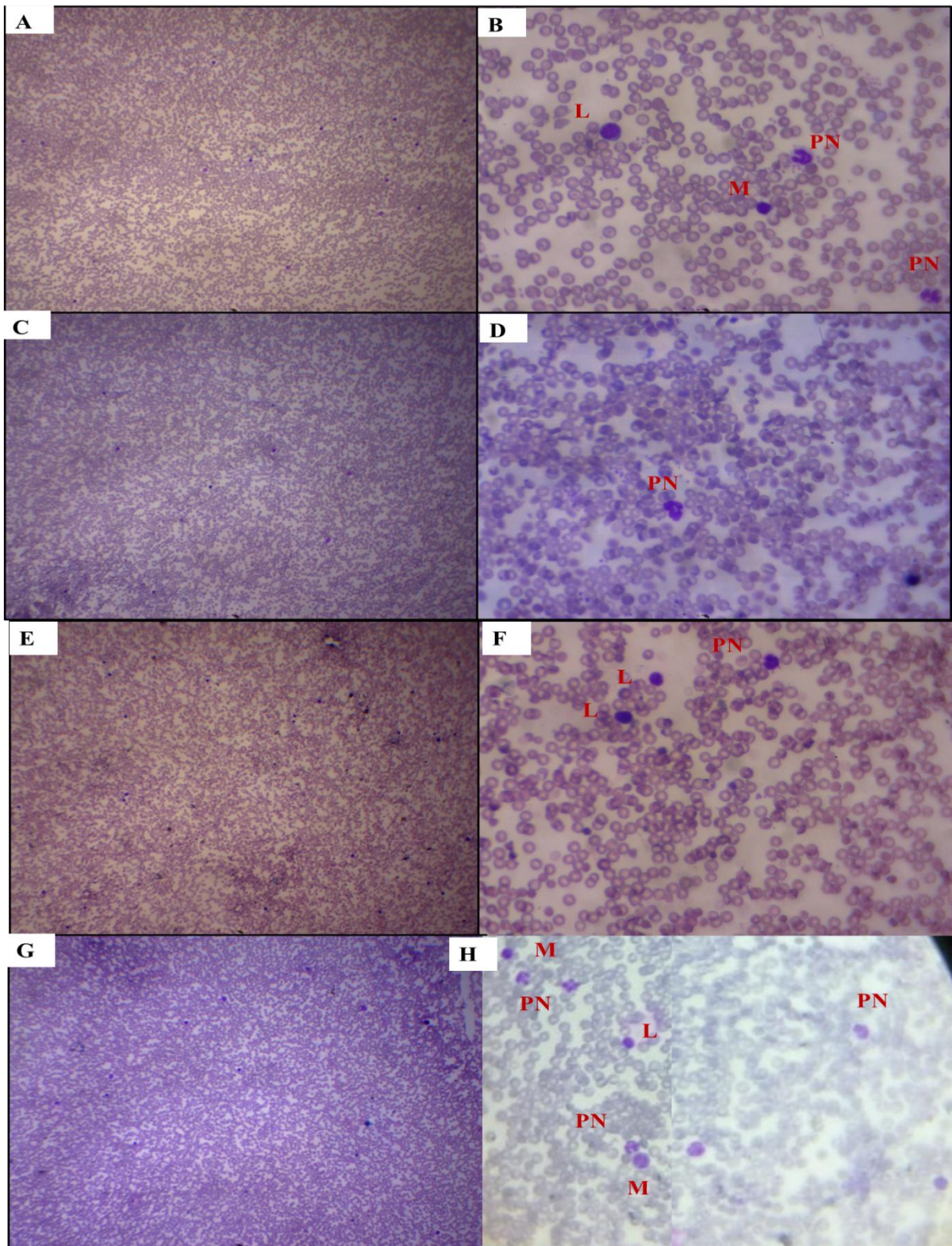


**Figure 16** : Taux de leucocytes et de lymphocytes dans le sang. **A**, taux de leucocytes des sanguins souris blanches et BALB/c. **B**, taux de lymphocytes sanguins des souris blanches et BALB/c. \* $P < 0.05$ , et \*\*\* $P < 0.001$  versus Contrôle souris blanche; ## $P < 0.01$  et ### $P < 0.001$  versus contrôle BALB/c; Φ $P < 0.05$ , ΦΦ $P < 0.01$ , and ΦΦΦ $P < 0.001$  versus sepsis.

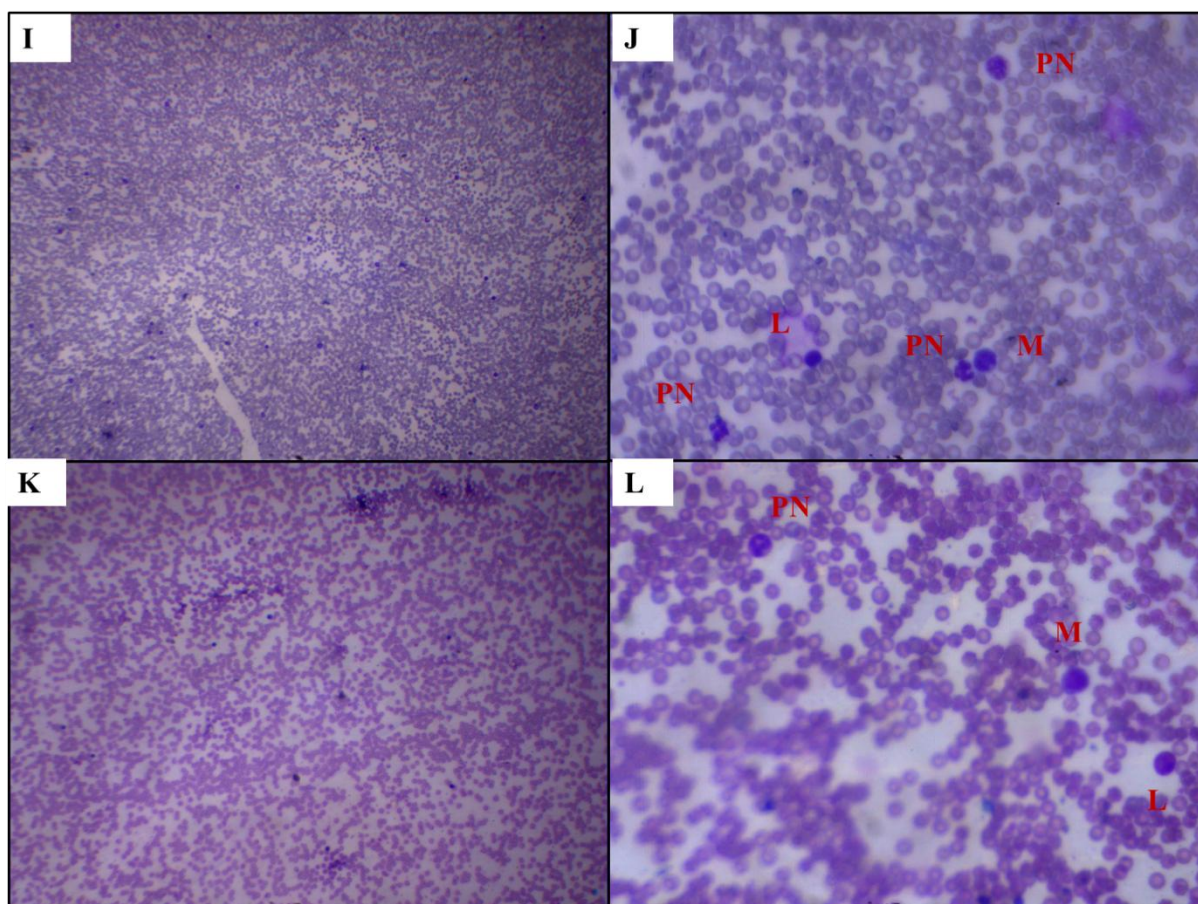
Le sepsis augmente de 84,4 % et de 132,26% les taux respectifs de leucocytes ( $8,85 \pm 1,65 \times 10^9/L$ ) et de lymphocytes ( $7,2 \pm 1,6 \times 10^9/L$ ) chez les souris BALB/c mais pas chez les souris Swiss (**Figure 16**).

La mélatonine diminue ces taux aussi bien chez les souris BALB/c que les souris Swiss. Les taux de leucocytes et de lymphocytes étaient comparables aux taux contrôles chez les souris BALB/c, ils étaient respectivement de  $5,6 \pm 0,7 \times 10^9/L$  et  $4,13 \pm 0,93 \times 10^9/L$  (**Figure 16**).

Ces résultats corroborent ceux du frottis sanguin qui montrent une augmentation du taux de leucocytes chez les souris BALB/c septique mais pas chez les souris Swiss (**Figure 17**). Toutefois, les souris BALB/c contrôles présentent un taux de leucocytes inférieur à celui des souris Swiss contrôles. La mélatonine diminue le nombre de leucocytes aux valeurs similaires aux contrôles.



**Figure 17** : Résultats de frottis sanguin, coloration MGG. A (Gx100) et B (Gx400): frottis de souris Swiss contrôle. C (Gx100) et D (Gx400): frottis de souris BALB/c contrôle. E (Gx100) et F(Gx400): frottis de souris Swiss septiques. G(Gx100) et H (Gx400): frottis de souris BALB/c septiques.



**Figure 17 (Suite) :** Résultats de frottis sanguin, coloration MGG. I (Gx100) et J (Gx400): frottis de souris Swiss septiques traitées par la mélatonine. K(Gx100) et L (Gx400): frottis de souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine. L: Lymphocyte, M: Monocyte, PN: Polynucléaire neutrophile.

Plusieurs travaux indiquent des différences dans les fonctions immunitaires des souris BALB/c et C57Bl/6 dans les conditions physiologiques. Des différences ayant une origine génétique qui détermine l'efficacité des réponses immunes anti-infectieuses et les sensibilité aux germes pathogènes propre à chaque souche murine (Trunova et al., 2011 ; Sellers et al., 2012).

Une prédominance des réactions immunitaires humores induites par les cellules T auxiliaires de type 2 (Th2), dans des conditions physiologiques ou pendant une stimulation antigénique, a été observée chez les souris BALB/c. En revanche, les souris C57Bl/6 sont génétiquement prédisposées à la prédominance de l'immunité cellulaire (Th1). Les différences initiales de réactivité immunologique des souris BALB/c et C57Bl /6 contribuent aux diverses sensibilités de ces animaux aux agents pathogènes (Trunova et al., 2011).

Les souris de ce profil sont largement utilisées dans les études concernant la relation entre les processus physiopathologiques et les caractéristiques génétiques du système immunitaire déterminées génétiquement. Les différences dans la réponse immunitaire à *S. marcescens* dans notre

modèle de souris BALB/c comparées aux souris Swiss, pourraient être expliquées par des paramètres morphofonctionnels du système immunitaire, déterminées génétiquement chez ces deux souches (Trunova et al., 2011 ; Sellers et al., 2012).

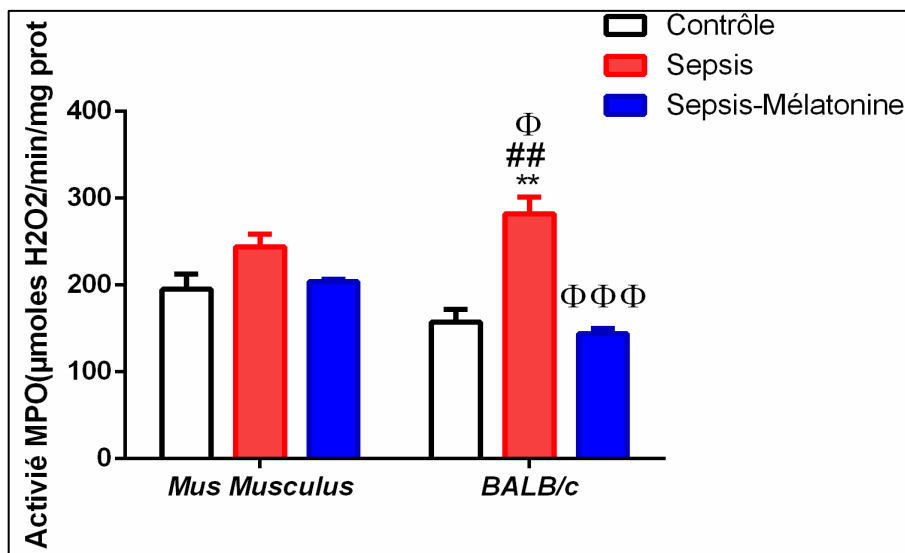
Le rôle immunorégulateur de la mélatonine a été largement démontré chez l'Homme et dans des modèles animaux de sepsis (Srinivasan et al., 2010 ; Galley et al., 2014). Il a été rapporté que le traitement des patients atteints de sepsis par mélatonine diminue le taux de leucocytes circulants, ce qui concorde avec nos résultats (Galley et al., 2014).

### **II. 3. Effet de *S.marcescens* et de la mélatonine sur l'activité MPO, marqueur de l'infiltration des neutrophiles**

L'activité myéloperoxydase basale était comparable chez les souris BALB/c et Swiss et qui est de  $157,65 \pm 32,8$  et  $195,11 \pm 39,6$   $\mu\text{moles/min/mg}$  de protéine, respectivement. Cette activité augmente significativement après sepsis de 79,04% chez les BALB/c pour atteindre  $282,27 \pm 42,53$   $\mu\text{moles/min/mg}$  de protéine. Cependant, le sepsis induit une augmentation de 25,2% ( $244,27 \pm 31,86$   $\mu\text{moles/min/mg}$  de protéine) chez les souris Swiss mais qui n'est pas significative (**Figure 18**).

Le traitement par la mélatonine réduit l'activité MPO aux valeurs contrôles chez les deux souches de souris. Les activités MPO respectives chez les souris BALB/c et Swiss sont de  $144,31 \pm 12$  et  $203,82 \pm 5,8$   $\mu\text{moles/min/mg}$  de protéine (**Figure 18**).

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



**Figure 18 :** Activité myéloperoxydase au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c. **\*\*P < 0.01 versus Contrôle souris blanche; ##P < 0.01 versus contrôle BALB/c; ΦP < 0.05 et ΦΦΦP < 0.001 versus sepsis.**

L'augmentation du taux de MPO dans le cœur lors du sepsis confirme l'infiltration cardiaque par les neutrophiles, et reflète la sévérité des dommages oxydatifs causés par les neutrophiles dans les organes (Serteyn *et al.*, 2003 ; Guo et Ward., 2007).

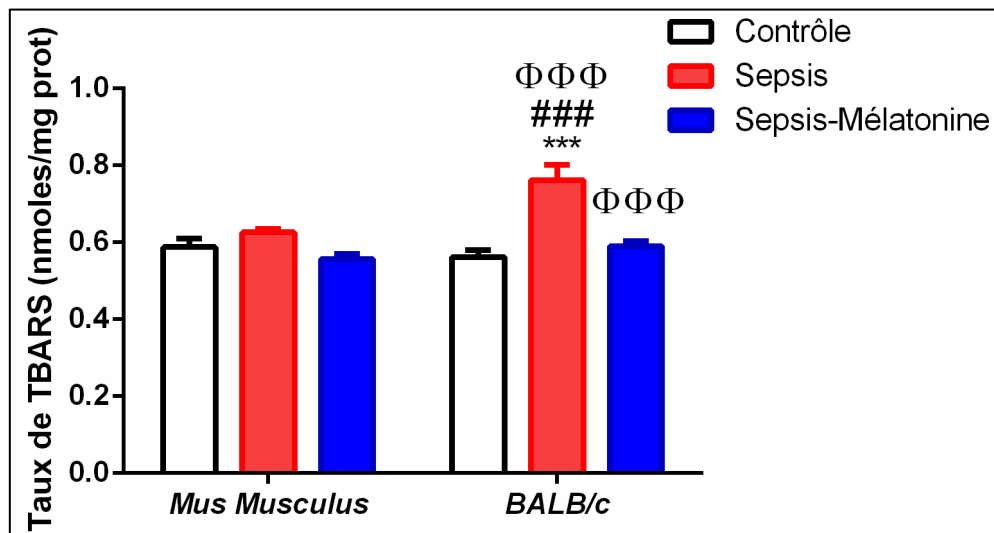
Il a été démontré que le dosage de la MPO plasmatique pourrait être utilisée comme biomarqueur de diagnostic différentiel entre un SIRS sans infection et un sepsis et qui pourrait prédire la mortalité des patients atteints de sepsis. Lors d'un sepsis, les neutrophiles libèrent le contenu de leurs granules, contenant la MPO et des ROS dont l'acide hypochloreux, dans le plasma afin de combattre l'agent pathogène. La MPO et les ROS formées par la MPO peuvent endommager les cellules natives sanguines ainsi que les organes (ElGammasy *et al.*, 2015 ; Schrijver *et al.*, 2017). De plus, l'acide hypochloreux, un oxydant puissant a été impliqué dans la destruction des bactéries (Nathan, 2002) et la destruction des tissus par induction de nécrose et d'apoptose (Klebanoff, 2005).

