Nº D'ORDRE : 37/2009-M/S.N

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

Faculté des Sciences Biologiques

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER
EN : SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : Biotechnologie et Santé

Par

RAHIM Ibtissem

SUJET

Modulation de la défaillance myocardique induite par *Escherichia coli* chez le rat blanc, par l'aspirine et la curcumine

Soutenu le 14/07/2009, devant le Jury composé de :

Mme TOUIL-BOUKOFFA CHAFIA	Professeur (FSB / USTHB)	Président
Mme DJERDJOURI BAHIA	Professeur (FSB / USTHB)	Directeur de thèse
Mme MESSAI YAMINA	Maître de Conférences (FSB / USTHB)	Examinatrice
Mme BARKA ZOHRA	Maître de Conférences (FSB / USTHB)	Examinatrice
Mr CHERGUI AHMED	Chargé de Cours (FSB / USTHB)	Examinateur
Mme IZEM MALIKA	Chargée de Cours (FSB / USTHB)	Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Djerdjouri, qui a assuré la direction de ce travail, pour m'avoir proposé ce sujet de recherche. Je la remercie vivement pour sa disponibilité, pour ses conseils et pour sa très grande patience.

Je remercie vivement Mme Touil-Boukoffa d'avoir bien voulu juger cette thèse et accepter de présider le jury.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme Izem qui a bien voulu m'accorder de son temps pour examiner ce travail, je la remercie pour son aide précieuse, sa patience, et sa gentillesse, Merci Mme Izem.

J'adresse mes remerciements à Mme Messai pour avoir pris de son temps pour examiner ce travail.

Je remercie Mr Chergui pour avoir aimablement accepter d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements à Mme Barka qui a bien voulu examiner ce travail.

Je tiens à remercier Mme Benazzoug, pour son aide et sa gentillesse.

Je remercie vivement Mr Bouffersaoui, Mme Benazzoug, Mr Bakour, Mme Messai, Mme Alouache, Mme Soukayna, Mme Idress, Mme Khedis, Mme Meriem, Mr Arezki et Ami Mouloud pour leurs aides pendant la réalisation de ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent aux membres de l'équipe Pharmacologie cellulaire et signalisation : Mme Izem, Ilhem, Abdou, Radia, Souad, Zineb, Nabila, Meriem, Amira, Asma, Nessrine.

Un très grand remerciement a toute personne qui a contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce travail surtout : Lynda, Soumia, Hayet R, Fouzia Z, Mourad, Radia, Oussama, Amina, Zineb, Samia, Fouzia G et Okba.

Liste des abréviations

AA:	Acide Arachidonique
ANT:	Adenine Nucléotide Translocator
AP-1:	Activator protein-1
APAF-1:	Apoptotic Protease Activiting Factor-1
Bcl 2:	B cell leukaemia-2
BSA:	Bovin Serum Albumin
CARD :	Caspase Recruitment Domain
CAT :	Catalase
CD :	Complexe de Différenciation
CIVD :	Coagulation Intravasculaire Disséminé
COX :	Cyclooxygenase
CSF :	Colony-Stimulating Factors
CTAB:	Hexadodecyl Sulfate Bromide
DO:	Densité Optique
DD:	Death Domain
E. coli :	*Escherichia coli*
$FADH_2$:	Flavine Adénine Dinucléotide (réduite)
$FMNH_2$:	Flavine Mononucléotide (réduite)
GSH :	Glutathion (forme réduite)
GM-CSF:	Colony-Stimulating Factor Granulocyte-Macrophage
H-E:	Hématoxyline-Eosine
H_2O_2 :	Peroxyde d'Hydrogène
ICAM :	Intercellular Adhesion Molecule
IFN :	Interféron
IKK :	IκB kinase
IL :	Interleukine
iNOS :	NOSynthase inductible
IRAK-4:	IL-1 Receptor-Associated serine/threonine Kinase -4
JNK:	Jun N-terminus Kinase
LBP:	Lipopolysaccaharide Binding Protein
LDH :	Lactate Déshydrogénase
LOX :	Lipoxygénase
LPS :	Lipopolysaccharide
LTB4 :	Leucotriène B4
MDA:	Malondialdéhyde
MPO:	Myeloperoxydase
MyD88:	Myeloid Differentiation protein
NAD^+:	Nicotinamide Adénine Dinucleotide (oxydée)
NADH:	Nicotinamide Adénine Dinucleotide (réduite)
NIK:	NFκB Inducing Kinase
$NO^{\cdot}$:	Monoxyde d'Azote
NOS:	NO Synthase
Nox:	NADPH oxydase
$O_2^{\cdot}$:	Anion Superoxyde

$^1O_2$:	Oxygène Singulet
$^{\cdot}OH$:	Radical Hydroxyl
$ONOO^-$:	peroxynitrite
ONOOH:	Nitroperoxyde ou acide peroxynetreux
PAF:	Platelet Activating Factor
PAL:	Phosphatase Alkaline
PAMP:	Pathogen Associated Molecular Pattern
PGs:	Prostaglandines
PLA2:	Phospholipase A2
PN :	Polynucléaires Neutrophiles
PRR :	Pattern Recognition Receptors
PTP :	Pore de Transition de Perméabilité
$RO^{\cdot}$:	Radical Alkoxyl
$ROO^{\cdot}$:	Radical Peroxyle
ROS:	Espèces Réactifs de l'Oxygène
SOD:	Superoxyde Dismutase
TAK-1:	Transforming growth factor-b- Activated Kinase-1
TBA:	Thiobarbituric Acid
TF :	Facteur tissulaire
TGF*β*:	Transforming Growth Factor *β*
TIR:	Toll / IL-1R/R
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TLR:	Toll Like Receptors
TRAF-6	TNF-Receptor-Associated Factor 6
TXs:	Thromboxanes
UQ :	Ubiquinone
VDAC :	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VG :	Ventricule Gauche

Liste des figures

Figure 01 : Structure et localisation du lipopolysaccaride bactérien (LPS) au niveau de la membrane externe des bactéries Gram négatif 03

Figure 02: Activation des macrophages par les bactéries à Gram négatif ou par leur LPS 06

Figure 03: dysfonctionnement endothéliale induit par LPS et/ ou par les cytokines proinflammatoires 07

Figure 04: Adhérence des neutrophiles à l'endothélium vasculaire 09

Figure 05: implication des neutrophiles dans le choc septique 10

Figure 06 : Reconnaissance du LPS par TLR4 10

Figure 07 : La famille des Toll- like receptors (TLR) chez les mammifères 11

Figure 08 : Voie de signalisation induite par LPS au niveau des monocytes 13

Figure 09 : Formation de radicaux super oxyde par fuite d'électrons à partir de l'ubi- semiquinone, au niveau de la mitochondrie 17

Figure 10 : Voie apoptotique mitochondriale 20

Figure 11 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène 22

Figure 12: Voies génératrices des espèces réactives d'oxygène et de nitrogènes dans les cellules 25

Figure 13 : Structure et activation de la NADPH oxidase Nox2 28

Figure 14: Structure des composantes de la curcumine commerciale 32

Figure 15: Les principaux métabolites de la curcumine 33

Figure 16: Molécules cibles de la curcumine 36

Figure 17 : Molécules cible de la curcumine dans la voie d'activation du NF-κB par TLR-4/ CD40 37

Figure 18 : Structure chimique de l'acide salicylique (acide o-hydroxybenzoïque) et de l'acide acétylsalicylique ou aspirine 38

Figure 19 **:** Métabolisme de l'acide arachidonique, et site d'action de l'aspirine 40

Figure 20 : Réaction d'oxydation de l'orthodianizidine 46

Figure 21: Réaction de Griess 48

Figure 22 : Effets des différents traitements sur le poids des rats blancs 53

Figure 23 : Effets des différents traitements sur le poids du cœur 54

Figure 24 : Effets des différents traitements sur le poids du ventricule gauche VG 54

Figure 25: Taux de lactate déshydrogénase dans le ventricule gauche des rats, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 55

Figure 26: Taux de lactate déshydrogénase dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 56

Figure 27: Taux de phosphatase alcaline dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 57

Figure 28: Taux de phosphatase alcaline PAL dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 58

Figure 29: Activité myeloperoxydase dans le ventricule gauche des rats témoins, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg 59

Figure 30: Taux de malondialdéhyde dans le ventricule gauche des rats témoins, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg 60

Figure 31: Taux de malondialdéhyde dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg 61

Figure 32: Taux de nitrites dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg 62

Figure 33 Taux de nitrites dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg 63

Figure 34: Taux de nitrites et nitrates dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 64

Figure 35: Taux de nitrites totaux et nitrates dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 65

Figure 36: Activité catalase CAT dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités a la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 66

Figure 37: Taux de glutathion GSH dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 67

Figure 38 : Gonflement des mitochondries myocardiques du ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg 68

Figure 39: Activité respiratoire des mitochondries myocardiques du ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg69

Figure 40 et 41: Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche d'un rat contrôle 72

Figure 42, 43, 44 et 45 : Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche d'un rat septique traité par *E. coli* inactivée 72

Figure 46, 47, 48, 49 et 50: Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche d'un rat septique traité par *E. coli* inactivée 73

Figure 51, 52, 53 et 54: Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche d'un rat prétraité par la curcumine 60 mg/kg 30 minutes avant induction du choc septique par *E. coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg 74

Figure 55 et 56 : Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche d'un rat prétraité par l'aspirine 30 mg/kg, 60 minutes avant induction du choc septique par *E. coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg 74

Figure 57 et 58: Micrographie du mésentère d'un rat témoin 76

Figure 59, 60, 61 et 62: Micrographie du mésentère d'un rat septique traité par *E. coli* inactivée 76

Figure 63 et 64: Micrographie du mésentère d'un rat prétraité par la curcumine 60 mg/kg, 30 minutes avant induction du choc septique par *E. coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg 77

Figure 65 et 66 : Micrographie du mésentère d'un rat prétraité par l'aspirine 30 mg/kg, 60 minutes avant induction du choc septique par *E. coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg 77

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les isoformes de la Nox et les cellules qui les expriment 27

Tableau 02 : Protocole pharmacologique 44

Tableau 03: Effet d'un traitement par la curcumine 60 mg/kg ou par l'aspirine 30 mg/kg sur le poids des rats et des cœurs soumis à un choc septique par *E. coli* 53

Sommaire

Introduction 01
Chapitre I : Rappel bibliographique
I.1.Le Choc septique 02
I.1.1. Définition du choc septique
I.1.2.Agents causales 02
I.1.3. Le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif 03
I.1.4. Physiopathologie du choc septique 04
I.1.4.1.Rôle des macrophages dans le choc septique 04
I.1.4.2. Rôle des cellules endothéliales vasculaires 06
I.1.4.3. Rôle des polynucléaires neutrophiles 07
I.1.5. Voies de signalisations activées par LPS 10
I.1.6.Choc septique et dysfonctionnement myocardique 13
I.1.6.1. Rôle du monoxyde d'azote 13
I.1.6.2.Hémostasie calcique et couplage excitation–contraction 14
I.1.6.3. Anomalies structurelles 15
I.1.6.4.Rôle des mitochondries 15
I.1.6.4. 1. Production des ROS par la mitochondrie 15
I.1.6.4. 2.Mitochondrie et apoptose 18
I.2.Implication du stress oxydatif dans le choc septique 21
I.2.1Le stress oxydatif 21
I.2.1.1.Le système oxydant (pro-oxydant) et système antioxydant cellulaire 21
I.2.1.1.1.Le système oxydant 21
I.2.1.1.1.Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote radicalaires et non radicalaires (ROS) 21
I.2.1.1.2. Rôles physiologiques des espèces réactives de l'oxygène 22
I.2.1.1.3. Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS) 22
I.2.1.1.3.1.L'anion superoxyde : $0_2{\cdot}^-$ 23
I.2.1.1.3.2.Le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée H_20_2 23
I.2.1.1.3.3.Le radical hydroxyle OH · 24
I.2.1.1.3.4.Les radicaux peroxyles ROO· 24
I.2.1.1.3.5.Les espèces réactives de l'azote 24
I.2.1.1.4.Origine des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote 25
I.2.1.1.4.1. La NADPH oxydase (Nox) 26
I.2.1.1.4.2. La xanthine oxydase 28
I.2.1.1.4.3 .Autres sources d'$O_2^{\circ-}$ et de ROS 28
I.2.1.1.5.Toxicité des ROS 29
I.2.1.1.5.1.Oxydation des molécules de DNA : cassures et mutation au sein de l'acide désoxyribonucléique 29
I.2.1.1.5. 2.Oxydation des protéines : inactivation des protéines et des enzymes 29
I.2.1.1.5.3.Oxydation des lipides : peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés, des lipoprotéines ou des membranes cellulaires 29
I.2.1.1.2.Le système anti-oxydant 30
I.2.1.1.2.1.Le système anti-oxydant enzymatique
I.2.1.1.2.1.1.Les superoxydes dismutases (SOD) 30

I.2.1.1.2.1.2.La catalase (CAT) 30
I.2.1.1.2.1.3.La glutathion peroxydase/glutathion réductase
a- Le glutathion 31
b-La glutathion peroxydase 31
c-La glutathion réductase 31
I.2.1.1.2.2.Le système anti-oxydant non enzymatique naturel 31
I.3.La curcumine
I.3.1.Définition 32
I.3.2.Propréités pharmacologiques de la curcumine
I.3.2.1.Activité antioxydante 34
I.3.2.2.Activités anti-inflammatoires 34
I.3.2.3.Récepteurs de la curcumine 36
I.4.L'aspirine 38
I.4.1.Définition
I.4.2.Mécanisme d'action de l'aspirine 38
Chapitre II : Matériel et méthodes
II.1.Matériel
II .1.1.Réactifs 41
II.1.2. Matériel biologique 41
II.2.Méthodes
II.2.1.Protocole pharmacologique 41
II.2.2.Etude biochimique
II.2.2.1. Préparation de l'homogénat tissulaire 44
II.2.2.2.Dosage des protéines 45
II.2.2.3.Dosage des marqueurs de stress oxydatif 45
II.2.2.3.1.Dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) 45
II.2.2.3.2 .Dosage de l'activité catalase 46
II.2.2.3.3.Dosage de glutathion (GSH) 46
II.2.2.3.4.Dosage du taux de malondialdehyde (MDA) 47
II.2.2.3.5.Dosage du monoxyde d'azote (NO) 47
II.2.2.4.Dosage des marqueurs de cytotoxicité
II.2.2.4.1.Activité lactate déshydrogénase (LDH) 48
II.2.2.4.2.Activité phosphatase alcaline (PAL) 49
II.2.2.5.Etude des marqueurs de dysfonctionnement mitochondrial et d'apoptose cellulaire
II.2.2.5.1.Préparation des mitochondries cardiaques 50
II.2.2.5.2. Etude de l'effet d'*E. coli* inactivée en absence ou en présence de la curcumine ou l'aspirine sur le gonflement ou la perméabilité mitochondriale 50
II.2.2.5.3.Etude de l'effet d'*E. coli* inactivée en absence ou en présence de la curcumine ou l'aspirine sur la respiration mitochondriale 50
II.2.3.Etude histologique 51
II.3.Etude statistique 51
Chapitre III : Résultats et discussion
III.1. Résultats 52
III.1.1.Résultats de l'étude biochimique 52
III.1.1.1. Modulation par la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg de la défaillance myocardique, après un choc septique induit par *E. coli* 55
III.1.1.1.1.Implication du lactate déshydrogénase LDH, marqueur de cytotoxicité 55

III.1.1.1.2.Implication de la phosphatase alcaline PAL, marqueur de cytotoxicité 57
III.1.1.1.3.Implication de la myéloperoxydase MPO, marqueur d'infiltration des PN 59
III.1.1.1.4.Implication du malondialdéhyde MDA, marqueur de peroxydation lipidique 60
III.1.1.1.5.Implication du monoxyde d'azote NO, estimation de l'activité NOS myocardique
III.1.1.1.6.Implication de la catalase, marqueur du système antioxydant 66
III.1.1.1.7.Implication de glutathion (GSH), marqueur du système antioxydant 67
III.1.1.2.Implication des mitochondries dans le disfonctionnement myocardique, après un choc septique à *E. coli*
III.1.1.2.1. Modulation de la perméabilité des mitochondries du ventricule gauche, après un choc septique à *E. coli* par la curcumine ou par l'aspirine 68
III.1.1.2.2. Modulation de la respiration des mitochondries du ventricule gauche, après un choc septique à *E.coli* par la curcumine ou par l'aspirine 69
III.1.2.Résultats de l'étude histologique
III.1.2.1.Histologie du myocarde 70
III.1.2.1.Histologie du myocarde des rats témoins 70
III.1.2.2.Histologie du myocarde des rats traités par *E.coli* 70
III.1.2.3.Histologie du myocarde des rats ayant reçu un prétraitement par la curcumine ou par l'aspirine avant induction du choc septique par *E.coli* 70
III.1.2.2. Histologie du mésentère 75
III.2. Discussion 78
Conclusion et perspectives 83
Références bibliographiques 84

Introduction

Introduction

La recherche de ces deux dernières décennies a montré que de nombreuses pathologies humaines sont associées au stress oxydatif (Halliwell, 1987; De la Fuente et Victor., 2001 ; Berger, 2006).