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



## II. 4. Effet de *S.marcescens* et de la mélatonine sur le taux de MDA, marqueur de peroxydation lipidique

Le taux de MDA est similaire chez les deux souches de souris contrôle. Il est de  $5,88 \pm 0,05$  nmoles/ mg de protéines chez les souris Swiss et  $5,62 \pm 0,04$  nmoles/ mg de protéines chez les souris BALB/c (**Figure 19**).



**Figure 19** : Taux de malondialdéhyde au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c. \*\*\* $P < 0.001$  versus Contrôle souris blanche; ### $P < 0.001$  versus contrôle BALB/c; ΦΦΦ $P < 0.001$  versus sepsis.

Le sepsis induit une augmentation significative de 35,6% du taux de MDA chez les souris BALB/c pour atteindre un taux  $7,62 \pm 0,09$  nmoles/ mg de protéines. Toutefois, le taux de MDA reste inchangé chez les souris Swiss septique, il est de  $6,26 \pm 0,02$  nmoles/ mg de protéines (**Figure 19**).

La mélatonine diminue le taux de MDA au taux contrôle chez les souris BALB/c, il est de  $5,9 \pm 0,03$  nmoles/ mg de protéines (**Figure 19**).

Le sepsis est caractérisé par un stress oxydatif (Andrades et al., 2009), résultant d'un déséquilibre entre les oxydants, tels que les ROS et les RNS, et des composés antioxydants, tels que la glutathion réductase et la superoxyde dismutase. Cet état hyperoxydant endommage les lipides et les protéines, altère la fonction cellulaire normale et induit l'apoptose. Le stress oxydatif induit la peroxydation des lipides membranaires, ce qui génère divers produits finaux de décomposition tels que le malondialdéhyde (MDA). Le MDA est un aldéhyde de faible poids moléculaire résultant d'attaques de radicaux libres sur des acides gras polyinsaturés lors de la dégradation de

phospholipides membranaires cellulaires (**Draper et Hadley, 1990; Dalle-Donne et al., 2006**). L'induction de la peroxydation lipidique lors du sepsis a été largement démontré chez l'Homme et dans divers modèles animaux (**Rahim, 2009 ; Lorente et al., 2013 ; Toufekoula et al., 2013 ; Lorente, 2015**).

La peroxydation des phospholipides membranaire permet la libération de MDA dans l'espace extracellulaire et finalement dans le sang; il a donc été utilisé comme biomarqueur efficace de l'oxydation des lipides (**Draper et Hadley, 1990 ; Dalle-Donne et al., 2006**). Il a été démontré que le taux de MDA sérique pourrait être utilisé comme un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteints de sepsis et un prédicteur de mortalité des patients (**Lorente et al., 2013 ; Toufekoula et al., 2013 ; Weiss et Deutschman., 2014 ; Lorente, 2015**).

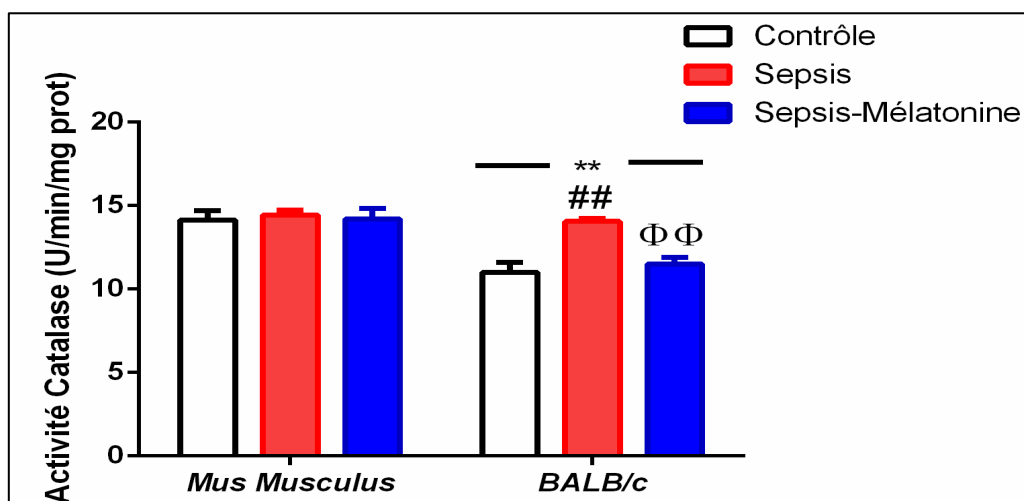
La mélatonine neutralise les ROS et prévient la peroxydation lipidique (**Costantino et al 1998 ; Sener et al., 2005**).

## **II. 5. Effet de *S.marcescens* et de la mélatonine sur l'activité catalase**

L'activité catalase basale était inférieure chez les souris BALB/c comparées aux souris Swiss ( $11 \pm 1,32$  vs  $14,15 \pm 1,32$  U/min/mg de protéine). Elle augmente de 27,81% chez les souris BALB/c septiques ( $14,06 \pm 0,42$  U/min/mg de protéine) mais pas chez les souris Swiss septiques ( $14,45 \pm 0,61$  U/min/mg de protéine) (**Figure 20**).

La mélatonine diminue l'activité catalase chez les souris BALB/c aux valeurs contrôles, elle est de  $11,51 \pm 0,9$  U/min/mg de protéine (**Figure 20**).

La catalase est une enzyme antioxydante qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène, un dangereux ROS ayant la capacité de traverser les membranes et d'oxyder différentes molécules, protéines, lipides, glucides et ADN. Un déséquilibre dans le système antioxydant pourrait être à l'origine d'un stress oxydatif. Nos résultats ont démontré une augmentation du taux de catalase chez les souris BALB/c septique, ceci pourrait être expliqué par le stress oxydatif instauré lors du sepsis qui conduit à une augmentation des ROS. Le taux élevé de ROS induit le facteur de transcription Nrf2 qui régule l'expression des enzymes antioxydantes dont la catalase, la SOD et la GPx.



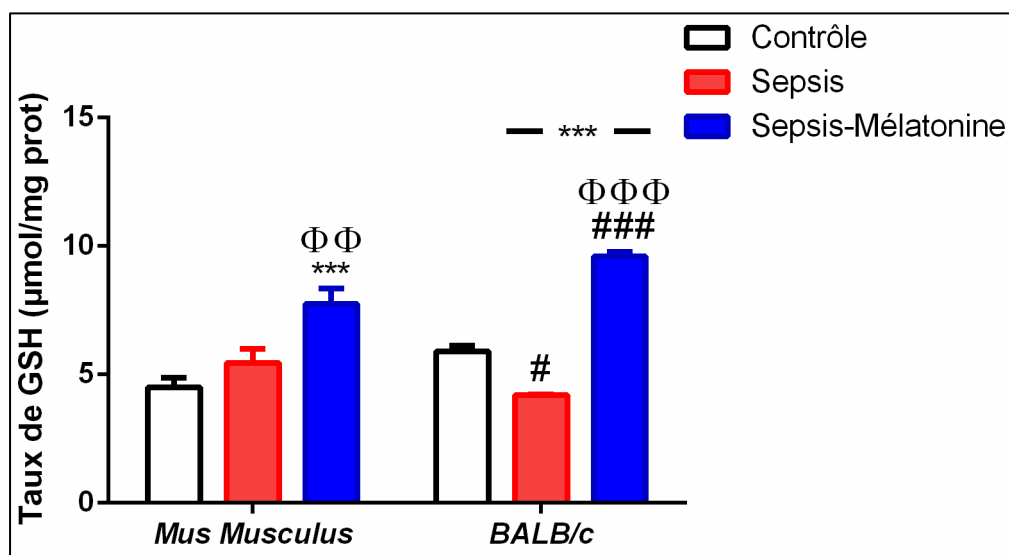
**Figure 20** : Activité catalase au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c. **\*\*** $P < 0.01$  versus Contrôle souris blanche; **##** $P < 0.01$  versus contrôle BALB/c; **ΦΦ** $P < 0.01$  versus sepsis.

Nos résultats sont en accord avec les travaux qui ont démontré une augmentation du taux de catalase sérique. Cette augmentation pourrait être considérée comme un marqueur de mauvais pronostic chez les patients septiques (Warner et al., 1995 ; Karapets et al., 2013 ; Molina et al., 2017). Néanmoins, des travaux dans différents modèles de sepsis ont démontré que l'activité catalase augmente, diminue ou reste inchangé dans le cœur (Nagar et al., 2018 ; Rahim, 2009 ; Garcia et al., 2015 ; Rahim et al., 2017). Cette différence pourrait être due aux modèles animaux qui varient entre un modèle d'endotoxémie, de sepsis monomicrobien ou polymicrobien.

## II. 6. Effet de *S.marcescens* et de la mélatonine sur le taux de glutathion réduit (GSH)

Les souris BALB/c contrôles présentent un taux de GSH supérieur de 31,04% comparées aux souris Swiss contrôles ( $5,91 \pm 0,46$  vs  $4,51 \pm 0,8$   $\mu\text{moles/mg}$  de protéines). Le taux de GSH diminue de 28,8% ( $4,21 \pm 0,03$   $\mu\text{moles/mg}$  de protéines) chez les souris BALB/c septiques mais reste inchangé chez les souris Swiss ( $5,46 \pm 1,2$   $\mu\text{moles/mg}$  de protéines) (Figure 21).

La mélatonine augmente le taux de GSH chez les deux souches de souris. Ce taux atteint  $9,61 \pm 0,4$   $\mu\text{moles/mg}$  de protéines chez les souris BALB/c et  $7,74 \pm 1,4$   $\mu\text{moles/mg}$  de protéines. L'augmentation du taux de GSH était plus importante chez les souris BALB/c comparées aux souris Swiss 128,3% vs 41,8 % (Figure 21).



**Figure 21 :** Taux de Glutathion réduit au niveau du cœur des souris blanches et BALB/c. \*\*\* $P < 0.001$  versus Contrôle souris blanche; # $P < 0.05$  et ### $P < 0.001$  versus contrôle BALB/c; ΦΦ $P < 0.01$  et ΦΦΦ $P < 0.001$  versus sepsis.

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).

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

### III. Etude histologique

Durant notre étude nous nous sommes intéressée à l'étude histologique par une coloration à l'hématoxyline-éosine de trois organes qui sont le cœur, la rate et le mésentère.

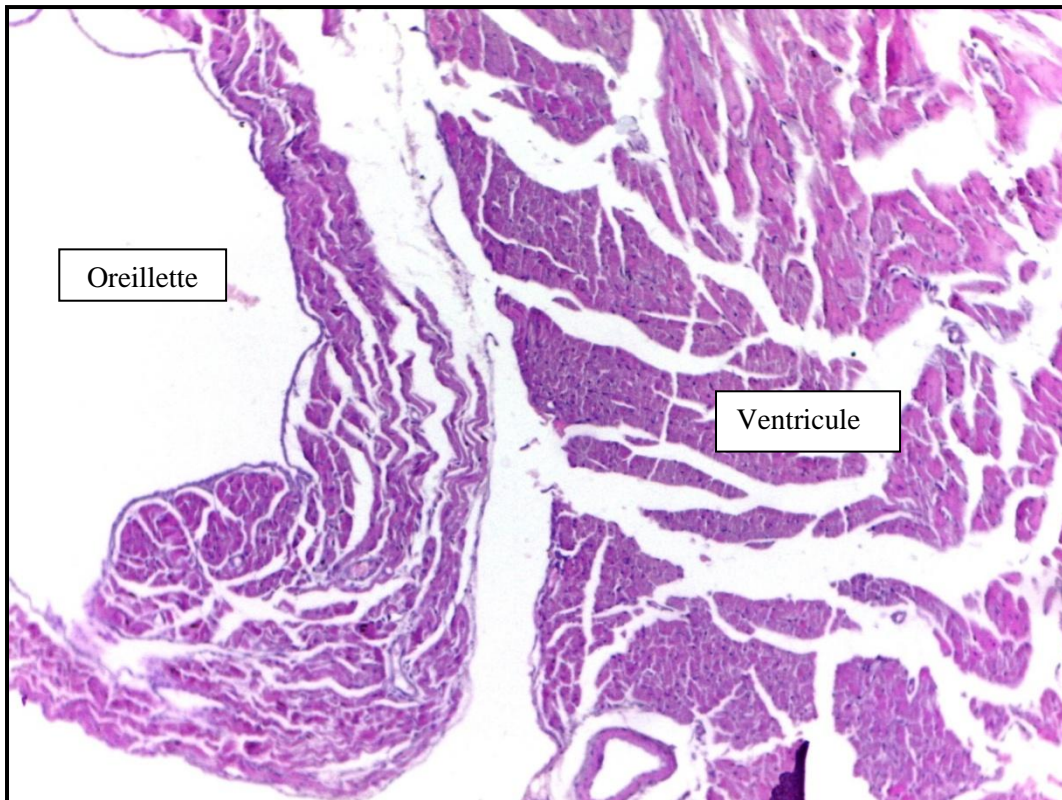
Pour des raisons techniques, nous allons vous présenter dans ce qui suit des résultats incomplets de l'histologie du cœur et de la rate.

#### III. 1. Effet de *S.marcescens* et de la mélatonine sur l'histologie cardiaque

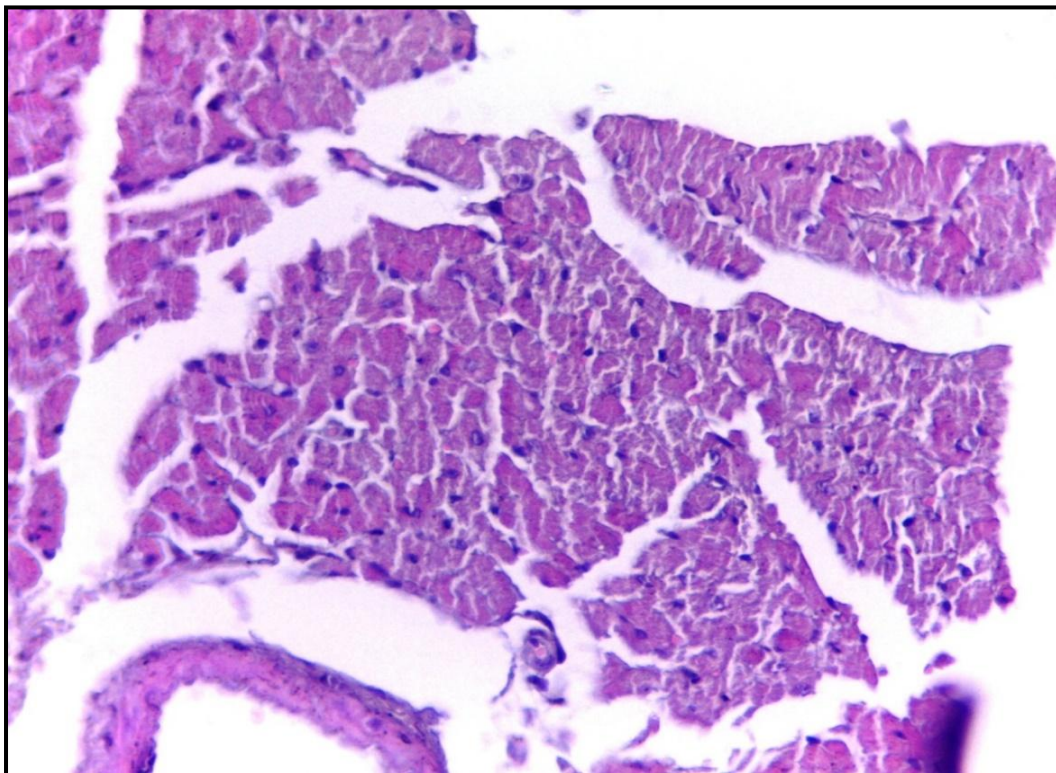
Les coupes histologiques du cœur des souris Swiss contrôles montrent une architecture normale fasciculée sans aucune lésion, modification structurale ou infiltration leucocytaire. Il s'agit d'une architecture de muscle cardiaque constitué d'un ensemble de myofilaments et de fibres anastomosés. Le noyau, clair de forme ovoïde, coloré en bleu est situé au centre de myocyte cardiaque et le sarcoplasme en rouge-rose (**Figures 22 et 23**).

Les coupes histologiques du cœur des souris BALB/c septique montrent des anomalies structurales comparées au contrôle. Des dommages sévères sont observés caractérisés par une mort cellulaire par nécrose (**Figure 24 et 25**) avec une dégénérescence des fibres musculaires et une augmentation de l'espace intercellulaire, un œdème et une infiltration leucocytaire (**Figure 26**). Une congestion de capillaires a été également observée traduisant une réponse inflammatoire au niveau cardiaque (**Figure 27**). La mort myocytaire représente une perte de tissu contractile et est responsable à la fois d'une hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes restant (non lésé), et d'une fibrose de remplacement. Il serait donc intéressant de faire la coloration de trichrome de Masson dans le but de visualiser la fibrose.

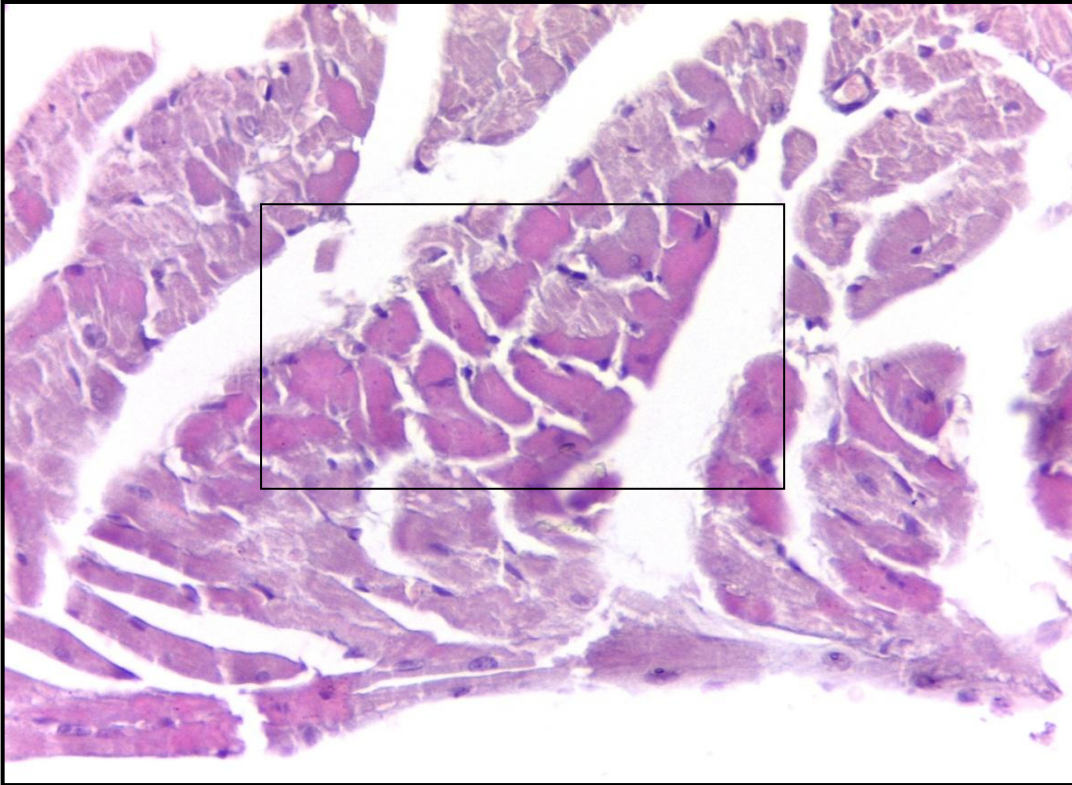
Le traitement par la mélatonine réduit les dommages induits par sepsis. L'architecture des cardiomyocytes des coupes histologiques des souris Swiss septiques traitées par la mélatonine est proche de celle de myocarde contrôle sans nécrose, lésion tissulaire ou infiltration leucocytaires (**Figure 28 et 29**). Nous avons également notée une régénération des cardiomyocytes après traitement par la mélatonine. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Eulalio et al. (2012)**.



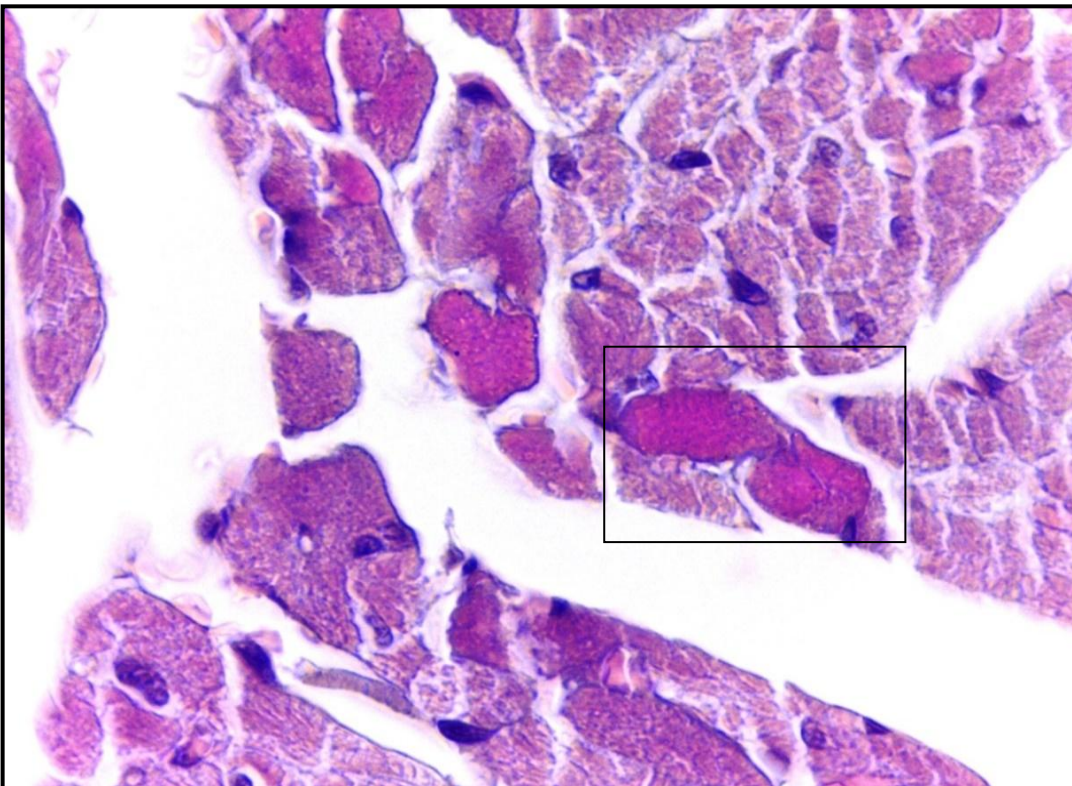
**Figure 22 :** Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss contrôle. Coloration HE (Gx100). tissu cardiaque d'architecture fasciculée.



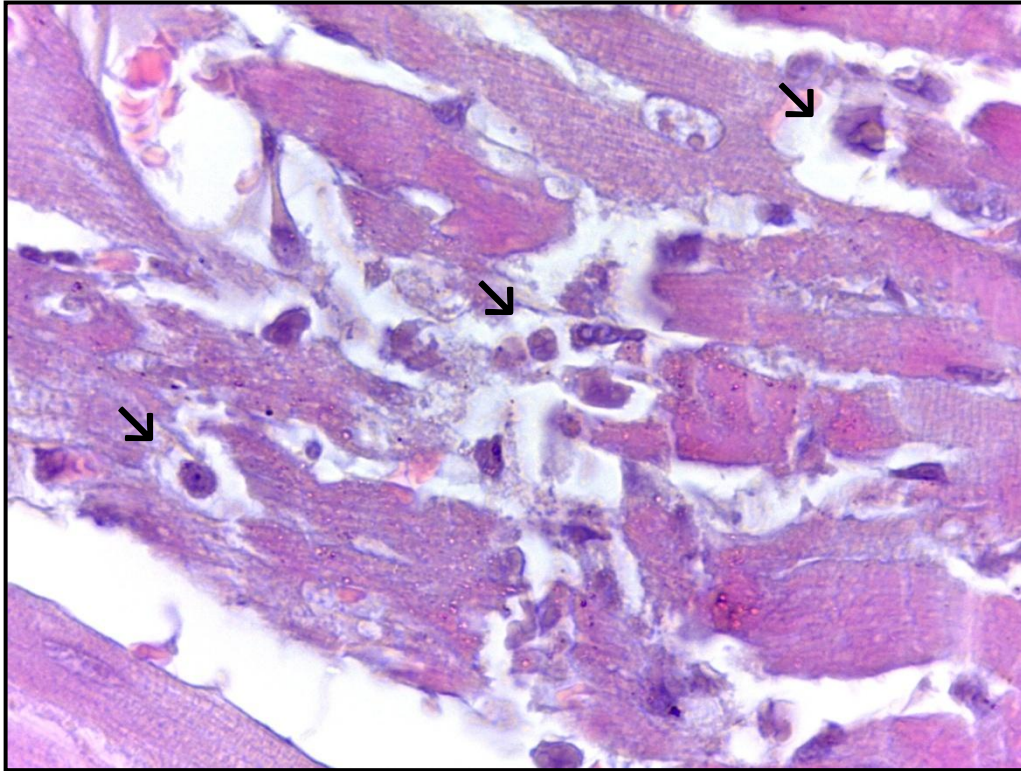
**Figure 23 :** Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss contrôle. KColoration HE (Gx400).Tissu cardiaque d'architecture fasciculée composé de cardiomyocytes regroupés en faisceaux



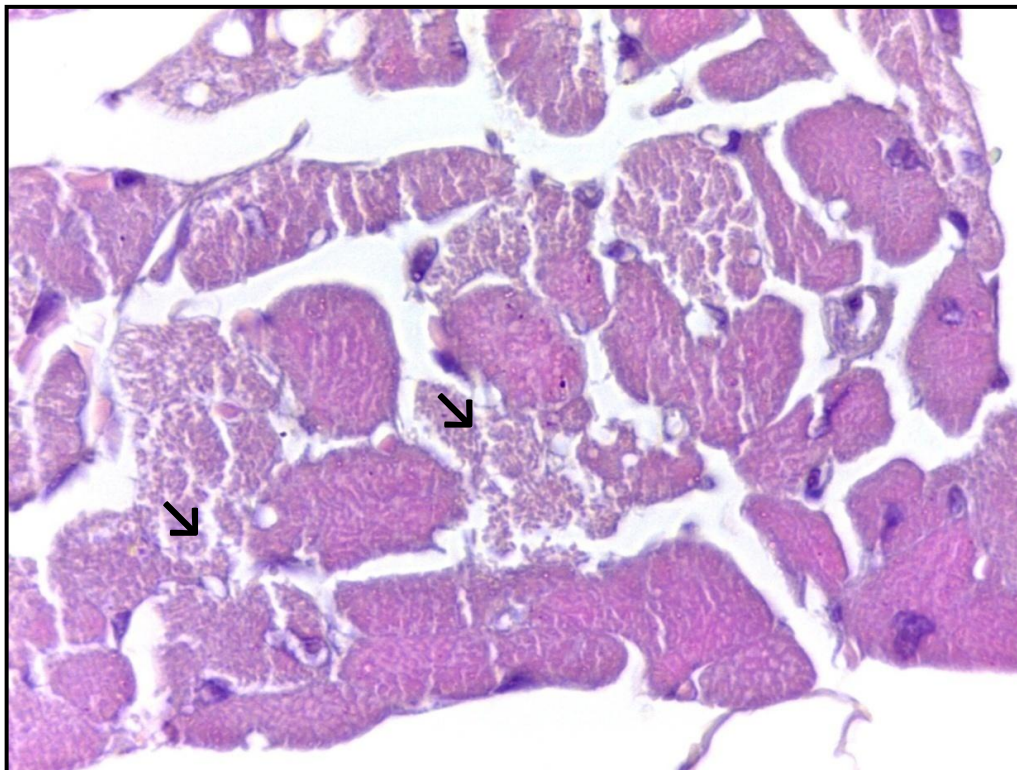
**Figure 24 :** souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx400). Groupe de cardiomyocytes en nécrose de coagulation : fibres hypercontractées, au cytoplasme éosinophile et homogénéisé. Les noyaux sont pycnotiques. (Encadré).



**Figure 25 :** Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Cardiomyocytes en nécrose de coagulation, au cytoplasme très éosinophile homogénéisé et sans limites nettes. (Encadré).