Le choc septique est l'une des maladies potentialisée par le stress oxydatif. C'est une détérioration aiguë du système vasculaire en réponse aux lipopolysaccharides bactériens (LPS), le composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Wheeler et Bernard., 1999 ; De la Fuente et Victor., 2001 ; Victor et Coll., 2002).

Le choc septique est une réponse inflammatoire systémique, caractérisée par une dépression cardiaque et une dilatation vasculaire résultant en une hypotension sévère et une défaillance irréversible de multiples organes (cœur, poumons, reins, foie) (Komarov et Reddy, 1998).

Le cœur est l'un des organes majeurs affecté par le choc septique. La défaillance cardiaque est fréquente dans le choc septique. Elle est observée dans plusieurs modèles animales du choc septique suite à l`administration des lipopolysaccharides bactériens ou des bactéries (*E. coli*) (Kumar et Coll., 2000 ; Spanier et McDonough., 2000 ; Neviere et Coll., 2001 ; Lancel et Coll., 2005 ; Rozenberg et Coll., 2006 ; Supinski Callahan., 2006).

Des travaux récents ont montré le rôle majeur des polynucléaires neutrophiles (PN) et des mitochondries, dans le dysfonctionnement d'organes au cours du choc septique.

Les quantités massives de ROS libérées dans ces conditions physiopathologiques sont associées à l'altération des voies antioxydantes cellulaire (Cadenas et Cadenas, 2002; Lancel et Coll., 2005; Supinski Callahan., 2006 ; Rozenberg et Coll., 2006 ; Clark et Coll., 2007).

Les ROS génèrent un stress oxydatif à l'origine de lésions tissulaires, au niveau des différents organes cibles. En effet, les ROS présentent une très grande réactivité avec les différents composés biologiques. Ils induisent l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides et l'altération de l'ADN (Brzozowski et Coll., 2001; Bassivireddy et Coll., 2004).

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'étudier l'implication du stress oxydatif dans le dysfonctionnement cardiaque induit par *E. coli* inactivée. Afin de comprendre le rôle des ROS dans la cytotoxicité induite par *E. coli,* l'effet de l'aspirine, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), inhibiteur sélectif de la cyclooxygénase1 (COX1) et de la curcumine, un antioxydant naturel scavenger des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et inhibiteur de la 5-lipooxygénase 5-LOX, de la cyclo-oxygénase2 (COX2 de la iNOSynthase), et de facteur de transcription NF-κB, a été recherché chez des rats blancs.

Rappel bibliographique

Chapitre I : Rappel bibliographique

I.1.Le Choc septique

I.1.1. Définition du choc septique

Le choc septique est défini comme un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) résultant de l'infection (bactérienne, fungique, virale ou parasitaire) (ACCP-SCCM Consensus Conference, 1992 ; Bone, 1994 ; Brun-Buisson et Coll., 1996 ; 1996; Sands et Coll., 1997 ; Friedman et Coll., 1998 ; Reyes et Coll.,1999 ; Cadenas et Cadenas.,2002).

Il est associé à une hypotension sévère irréversible, une réduction de la perfusion sanguine, une thrombose et un dysfonctionnement d'organes. (Rackow et Astiz., 1991 ; Mayer et Coll., 1995 ; Kilbourn, 1997 ; Cadenas et Cadenas., 2002 ; Levy et Coll., 2003).

Le choc septique reste une pathologie grave, associé à un fort taux de mortalité des patients (Mayer et Coll., 1995 **;** Balk, 1998 ; Tslotou et Coll., 2005), avoisinant les 50 % malgré les progrès en chimiothérapie anti-infectieuse, antibiothérapie et cardiothérapie (Mayer et Coll., 1995 ; Friedman et Coll., 1998 ; Alberti et Coll., 2002 ; Bouglé et Annane., 2007).

Le choc septique est une réponse inflammatoire systémique exagérée à l'infection conduisant à un déséquilibre des systèmes : pro-oxydant-antioxydant ; inflammatoire-anti-inflammatoire ; procoagulant-anticoagulant et proapoptotique-antiapoptotique (Cinel et Dellinger., 2007).

I.1.2. Agents causales du choc septique

L'infection bactérienne est la cause la plus fréquente de choc septique. Une bactériémie est observée chez 40 à 60 % des patients présentant un choc septique (Astiz et Rackow., 1998 ; Wheeler et Bernard., 1999).

Les organismes responsables peuvent être :

-Des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli, Pseudomonas, Proteus, Serratia, Bacteroïdes fragilis, méningocoque ; Salmonella typhimurium* …) ou leurs dérivés membranaires les lipopolysaccharides (LPS ou endotoxines) (Murphy et Coll., 1998 **;** Spanier et McDonough., 2000 ; Rozenberg et Coll., 2006) ;

-Des bacteries à Gram positif (Pneumocoque, streptocoque, staphylocoque particulièrement *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*), leurs acide lipoteichoique ou exotoxines (Geerdes et Coll., 1992; Bates et Coll., 1995 ; Glauser et Coll., 2000);

- Ou tout autre agent infectieux (virus, parasite, levure ou champignon).

Les poumons, l'abdomen et le tractus urinaire représentent les sites infectieux les plus fréquents (Astiz et Rackow., 1998 ; Wheeler et Bernard., 1999 ; Tslotou et Coll., 2005).

I.1.3. Le lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif (endotoxine)

Le LPS est le constituant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (une cellule de *E. coli* contient approximativement 3.5 x 10^6 molécules de LPS (Rackow et Astiz., 1991 ; Rietschel et Coll., 1994).

Le LPS est constitué de trois parties (**Figure 01**) :

-Un polysaccharide spécifique O, avec une structure spécifique à la bactérie et dont la variabilité forme la base des antigènes somatiques ou antigène O (sérotypes),

-Un corps oligosaccharide, avec une structure peut variable au sain de la même espèce,

-Un lipide A, avec une structure conservé, responsable des propriétés toxiques du LPS (Raetz, 1990; Rietschel et Coll., 1994; Proctor et Coll., 1995; Hull, 1997 ; Darveau, 1998 ; Hemann et Coll., 2000).

Les molécules de LPS incorpore à la bactérie ne sont pas toxiques, leurs libération de la membrane externe bactérienne permet d'exposer la partie toxique "lipide A" du LPS aux cellules immunitaires conduisant à une réponse inflammatoire. Le LPS peut être libérer après lyse (agents bactéricides, complément, ROS) ou mort bactérienne (Rietschel et Coll., 1994; Hemann et Coll., 2000).

Le LPS est le médiateur majeur de la mortalité élevé caractéristique du choc septique due aux bactéries á Gram négatif. Son administration provoque les mêmes symptômes observés lors du choc septique dont la libération des cytokines proinflammatoire (IL-1, IL-6, TNF-α), activation du complément, coagulation intravasculaire disséminé (CIVD) et dysfonctionnement cardiovasculaire (Danner, 1990 ; Rackow et Astiz., 1991; Wenzel, 1992 ; Faure et Coll., 2001).

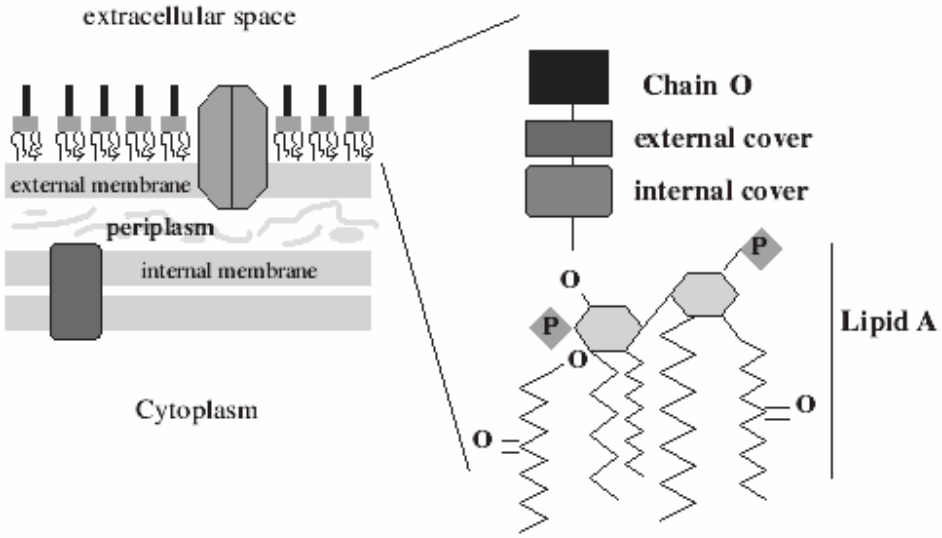


Figure 01 : Structure et localisation du lipopolysaccaride bactérien (LPS) au niveau de la membrane externe des bactéries Gram négatif (Lopez-Bojorquez et Coll., 2004)

I.1.4.Physiopathologie du choc septique

Le choc septique est le résultat d'une réponse inflammatoire systémique excessive due à la présence des bactéries à Gram négatif ou de leur LPS dans le sang (Vallet et Tavernier., 1999 ; Murphy et Coll., 1998 ; Cadenas et Cadenas., 2002 ; Tslotou et Coll., 2005).

Cette réponse conduit à plusieurs désordres incluant un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire, un dysfonctionnement d'organes (cœur, foie, rein, poumon) et un défaut d'apport d'oxygène aux tissus(hypoxie) lié au développement de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Leone et Coll., 2003).

I.1.4.1.Rôle des macrophages dans le choc septique

La reconnaissance du LPS bactérien par les macrophages représente une source importante dans l'activation des systèmes immunitaires et inflammatoires résultant en un choc septique (Lopez-Bojorquez et Coll., 2004).

Les monocytes /macrophages activés par LPS, produisent des ROS et NO ; des cytokines dont le facteur de nécrose des tumeurs-alpha (TNF-α), interleukine 1-beta (IL-1ß), interleukine-6 (IL-6), interleukine-12 (IL-12), interleukine-18 (IL-18), GM-CSF colony-stimulating factor granulocyte-macrophage et l'interféron ; des chémokines dont l'interleukine-8 (IL-8) ; le facteur activateur des plaquettes (PAF), activateur de plasminogène, le facteur tissulaire (TF) et des eicosanoides (prostaglandines, leucotriènes, thromboxane et prosatcycline) ; des agents microbicides (lysozyme, protéines cationiques, hydrolases acides et lactoferrine). Ces molécules agissent sur divers cellules induisant une séries d'altération de système vasculaire, de système immunitaire et de divers tissus (Mayer et Spitzer., 1991 ; Hiemstra et Coll., 1993 ; Roitt, 1994 ; Fantuzzi et Coll., 2000 ; Fernando et Coll., 2000 ; Van Bost et Mainil, 2003). (**Figure 02**)

Les effets inflammatoires et délétères des cytokines peuvent résulter de leur action en synergie avec le LPS (Rothstein et Schreiber., 1988) ou entre elles.

Les cytokines TNF-α, IL-1ß, IL-6 libérés par le macrophage ou par d'autres cellules (le cerveau, les reins, l'intestin, la rate, le foie, les poumons et le cœur) :

- Activent la cascade du complément et celle de la coagulation (Van Bost et Mainil, 2003),
- Activent les cellules endothéliale, induisent la production d'IL-8, d'IL-6, PAF, NO, ROS, PGE-2 et de CSF (colony-stimulating factors), favorisent l'expression du facteur tissulaire et accroissent l'expression des molécules d'adhérence (Fortenberry, 1992; Bone, 1994; Nansen et Coll., 1997 ; Bochkov et Coll., 2002),

- Activent les cellules phagocytaires (PN), augmentent leurs adhérences à l'endothélium (Roit, 1994),

- Activent les lymphocytes T et B, les monocytes/macrophages et les neutrophiles conduisant à la libération des eicosanoides, PAF et d'autres médiateurs inflammatoires l'IL-2, l'IFN-γ et le (GM)-CSF (Bone, 1991). L'IL-2 et le GM-CSF sont impliqués dans la prolifération et l'activation des PN et des cellules mononuclées, alors que l'IFN-

augmente l'effet du LPS sur les cellules mononuclées) (Bone, 1991; Fortenberry, 1992; Yong et Linch., 1993; Bone, 1994 ; Heinzel et Coll., 1994 ; Jaeschke, 1996),

- Induisent la production de chémokines par un grand nombre de cellules différentes (monocytes/macrophages, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules épithéliales, hépatocytes et neutrophiles) (Virdis et Coll., 2005),

- Induisent la synthèse de la phospholipase A2, une enzyme qui transforme les acides gras membranaires en acide arachidonique (AA). Ce dernier donne naissance à plusieurs médiateurs lipidiques sous l'action de divers enzymes. L'AA est métabolisé par la cyclooxygénase (COX1/2) en prostaglandines (PGE2), prostacycline (PGI2) et en thromboxane (TXA2). Les PGE2 et PGI2 sont responsables de la vasodilatation et de l'augmentation du flux sanguin. Le TXA2 est un vasoconstricteur, responsable de l'agrégation plaquettaire et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire. La transformation de l'acide arachidonique par la lipoxygénase aboutit à la génération des leucotriènes (LTC4 vasoconstricteur, LTB4 chimiotactique, ou LTD4 amplificateur de la perméabilité vasculaire) (Ejima et Coll., 2003) (**Figure 19**)

L'IL-12 participe à l'amplification de la réponse inflammatoire et immunitaire, essentielle pour le développement du choc septique. Il active les NK (natural killer) et les lymphocytes T ($TCD4^{+}$), qui se différentient en cellule Th1. Ces dernières libèrent l'interféron-gamma IFN-γ qui active à son tour les macrophages (Assenmacher et Coll., 1998). (**Figure 02**)

Le PAF est synthétisé par la phospholipase A2, qui transforme les phospholipides membranaires en acide arachidonique ainsi qu'en lyso-PAF. Le lyso-PAF est transformé en PAF sous l'action d'une acétyltransférase. Le PAF favorise l'agrégation plaquettaire et est à l'origine de l'hypotension (Van Amersfoort et Coll., 2003).