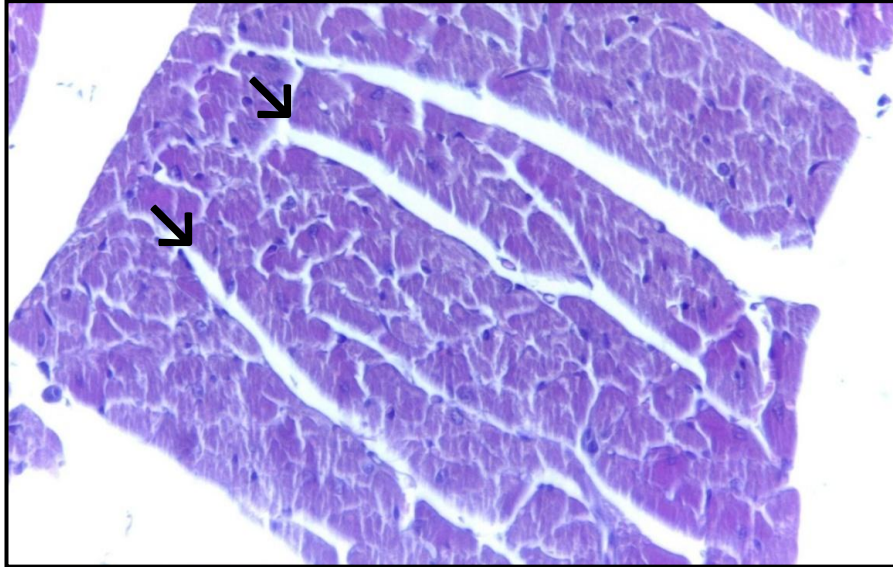


**Figure 26 :** Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Cardiomyocytes en nécrose de liquéfaction, au cytoplasme infiltré de macrophages (↘)

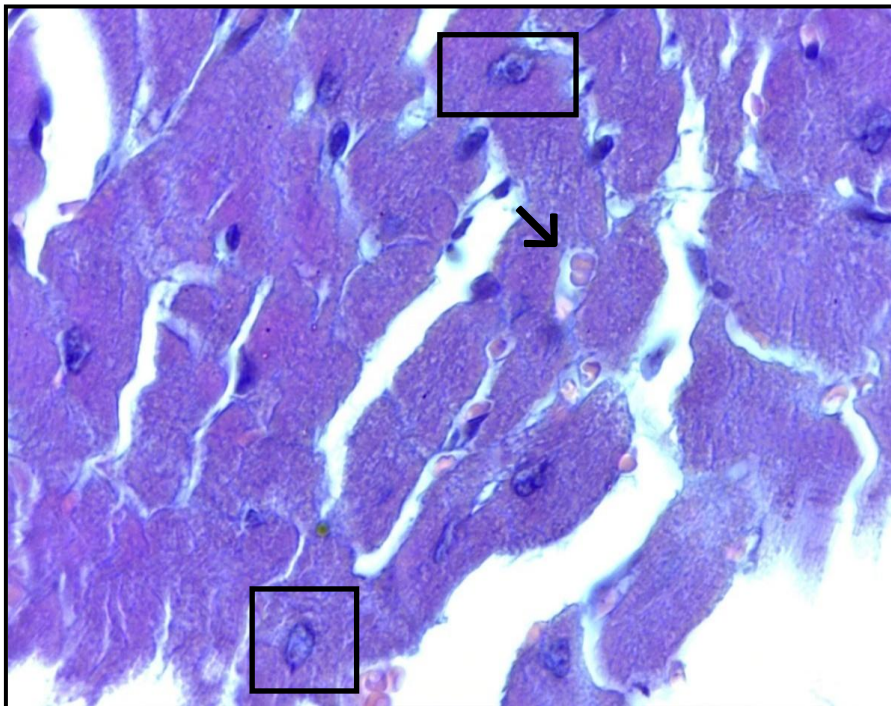


**Figure 27 :** Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Cardiomyocytes en nécrose de liquéfaction, au cytoplasme clarifié et sans limites nettes. Pas de noyau évident (↘).





**Figure 28 :** Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss septiques traitées par la mélatonine. Coloration HE (Gx100). Cardiomyocytes d'aspect normal sans évidence d'infiltrat polynucléaire entre les cellules myocardiques.

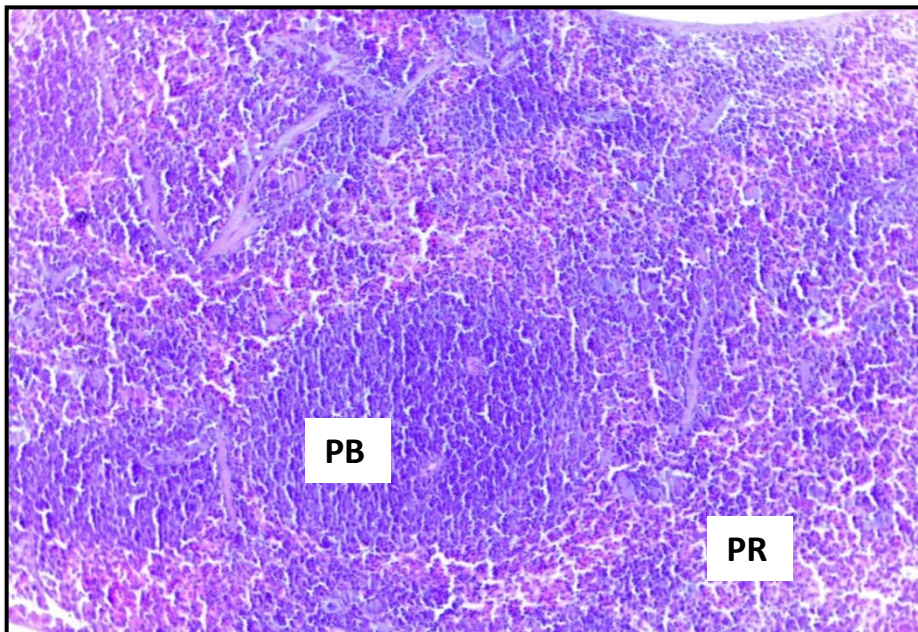


**Figure 29 :** Micrographie d'une coupe transversale du cœur de souris Swiss septiques traitées par la mélatonine. Coloration HE (Gx1000). Cardiomyocytes avec un large noyau central vésiculeux et nucléolé (encadrés). Les capillaires entre les cardiomyocytes sont congestifs (↘).

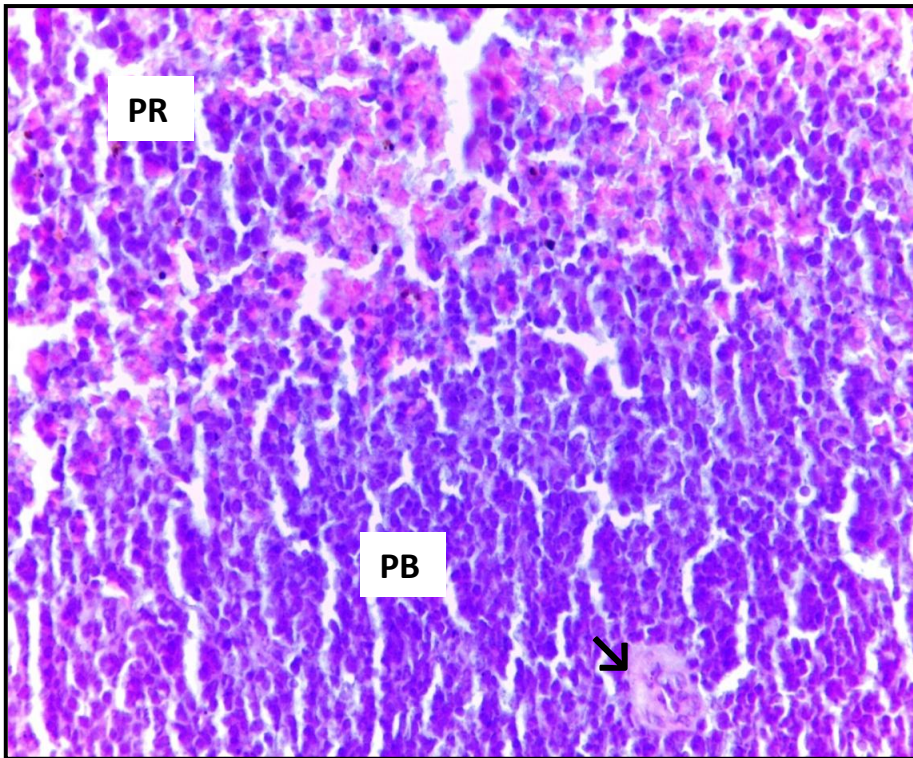
### III. 2. Effet de *S.marcescens* et de la mélatonine sur l'histologie de la rate

Les coupes histologiques de la rate des souris BALB/c contrôle montrent architecture normale avec pulpe blanche faite de follicules lymphoïdes centrés d'une artériole et entourés par la pulpe rouge faite de sinus (**Figures 30, 31 et 32**). Les coupes histologiques de la rate des souris BALB/c septiques montrent une architecture riche en cellules comparée au contrôle. La pulpe blanche est faite de follicules lymphoïdes plus larges tandis que la pulpe blanche présente une infiltration massive de polynucléaires et de macrophages (**Figures 33, 34, 35 et 36**). Nous avons également constaté la présence de mégacaryocytes, un signe d'une transformation myéloïde de la rate justifiant une éventuelle compensation et une transformation myéloïde.

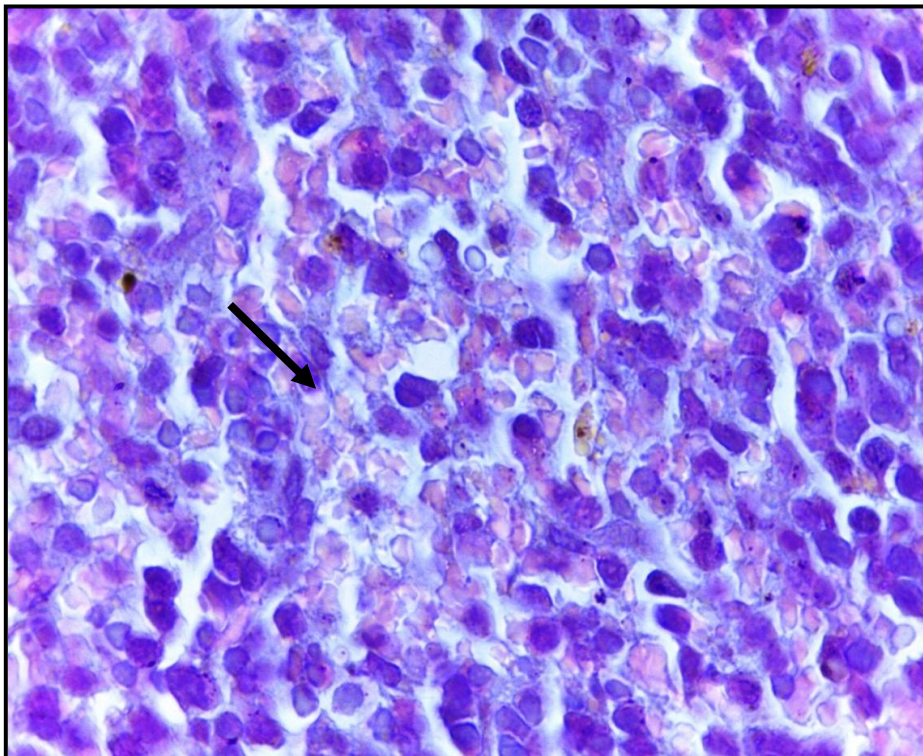
Le traitement des souris BALB/c septiques par la mélatonine réduit l'activation folliculaire au niveau de la rate. La pulpe rouge présente une architecture riche en cellule mais l'intensité cellulaire est moindre comparée au contrôle avec présence de macrophage et une diminution de neutrophiles (**Figures 37, 38, 39 et 40**).



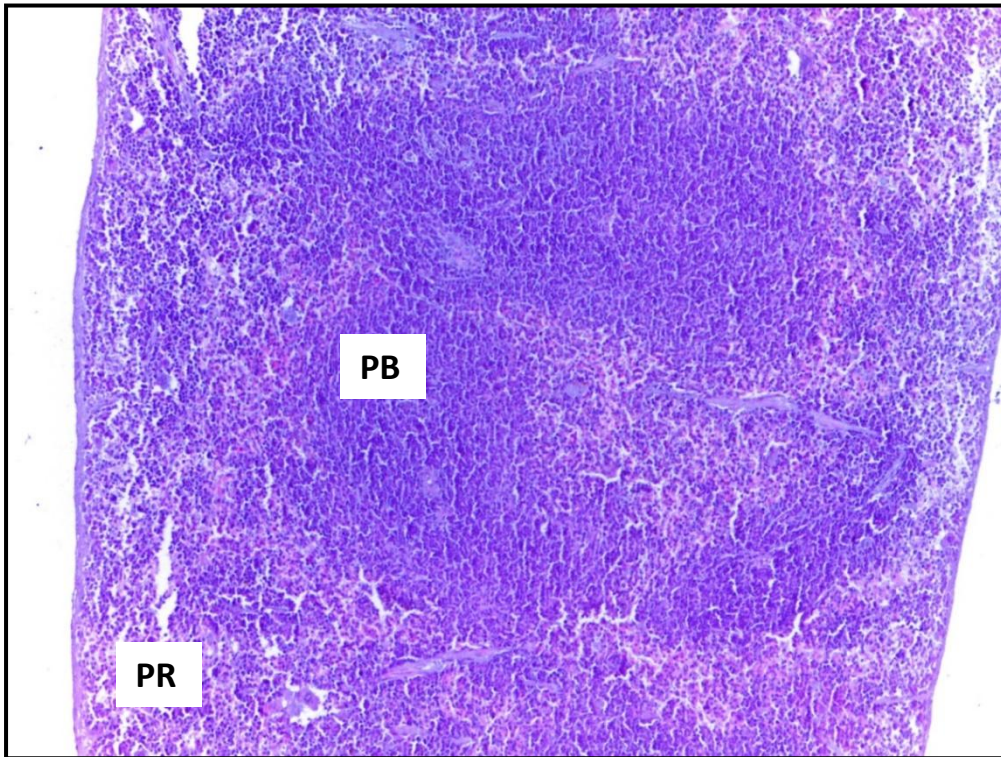
**Figure 30** : Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles. Coloration HE (Gx100). Architecture normale de la rate avec pulpe blanche (PB) faite de follicules lymphoïdes centrés d'une artériole et entourés par la pulpe rouge (PR) faite de sinus.



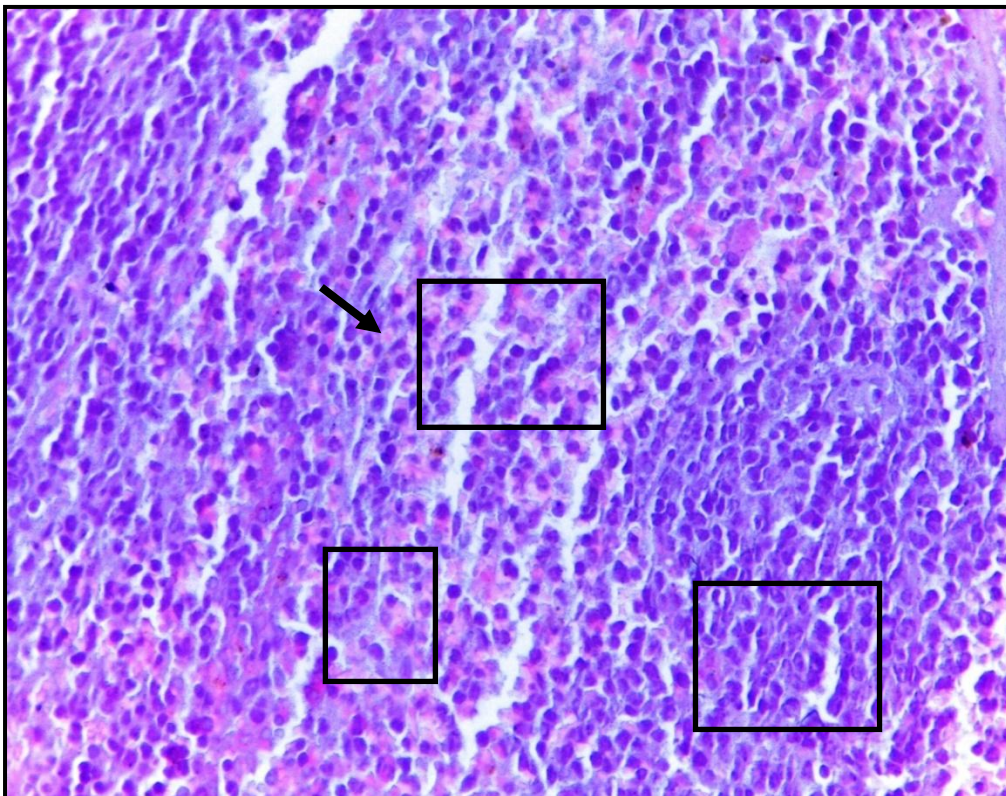
**Figure 31 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles. Coloration HE (Gx400). Architecture normale de la rate avec pulpe blanche (bas) faite d'un follicule lymphoïde centré d'une artériole (↘) et surmonté par la pulpe rouge ( haut) faite de sinus renfermant surtout des hématies et quelques éléments lymphoïdes.