Le rôle principal de l'IL-8 est le chimiotactisme et l'activation des neutrophiles au site inflammatoire. Ces dernières jouent un rôle important dans la physiopathologie du choc septique (Van Zee et Coll., 1991; Hack et Coll., 1992)**.**

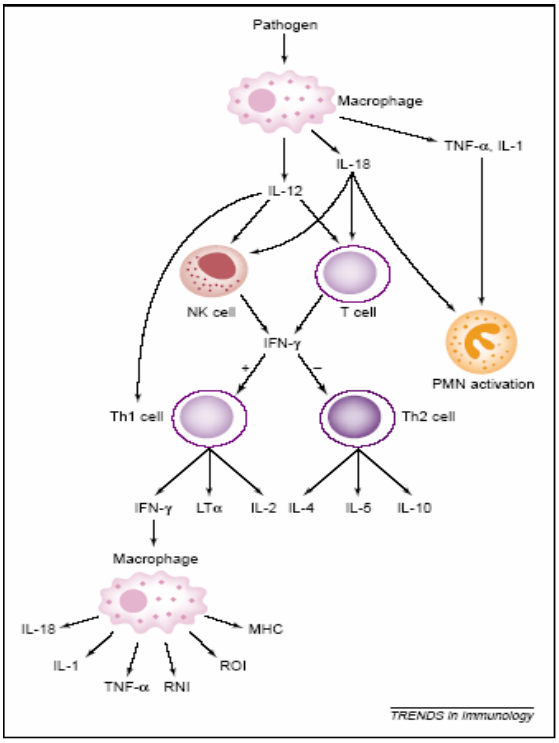


Figure 02: Activation des macrophages par les bactéries à Gram négatif ou par leur LPS (Netea et Coll., 2003).

I.1.4.2. Rôle des cellules endothéliales vasculaires :

L'altération de l'endothélium vasculaire est une évidence durant le choc septique. Ceci est dû à l'action des cytokines proinflammatoires, du LPS et des ROS sur ce dernier (Frey et Coll., 2002 ; Virdis et Coll., 2005)

L'action du LPS et des cytokines proinflammatoires (TNF-α, IL-1ß, IL-6) sur des cellules endothéliales conduit à la :

- Libération d'IL-1, d'IL-6, d'endothéline, CSF (colony-stimulating factor) et chémokines (IL-8) (Mahalingam et Karupiah., 1999),
- Induction de la COX-2, enzyme responsable de la synthèse des eicosanoides (PGE2, PGI2, et TXA2) (Frey et Coll., 2002 ; Virdis et Coll., 2005),
- Induction de la NO synthase-2 (iNOS), responsable de la synthèse accrue du monoxyde d'azote, NO (Frey et Coll., 2002 ; Virdis et Coll., 2005). A coté de son effet bactéricide le NO cause une vasodilatation, des dommages de l'endothélium et augmente l'adhérence des leucocytes (Hickey et Coll., 1997; Wang et Coll., 1998) ;
- Expression de facteur tissulaire (TF) et des molécules d'adhérences (sélectines) (Vallet et Wiel., 2001 ; Leone et Coll., 2002) ;
- Synthèse des ROS. L'anion superoxyde produit par la NADPH oxydase ou la xanthine oxydase peut réagir avec le NO. Cette réaction conduit à une diminution du NO et à la surproduction de peroxynitrite $ONOO^-$, qui peut réagir avec plusieurs protéines

impliquées dans la relaxation de l'endothélium dont la eNOS et inhibe son activité. Le peroxynitrite peut également endommager directement les cellules endothéliales (Frey et Coll., 2002 ; Virdis et Coll., 2005). (**Figure 03**)

Cette réponse contribue à une lésion de l'endothélium et une activation des PN (Vallet et Wiel., 2001 ; Leone et Coll., 2002).

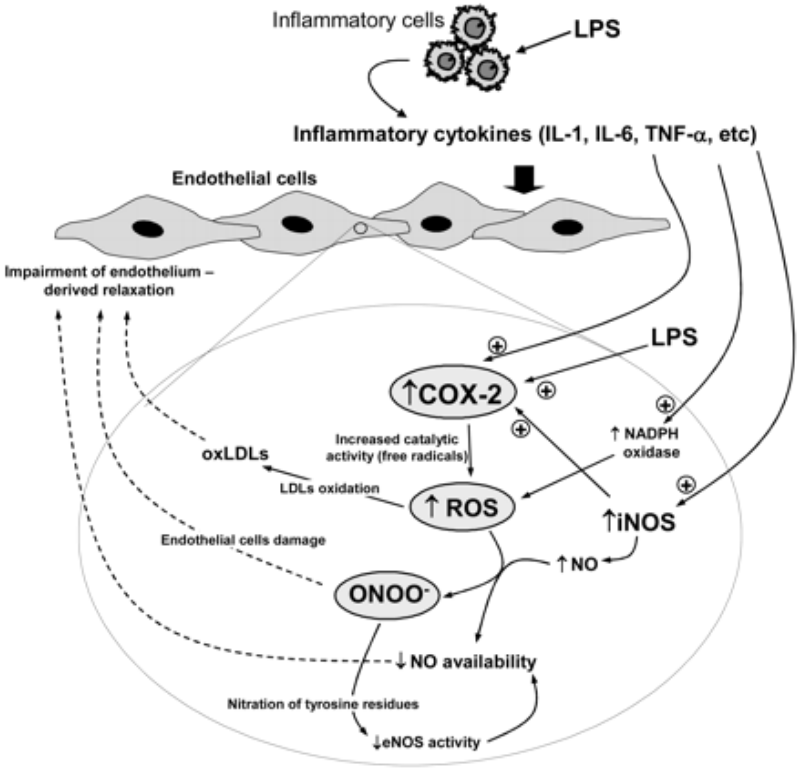


Figure 03: Dysfonctionnement endothéliale induit par LPS et/ ou par les cytokines pro inflammatoires (Virdis et Coll., 2005).

I.1.4.3. Rôle des polynucléaires neutrophiles:

L'élimination des bactéries dépend du recrutement rapide des PN circulants vers le site d'infection. Les PN doivent d'abord adhérés à l'endothélium vasculaire avant migration vers le site inflammatoire en réponse aux divers stimuli IL-8, complément C5a, LTB4, PAF, (GM)-CSF IL-1, TNF-α, NO, IFN-γ et LPS bactérien (Mollnes et Coll.,2002).
Les substances chimiotactiques provoquent la margination des neutrophiles (adhérence aux cellules endothéliales) et leur diapédèse (traversée de la paroi capillaire) (Roit et Coll., 1997 ; Mollnes et Coll., 2002).

La première étape de l'infiltration des PN est leur adhérence faible et réversible aux cellules endothéliales. Cette adhérence permet le roulement des PN le long de l'endothélium vasculaire. Elle est assurée par des interactions transitoires entre des protéines membranaires : les P sélectine (CD62P) et E sélectine (CD62E) exprimées à la surface des cellules endothéliales, et leur ligands

glucidiques distribués à la surface du PN, la L-sélectine (CD62L) à la surface des PN, et son ligand à la surface des cellules endothéliales (Carlos et Coll., 1994 ; Jaeschke et Smith., 1997 ; Gonzalez-Amaro et Sanchez-Madrid., 1999 ; Brown et Coll., 2006) (**Figure 04**).

Des gradients de cytokines pro inflammatoires (interleukine-1 et TNFα) libérées par les tissus lésés et les macrophages, induisent l'activation des cellules endothéliales et des fibroblastes qui libèrent de puissants chimioattractants pour les PN, chémokines (interleukine-8) et facteurs chimiotactiques (PAF, leucotriènes B4, LTB4, facteur C5a du complément) (Jaeschke et Smith, 1997). Ces PN préactivés (primés) par les chémokines expriment à leur surface, des molécules de l'adhérence de la famille des intégrines comme les LFA-1(CD11a/ CD18), et MAC-2 (CD11b/CD18). Elles se lient fortement aux molécules ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, CD54) exprimées à la surface des cellules endothéliales, ce qui facilite leur migration transendothéliale et leur extravasation vers le site infectieux. L'expression de CD54 est stimulée par le TNFα, l'IL-1 et le LPS (Brown et Coll., 2006). (**Figure 04**)

Au cours du choc septique l'activation exacerbée des neutrophiles (PN) conduit aux dommages tissulaires, cette action peut être direct ou indirect (Brown et Coll., 2006)

L'effet indirect des PN résulte de leur forte adhérence aux cellules endothéliales. Cette forte liaison est assurée par une expression intense des molécules d'adhérences CD11a, CD11b et CD54, et elle est augmentée par la liaison CD49d (PN)- CD106 (cellules endothéliales). Ces molécules sont exprimées sous l'action de TNFα et d'IL-1 (Ibbotson et Coll., 2001 ; Brown et Coll., 2006). Cette forte adhérence conduit à l'occlusion microvasculaire, qui est responsable de l'hypoperfusion et de l'hypoxie des tissus observées lors du choc septique (Astiz et Coll., 1995; Taylor et Coll., 2000 ; Fink et Evans., 2002). Une inhibition des molécules d'adhérence diminue les dommages induits par LPS (Brown et Coll., 2006).

Les PN deviennent activent, libèrent des protéases (lysozymes et BPI, bactericidal/permeability-increasing protein), des médiateurs inflammatoires (TNF-α, leucotrienes B4 et PAF) et des ROS. Ces derniers (ROS) provoquent une altération endothéliale par ouverture des jonctions endothéliales, augmentation de la perméabilité vasculaire, et une fuite plasmatique du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel et tissulaire (œdème) (Van Epps et Coll., 1993 ; Erlich et Coll., 1999 ; Brown et Coll., 2006 ; Huet et Duranteau., 2008).

La constitution de ces oedèmes cellulaires endothéliaux et interstitiels provoque une diminution de la lumière capillaire et une augmentation des résistances hydrauliques capillaires (augmentation de la viscosité sanguine) qui contribuent à l'altération de la perfusion capillaire et au développement d'une hypoxie tissulaire (Menger et Coll., 1997)
Cet oedème interstitiel va majorer les phénomènes d'ischémie entraînant ainsi une augmentation de la production de radicaux libres pérennisant ainsi le cercle vicieux (Huet et Duranteau., 2008).

La lésion endothéliale et la libération du TNF-α par les PN, permettent le passage des cellules endothéliales vers un état procoagulant suite à l'expression du facteur tissulaire par les cellules endothéliales. Ce dernier permet d'activer la cascade de la coagulation conduisant au développement de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Erlich et Coll., 1999 ; Aird, 2003).

De même les cytokines produites par les PN, induisent la production du NO par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Paterson et Webster., 2000) et activent d'autres leucocytes qui adhérent à leur tour à l'endothélium vasculaire. Le NO est responsable de l'hypotension observé lors du choc septique (Rees et Coll., 1998).

L'effet direct des PN résulte de leur infiltration dans les tissus en réponse aux stimuli chimiotactiques. Les PN accumulés dans les tissus, dégranulent et libèrent des enzymes lytiques comme la cathepsine G, l'élastase et la myeloperoxydase (dégranulation des granules primaires ou azurophiles). La cathepsine G et l'élastase sont des enzymes protéolytiques qui dégradent les fibrilles élastiques (Jaeschke et Coll., 1997). Ces enzymes agissent en synergie avec l'anion superoxyde et ses métabolites pour induire un stress oxydatif, à l'origine de la nécrose tissulaire. Le degré d'infiltration corrèle avec le degré de dysfonctionnement (Fortenberry ,1992; Saez-Liorens et McCracken., 1993 ; Lawson et Coll., 2000 ; Albert, 2001 ; Chen et Coll., 2002 ; Brown et Coll., 2006). (**Figure 05**)

Les deux mécanismes direct et indirect peuvent arriver simultanément. Les PN fortement adhéré endommagent l'endothélium vasculaire ce qui permet leur extravasation vers le tissu (Brown et Coll., 2006). (**Figure 05**)

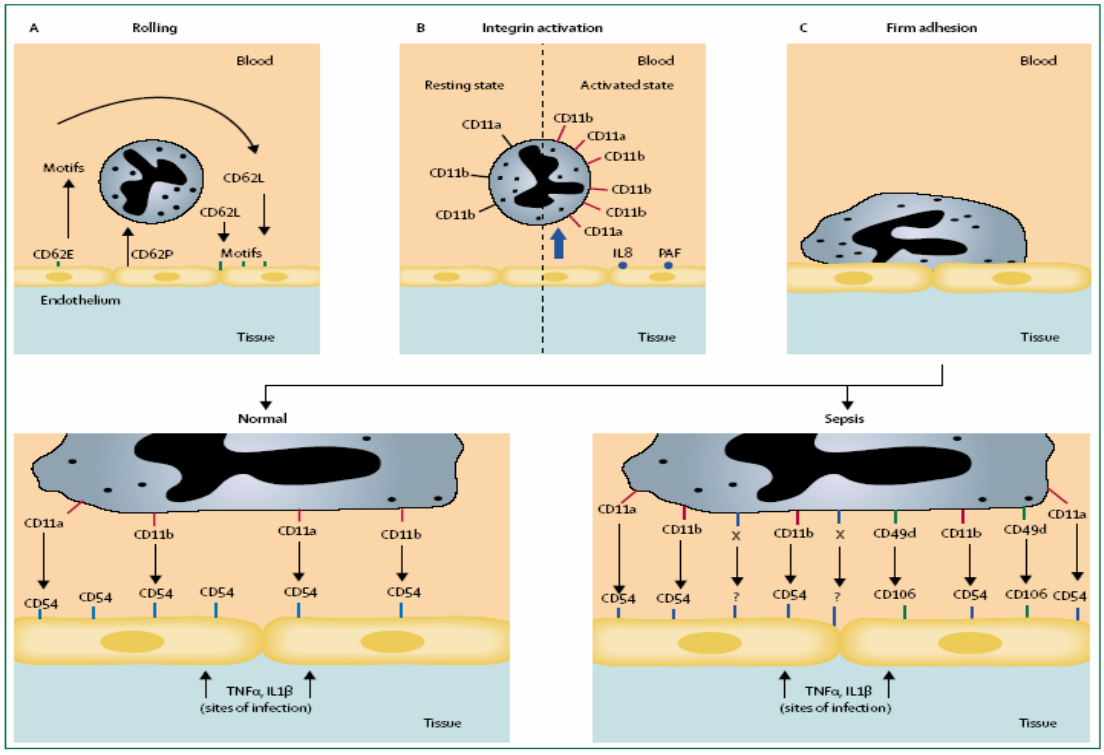


Figure 04: Adhérence des neutrophiles à l'endothélium vasculaire (Brown et Coll., 2006).