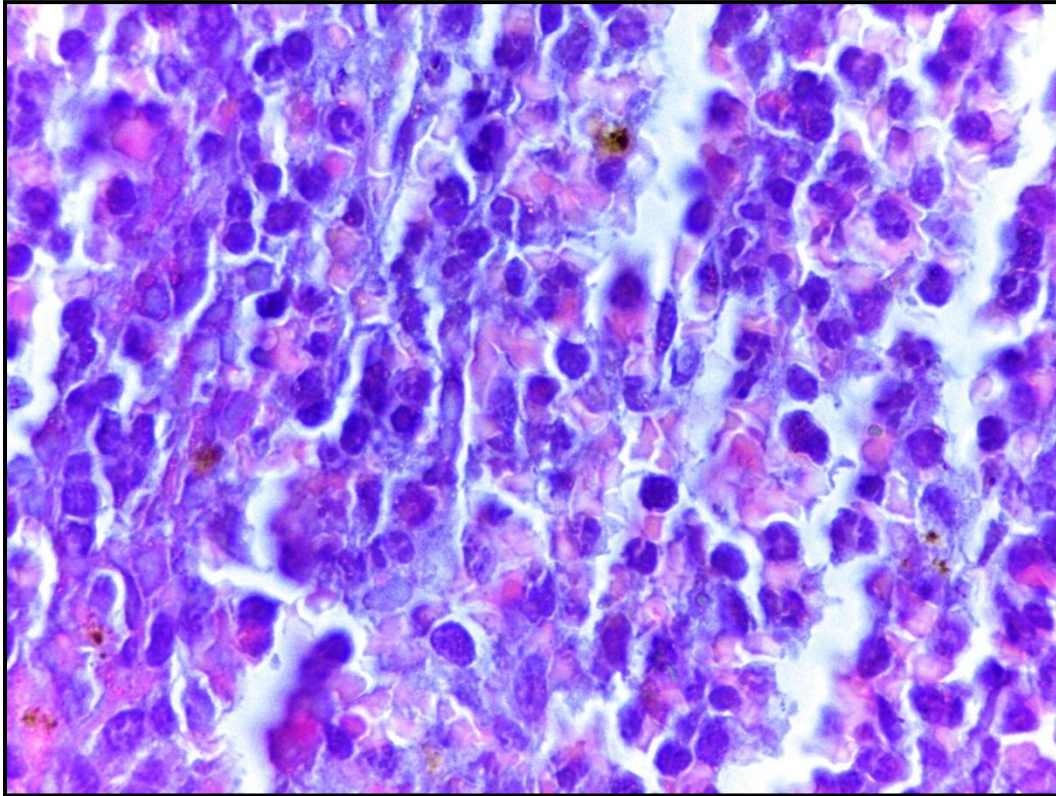
**Figure 32 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c contrôles. Coloration HE (Gx1000). La pulpe rouge faite de sinus parsemés d'hématies (↘) surtout et de quelques éléments lymphoïdes. Pas de polynucléaires évidents.



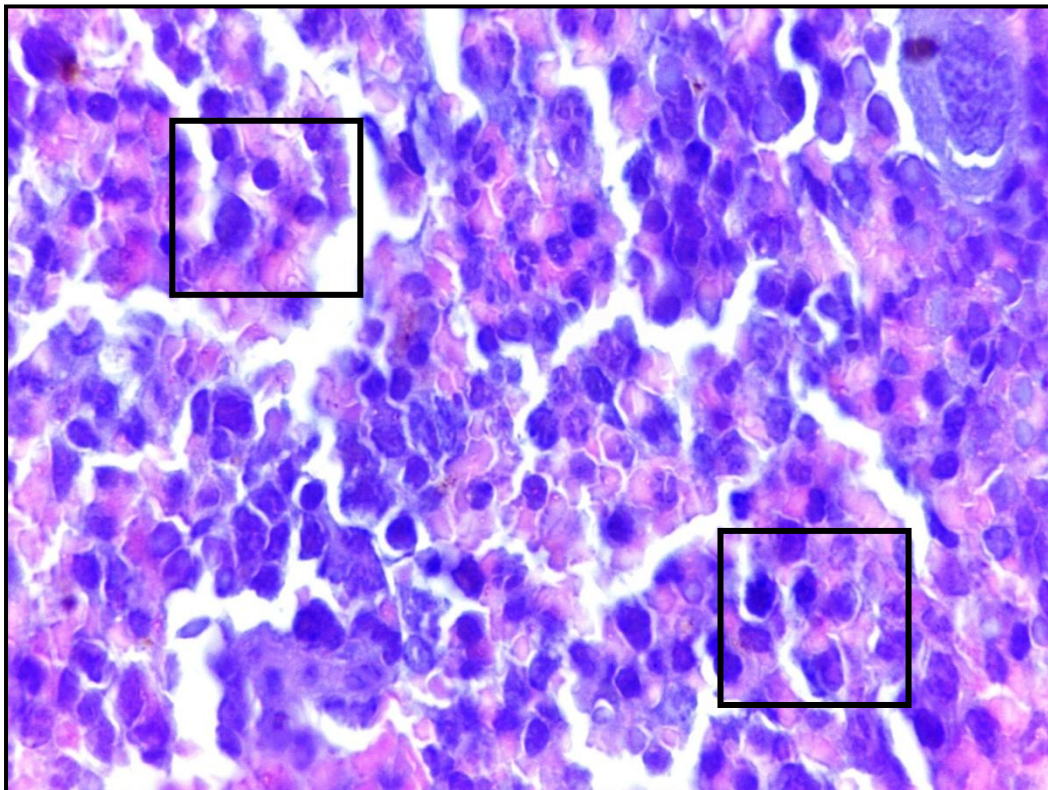
**Figure 33 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx100). Pulpe blanche faite de follicules lymphoïdes plus larges et une pulpe rouge plus cellulaire.



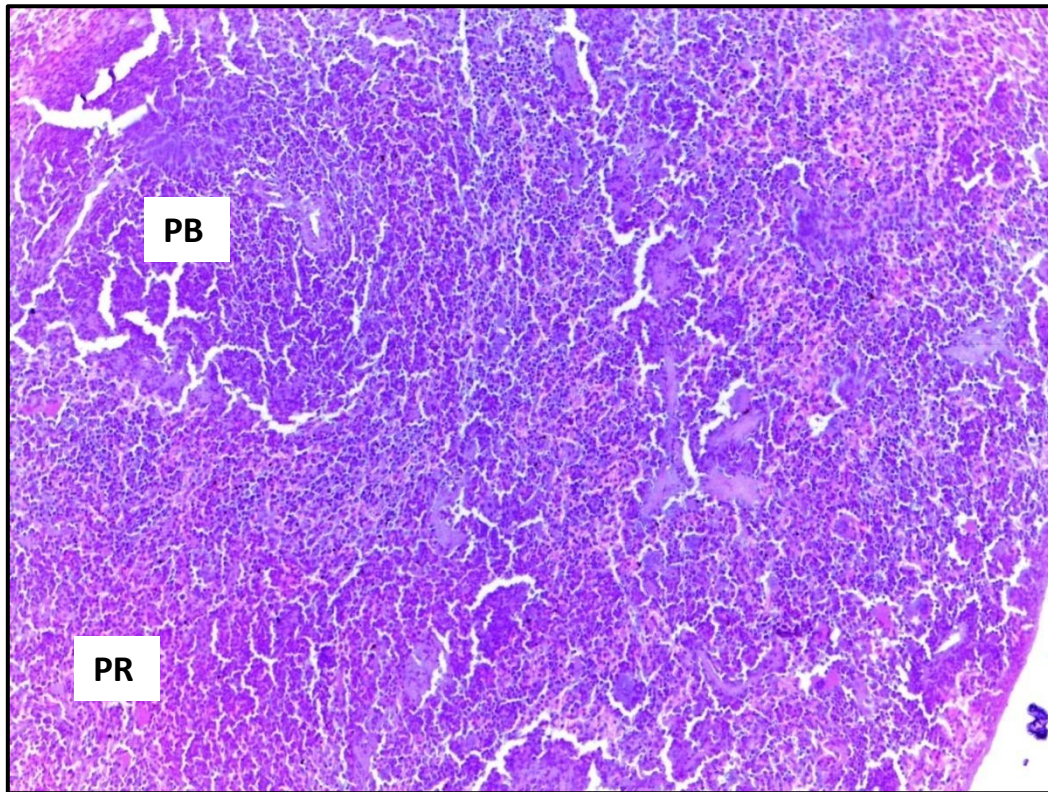
**Figure 34 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx400). Pulpe rouge plus cellulaire (↘) que le contrôle avec présence de polynucléaires.



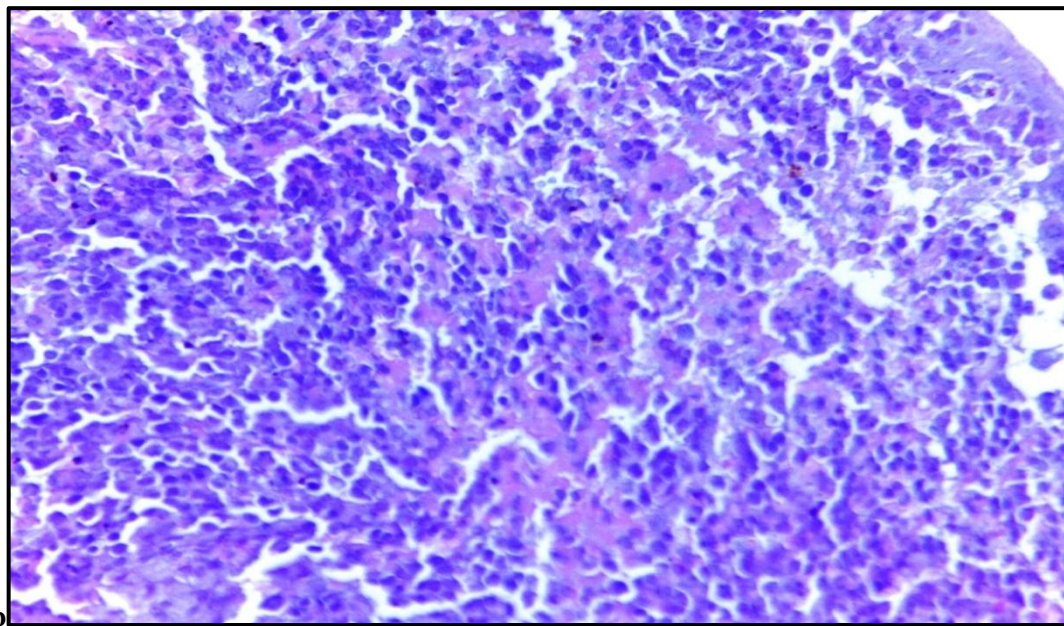
**Figure 35 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Pulpe rouge plus cellulaire que le contrôle avec présence de nombreux polynucléaires .



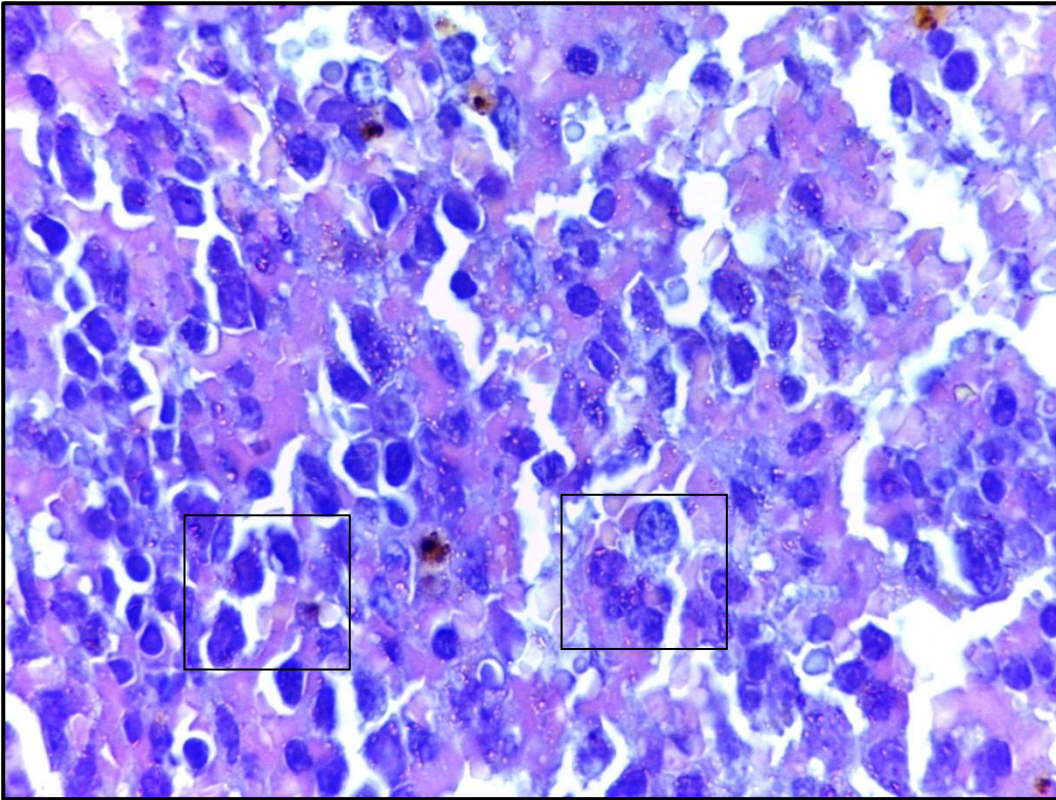
**Figure 36 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques. Coloration HE (Gx1000). Pulpe rouge plus cellulaire que le contrôle avec présence de polynucléaires et de macrophages(encadrés).



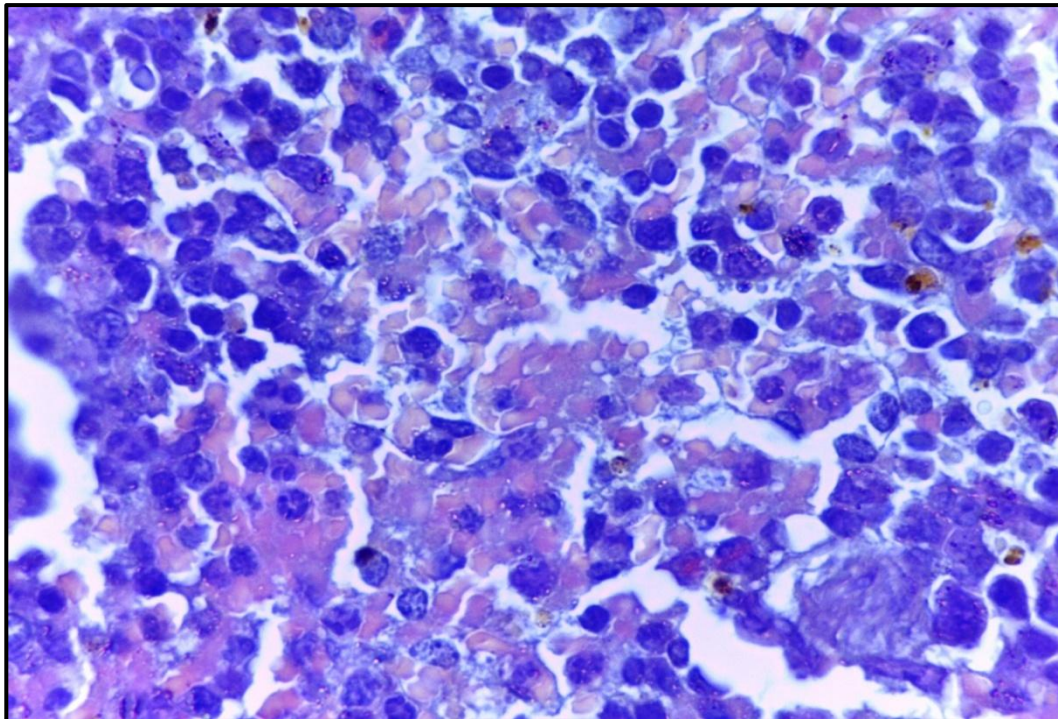
**Figure 37 :** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine. Coloration HE (Gx100). Architecture splénique conservée avec une pulpe rouge plus cellulaire que le contrôle.