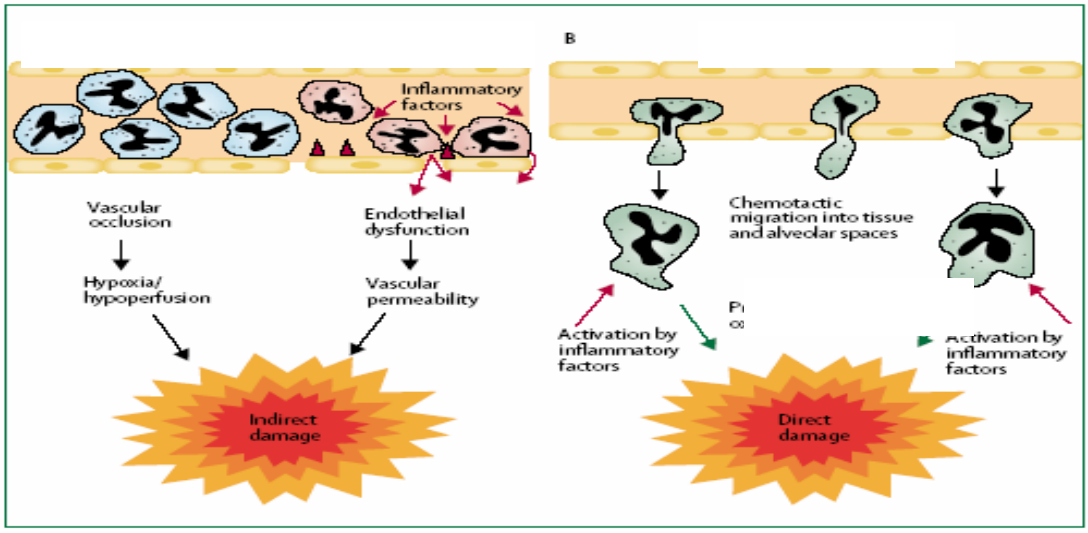


Figure 05: Implication des neutrophiles dans le choc septique (Brown et Coll., 2006)

.I.1.5. Voies de signalisations activées par LPS

Au niveau systémique (sang), l'endotoxine est capturée par une glycoprotéine de 60 kDa appelée LBP (*lipopolysaccaharide binding protein*). Le complexe LPS-LBP formé se lie aux cellules exprimant le complexe de différenciation 14 (récepteur CD14, monocyte/macrophage, PN, cardiomyocytes, plaquettes..), et des cellules n'exprimant pas le récepteur CD14 (cellules endothéliales) via le récepteur CD14 soluble (**figure 06**). Ce complexe déclenche un signal via des récepteurs *toll like receptors* (TLRs) chez les mammifères, qui ont un rôle important dans l'immunité innée (Nathan et Sporn., 1991; Hamann et Coll., 2000 ; Faure et Coll., 2001).

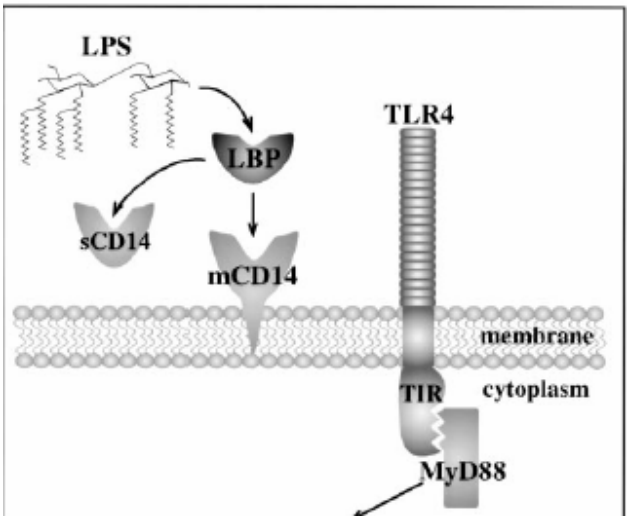


Figure 06 : Reconnaissance du LPS par TLR4 (Qureshi et Coll., 1999)

Les Toll-like receptors (TLRs), une famille de 11 récepteurs apparentés au récepteur Toll chez la drosophile sont des PRR (*pattern recognition receptors*). Ils reconnaissent les PAMP (*pathogen associated molecular pattern*), des motifs moléculaires conservés au sein de différents types de microorganismes. Ces PAMP activent la réponse innée, et ils sont caractérisés par les trois propriétés suivantes : - ils sont absents des cellules de l'hôte ; -ils sont communs à de nombreuses espèces de microorganismes ce qui permet de reconnaître une énorme diversité des microbes par un nombre restreint de récepteurs ; - ils sont essentiels à la survie des microorganismes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance (Takeuchi et Coll., 1999 ; Imler, 2004). (**Figure 07**)

Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine intracytoplasmique, qu'ils partagent avec les membres de la famille du récepteur de l'interleukine-1 (IL-1R). Ce domaine est également présent dans les produits de plusieurs gènes de résistance à l'infection chez les plantes (gènes R), et a été baptisé domaine TIR (**T**oll/ **I**L-1R/**R**). L'ectodomaine des récepteurs Toll est constitué de répétitions riches en leucine (motifs LRR) (Imler et Hoffmann., 2001).

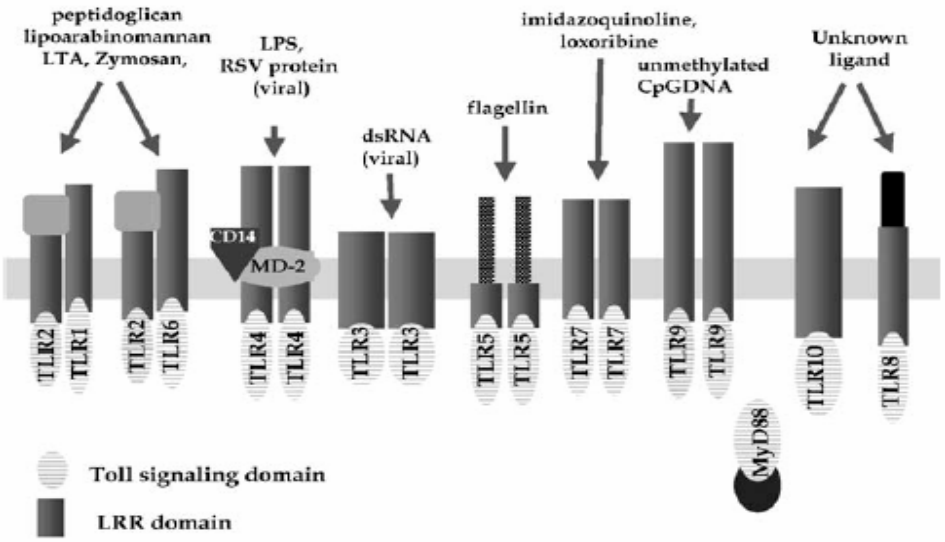


Figure 07 : La famille des Toll- like receptors (TLR) chez les mammifères (Lopez-Bojorquez et Coll., 2004)

Le LPS est un PAMP reconnu par le TLR-4. Le récepteur TLR-4 est un homodimère qui a besoin de s'associer avec des molécules accessoires (MD-2 et CD14) pour une reconnaissance est une signalisation optimale. Le facteur MD-2 et le corécepteur CD14 s'associent au TLR-4 pour constituer un complexe récepteur au LPS (Beutler, 2000 ; Imler, 2004). (**Figure 07**)

Le signal LPS est transmis via le récepteur TLR-4 qui interagit par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique TIR avec une molécule cytoplasmique contenant elle-même un domaine TIR, le facteur MyD88 (*myeloid differentiation protein*). Cette molécule contient un domaine de mort (DD : *Death domain*) aminoterminal par l'intermédiaire duquel, elle interagit avec une sérine-thréonine kinase à domaine DD, IRAK-4 (*IL-1 receptor-associated serine/threonine-4*)

(Janssens et Beyaert., 2002). MyD88 fonctionne donc comme un adaptateur entre les récepteurs à domaine TIR et les kinases impliquées dans la signalisation en aval (Medzhitov et Janeway., 1998; Beutler, 2000 ; Imler, 2004).

La protéine kinase IRAK-4 s'autophosphoryle et recrute le facteur TRAF-6 (TNF-receptor-associated factor 6) qui active la protéine kinase NIK (NFκB inducing kinase). NIK phosphoryle la kinase IKK (IκB kinase), qui à son tour phosphoryle l'inhibiteur IκB, permettant ainsi le relargage du facteur de transcription NFκB (Facteur nucléaire Kappa B) et sa translocation nucléaire. (Cambarnous, 2004 ; Symons et Coll., 2006).

La stimulation du facteur NFκB conduit à la production des ROS, l'activation de la iNOS, l'activation de la COX-2, la production des cytokines proinflammatoires (TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12), chémokines (l'IL-8), de PAF et de molécules d'adhésions (L-selectin, CD11b) implique dans la pathogénèse du choc septique (Christman et Coll., 1998 ; Faure et Coll., 2001 ; Hayashi et Coll.,2003 ; Sabroe et Coll.,2003 ; De Candia et Coll., 2007). (**Figure 08**)

D'autres voies de signalisation peuvent être induites suite à une stimulation TLR-4 par LPS : TRAF-6 peut également activer une sérine-thréonine kinase la TAK-1 (transforming growth factor-b- activated kinase-1). Celle-ci phosphoryle et active la IKK et MKK6. L'IKK phosphoryle l'inhibiteur IκB permettant de stimuler le facteur de transcription NFκB (Israel, 2003).La MKK6 phosphoryle quant à elle la kinase JNK (*Jun N-terminus Kinase*), qui active le facteur de transcription AP-1 (*activator protein-1*). AP-1 et NFκB transloquent vers le noyau pour transcrire les gènes codant pour des molécules de l'inflammation (cytokines, iNOS, E-sélectine…) et pour des costimulateurs de la réponse adaptative (CD40, CD80/CD86) (Irie et Coll., 2000 ; Imler, 2004).

L'importance de facteur de transcription NFκB dans le développement du choc septique est devenue une évidence. Son inhibition interrompe les évènements conduisant au choc septique (Liu et Coll., 1999)

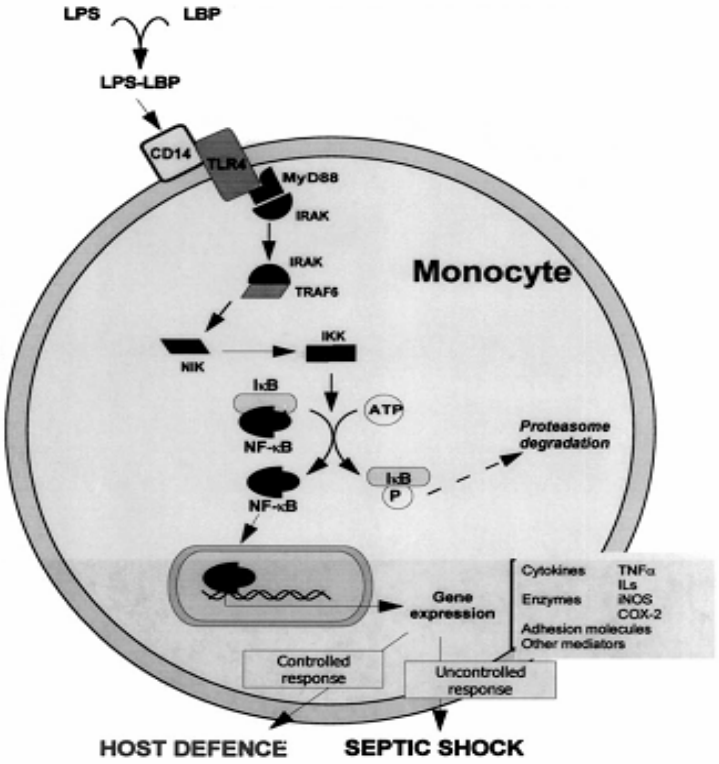


Figure 08 : Voie de signalisation induite par LPS au niveau des monocytes (Cadenas et Cadenas., 2002).

I.1.6.Choc septique et dysfonctionnement myocardique

Les bactéries à Gram négatif ou leur LPS contribuent au dysfonctionnement cardiaque (diminution de la contractilité du myocarde et dilatation du ventricule gauche). Ceci résulte de l'effet du LPS et/ou des cytokines proinflammatoires induits par LPS sur le myocarde, l'endothélium et les muscles lisses vasculaires. Cette infection systémique peut produire des dommages réversible ou irréversible pour les cardiomyocytes dont l'altération de l'homéostasie calcique, altération de couplage excitation/contraction et augmentation de mort cellulaire programmé ou apoptose au niveau du cœur (Parrillo, 1993 ; Chagnon et Coll., 2005).

I.1.6.1 Rôle du monoxyde d'azote NO

De nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle de monoxyde d'azote (NO) dans le dysfonctionnement cardiaque observé lors du choc septique (Krishnagopalan et Coll., 2002).

La surproduction de NO au cours du choc septique, est le reflet de l'induction de la NO synthase inductible (iNOS ou NOS2) en réponse aux cytokines inflammatoires comme l'IFNγ, l'IL-1, et le TNF-α ou en réponse aux endotoxines (LPS). Cette enzyme produit de grandes quantités du NO et pour une long période (Vallance et Moncada., 1993 ; Laubach et Coll., 1995 ; Szabo et Coll., 1995 ; Krishnagopalan et Coll., 2002).

La iNOS est exprimée par plusieurs types cellulaires dont les neutrophiles, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et myocytes cardiaque (Jiang et Coll., 1995; Kikkawa et Coll., 1998). Elle transforme la L-arginine en NO et citruline (Laubach et Coll., 1995).

Le NO, gaz instable, est ensuite rapidement oxydé en nitrite (NO2-) en présence d'H2O ou en nitrate (NO3 -) en présence d'oxyhémoglobine (Laubach et Coll., 1995).

Le NO est un vasodilatateur, il joue un rôle important dans le développement de l'hypotension vasculaire sévère observée dans le choc septique (Szabo et Coll., 1993 ; Gomez-Jiménez et Coll., 1995 ; Hashiguchi et Coll., 2008). Il contribue à l'hyporéactivité vasculaire aux agents vasopresseurs et est responsable de l'atteinte de l'intégrité de la micro-vasculature (Laubach et Coll., 1995 ; Hashiguchi et Coll., 2008).

La cytotoxicité du NO est la conséquence de sa capacité d'inhiber la glycolyse, le cycle de Krebs, la respiration mitochondriale et la synthèse d'ADN (Laubach et Coll., 1995).

Il altère la contractilité myocardique suite à l'inhibition de l'utilisation de l'oxygène par les mitochondries, ce qui diminue l'efficacité cardiaque (Preiser, 2000).

Le NO favorise la production d'anion superoxyde par inhibition du complexe complexe IV de la chaîne respiratoire. L'anion superoxyde est transformé par la Mn SOD en H_2O_2. L'H_2O_2 favorise la production du NO par activation du NF-kB responsable de l'expression de la iNOS (Han et Coll., 2001). Le NO à son tour inhibe la catalase de façon réversible en se fixant sur l'hème de cette enzyme. La catalase est une enzyme antioxydante qui catalyse la réduction d'H_2O_2 en eau et oxygène moléculaire. L'inhibition de la catalase par le NO augmente la concentration cellulaire en H_2O_2 et le cycle continu (Brown, 1995).

Le NO pourrait aussi réagir avec l'anion superoxyde (O_2^-) pour donner du peroxynitrite ($ONOO^-$) , un puissant agent oxydant qui peut contribuer aux dommages tissulaires et qui aurait plusieurs cibles, comme la chaîne respiratoire mitochondriale, les lipides, les protéines et l'ADN (Laubach et Coll., 1995 ; Tavernier et Coll., 2001) . Ce dernier altère les protéines contractiles conduisant à une diminution de la contractilité du myocarde observée lors du choc septique. Il a été démontré que la myosine myocardique des patients atteints de choc septique, subit une nitration spécifique par le peroxynitrite (Rabuel et Coll., 2004).

Une étude récente animale tend à aller dans le même sens en démontrant un effet bénéfique d'un inhibiteur de la formation du $ONOO^-$ sur la défaillance myocardique des rats endotoxémiques (Lancel et Coll., 2004).
L'inhibition sélective de la iNOS peut être efficace dans le traitement du choc septique (Hayashi et Coll., 2005).

I.1.6.2.Hémostasie calcique et couplage excitation-contraction

La contraction des cardiomyocytes dépend de flux calcique de réticulum sarcoplasmique vers le cytosol, facilitant l'interaction des filaments d'actine et myosine pour produire un rétrécissement des fibres musculaires cardiaques (contraction). La troponine et la tropomyosine sont des protéines contractiles. Elles agissent par liaison du calcium pour réguler l'interaction

des filaments (actine et myosine). La reséquestration du calcium à la fin de la contraction initie la relaxation cardiaque (Ren et Coll., 2004).

Dans le choc septique, une altération des mouvements calciques et une diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium ont été observées.

Le calcium intracytoplasmique conditionne la contractilité des fibres myocardiques. Les mouvements calciques sont régulés par les canaux calciques de type L pour la contraction, par la pompe calcique ATP dépendante sarcoplasmique et l'échangeur Na^{+}-Ca^{2+} (Tavernier et Coll., 2001 ; Gibot et Coll., 2004 ; Ren et Coll., 2004).

.

Dans différents modèles de choc septique, une diminution des canaux calciques de type L a été observée, en lien avec une diminution de la fonction myocardique et une diminution du transport du calcium par les pompes calciques et l'échangeur Na^{+}-Ca^{2+}. Ces altérations du flux calcique, sont accompagnées d'une diminution de la sensibilité des myofilaments au calcium sur différents modèles animaux (Tavernier et Coll., 2001 ; Gibot et Coll., 2004 ; Ren et Coll., 2004).

Le GMPc (Guanosyl-MonoPhospahte cyclique), pourrait réduire la réponse des myofilaments au calcium par une phosphorylation de la troponine I (Grover et Coll., 1999). Le GMPc est un second messager intracellulaire, produit par la guanylate cyclase soluble cytoplasmique à partir du GTP (Guanosine Tri-Phosphate) sous l'action du NO (Combarnous, 2004).

I.1.6.3.Anomalies structurelles

Des anomalies structurelles sont visibles au niveau myocardique dans le choc septique. Il associe une nécrose, œdème, dépôts de fibrines, agrégats leucocytaires intravasculaires. Ces anomalies sont attribuées en partie à l'action combinée du TNFα et de l'interleukine 1ß, et des ROS (Gibot et Coll., 2004).

I.1.6.4. Rôle des mitochondries

La possibilité qu'un dysfonctionnement mitochondrial soit impliqué dans la physiopathologie du choc septique apparaît dans la littérature dès les années 1970 (Nevière., 2008).

I.1.6.4. 1. Production des ROS par la mitochondrie

Les mitochondries sont à la fois source et cible des ROS.

Les travaux de Supinski et Callahan., (2006) ont montré que l'endotoxine (LPS) induit une génération excessive des ROS par les mitochondries cardiaques (Supinski et Callhan., 2006).

La chaîne respiratoire est constituée de cinq complexes hétéropolymériques localisés dans la membrane interne mitochondriale (I : NADH-ubiquinone (UQ) réductase, II : succinate-UQ réductase, III : UQH2-cytochrome c réductase, IV : cytochrome oxydase, V : ATP synthase) et de deux groupements redox mobiles (UQ et cytochrome c). Elle catalyse une suite de réactions d'oxydoréduction associant l'oxydation du NADH et du FADH2 à la réduction de l'oxygène en eau (Nevière, 2008). (**Figure 09**)

La chaîne respiratoire est une source importante de ROS, en particulier d'anions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Les complexe I et III de cette chaîne sont les deux sites de production des ROS (Liu et Coll., 2002 ; Kushnareva et Coll., 2002).

Les complexes I et II catalysent un transfert d'électrons à partir du NADH et FADH2 au coenzyme Q mitochondrial (ubiquinone, UQ). Il est réduit en ubiquinol (UQH2), en passant par la forme intermédiaire radicalaire UQH▪.
Au niveau du complexe III, l'ubiquinol (UQH_2) est ré- oxydé sous la forme radicalaire ubi- semi quinone, $UQH^{\bullet}$, puis sous forme ubiquinone (UQ). Lors de ce cycle, une partie des électrons s'échappe à partir de la forme intermédiaire radicalaire, $UQH^{\bullet}$, du coenzyme Q, pour réagir directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme, et former les anions superoxyde ($O_2^{-\bullet}$) (Chen et Coll., 2003 ; Nianyu et Coll., 2003). (**Figure 09**)

A l'état physiologique, 1 à 5 % environ des électrons échangés dans la chaîne respiratoire sont utilisés pour la formation de l'anion superoxyde. Cependant, le taux de production de ROS augmente dans différentes conditions pathologiques comme l'hypoxie, l'ischémie- reperfusion, désordres inflammatoires (effet du TNF-α) et l'inhibition de la respiration mitochondriale (Becker et Coll., 1999 ; Venditti et Coll., 2001 ; Moghaddas et Coll., 2003 ; Kevin et Coll., 2003 ; Magder, 2006).

De plus, les espèces réactives l'azote amplifient la production de ROS par la mitochondrie (Basivireddy et Coll., 2004). En effet, le monoxyde d'azote (NO) inhibe réversiblement la cytochrome c oxydase (complexe IV), et entre en compétition avec l'oxygène, tendis que le peroxynitrite ($ONOO^{-\bullet}$), inhibe le complexe I et III de manière irréversible et induit la mort cellulaire (Lizasoain et Coll., 1996 ; Brown et Borutaite., 1999 ; Beltran et Coll., 2002 ; Brown et Borutaite., 2007).
In vitro, l'inhibition du complexe I par la roténone peut augmenter la génération de ROS (Kushnareva et Coll., 2002 ; Liu et Coll., 2002). De même, l'oxydation des substrats du complexe I en présence de l'antimycine A, inhibiteur du complexe III, provoque également l'augmentation de production de ROS (Nianyu et Coll., 2003). (**Figure 09**)

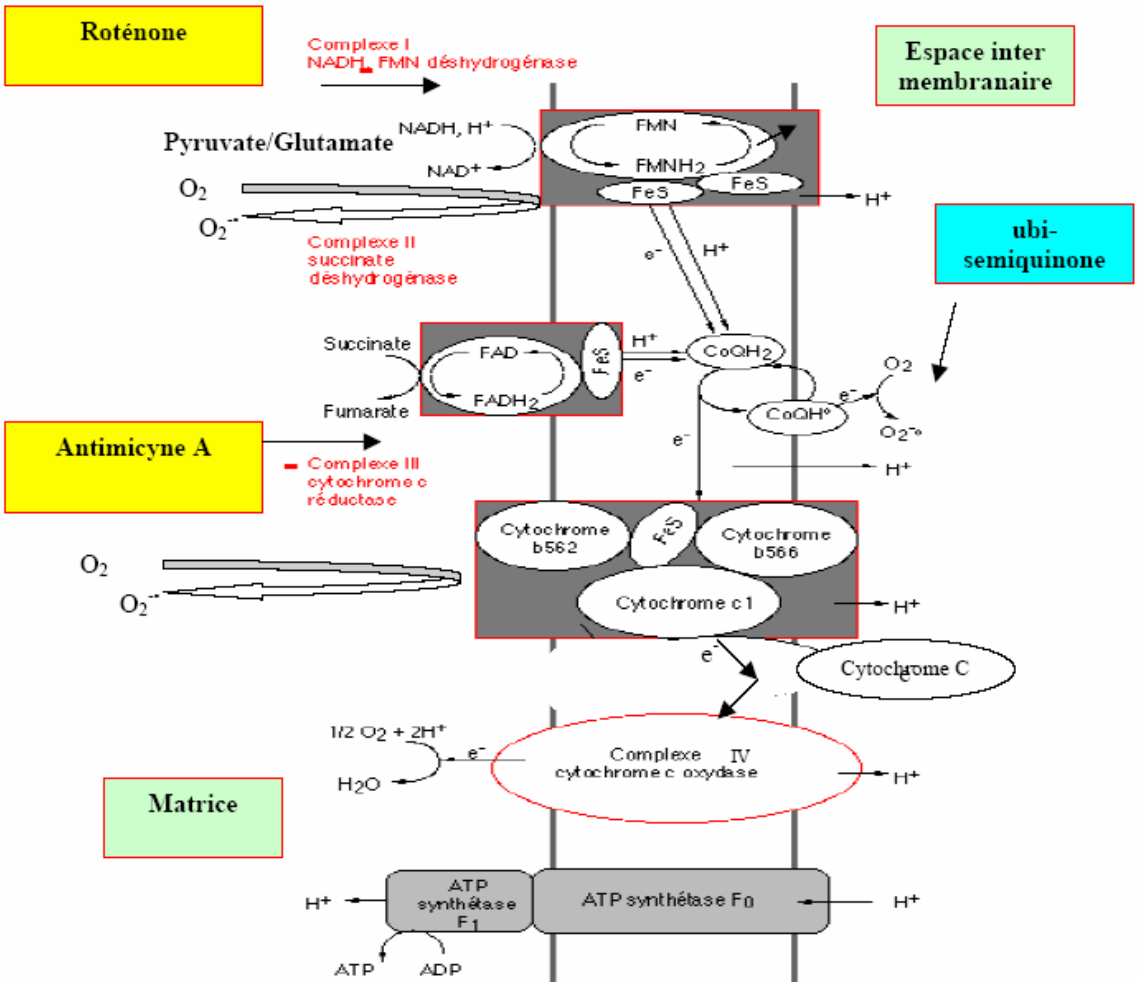


Figure 09 : Formation de radicaux superoxyde par fuite d'électrons à partir de l'ubi-semiquinone, au niveau de la mitochondrie (Chen et Coll., 2003 ; Nianyu et Coll., 2003)

I.1.6.4. 2.Mitochondrie et apoptose

La voie mitochondriale de l'apoptose est déclenchée par différents facteurs comme le calcium, les ROS et les céramides. Une étape critique de ce processus est la libération du cytochrome c depuis l'espace intermembranaire vers le cytosol. Plusieurs mécanismes, parmi lesquels l'ouverture du pore de transition de perméabilité ou la perméabilisation de la membrane externe par les proteines proapoptotiques Bax, peuvent conduire à cette fuite de cytochrome c, qui déclenche la cascade apoptotique (Chopra et Sharma., 2007).

La transition de perméabilité est due à l'ouverture d'un canal non spécifique, le pore de transition de perméabilité (PTP) (Bernardi et Coll., 2006). Ce canal, normalement fermé, s'ouvre en présence d'une augmentation de la concentration matricielle de calcium ou de phosphate inorganique, un faible potentiel membranaire et un stress oxydatif. L'ouverture du PTP est à l'origine du processus d'apoptose mais aussi de nécrose (Szewczyk et Wojtczak., 2002 ; Nevière., 2008).

Le pore PTP est un canal oligoprotéique constitué au niveau de la membrane externe par la porine (ou VDAC : Voltage Dependent Anion Channel), sur la membrane interne par l'ANT (Adenine Nucléotide Translocator) et d'une protéine matricielle la cyclophiline D (Kroemer et Coll., 1998 ; Han et Coll., 2001).

L'ouverture des pores PTP augmentent la perméabilité de la membrane interne, ce qui provoque le gonflement de la mitochondrie par entrée d'eau, et une dissipation du potentiel membranaire nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthétase.

Le pore PTP forme un canal specifique avec Bax facilitant la diffusion du cytochrome c vers le cytoplasme, où il active la voie apoptotique des caspases (Degterev et Coll., 2001 ; Szewczyk et Wojtczak., 2002).

Le cytochrome c se lie au domaine C-terminal d'une protéine cytoplasmique l'APAF-1 (Apoptotic Protease Activiting Factor-1) dans une région riche en motifs répétés tryptophane-aspartate, impliquée dans les interactions protéines-protéines. La fixation du cytochrome c provoque l'oligomérisation et un changement conformationnel de APAF-1, qui s'accompagne du recrutement de la pro caspase 9, elle aussi libérée par la mitochondrie (Ravagnan et Coll., 2002).

La pro caspase9 se lie aux domaines CARD (Caspase Recrutment Domain) de l'APAF-1, ce qui provoque son activation en caspase 9. La caspase 9 active à son tour la caspase 3, l'une des protéases effectrices majeures de l'apoptose (Alam et Coll., 1999). (**Figure 10**)

Les pro caspases sont les pro enzymes de cystéine protéases. Leur activation est due à une coupure protéolytique libérant 2 sous unités : une grande (p20) et une petite sous unité (p10) qui s'associent en 1 hétéro dimère actif, la caspase (Alam et Coll., 1999).

Ces cystéines protéases clivent les protéines après un résidu d'acide aspartique. Ce mode de clivage est spécifique aux caspaces et à la granzyme B, une sérine protéase présente dans les lymphocytes T cytotoxiques

La caspase 3 dégrade les filaments d'actine du cytosquelette, et de nombreuses enzymes indispensables à l'intégrité cellulaire telles que la poly ADP ribose polymérase responsable de la réparation de l'ADN, des protéines Kinases intervenant dans la signalisation et le métabolisme cellulaire (PKC), et des protéines anti- apoptotiques comme la Bcl2. Ceci conduit à l'activation d'endonucléases qui clivent l'ADN en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases (Lee et Col., 2001).

La membrane plasmique bourgeonne, et conduit à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique par translocation des molécules de phosphatidylsérines qui passent du feuillet cytoplasmique au feuillet externe de la membrane plasmique. La mort cellulaire programmée est un processus rapide qui se fait en quelques heures (Ravagnan et Coll., 2002).

L'apotose joue un rôle clé dans les mécanismes physiopathologiques du choc septique puisque sa prévention s'avère être bénéfique contre la défaillance tissulaire et la mort (Braun et Coll., 1999 ; Coopersmith et Coll., 2002).

Il a été démontré que l'apoptose contribue à la perte des cardiomyocytes conduisant à la défaillance cardiaque observée dans le choc septique (Lancel et Coll., (2005).

Les travaux de Lancel et Coll., (2005) ont montré que l'endotoxine (LPS) induit une libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol des cardiomyocytes et une activation des caspases (-3, 8,- et -9). L'activation des caspases est associée à une diminution de la réponse des myofilaments au calcium, une destruction des sarcomères et un clivage des protéines contractiles (Troponine T), conduisant à une diminution de la contractilité myocardique et donc à un dysfonctionnement cardiaque (Neviere et Coll., 2001 ; Carlson et Coll., 2005 ; Lancel et Coll., 2005). L'expression des protéines proapoptotique (Bax) et des caspases corrèle avec le degré de dysfonctionnement myocardique (Chopra et Sharma., 2007)

La caspase-3 joue un rôle important dans le dysfonctionnement des cardiomyocytes induit par LPS, son inhibition *in vivo* attenue le dysfonctionnement myocardique observé lors du choc septique (Neviere et Coll., 2001 ; Lancel et Coll., 2005 ; Chopra et Sharma., 2007)

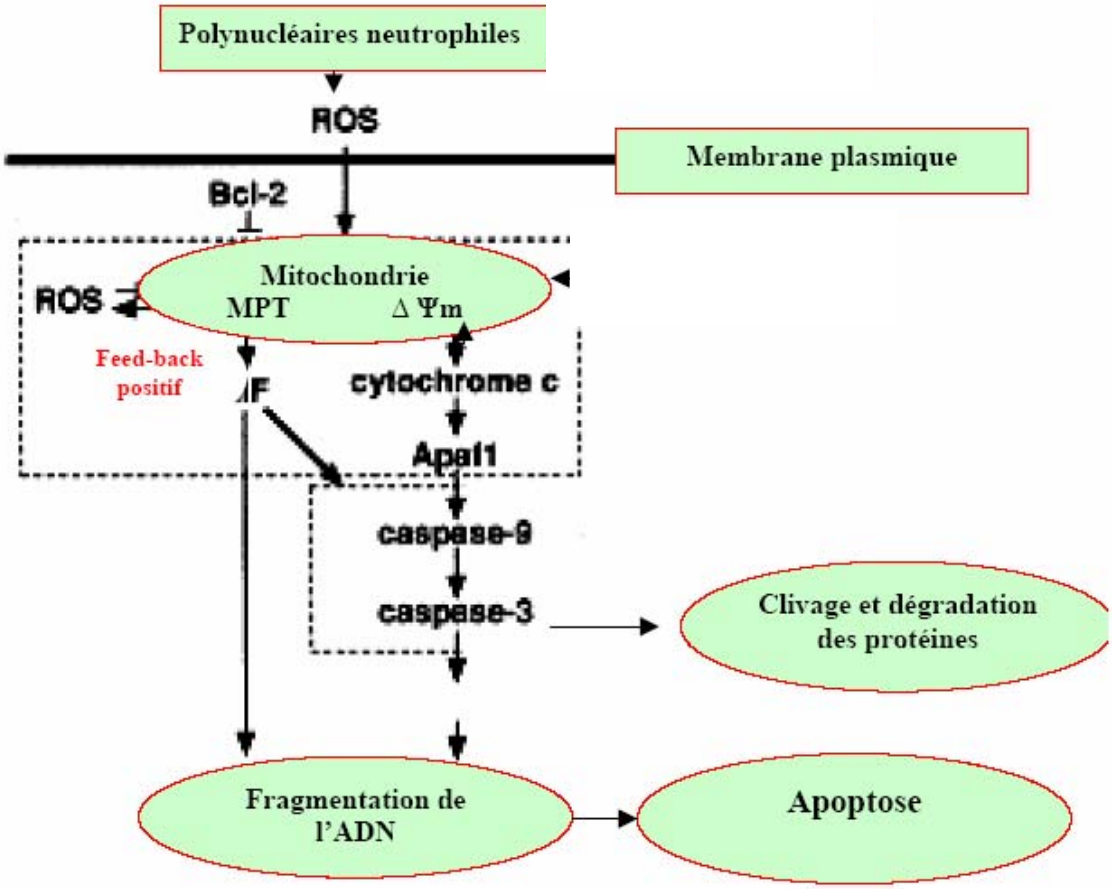


Figure 10 : Voie apoptotique mitochondriale (Ravagnan et Coll., 2002).