**Figure 38** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traités par la mélatonine. Coloration HE (Gx400). Pulpe rouge plus cellulaire que le contrôle.



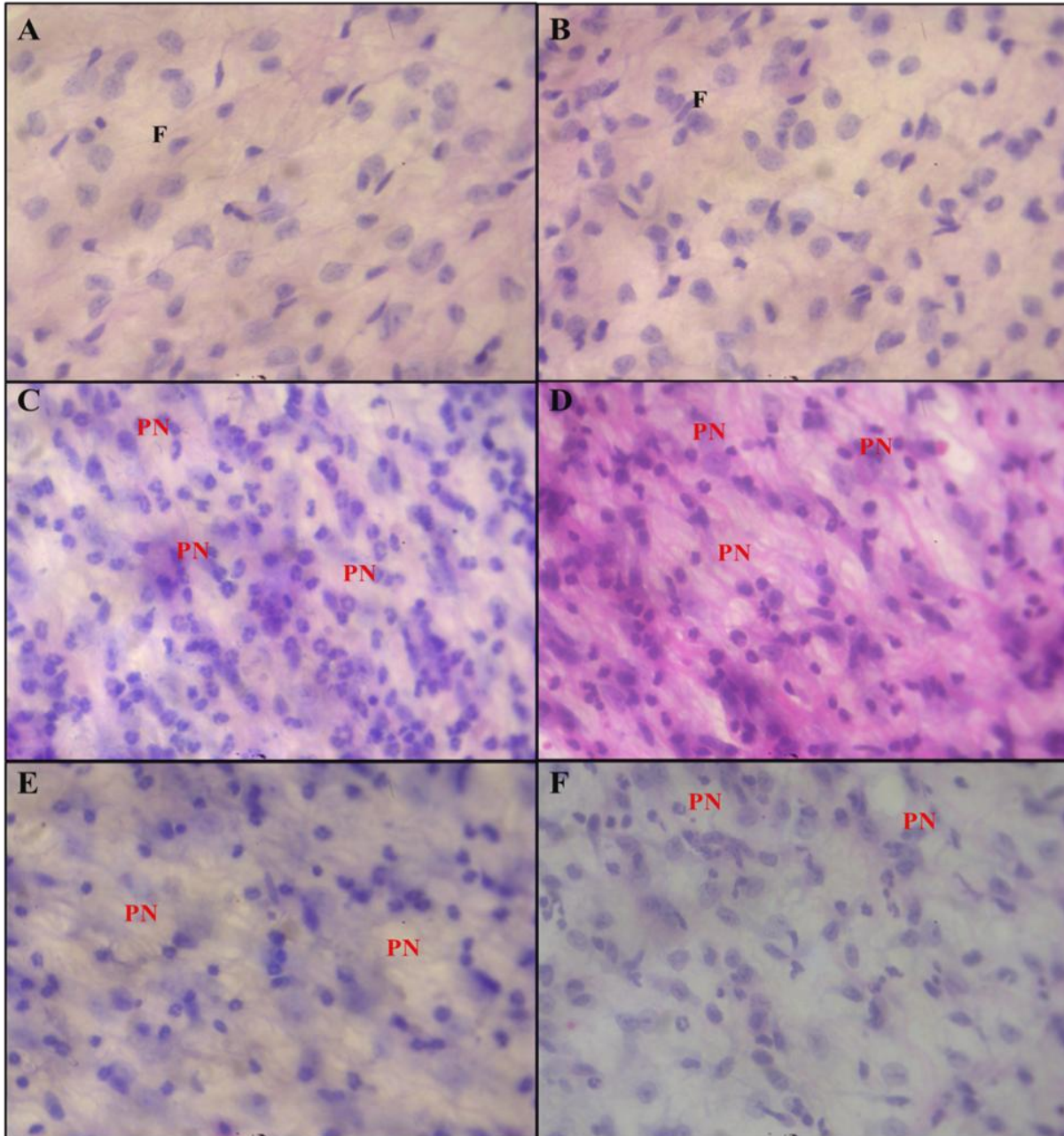
**Figure 39.** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine. Coloration HE (Gx100). Pulpe rouge plus cellulaire que le contrôle avec présence de macrophages (encadrés).



**Figure 40.** Micrographie d'une coupe transversale de la rate des souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine. Coloration HE (Gx1000). Pulpe rouge plus cellulaire que contrôle sans évidence de polynucléaires.

### III. 3. Effet de *S.marcescens* et de la mélatonine sur l'histologie du mésentère

Le mésentère est une membrane fine richement vascularisée contenant des ganglions mésentériques, ce qui nous permet une meilleure observation de l'infiltration leucocytaire péritonéale au cours de l'inflammation aiguë induite par *S. marcescens*.



**Figure 41 :** Micrographie du mésentère des souris BALB/c et Swiss, coloration HE (Gx400). A: Mésentère de souris Swiss contrôle. B: Mésentère de souris BALB/c contrôle. C: Mésentère de souris Swiss septiques. D: Mésentère de souris BALB/c septiques. E: Mésentère de souris Swiss septiques traitées par la mélatonine. F: Mésentère de souris BALB/c septiques traitées par la mélatonine. F:Fibroblaste, PN: Polynucléaire neutrophile.



Le mésentère des souris contrôles Swiss (**Figure 41A**) et BALB/c (**Figure 41B**) montre une architecture normale faite essentiellement de fibroblastes. Le mésentère des souris septiques montre des signes d'une inflammation aiguë caractérisée par une activation des fibroblastes et une importante infiltration leucocytaire, principalement des polynucléaires neutrophiles. L'infiltration était plus importante chez les souris BALB/c septiques (**Figure 41C**) comparées aux souris Swiss septiques (**Figure 41D**).

Les neutrophiles préactivés par les signaux pro inflammatoires (cytokines, chémokines et facteurs chimioattractants) émis par la paroi abdominale après inflammation par *S. marcescens*, adhèrent à l'endothélium vasculaire, puis atteignent le site inflammatoire par extravasation et diapédèse. Au site inflammatoire, les neutrophiles vont phagocyter et détruire les particules de *S. marcescens* par bactéricidie et exocytose d'enzymes lytiques.

Le traitement des souris septiques par la mélatonine réduit l'infiltration leucocytaire et l'activation des fibroblastes chez les deux souches de souris Swiss (**Figure 41E**) et BALB/c (**Figure 41F**).

## Discussion générale

Dans la présente étude nous avons démontré l'association du stress oxydatif à la physiopathologie du sepsis à *S. marcescens* dans le cœur. Ce stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre de la balance redox traduit par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MDA et MPO) et une diminution (GSH) ou une augmentation (Catalase) des anti-oxydants.

Le déséquilibre de la balance redox est dû à une surproduction de ROS qui sont hautement toxique entraînant des dommages tissulaires (**Hallwell, 1999**).

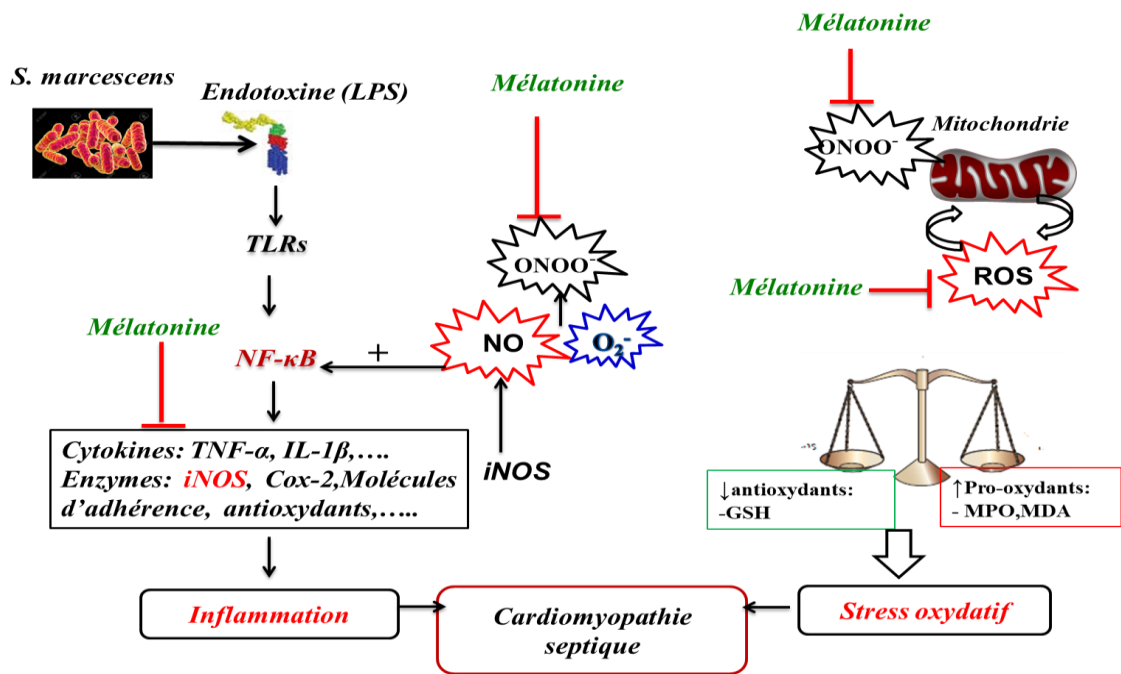
L'activation des PRRs (TLRs) par les PAMPs bactériens (LPS) résulte en une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui, à son tour, induit la transcription de plus de 200 gènes (**Kunsch et al., 1992**) dont des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), des chimiokines (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) (**Poltorak et al., 1998 ; Tak et Firestein, 2001 ; Abraham, 2003**). Certains de ces produits exercent un feedback positive et activent la voie NF- $\kappa$ B, intensifiant la réponse inflammatoire en cas de sepsis. Parmi eux, les cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 $\beta$ , et le TNF $\alpha$ , participent à l'amplification de l'inflammatoire réponse (**Liu et Malik, 2006**).

Parallèlement à la réponse inflammatoire, il y a une augmentation de la production de ROS/RNS conduisant à un crosstalk de ces molécules et la voie NF- $\kappa$ B (**Morgan et Liu, 2011**). En revanche, les leucocytes activés pendant la réponse inflammatoire augmente la production des ROS (**Shen et Pervaiz, 2006**). La mitochondrie est la principale source de ROS, l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en grande partie, produit par une fuite d'électrons transférés par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les ROS produites suppriment l'activation de NF- $\kappa$ B, réduisant le signal de survie dépendant du NF- $\kappa$ B favorisant la mort cellulaire ROS-dépendante (**Shen et Pervaiz, 2006**). Toutefois, il a été démontré que les ROS mitochondriales peuvent favoriser, plutôt d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF (**Hughes et al., 2005 ; Morgan et Liu, 2011 ; Blaser et al., 2016**). Bien que ces ROS soient contrôlés par le système antioxydant, principalement la SOD et le cycle du glutathion (**Rhee et al., 2005a**), le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un messenger intracellulaire important (**Rhee et al., 2005a**). 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- $\kappa$ B de manière dose-dépendante (**Zhou et al., 2001; Horton, 2003**).

Les RNS, principalement d'oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>) et les peroxydinitrites (ONOO<sup>-</sup>) sont produits sous le contrôle de NF- $\kappa$ B après activation des deux NOSynthases inductibles cytosolique (iNOS)

et mitochondriale (i-mtNOS). Le NO• est le produit principal de ces enzymes, il provoque des effets délétères car il induit une vasodilatation systémique et une hypotension, et augmente les dommages cellulaires (Lanone et al., 2000 ; Lundberg et Weitzberg, 2005). De plus, le NO• réagit rapidement avec l'O2•- donnant un produit très toxique le peroxy-nitrite ONOO- (Lipton et al., 1993). 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).

Par conséquent, la complexité de la réponse immuno-inflammatoire associée au stress oxydatif et à la mort cellulaire lors du sepsis exige une thérapie à base d'une molécule ayant un effet pléiotrope anti-inflammatoire, immunorégulateur, antioxydant et anti-apoptotique comme la mélatonine. La mélatonine neutralise les ROS et induit les enzymes anti-oxydantes dont la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (Rodriguez et al., 2004; Garcia et al., 2017 ; Rahim et al., 2017). En outre, la mélatonine réprime la réponse inflammatoire dépendante du NF-κB, rétablit l'homéostasie mitochondriale, et réduit les dommages cardiaques sepsis-dépendants (Escames et al., 2003 ; García et al., 2015 ; An et al., 2016).



**Figure 44.** Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants de la mélatonine dans le modèle de cardiomyopathie septique.

## **Conclusion :**

La caractérisation préalable de *S. marcescens* montre qu'elle exprimait différents facteurs de virulence en plus de sa résistance aux différents antibiotiques (aminopénicillines, C1G et polymyxines). Cette souche était résistante au système du complément, formait un biofilm de forte intensité et possédait un pouvoir hémolytique évalué à 70%. La dose létale 50 (DL50) de *S. marcescens*, testée sur des souris BALB/c était comprise entre  $10^7$ - $10^8$  CFU.

L'étude de l'effet de sepsis à une dose sublétales de *S. marcescens* et de la mélatonine dans notre modèle de souris Swiss et BALB/c suggère :

Une implication du stress oxydatif dans les dommages oxydatifs induite par sepsis caractérisé par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MDA, MPO), une diminution de marqueur antioxydant non enzymatique (GSH) et une augmentation de marqueur antioxydant enzymatique (catalase) chez les souris BALB/c et non pas les souris Swiss. Ce déséquilibre redox est associé à des dommages tissulaires myocardiques caractérisé par une nécrose cellulaire, une infiltration leucocytaire et une hypertrophie cardiaque.

Une activation de la réponse immuno-inflammatoire caractérisée par une augmentation du taux des leucocytes circulants, une splénomégalie associée à une forte infiltration leucocytaire, ainsi qu'une infiltration massive des mésentères des souris BALB/c septiques.

La mélatonine prévient le stress oxydatif et rétablit la balance redox, inhibe la réponse inflammatoire et exerce un effet immuno-régulateur chez les souris BALB/c septiques.

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

En perspectives, il serait intéressant de :

- Etudier l'effet de la mélatonine sur la mortalité induite par sepsis en utilisant une dose létale de *S. marcescens*.
- Elucider le mécanisme par lequel la mélatonine exerce son effet immuno-régulateur et son effet sur la neutropénie et la leucopénie observé chez les patients.
- Explorer l'effet de la mélatonine sur le dysfonctionnement mitochondrial induit par sepsis.
- Etudier l'effet de la mélatonine sur la régénération des cardiomyocytes en ciblant des marqueurs spécifiques.

## Références Bibliographiques :

### A

- Abbas HI, Elsherbini AH .M.(2018). Silencing the nosocomial pathogen *Serratia marcescens* by glyceryl trinitrate. *Afri Health Sci. University- Zagazig- Egypt*; 18(1): 1-10.
- Abraham E (2003) Nuclear factor-kappaB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis* 187:S364–S369
- Acuña-Castroviejo; D. I. Rahim, C. Acuña-Fernández, M. Fernández-Ortiz, J. Solera-Marín, R. K. A. Sayed, M. E. Díaz-Casado, I. Rusanova, L. C. López et G. Escames (2017). Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1-23
- Ambroise-Thomas So. (1998). La Melatoine :role biologique ,intérêt et limites de l’usage Thérapeutique. Université Joseph Fourier -Grenoble I.
- Anderson, M. T., L. A. Mitchell, L. Zhao et H. L. T. Mobleya (2017). Capsule Production and Glucose Metabolism Dictate Fitness during *Serratia marcescens* Bacteremia
- Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci Elite Ed*; 1: 277-87
- An R, Zhao L, Xi C, Li H, Shen G, Liu H, Zhang S, Sun L.2016. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Basic Res Cardiol*; 111:8.
- 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.