I.2.Implication du stress oxydatif dans le choc septique

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution (Sohal et Coll., 2002).

Le stress oxydatif, associé à une forte production des ROS, est impliqué dans le choc septique. Il est lié à l'incapacité de l'hôte de maintenir un équilibre prooxydant-antioxydant en faveurs des prooxydants (Víctor et Coll., 2002).

Plusieurs études ont montré qu'au court du choc septique une forte production des ROS est observée au niveau cardiaque (Khadour et Coll., 2002)**.** Ces ROS sont impliquées dans la pathogenèse et les manifestations du choc septique. Ils réagissent avec divers substrats biologiques conduisant à des dommages tissulaires (Durant et Coll., 2004)

I.2.1.Le stress oxydatif

Le stress oxydatif apparaît lors d'un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant en faveur des premiers. Les espèces pro-oxydantes sont représentées par les espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote (ROS) (Gutteridge, 1995 ; Halliwell, 1996 ; Berger, 2006).

Dans les conditions physiologiques, la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. De faibles taux de radicaux oxydants sont produits régulièrement par le métabolisme cellulaire. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. (Halliwell et Coll., 1992)

Par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydatif » (Favier, 2003).

I.2.1.1.Le système oxydant (pro-oxydant) et système antioxydant cellulaire

I.2.1.1.1.Le système oxydant

*I.2.1.1.1.1.Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote radicalaires et non radicalaires (ROS***)**

Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS) englobe les radicaux oxygénés (radical superoxyde (O_2•–), radical hydroxyle (•OH),..) et les dérivés non radicalaires toxique de l'O2 (peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), hypochlorite (HOCl), oxygène singlet ($^1O_2$) (Halliwell et Gutteridge., 1999 ; Berger et Chioléro, 2001 ; Afonso et Coll., 2007). (**Figure 11**)

Les espèces réactives de l'azote englobent le radical monoxyde d'azote (•NO) et ses dérivés non radicalaires toxique tel que le peroxynitrite ($ONOO^-$)

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un (ou plusieurs) électron(s) non pairé(s) instables (par perte d'un (ou plusieurs) électron(s) de l'orbitale externe) (Berger et Chioléro, 2001; Afonso et Coll., 2007 ; Berger, 2006 ; Buonocore et Groenendaal, 2007).

Ce radical libre aura tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Système redox).Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte.

La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants (Goudable et Favier., 1997).

Ils réagissent avec les tissus voisins causant des lésions oxydatives et/ou nitrosatives par extension de proche en proche, lésant les acides nucléiques, les lipides, les protéines et les hydrates de carbone (Berger, 2006 ; Bunocore.et Gonendaal., 2007).

C'est pourquoi les effets des radicaux libres sont retrouvés dans tout l'organisme et dans des pathologies très variées (Goudable et Favier., 1997; Bunocore et Gonendaal., 2007).

I.2.1.1.1.2.Rôles physiologiques des espèces réactives de l'oxygène

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement toxique, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant indispensables à la vie.

Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à l'exception de la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les ROS participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différentiation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier, 2003).

I.2.1.1.1.3.Les principales espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS)

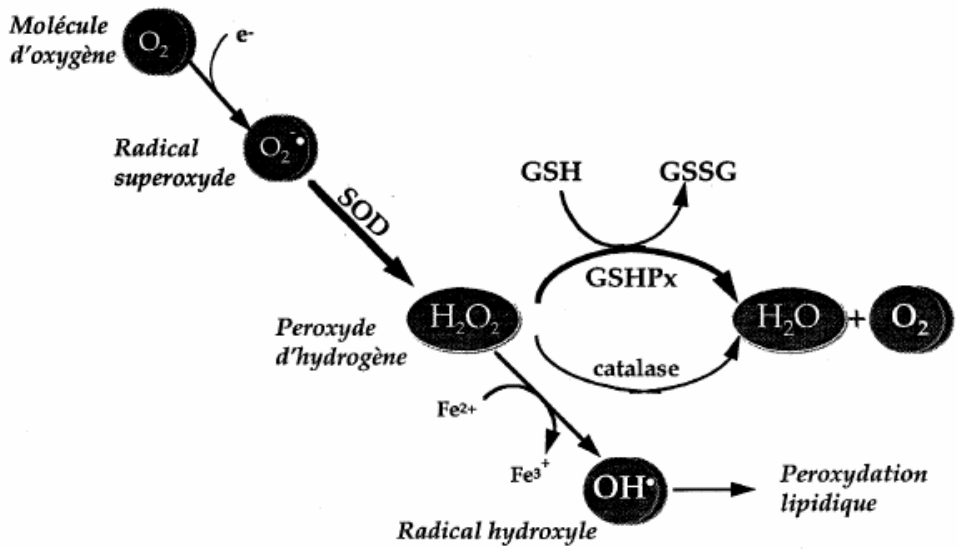


Figure 11 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène (Goudable et Favier., 1997)**.**

I.2.1.1.3.1. L'anion superoxyde, $O_2^{-\cdot}$

Le radical superoxyde ($O_2^{-\cdot}$) constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles (Haddad, 2002).

Il est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages, éosinophiles), et il participe à l'inactivation des virus et bactéries. Cependant, stimulées de façon excessive ou inappropriée, ces cellules sont sources d'une importante quantité de radicaux libres dans le milieu environnant et susceptibles d'entraîner des 1ésions tissulaires sévères (Nohl, 1994).

Parmi les fonctions pro-inflammatoires de l'$O_2^{-\cdot}$, on peut noter l'agression des cellules endothéliales, l'augmentation de la perméabilité microvasculaire et le recrutement des PN sur les sites inflammatoires. Il est également un précurseur d'autres espèces radicalaires plus réactives comme le radical hydroxyle ·OH, radical peroxyle ROO·, et radical alkoxyle RO· (Haddad, 2002 ; Afonso et Coll., 2007).

I.2.1.1.3.2.Le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée H_20_2 (espèce réactive non radicalaire)

L'$O_{2}^{-\cdot}$ réagit sur lui-même (dismutation) en donnant le peroxyde d'hydrogène, et l'oxygène moléculaire:

$$O_{2}^{-\cdot} + O_{2}^{-\cdot} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Cette réaction peut avoir lieu spontanément, mais elle est généralement accélérée par la superoxyde dismutase (SOD) cellulaire (Fridovich, 1995). L'H_2O_2 peut être également produit directement après réduction de l'O_2 par deux électrons, sous l'action de flavoprotéines oxydases (Massey, 1994). (**Figure 11**)

Le peroxyde d'hydrogène (H_20_2) est un produit hautement diffusible et plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux é1ectrons supplémentaires. I1 est potentiellement toxique pour la cellule et il est utilisé par la myé1operoxydase pour produire de l'hypochlorite (HOCl) qui permet de tuer les micro-organismes pathogènes (Halliwell, 1996).

I.2.1.1.3.3.Le radical hydroxyle OH °

Le radical hydroxyle représente la forme la plus réactive des ROS. Il réagit très rapidement avec la plupart des molécules biologiques (Radi et Coll., 1991 ; Halliwell et Chirico, 1993). Sa demi-vie est extrêmement courte de l'ordre de 10^{-9} s. Sa production est initiée par la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène, et le fer ferreux (Gutteridge, 1995). (**Figure 12**)

Cette réaction est stimulée par la réduction du fer ferrique formé, en présence de l'anion superoxyde :

$$Fe(III) + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe(II) + O_2$$

$$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

Il peut être également produit par la réaction de Haber-Weiss entre le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde (Huet et Duranteau., 2008) :

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$$

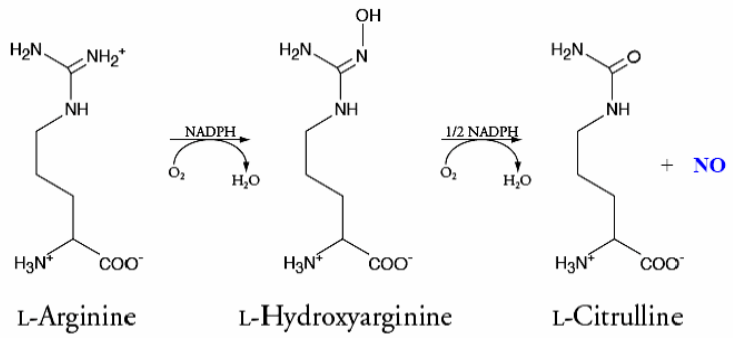
I.2.1.1.3.4.Les radicaux peroxyles ROO·

Les radicaux peroxyles sont obtenus par l'action d'un radical ·OH sur une chaîne d'acide gras poly-insaturés, ou sur des molécules contenant des cycles aromatiques, suivie de l'adition d'une molécule d'oxygène moléculaire sur le radical formé (Fridovich, 1995 ; Apel et Hirt, 2004). Les radicaux peroxyles sont relativement stables, et produisent des peroxydes, ROOH. Ce dernier réagit avec $O_2^{\bullet -}$ pour former un radical alcoxyle RO·. Le radical RO· est moins réactif que le radical hydroxyle, du fait d'une stabilisation du radical libre par le groupement R (Fridovich, 1995 ; Apel et Hirt, 2004).

I.2.1.1.3.5.Les espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote sont représentées principalement par le radical monoxyde d'azote NO, et le peroxynitrite $ONOO^{\bullet -}$.

Le NO dont l'électron célibataire est centré sur l'azote, est synthétisé à partir de la L-arginine, en présence d'oxygène, sous l'action de la NO synthase selon les réactions suivantes (Berlett et Stadtman, 1997 ; Comhair et Erzurum, 2002) :



Il est synthétisé sous demande est pour une courte période par les NOS constitutives endothéliale (eNOS ; type 3) ou neuronale (nNOS ; type 1). Une production excessive et pour une long période est assuré par la NOS inductible (iNOS ; type 2) (Hayashi et Coll., 2005).

Le NO, à un taux basal n'est pas réactif vis-à-vis des molécules biologiques, mais devient délétère pour les cellules à une forte concentration (conduisant à la mort cellulaire) ou en réagissant avec un radical superoxyde ($\bullet O_2^-$) pour former un puissant oxydant : le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Beckman et Koppenol., 1996 ; Halliwell, 2006)
En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ($NO\bullet_2$, •OH). A pH physiologique, le peroxynitrite (ONOO –) est rapidement transformé en acide peroxynetreux (ONOOH) un puisant agent oxydatif et nitrosatif qui peut entraîner des altérations des composants cellulaires (protéines, lipides et ADN) (Buoneocore et Groenendaal., 2007 ; Huet et Duranteau., 2008).

I.2.1.1.4.Origine des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), radicalaires ou non radicalaires, sont produites en permanence par les cellules notamment au niveau des mitochondries lors de la respiration cellulaire (complexe I et complexe III de la chaîne respiratoire), dans les cellules endothéliales par activation de la xanthine oxydase, lors de l'inflammation par la NAPHoxydase et la myéloperoxydase, par les NO synthases, par auto-oxydation des catécholamines, lors de perturbations du métabolisme du calcium et en cas d'acidose (Beaudeux et Coll., 2006 ; Afonso et Coll., 2007).

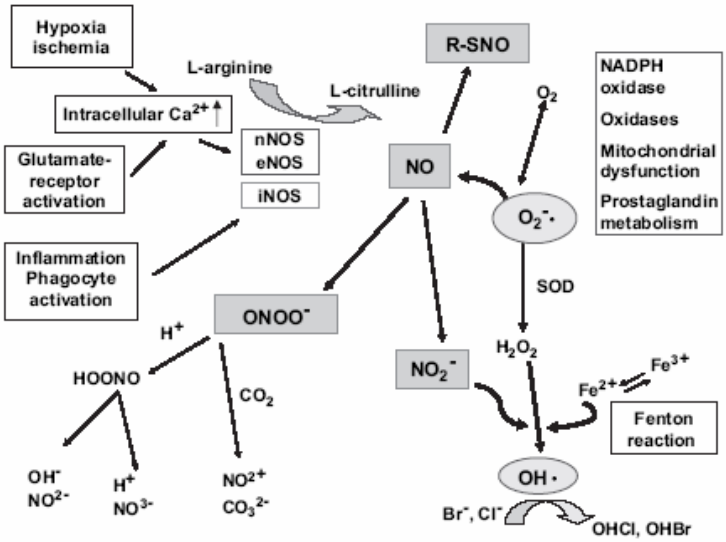


Figure 12 : Voies génératrices des espèces réactives d'oxygène et de nitrogènes dans les cellules. NOS: iNOsynthase inductible, eNOS: NOsynthase endothéliale, nNOS: Nosynthase neuronale, R-SNO: nitrosothiols, SOD: superoxyde dismutase (Buonocore et Groenenendaal; 2007).

I.2.1.1.4.1.La NADPH oxydase

La NADPH oxydase (Nox-2) est un complexe enzymatique formé de plusieurs sous unités membranaire (flavocytochrome b_{558} : gp91phox, p22phox) et cytosolique (p47*phox*, p67*phox*, p40*phox* et Rac). Cette enzyme est décrite initialement au niveau des cellules phagocytaires (PN) comme responsable de l'explosion oxydative essentielle pour la fonction bactéricide de ces cellules (Segal, 2005). **(Figure 13)**

La flavocytochrome b_{558} est une protéine membranaire hétérodimérique constitué de deux sous unités : une sous- unité glycosylée de masse de 91 kDa portant les deux hèmes, les sites FAD et NADPH (gp91phox, phagocyte oxidase), et une sous- unité de 22 kDa (p22phox) (Doussière et Coll., 1999 ; Dworakowski et Coll., 2006). **(Figure 13)**

Les facteurs chimiotactiques (fMLP, PAF, LTB4, C5a, IL-8), cytokines pro inflammatoire (TNFα), et les endotoxines bactériennes (LPS) priment et/ou activent le PN. Ils induisent une mobilisation rapide des composantes cytosoliques (p47*phox*, p67*phox*, p40*phox* et la petite protéine G monomériques Rac liée au GTP), qui transloquent vers la membrane (cytoplasmique ou phagosome) pour former une Nox-2 active (Doussière et Coll., 1999 ; Mortensen et Zhong, 2000). **(Figure 13)**

La Nox-2 activé, transfert deux électrons à partir de la NADPH via FAD et les deux hèmes, vers l'oxygène moléculaire pour former l'anion superoxyde (Dworakowski et Coll., 2006). **(Figure 13)**

$$NADPH \rightarrow FAD \rightarrow 2Hème \rightarrow 2O_2 \rightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$$

Les PN et les phagocytes activées, produisent par la Nox-2 et libèrent des quantités massives d'anions superoxyde $O_2^{-\bullet}$ par réduction mono électronique de l'oxygène. C'est l'explosion oxydative (oxidative burst) (Cross et Segal., 2004).

$$NADPH + O_2 \rightarrow NADP^+ + O_2^{-\bullet} + H^+$$

Ces anions superoxyde sont produits dans les phagosomes, ou dans le milieu extracellulaire. Ils sont directement dismutés en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD).

$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

L'H_2O_2 est métabolisé rapidement par la *myeloperoxydase* granulaire en hypochlorites (HOCl), un agent bactéricide hautement réactif avec les membranes cellulaires (Albert, 2001 ; Chen et Coll., 2002) :

$$MPO\ [Porphyrine - (Fe^{4+})] + Cl^- \rightarrow MPO\ [Porphyrine - (Fe^{3+})] + HOCl$$

La Nox est également présente dans des cellules non phagocytaires (cellules musculaires lisses vasculaires, fibroblastes cardiaques, cardiomyocytes, muscles squelettiques et cellules hépatiques …), sous sept isoformes. (Tableau 01)

Cette répartition est basée sur la sous unité gp91phox ou Nox qui présente 7 isoformes (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 et Duox2) codés par différents gènes (Javesghani et Coll., 2002 ; Durant et Coll., 2004 ; Dworakowski et Coll., 2006).
Tableau 01 : Les isoformes de la Nox et les cellules qui les expriment (Cheng et Coll., 2001 ; Banfi et Coll., 2004)

Nox isoformes	Cellules productrices
Nox-1	Cellules épithéliales (colon) et cellules musculaires lisses vasculaires
Nox-2	Cellules endothéliales, cardiomyocytes, fibroblastes et phagocytes
Nox-3	Tissue de fœtus
Nox-4	Reins, placenta, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses vasculaires, cardiomyocytes, fibroblastes, ovaire, testicule, et muscle squelettique
Nox-5	Tissue de fœtus, testicule de l'adulte, ovaire, poumon, placenta, et pancréas

Ces cellules produisent par la Nox, à l'état physiologique de faibles quantités d'anion superoxyde et des ROS, Cependant cette production augmente significativement sous l'effet de divers stimuli (Dworakowski et Coll., 2006)

Dans les cellules cardiovasculaires, l'activité Nox augmente par divers stimuli physiopathologiques :

- agonistes des récepteurs couples à la protéine G dont l'endotheline-1;
- cytokines tells que : TNFα (tumour necrosis factor α) et TGFβ (transforming growth factor β);
- hypoxie-reoxygénation ou ischémie-réperfusion;
- thrombine, insuline, VEGF (vascular endothelial growth factor), lipoprotéines de faible densité oxydée, protéines glycosylées (Li et Shah., 2003).

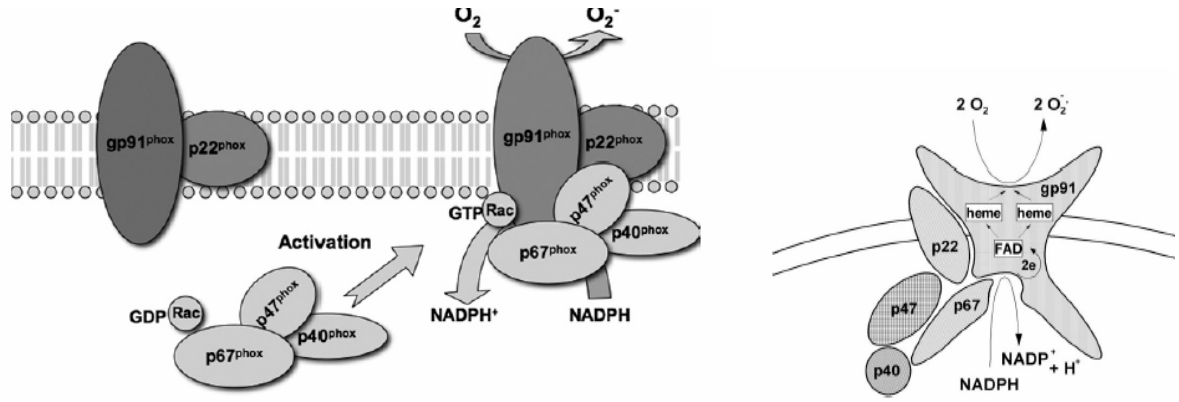


Figure 13 : Structure et activation de la NADPH oxidase Nox2. L'activation Nox2, implique la translocation des sous unités cytosoliques p47*phox*, p67*phox*, p40*phox* et *Rac où elles se lie au cytochrome b558 membranaire formé de p22phox and gp91phox r formant la , Nox2* (Dworakowski et Coll.,2006 ; Roos et Coll.,2003).

I.2.1.1.4.2.La xanthine oxydase

La xanthine oxydase est localisée au niveau du cytosol de plusieurs tissus, elle est retrouvée également au niveau de la circulation sanguine et liée aux sites glycosaminoglycanes des parois artérielles.

Dans les conditions normales l'enzyme joue le rôle d'une déhydrogénase, elle transfère des électrons à la NAD^+ plutôt que l'oxygène, mais en cas d'ischémie-réperfusion ou choc septique le site actif de l'enzyme est oxydé et l'enzyme joue le rôle d'oxydase et produit l'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine lors de la reperfusion (cas d'ischémie), selon les réactions suivantes (Goudable et Favier., 1997 ; Magder, 2006).

$$\text{Hypoxantine} + O_2 \xrightarrow{\text{Xantine oxydase}} \text{Xantine} + O_2^{\cdot -}$$

$$\text{Xantine} + O_2 \xrightarrow{\text{Xantine oxydase}} \text{Acide urique} + H_2O_2 + O_2^{\cdot -}$$

I.2.1.1.4.3.Autres sources d'$O_2^{\circ -}$ et de ROS

La production d'anion superoxyde $O_2^{\circ -}$ est aussi réalisée par autres enzymes métaboliquements actives comme partie de leur fonction (métabolisme normal) ou suite au métabolisme d'un substrat inadéquat. Par exemple l'enzyme cytochrome P450 peut produire l'$O_2^{\circ -}$ lors d'épuisement des molécules cibles de cette dernière.

Les NO synthases (NOS), une famille d'enzymes productrices du NO, peuvent produire l'$O2^{\circ -}$ lors d'insuffisance de substrat L-arginine.

L'$O_2^{\circ -}$ peut être produit par la cyclo-oxygénase comme partie du métabolisme de l'acide arachidonique. Il peut étre également produit par auto-oxydation de certaines molécules telles que le glyceraldehyde, FMNH2, FADH2, adrénaline, noradrénaline, dopamine et thiol contenant certaines molécules telle que la cystéine en présence de l'oxygène O_2 (Magder, 2006).

I.2.1.1.5.Toxicité des ROS

La production excessive des ROS provoque des lésions directes des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps (Favier, 2003).

I.2.1.1.5.1.Oxydation des molécules de DNA : cassures et mutation au sein de l'acide désoxyribonucléique

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les ROS

L'action du radical $^{\cdot}OH$ sur l'ADN peut engendrer :

- une oxydation des bases puriques et pyrimidiques, l'oxydation de la guanine 8-hydroxy-2' déoxyguanosine (8-OH2DG) ;
- cassures des brins d'ADN résultant de l'attaque des sucres ;
- cassures des pontages ADN-protéines.

Cette modification de l'ADN induit des mutations (cancer) ou aboutira à la mise en route d'une mort cellulaire par apoptose (Pincimail et Coll., 1999 ; Favier, 2003)

Le peroxynitrite ($ONOO^{-\cdot}$) oxyde également les bases puriques et pyrimidiques (Cadet, 1999).

I.2.1.1.5. 2.Oxydation des protéines : inactivation des protéines et des enzymes

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui portent un groupement sulfhydryle (SH). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, elles vont former des amas anormaux dans ou autour des cellules (Favier, 2003).

I.2.1.1.5.3.Oxydation des lipides : peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés, des lipoprotéines ou des membranes cellulaires

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme les acides linoléique ou arachidonique sont les cibles privilégiées des ROS et plus particulièrement des radicaux libres ($^{\cdot}OH$). Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH), Sous l'action de métaux de transition (fer, cuivre), les peroxydes lipidiques se décomposent ensuite en toute une série de sous-produits que sont les aldéhydes dont le dialdéhyde malonique MDA et les hydrocarbones. Les aldéhydes sont très réactifs et peuvent augmenter les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Le MDA altère les protéines et l'ADN (Niitsu et Coll., 1995 ; Pincimail et Coll., 1999).

Les conséquences biologiques du stress oxydatif seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates (Favier, 2003).

I.2.1.1.2.Le système anti-oxydant

L'équilibre entre la production des ROS et leur neutralisation est lié à la présence de nombreux systèmes antioxydants (enzymatiques et non enzymatiques).Cet état d'équilibre est la condition clé pour maintenir la fonction cellulaire et tissulaire normale (Afonso et Coll., 2007).

I.2.1.1.2.1.Le système anti-oxydant enzymatique

I.2.1.1.2.1.1.Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD ; EC 1.15.1.1) regroupent des métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde. Elles possèdent dans leur site actif, un métal de transition qui peut être du cuivre, du manganèse ou du fer, qui va capter un électron de l'anion superoxyde, et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif (réaction de dismutation) (Cossu et Coll., 1997). Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire. La Cu/Zn-SOD ou SOD1 est localisée dans le compartiment cytosolique, les peroxysomes, les lysosomes et le noyau, la ECSOD ou SOD3 est extracellulaire, alors que la Mn-SOD est retrouvée dans la matrice mitochondriale (Goudable et Favier., 1997).

L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) est impliquée dans la neutralisation de l'$O_2^{\cdot -}$ en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la reaction suivante (Afonso et Coll., 2007) :

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

I.2.1.1.2.1.2.La catalase (CAT)

La catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) est une enzyme cytosolique (Roméo et Coll., 2000). C'est une hémoprotéine tétramérique de 240 kDa, avec un atome de fer par sous unité. Cette enzyme catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Lindau-Sehpard et Shaffer., 1993 ; Cossu et Coll., 1997) :

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\,H_2O$$

La catalase est également présente dans des peroxysomes (Lindau-Sehpard et Shaffer., 1993)

I.2.1.1.2.1.3.La glutathion peroxydase/glutathion réductase

a- Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide (L-.glutamyl-L-cystéinyl glycine) joue un rôle central dans le système antioxydant cellulaire (Sies, 1999). Sous sa forme réduite (GSH), le gluthation va agir comme un donneur d'électron. La présence de glutathion sous sa forme oxydée traduit un stress oxydatif (GSSG). La réaction du glutathion avec les radicaux libres génère le radical thiyl ($GS^{\cdot}$) qui donne par la suite une forme oxydée GSSG :

$$GS^{\cdot} + GS^{\cdot} \rightarrow GSSG$$

Le GSH intervient également comme donneur d'atomes d'hydrogènes dans les réactions catalysées par les glutathion peroxydases. (Cossu et Coll., 1997)

$$H_2O_2 + 2\ GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

b-La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase sélénium-dépendante (SeGPx ; EC 1.11.1.9) est une métalloenzyme tétramérique de 80 kDa, dont chaque sous unité contient un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine (Halliwell et Gutteridge 1999). Cette enzyme qui catalyse la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes, allant du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques, est présente dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale. Elle joue un rôle majeur dans la neutralisation des processus de peroxydation de lipides endogènes et exogènes (Vitoux et Coll., 1996 ; Cossu et Coll., 1997).

c-La glutathion réductase

La glutathion réductase (GR ; EC 1.6.4.2) est une flavoprotéine dimérique. Elle a un fonctionnement couplé à celui des glutathion peroxydases. Elle contribue au maintien à un niveau faible et constant du rapport GSSG/GSH, en catalysant la réduction du GSSG en GSH au sein de la cellule (Cossu et Coll., 1997):

$$GSSG + NADPH, H^{+} \rightarrow 2\ GSH + NADP^{+}$$

I.2.1.1.2.2.Le système anti-oxydant non enzymatique naturel

Leur pouvoir antioxydant réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres par réduction. Parmi ces antioxydants :

- Les composés phénoliques et flavonoides des plantes flavonoides.
- La vitamine E peut céder un atome d'hydrogène aux espèces radicalaires. Son isomère, l'α-tocophérol, a un pouvoir antioxydant plus puissant. Grâce à ses propriétés lipophiles, il est souvent associé aux membranes intracellulaires, en particulier celles des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Il les protège de la peroxydation des lipides.
- La vitamine C peut réduire l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et de nombreux hydroperoxydes lipidiques. La vitamine C est hydrosoluble, ce qui en fait un moyen de défense complémentaire de la vitamine E. De plus, la vitamine C permet la régénération de la vitamine E oxydée (Cossu et Coll., 1997). Ce type d'antioxydant est appelé piégeur ou éboueur « scavenger » (Favier, 2003).

I.3.La curcumine

I.3.1.Définition

La curcumine (1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) (Ammon et Wahl., 1991), est un polyphénol, isolé des rhizomes d'une plante médicinale asiatique, *Curcuma longa L* (Turmeric), appartenant à la famille des Zingibéracées (Surh, 1999 ; Edeas, 2006). (**Figure 14**).

Le curcuma contient plus d'une douzaine de composés phénoliques appelés curcuminoïdes, dont le principal est la curcumine (de 50 a` 60 %), le demethoxycurcumine (curcumine II), le bisdemethoxycurcumine (curcumin III), cyclocurcumine (Kiuchi et Coll., 1993). Ces composés produisent différents effets bénéfiques pour la santé (Edeas, 2006).

La curcumine est une poudre de couleur orange-jaune utilisée comme épice, pour renforcer la saveur des aliments et les conserver. Elle a une saveur poivrée et amère (Edeas, 2006). Elle est utilisé depuis des siècles en médecine traditionnelle, notamment en Inde, pour traiter toute une variété d'indispositions incluant problèmes gastro-intestinaux, inflammations, maux de tête, anorexie, désordres hépatiques et biliaires, rhumatisme, sinusite, infections et rhumes (Aggarwal et Coll., 2006 ; Edeas, 2006). Sa formule chimique est ($C_{21}H_{20}O_6$) et sa masse molaire est de 368.37 g/mole (Aggarwal et Coll., 2006)

La curcumine commerciale est constituée de 77% de curcumine (curcumine I), 17% de demethoxycurcumine (curcumine II) et 3% bisdemethoxycurcumine (curcumine III) (Aggarwal et Coll., 2006). (**Figure 14**).