### B

- Baraka-Vidot JE. (2015). Stress oxydant et pathologie diabétique à l’île de La Réunion .Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l’albumine glyquée. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion. Français.
- Benleulmi-Chaachou AB. (2014). Etude des partenaires protéiques associés aux homodimères et aux hétérodimères des récepteurs couplés aux protéines G. Université Paris –Sud.
- Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D (2016) TNF and ROS crosstalk in inflammation. *Trends Cell Biol*; 26:249–261.
- 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.
- Bosmann MA ET Peter A. Ward. (2013). The inflammatory response in sepsis. The University of Michigan Medical School, Department of Pathology, USA.
- Bouroche GA.(2012). Pneumonies acquises sous ventilation mécanique dans les suites d’un sepsis sévère : particularité des infections intra-abdominales .Université Paris Descarte .
- Bouglé A, Annane D. (2007). Physiopathologie du choc septique. *Antibiotiques*; 9: 9-19.

- 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.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. (2005). Animal models of sepsis :setting the stage. *Nat Rev Drug Discov* ;4: 854–865

## C

- Cadenas E, Poderoso JJ, Antunes F, Boveris A. (2000). Analysis of the pathways of nitric oxide utilization in mitochondria. *Free Radic Res* ; 33:747–756.
- Camille MI,Serres MI . (2011). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. Université Lyon 1, Laboratoire de recherche dermatologique, pavillon R, Hôpital Édouard Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France.
- Carrillo-Vico. A, Calvo. J.R, Abreu. P, Lardone. P.J, Garcia-Maurino. S, Reiter. R.J, Guerrero. J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* ; 18, 537-539.
- Carrillo-Vico. A, Guerrero. J.M, Lardone. P.J, Reiter. R.J. (2005). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* ; 27, 189-200.
- Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, Bugger H. (2015). Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. *Int. J Mol Sci*; 16:17763-17778.
- Costantino G, Cuzzocrea S, Mazzon E, et al. (1998). Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation *Eur J Pharmacol*; 363:57-63.
- Coulthurst SJ, Williamson NR, Harris AK, Spring DR, Salmond GP (2006). Metabolic and regulatory engineering of *Serratia marcescens*: mimicking phage-mediated horizontal acquisition of antibiotic biosynthesis and quorum-sensing capacities. *Microbiology* 152: 1899-1911.
- Cristina MA, Sartini MA and Spagnolo AN (2019). *Serratia marcescens* Infections in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). *Int. J. Environ. Res. Public Health*; 16: 610.

## D

- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A.(2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*;52(4): 601-23
- Darshan, N. et H. K. Manonmani (2015). Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol* 52(9):5393–5407
- Devavry SE. (2011). Récepteurs de la mélatonine : pharmacologie du récepteur ovin MT2, identification de leur activité constitutive et développement d’une approche par ARN interférent. Université François – Rabelais de Tours.
- Doorduijn, D. J., S. H.M. Rooijackers, W. Van Schaik et B. W. Bardoel (2016). Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*. 1-8.

- Draper HH, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*; 186: 421-31

## E

- ElGammasy .T M. A, Abushady NA M, Hamza MO T, Shaker R.(2015). Increased myeloperoxidase activity as an indicator of neutrophil-induced inflammation and sepsis in neonates. *Egypt J Pediatr Allergy Immunol* ;13(1):15-20.
- Embrey, M., P. Hunter, J. Sellwood, P. Wyn-Jones, S. L. Percival et R. Chalmers(2004). *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*, Elsevier.
- 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.

## F

- Fan J, Ye RD, Malik AB. (2001). Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* ; 281:1037-1050.
- Favero GA, Franceschetti LO, Bonomini FR, Fabrizio Rodella LU, and Rezzani RI. (2017). Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. *International Journal of Endocrinology*.
- Fierer, J., F. Finley et A. I. Braude (1972). A plaque assay on agar for detection of Gram-negative bacilli sensitive to complement. *Journal of Immunology*. 109:1156–1158.
- Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolff Met al. (2014). Melatonin receptors mediate improvements of survival in a model of polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 42: e22–e31
- Franzon, J. H. et D. S. Santos (2004). A role for histone-like protein H1 (H-NS) in the regulation of hemolysin expression by *Serratia marcescens*.
- Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. (2008). Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin* 2009; 25: 83–101.

## G

- Gallay HE, Damon A LO, Lee AL, Gary CA, Lorna S AU, and Nigel R WE.(2014). Melatonin as a potential therapy for sepsis: a phase I dose escalation study and an ex vivo whole blood model under conditions of sepsis. *J. Pineal Res*; 56:427–438.
- Garcia JA, Ortiz F, Miana J, Doerrier C, Fernandez-Ortiz M, Rusanova I, Escames G, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. (2017). Contribution of inducible and neuronal nitric oxide synthases to mitochondrial damage and melatonin rescue in LPS-treated mice. *J Physiol Biochem* 73:235–244.
- Genaud P, C. Vinsonneau, A. Cariou. (2001). Dysfonction myocardique et sepsis physiopathologie et perspectives thérapeutiques; 10 : 153-61.
- Golemi-Kotra Dasantila.(2008). *Serratia, Edwardsiella and Morganella Infections*. York University, Toronto, Canada.

- González-Juarbe, N., C. A. Mares, C. A. Hinojosa, J. L. Medina, A. Cantwell, P. H. Dube, C. J. Orihuela et M. A. Bergman (2015). Requirement for *Serratia marcescens* Cytolysin in a Murine Model of Hemorrhagic Pneumonia. (83): 2. *Infection and Immunity*.
- Gazengel, J-M (2013). *Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique*, 2nd. Hughes, R. B. et A. C. Smith (2007). *Capsule Stain Protocols*. American Society for Microbiology. 1-11.
- 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.
- Grimont FR and Grimont PA A. D. (2006). The Genus *Serratia*. *Prokaryotes* 3, 219–244.
- Guo RF, Ward PA. (2007). Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal*; 9:1991- 2002.

## H

- Hardjito, L., A. Huq et R. Colwell (2002). The Influence of Environmental Conditions on the Production of Pigment by *Serratia marcescens* Linawati. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7: 100-104.
- Hallwell B. (1999). Free radical, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*; 344:721–4.
- Hardeland R, Pandi-Perumal S.R. Cardinali D.P. (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* ; 38, 313-316.
- Hejazi and Falkner .F.R. (1997). *Serratia marcescens* ; Vol. 46 : 903-912.
- Hertle, R. (2000). *Serratia* Type Pore Forming Toxins. *Current Protein and Peptide Science*. 1: 75-89.
- Horii, T., M. Kobayashi, M. Nadai, S. Ichiyama et M. Ohta (1998). Carbapenem-induced endotoxin release in Gram-negative bacterial sepsis rat models. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 21: 297-302.
- Horton JW (2003) Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*; 189:75–88
- Hughes G, Murphy MP, Ledgerwood EC. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem J*; 389:83–89.

## I

- Iguchi A, Nagaya Y, Pradel E, Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Kurokawa K, Oshima K, Hattori M, J. Parkhill, M. Sebaihia, S. J. Coulthurst, N. Gotoh, N. R. Thomson, J. J. Ewbank et T. Hayashi (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome Biol Evol* 6:2096–2110.

## J

- Jeannina, P., S. Jaillonb, Y. Delneste (2010). Biologie des récepteurs de l'immunité innée : applications cliniques et thérapeutiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 41-51.



- Jeanty M, Suzenet F, Guillaumet G. (2011). La mélatonine : rôles biologiques et intérêts thérapeutiques. Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans.

## K

- Krzymi-Ska SY, Marta RA and Adam KA. (2010). Cytotoxic Activity of *Serratia marcescens* Clinical Isolates. Vol. 59, No 3, 201- 205.
- Klebanoff SJ. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* ;77:598–625.
- König, W., Faltin, Y., Scheffer, J., Schöffler, H., Braun, V. (1987). *Infect. Immun.* 55,2554-2561.
- Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. (1992). Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12:4412–4421.

## L

- Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Henin D, Poderoso JJ, Panis Y, Zedda C, Billiar T, Payen D, Aubier M, Boczkowski J. (2000). Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Respir Crit Care Med*; 162:2308–2315.
- LeÂopold KU.C, Sophie CH, Emmanuel AN, Marianne AU, Isabelle VA, GeÂrard P.F.Michel, Mitch Uh, Jean CE, Alain FI, Sophie BE, Ivo ST, Jules A.HO, B.Brett Finlay, Jean-Pierre Gorvel, Ferrandon.DO and Ewbank.JO. (2003). Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *The EMBO Journal* Vol. 22 No. 7 pp. 1451-1460
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. (2001). International Sepsis Definitions Conference. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*; 31:1250–1256.
- Lin, C-S., J-T. Horng, C-H. Yang, Y-H Tsai, L-H Su, C-F Wei, C-C Chen, S-C Hsieh, C-C Lu et H-C Lai (2010). RssAB-FlhDC-ShlBA as a Major Pathogenesis Pathway in *Serratia marcescens*.
- Lorente LE. (2015). New Prognostic Biomarkers of Mitochondrial Oxidative Stress in Septic Patients. *Archives of Critical Care Medicine*; 1 (2)- e3125.
- Liu SF, Malik AB. (2006). NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ; 290:L622–L645.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*;364:626–632.
- Lorente LE, Martín MA M, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez AL, Labarta LO, Díaz CE, Solé-Violán JO, Ferreres JO, María Borreguero-León JU, Jiménez AL, and Morera-Fumero AR. (2013). Prognostic Value of Malondialdehyde Serum Levels in Severe Sepsis: A Multicenter Study. *PLoS One* ; 8(1): e53741.
- Lowes DA, Almawash AM, Webster NR, Reid VL, Galley HF. (2011). Melatonin and structurally similar compounds have differing effects on inflammation and mitochondrial

function in endothelial cells under conditions mimicking sepsis. *Br J Anaesth*; 107(2):193-201.

- Lundberg JO, Weitzberg E (2005) NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25:915–922.

## M

- Mahlen ST D.(2011). *Serratia Infections: from Military Experiments to Current Practice*, Vol. 24, No. 4 ; p. 755–791
- Marre, R., Hacker, J., Braun, V. (1989) *Microbial. Pathogenesis*. 7, 153-156.
- Ménard CE. (2011). Mélatonine, agonistes mélatoninergiques et luminothérapie dans les troubles du sommeil et du décalage horaire, Université de Nantes Faculté de Pharmacie .
- Merx M.W.et C. Weber.(2007). Sepsis and the Heart; 116:793–802.
- 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.
- Molina VI , Dessauer BE , Rodrigo RA & Carvajal CR.(2017) Oxidative stress biomarkers in pediatric sepsis: a prospective observational pilot study. *REDOX REPORT*; VOL: 22, NO. 6, 330–337.
- Morgan MJ, Liu ZG (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21:103–115.

## N

- Naji LA, Antonio Carrillo-Vico AN, Guerrero JU. M, Calvo JU .M.(2004). Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sciences* ; 74 :2227–2236.
- Napolitano Lena M. Sepsis. (2018). Definitions and Guideline Changes. *SURGICAL INFECTIONS*; Vol: 19, Number 2.
- Nathan C. (2002). Points of control of inflammation. *Nature*; 420: 846–852

## O

- O'Neill, L., D. Golenbock et A.G. Bowie (2013). The history of Toll-like receptors redefining innate immunity. *Nature Reviews | Immunology*. Volume 13: 453-460
- Ortiz FR, Garc JO, Castroviejo DR, Doerrier CA, Lopez AN, Venegas CA, Volt HU , Marta Luna-Sanchez MA, Lopez LU and Escames GE.(2014). The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: inhibition of iNOS and preservation of nNOS. *J. Pineal Res*; 56:71–81

## P

- Pinna A, Usai D, Sechi LA, Carta A, Zanetti S (2011). Detection of virulence factors in *Serratia* strains isolated from contact lens-associated corneal ulcers. *Acta Ophthalmol* 89: 382- 387.
- Pitsika MA, Goutzourelas NI , Becker AP, EP. (2013). Oxidative status in ICU patients with septic shock. *Food and Chemical Toxicology*; Volume: 61, Pages 106-111.
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B

.(1998).Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24:340–355.

- 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 JAY. (2014).Metabolic theory of septic shock. *World J Crit Care Med*; 4:3(2): 45-54.

## Q

- 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.

## R

- Rahim I. (2009). Modulation de la défaillance myocardique induite par *Escherichia coli* chez le rat blanc, par l'aspirine et la curcumine. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.
- Reiter RJ, Tan DX, Galano A. (2014). Melatonin: exceeding expectations. *Physiology Bethesda*; 24:325–333.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*; 61:253-278.
- Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS (2005) Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via posttranslational modification. *Antioxid Redox Signal* ; 7:619–626.
- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* ; 17:183–189.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* ;36:1–9.
- Rozenberg S, Besse S, Brisson H, Jozefowicz E, Kandoussi A, Mebazaa A, Riou B, Vallet B and Tavernier B. (2006).Endotoxin-induced myocardial dysfunction in senescent rats *Critical Care*;10:1-9.

## S

- Sarti PO, Magnifico MA , Altieri FA , Mastronicola DA, et Arese MA .(2013). New Evidence for Cross Talk between Melatonin and Mitochondria Mediated by a Circadian-Compatible Interaction with Nitric Oxide; 14(6): 11259–11276.
- 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 Radic Res*; 40:619–630.
- Shanks, R. M. Q, R. M. Lahr, N. A. Stella, K. Arena, K. M. Brothers, D. H. Kwak, X.Liu et E. J. Kalivoda (2013). A *Serratia marcescens* PigP Homolog Controls Prodigiosin Biosynthesis, Swarming Motility and Hemolysis and Is Regulated by cAMP-CRP and HexS. *PLOS ONE*. 8 (3): e57634

- Shen HM, Pervaiz S. (2006). TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J*; 20:1589–1598.
- Schrijver IR , Kemperman HA , Roest MA , Kesecioglu JO and Dylan W. de Lange1. (2017). Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. *Intensive Care Medicine Experimental*; 5:43
- Sellers.R.S,Clifford.C.B , Treuting.P.M , and Brayton.C.(2012) Immunological Variation Between Inbred Laboratory Mouse Strains: Points to Consider in Phenotyping Genetically Immunomodified Mice. *Veterinary Pathology*; 49(1) 32-43.
- Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BC.(2005). Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today*;35(1):52-9.
- 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.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Kato H, Cardinali DP.(2010). Melatonin in septic shock: some recent concepts. *J Crit Care*; 25(4):656.e1-6.
- Srinivasan, R., R. Mohankumar, A. Kannappan, V. Karthick Raja, G. Archunan, S.Karutha Pandian, K. Ruckmani et A. Veera Ravi (2017). Exploring the Anti-quorumSensing and Antibiofilm Efficacy of Phytol against *Serratia marcescens* Associated Acute Pyelonephritis Infection in Wistar Rats. *Frontiers in Cellular and InfectionMicrobiology*. 7: 1-18.

## T

- 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.
- Thomson NR, Crow MA, McGowan SJ, Cox A, Salmond GP (2000). Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* 36: 539-556.
- Trunova.G.V, Makarova.O.V, Diatroptov.M.E, Bogdanova.I.M, Mikchailova.L.P, and Abdulaeva.S.O. (2011). Morphofunctional Characteristic of the Immune System in BALB/c and C57Bl/6 Mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*; Vol: 151, No. 1, pp. 112-115.
- Toufekoula RH, Papadakis VA, Tsaganos TH, Routsis CH , E Orfanos ST , Kotanidou AN , Carre DI , Raftogiannis MA, Baziaka FO and Giamarellos-Bourbouli EV.(2013). Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram C – negative bacteria: experimental and clinical evidence. *Critical Care*;17.

## V

- 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.

- Villette MA. (2017). La mélatonine: un somnifère naturel. Université de Lille 2.

## W

- Warner AN, Bencosme AN, Healy DA and Verme CA. (1995). Prognostic Role of Antioxidant Enzymes in Sepsis: Preliminary Assessment. *CLIN. CHEM*; 41/6, 867-871.
- Wang RI, Hui LI, Li XU, Hui ZH and Rui XI. (2015). Involvement of nuclear receptor RZR/ROR $\gamma$  in melatonin-induced HIF-1 $\alpha$  inactivation in SGC-7901 human gastric cancer cells. *Oncology Reports* ; 34: 2541-2546,
- Wei JR, Tsai YH, Horng YT, Soo PC, Hsieh SC, Hsueh PR, Horng JT, Williams P, Lai HC (2006). A mobile quorum-sensing system in *Serratiamarcescens*. *J Bacteriol* 188: 1518-1525.
- Wei Hu, Chao DE, Zhiqiang Ma, Dongjin WA, Chongxi Fan, Tian Li, Shouyin Di, Bing Gong, Reiter RU and Yang YA. (2017). Utilizing melatonin to combat bacterial infections and septic injury. *British Journal of Pharmacology* ; 174 754–768.
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. (2000). Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*; 7:53–58.
- Wiskur, B. J., J. J. Hunt, M. C. Callegan (2008). Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 49:4931-8.

## Y

- Yuan, B., A. Cheng et M. Wang (2013). Polysaccharide export outer membrane proteins in Gram-negative bacteria. *Future Microbiology*. 8 : 525-535.

## Z

- Zhang H, Liu D, Wang X, Chen X, Long Y, Chai W et al. (2013). Melatonin improved rat cardiac mitochondria and survival rate in septic heart injury. *J Pineal Res* ; 55: 1–6 .
- Zhou JI, Ruan LI, Chen HO, Luo HU, Huan Jiang HU, Wang JU, and Jia AI. (2019). Inhibition of Quorum Sensing and Virulence in *Serratia marcescens* by Hordenine. *Food Chem* ; 67, 784–795.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA (2001) NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 31:1405–1416.

## Annexes:

### Annexe 1

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

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

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

Annexes 1 (Suite)

Tableau II: Récepteurs TLRs chez l'homme et agonistes(Jeanninet al., 2010)

TLR	PAMPs
TLR1/TLR2	Triacyl lipopeptides (bactéries, mycobactéries)
TLR2	Lipoprotéines
	Acide lipotéichoïque (bactéries Gram positif)
	Lipoarabinomannan (mycobactérie)
	OmpA (bactéries Gram négatif)
	Porine (bactéries Gram négatif)
TLR3	ARN double brin (virus)
TLR4	LPS (bactéries Gram négatif)
	Protéines virales (virus respiratoire syncytial)
	phosphatidylinositol mannosides (mycobactéries)
TLR5	Flagelline (bactéries à flagelle)
TLR6/TLR2	Diacyl lipopeptides (mycoplasme)
TLR7	ARN simple brin (virus)
TLR8	ARN simple brin (virus)
TLR9	ADN hypométhylé (bactéries)
TLR10	Ligand non-connu

Abréviations : OmpA, outer membrane protein A ; LPS, lipopolysaccharide.

**Annexe 2 :**

**Les appareillages**



**Centrifugeuse**



**Vortex**



**Balance de précision**



**Lecteur ELIZA**



Annexe 2 (Suite)

Tableau III: liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes

Entérobactéries	Pseudomonas spp.	Acinetobacter spp.	Staphylococcus spp.	Enterococcus spp.
Ampicilline (10µg)	Ticarcilline (75µg)	Ticarcilline (75µg)	Pénicilline (10 UI)	Ampicilline (10µg)
Amoxicilline+acide clavulanique (20/10µG)	Ticarcilline+acide clavulanique (75/10µg)	Ticarcilline+acide clavulanique (75/10µg)	Oxacilline (CMI seulement)	Amoxicilline+acide clavulanique (20/10µG)
Aztréonam (30µg)	Pipéracilline (100µg)	Pipéracilline (100µg)	Céfoxitine (30µg)	Céfotaxime (30µg)
Céfalotine (30µg)	Céftazidime (30µg)	Céftazidime (30µg)	Amikacine (30µg)	Tétracycline (30µg)
Céfazoline (30µg)	Aztréonam (30µg)	Imipénème (10µg)	Gentamicine (10µg)	Furanes (300µg)
Céfoxitine (30µg)	Imipénème (10µg)	Amikacine (30µg)	Kanamycine (30µg)	Colistine (10µg)
Céfotaxime (30µg)	Amikacine (30µg)	Gentamicine (10µg)	Erythromycine (15µg)	Triméthoprim+ sulfaméthoxazole
Céftazidime (30µg)	Gentamicine (10µg)	Tobramycine (10µg)	Clindamycine (2µg)	Acide nalidixique (30µg) <small>Active</small>
Imipénème (10µg)	Tobramycine (10µg)	Nétilmicine (CMI seulement)	Pristinamycine (15µg)/Quinupristine-dalfopristine	Composé vibriostatique O/129 <small>Accéder à l'activer</small>
Ertapénème (10µg)	Nétilmicine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Ofloxacine (5µg)	Chloramphénicol (30µg)
Amikacine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Ciprofloxacine (5µg)	
Gentamicine (10µg)	Lévofloxacine (5µg)	Doxycycline (30µg)	Lévofloxacine (5µg)	
Acide nalidixique (30µg)	Fosfomycine CMI	Triméthoprim+ sulfaméthoxazole (1,25/23,75µg)	Chloramphénicol (30µg)	
Ciprofloxacine (5µg)	Colistine (10µg)	Colistine (CMI seulement)	Vancomycine (CMI seulement)	
Colistine CMI			Teicoplanine (30µg)	
Chloramphénicol (30µg)			Rifampicine (5µg)	
Furanes (300µg)			Triméthoprim+	

			sulfaméthoxazole (1,25/23,75µg)	
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (1,25/23,75µg)			Tétracycline (30µg)	
Fosfomycine (200µg)			Acide fusidique (10µg)	
			Fosfomycine IV	
			Composé vibriostatique O/129	

## Annexe 2 (suite)

### Etude histologique par coloration standard à hématoxyline-éosine

#### A. Fixation

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

Les fragments tissulaires sont mis dans des cassettes en plastique puis fixés dans du formol tamponné pendant 24 heures.

#### B. Déshydratation et inclusion

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

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

Etapes	Réactifs	Durée
<b>Fixation</b>	Formol tamponné à 4%	1h
<b>Déshydratation</b>	1 bain d'éthanol 70°	6h
	1 bain d'éthanol 80°	6h
	1 bain d'éthanol 95°	6h
	3 bains d'éthanol 100°	6h x3
<b>Inclusion</b>	3 bains de xylène	3h x3

	3 bains de paraffine	3hx3
--	----------------------	------

Une fois totalement imprégné, le tissu est placé dans un moule contenant de la paraffine fondue (portée à 56/58°C), la chaleur provoque l'évaporation du solvant et les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine, après refroidissement, on procède alors au démoulage ; on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.

### C. Coupes histologiques et coloration H-E

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

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

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

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

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

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

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

	3 bains de Toluène	45sec x3
--	--------------------	----------

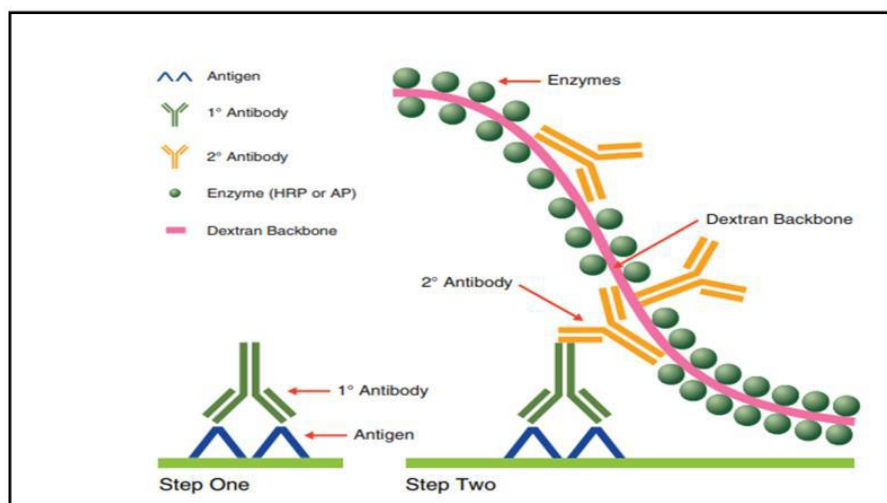
#### D. Observation microscopique

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

#### Etude immunohistochimique (IHC)

L'immunohistochimie (IHC) est une technique histologique de localisation des protéines dans des cellules d'un tissu donné. Elle fournit des données semi-quantitatives sur l'expression, la distribution et localisation *in situ* des protéines cibles dans les cellules d'une coupe de tissu. Elle est basée sur une réaction spécifique immunologique de type antigène-anticorps permettant la détection des protéines (antigène) cellulaires au moyen d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux.

Le couple anticorps-antigène (anticorps primaire) peut être visualisé par un anticorps secondaire conjugué à une enzyme (peroxydase) qui peut catalyser une réaction de production de couleur visualisable en lumière blanche du microscope optique (Pluot et al., 2006). Plusieurs systèmes de révélation/ amplification sont utilisés en IHC. Le système avec polymère est celui utilisé dans notre étude. Il s'agit d'une technique en deux étapes, incubation de l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène d'intérêt, puis incubation de l'anticorps secondaire directement couplé au polymère de type micropolymère sur lequel les marqueurs sont fixés (Figure 1).



**Figure 1.** Schéma récapitulatif du principe d'immunohistochimie basé sur la méthode des polymères.

Dans notre étude, l'étude immunohistochimique était réalisée sur les coupes de tissu cardiaque ciblant le CD-15 un marqueur d'infiltration de PN. Dans ce qui suit le protocole détaillé de cette méthode (Tableau VI) :

#### A. Coupes histologiques

Des coupes histologiques de 4µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un microtome à partir des blocs inclus en paraffine. Les coupes sont ensuite étalées sur des lames silanisées dans un bain Marie qui contient de l'eau chauffée à 45°C. Le numéro du bloc et l'anticorps utilisé sont mentionnés sur la lame à l'aide d'un crayon.

### **B. Déparaffinage et réhydratation**

La paraffine éliminée par incubation des lames histologiques dans une étuve à 50° C pendant 24h suivie par un passage dans 4 bains de toluène pendant 5 min. Les lames sont ensuite réhydratées dans des bains d'alcool à concentration décroissante (100°, 95°, 80°, 70°) pendant 5min chacun. Enfin, les lames sont rincées à l'eau distillée (Tableau VI).

### **C. Démasquage antigénique**

Cette étape permet aux antigènes de retrouver leur conformation protéique initiale et les rend accessibles aux anticorps. Elle consiste à prétraiter les lames avec une solution tampon à pH6 pendant 40min à 95°C dans le but de démasquer l'antigène d'intérêt (CD15). Après refroidissement, les lames sont lavées à l'eau distillée. Une chambre humide doit être préparée afin de déposer les lames dessus après avoir encercler les coupes histologiques à l'aide d'un Dakopen®.

### **D. Blocage des peroxydases endogènes**

L'activité des peroxydases endogènes, qui pourrait interférer avec celles des peroxydases exogène apportées lors la réaction, est bloquée en déposant à l'obscurité du peroxyde d'hydrogène l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les lames pendant 5min. Jouant le rôle de substrat de l'enzyme, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> va être consommé par les enzymes endogènes qui seront alors inactives. Cette étape est suivie par trois lavages successifs avec du tampon TBS (*Tris-Buffered Saline*) pendant 5 min.

### **E. Dépôt d'anticorps et révélation**

Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps monoclonaux Dako® d'origine souris, spécifiques au CD15. Ces anticorps sont dilués au 1/100<sup>ième</sup> puis déposés, à raison de 100 µL sur les lames. Les lames sont incubées 1 heure à température ambiante et à l'obscurité, puis rincées trois fois avec du tampon TBS pendant 5 min.

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps monoclonal d'origine chèvre. Il est couplé à l'enzyme HRP. Il est déposé directement sur la lame et incubé pendant 15min puis lavé 3 fois avec du tampon TBS pendant 5 min.

La révélation a été réalisée à l'aide du chromogène DAB (3,3'-diaminobenzidine) en présence du substrat de l'enzyme HRP, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à l'obscurité pendant 10 min. Le DAB forme un dépôt marron (positif) lorsqu'il réagit avec la peroxydase. Des lavages (3x) sont effectués avec du TSB.

### **F. Contre coloration**

La contre coloration des coupes histologiques a été réalisé par l'hématoxyline pendant 10 min. Elle permet de colorer les noyaux, les cytoplasmes et les membranes qui n'ont pas été révélés par les anticorps. Elle est suivie par un rinçage à l'eau pendant 10 min, une déshydratation dans des bains de degrés croissants d'alcool éthylique (70°, 80°, 95°, 100°) pendant 5min, et un éclaircissement dans du toluène. Les lames sont ensuite montées à l'aide l'Eukitt pour préserver les colorations.

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

**Tableau VII.** Etapes de l'immunohistochimie (IHC).

<b>Etapes</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Durée</b>
<b>Déparaffinage</b>	Etuve 50°C	24h

	4 bains de toluène	5min x4
<b>Réhydratation</b>	1 bain d'éthanol 100°	5min
	1 bain d'éthanol 95°	5min
	1 bain d'éthanol 80°	5min
	1 bain d'éthanol 70°	5min
	1 bain d'eau distillée	5min
<b>Démasquage antigénique</b>	Tampon pH6 à 95°C	40min
	Lavage d'eau distillée	2min
<b>Blocage des peroxydases endogènes</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5min
	3 Lavages TBS	5min x3
<b>Dépôt d'anticorps et révélation</b>	Anticorps primaires Anti-p63, anti-TTF1	1h
	3 Lavages TBS	5min x3
	Anticorps secondaire	15min
	3 Lavages TBS	5min x3
	DAB+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10min
	3 Lavages TBS	5min x3
<b>Contre coloration à l'hématoxyline</b>	Hématoxyline	10min
	Lavage d'eau distillée	10min
	3 bains éthanol 70°, 80°, 95°	5min
	3 bains d'éthanol 100°	5min
	3 bains de Toluène	45sec x3

**Tableau VIII** Caractères biochimiques et cultureux d'identification des espèces du genre *Serratia* (Mahlen, 2011).

Caractéristiques	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. ficaria</i>	<i>S. odorifera</i>	<i>S. fonticola</i>	
DNase	+	+	+	+	-	
Gélatinase	+	+	+	+	-	
Lipase (Hydrolyse de tween80)	+	+	+	-	+	
Production de la prodigiosine	V	-	-	-	-	
L'odeur de la pomme de terre	-	-	+	+	-	
Indole	-	-	-	V	-	
Urease	-	-	-	-	-	
Arginine dihydrolase (ADH)	-	-	-	-	-	
Lysine décarboxylase (LDH)	+	+	-	+	+	
Ornithine décarboxylase (ODC)	+	+	-	V <sup>b</sup>	+	
Fermentation de l-Arabinose	-	+	+	+	+	
Fermentation de Lactose	-	V	V	+	+	
Fermentation de d-Sorbitol	+	+	+	+	+	Acti
Fermentation de sucrose	+	+	+	V <sup>b</sup>	V	Accél active