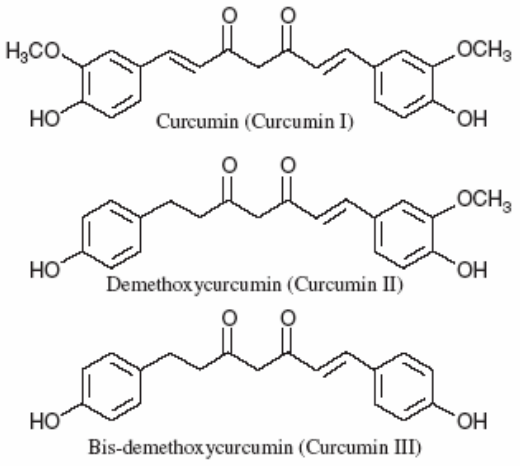
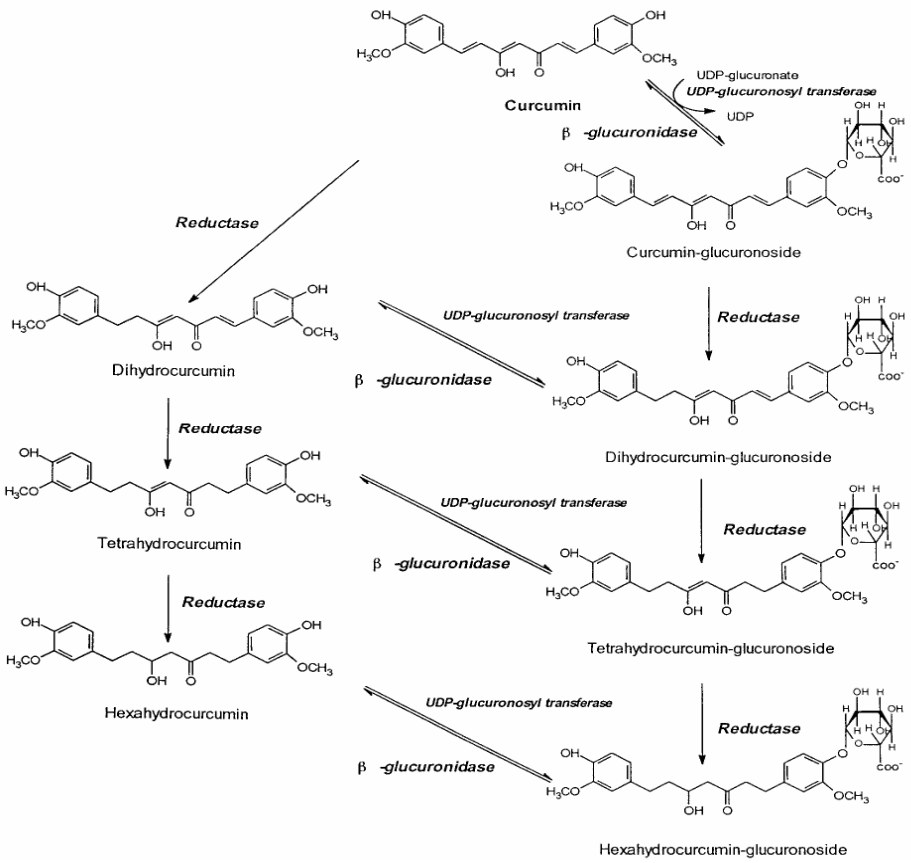


Figure 14: structure des composantes de la curcumine commerciale. Curcumine I (diferuloylmethane=C21H20O6), curcumine II (Demethoxycurcumine) et curcumine III (Bis-demethoxycurcumine) (Aggarwal et Coll., 2006).

Chez la souris, la curcumine est initialement biotransformé en dihydrocurcumine et tetrahydrocurcumine puis conjugué en glucuronides de curcumine, dihydrocurcumine et tetrahydrocurcumine (Pan et Coll., 1999) .Chez le rat et l'homme, la curcumine est métabolisée en curcumine-glucuronide et curcumine-sulfate (voie orale) (Ireson et Coll., 2001), et en tétrahydrocurcumine, (THC), hexahydrocurcumin (HHC) et octahydrocurcumin (OHC) (voie intrapéritonéale ou intraveineuse) (Aggarwal et Coll., 2006).(**Figure 15**)

Les métabolites formés liés ou non à l'acide glucoronique sont à l'origine des activités pharmacologiques de la curcumine (Christopher et Coll., 2001)

A



B

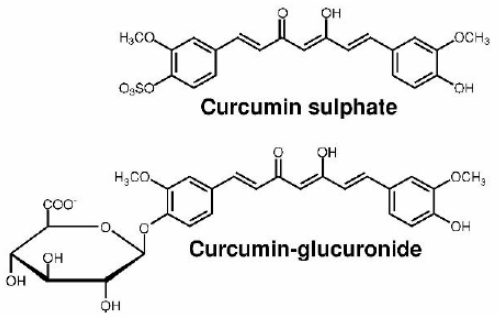


Figure 15: Les principaux métabolites de la curcumine. A (Pan et Coll., 1999) ; *B* (Aggarwal et Coll., 2006).

I.3.2. Propriétés pharmacologiques de la curcumine

La curcumine possède des effets pharmacologiques variés, notamment comme antioxydants, anti-inflammatoires, anti tumorales, anti-VIH et anti infectieux (Nirmala et Coll., 1999). Son mode d'action n'est pas encore entièrement connu (Jagetia et Rajanikant., 2004).

I.3.2.1.Activités antioxydantes

La curcumine possède des propriétés antioxydantes. Elle apporte une protection efficace contre les lésions occasionnées par les ROS en diminuant le stress oxydatif.
La curcumine :
- Neutralise les radicaux superoxydes, hydroxyle et NO (Sreejayan et Rao., 1996).
- Inhibe la peroxydation lipidique (Antunes et Coll., 2001 ; Rukkumani et Coll., 2003 ; Kalpana Menon., 2004),
- Augmente le taux de glutathion intracellulaire en induisant sa biosynthèse (Awasthi et Coll., 2000 ; Blasius et Coll., 2004)
- Neutralise le fer (Unnikrishnan et Rao., 1992),
- Inhibe les enzymes génératrices des ROS et RNS telle que la lipooxygenase (LOX), la cyclooxygenase (COX), la xanthine déshydrogénase, et la iNOS (Reddy et Lokesh., 1992 ; Sreejayan et Rao., 1994).

Elle agit également contre le stress oxydatif en induisant l'expression d'une enzyme cytoprotectrice, l'hème oxygénase-1(HO-1) dans les cellules endothéliales vasculaires (Edeas, 2006).

Une étude a montré qu'un contact prolongé des cellules endothéliales d'une aorte de bovin avec la curcumine renforçait la résistance cellulaire aux lésions oxydatives (Jagetia et Rajanikant., 2005).

Priyadarsini et Collaborateurs ont démontré que la présence du groupement phénol est essentielle pour neutraliser les ROS et la présence des groupements methoxy en position ortho augmente cette activité (Priyadarsini et Coll., 2003).

I.3.2.2.Activités anti-inflammatoires

Les effets anti-inflammatoires de la curcumine sont dus à :
- L'inhibition de la 5-LOX, (Huang et Coll., 1991 ; Prasad et Coll., 2004). Il a été démontré que la curcumine se lie au site actif de la 5-LOX et inhibe son activité (Hong et Coll., 2004),
- La diminution de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1), présentant un rôle important en inflammation (Gupta et Ghosh., 1999 ; Fuller et Coll., 2003)
- La diminution de l'expression de plusieurs cytokines (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12 et IFN-γ) et chémokines (IL-8), (Chan ,1995 ; Xu et Coll., 1997 ; Tomita et Coll., 2005),
- L'inhibition de l'action du TNF-α (Chan ,1995 ; Gulcubuk et Coll., 2006),
- L'inhibition de l'action de l'IL-6 par diminution de l'activation du facteur de transcription STAT3 (Bharti et Coll., 2003)
- L'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique par blocage de la phosphorylation de la cPLA2 (Huang et Coll., 1991), diminuant ainsi l'activité des COX-2 et l'activité de la 5-lipooxygénase (5-LOX) (Hong et Coll., 2004).

- La diminution de l'expression et de l'activité COX-2 et la production de PGE2 induites par LPS (Plummer et Coll., 2001 ; Lee et Coll., 2005).
- L'inhibition de l'expression de la iNOS de manière dose dépendante ((Pan et Coll., 2000 ; Garcea et Coll., 2004).
- L'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Sasaki et Coll., 2003 ; Yang et Coll., 2006) et de la synthèse de fibrinogène impliqués dans la formation des caillots sanguins (Ramirez Bosca et Coll., 2000)
-L'inhibition de l'activation des facteurs de transcriptions NF–κB et AP-1 qui régulent l'expression des gènes proinflammatoires (Singh et Aggarwal., 1995 ; Weber et Coll., 2006),

Le facteur de transcription AP-1 (Activated protein-1) est formé d'un hétérodimère c-*jun*/c-*fos* ou d'un homodimère c-*jun*/c-*jun* (Droge, 2002). L'activation de facteur AP-1 nécessite la phosphorylation de c-*jun* par la protéine kinase JNK activée (Xia et Coll., 2000). L'inhibition de AP-1 par la curcumine, ce fait par interaction direct de la curcumine avec le site AP1-ADN en inhibant l'interaction de AP-1 avec son site d'ADN (Bierhaus et Coll., 1997). Cette inhibition joue un rôle important dans l'activité antiproliférative et anticancéreuse de la curcumine sachant que l'activation de AP-1 permet la prolifération des cellules tumorales (Karin et Coll., 1997).

Le facteur de transcription NF-κB est un héterodimère formé de deux sous unités : p50 et p65. Il est localisé au niveau cytoplasmique, lié à une protéine inhibitrice IκB. La phosphorylation de la IκB par la IKK déclenche la dégradation de ce dernier et permet au facteur NF-κB (hétéro dimère p50 - p65) de transloquer vers le noyau (Ghosh et Coll., 1998 ; Sha, 1998).

Ce facteur de transcription se fixe sur les promoteurs d'une multitude de gènes, et induit alors leur l'expression. Il s'agit des gènes de cytokines, récepteurs de cytokines (TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12), des chimiokines (l'IL-8), de PAF, des molécules de l'adhérence (L-selectin, CD11b et CAMs), des enzymes (iNOS, COX-2) et des facteurs de croissances (Bubici et Coll., 2004). (**Figure 17**)

Les travaux de Singh et Aggarwal., (1995), ont montré que la curcumine diminue l'activation de NF-κB induite par TNF-α et par H_2O_2 (Singh and Aggarwal, 1995).D'autres travaux ont montré que l'inhibition du facteur NF-κB, ce fait par inhibition de la IKK (Jobin et Coll., 1999; Plummer et Coll., 1999).

Kim et Collaborateurs, ont montré que la curcumine inhibe l'activation des protéines MAPK (Mitogen Activated Potein Kinase) et la translocation de NF-κB induite par LPS au niveau des cellules dendritiques (Kim et Coll., 2005).

La curcumine exerce son effet anti-inflammatoire grâce aux groupements hydroxyles et phénols (Bright, 2007)

Madan et Ghosh (2003), ont montré que la curcumine prévient le choc septique induit par une forte dose de LPS chez la souris, permettant la survie de ces dernières. Ils ont démontré que la curcumine inhibe la transmigration et l'infiltration des PNs au niveau de foie, ce qui permet d'inhiber les dommages induits par LPS au niveau du foie. De même la curcumine inhibe l'expression des molécules d'adhérence (ICAM-1 and VCAM-1) au niveau de foie et des reins (Madan et Ghosh., 2003).

I.3.2.3.Récepteurs de la curcumine :

A l'heure actuelle, aucun récepteur authentique de la curcumine n'a été identifié. Cependant plusieurs molécules à laquelle la curcumine se lie ont été identifiées. L'action de la curcumine se fait soit par inhibition ou activation de ces molécules. Le mécanisme d'action exact de la curcumine demeure inconnu (Aggarwal et Coll., 2006).

Parmi ces molécules on note :

La 5-LOX (Skrzypczak-Jankun et Coll., 2003 ; Hong et Coll.,2004), l'albumine (Barik et Coll.,2003 ; Zsila et Coll.,2003), la xantine oxydase (Lin et Shih.,1994), le fer (Jiao et Coll.,2006), la COX-2 (Ramsewak et Coll.,2000), la IKK (Bharti et Coll.,2003), la PKA (Reddy et Aggarwal.,1994), la PKC (Reddy et Aggarwal.,1994), les proteines kinase Ca^{2+} dependante(CDPK)(Hasmeda et Polya.,1996), Ca^{2+}-ATPase du réticulum sarcoplasmique (Logan-Smith et Coll.,2001), et le gluthation (Awasthi et Coll.,2000).(**Figure 16**)

.

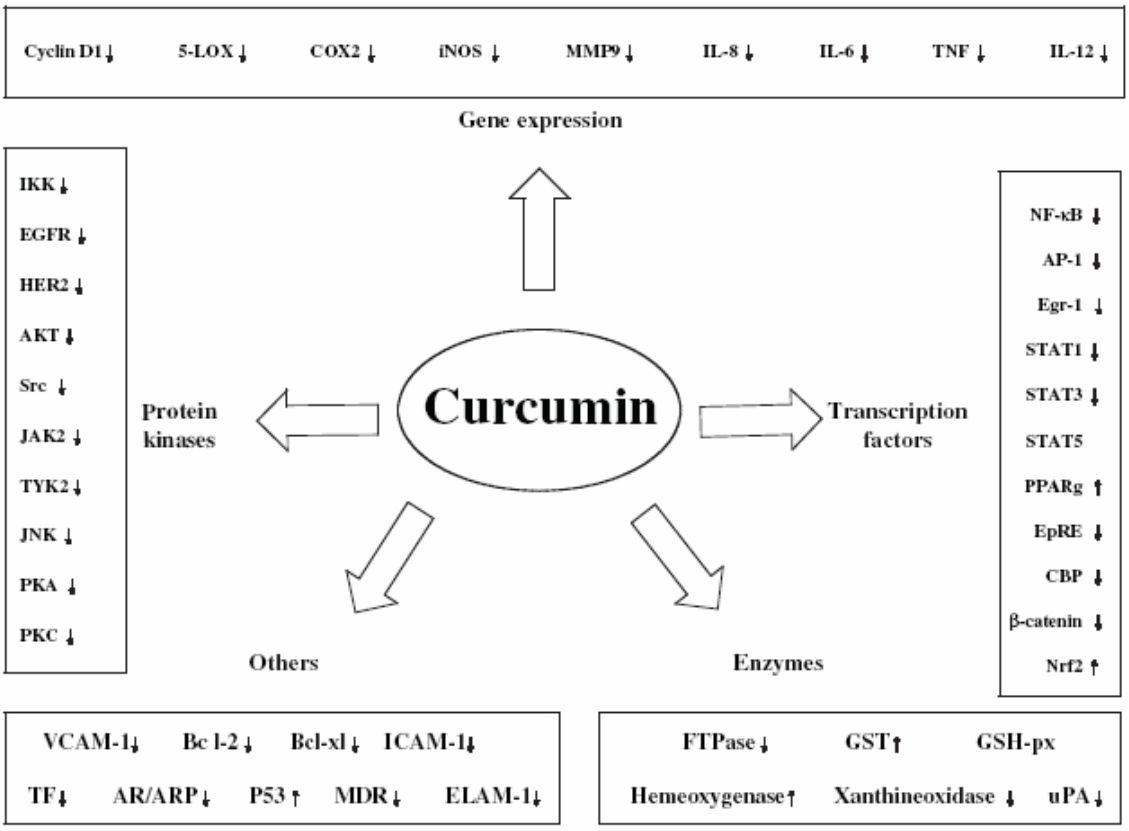


Figure 16 : Molécules cibles de la curcumine (Aggarwal et Coll., 2006).

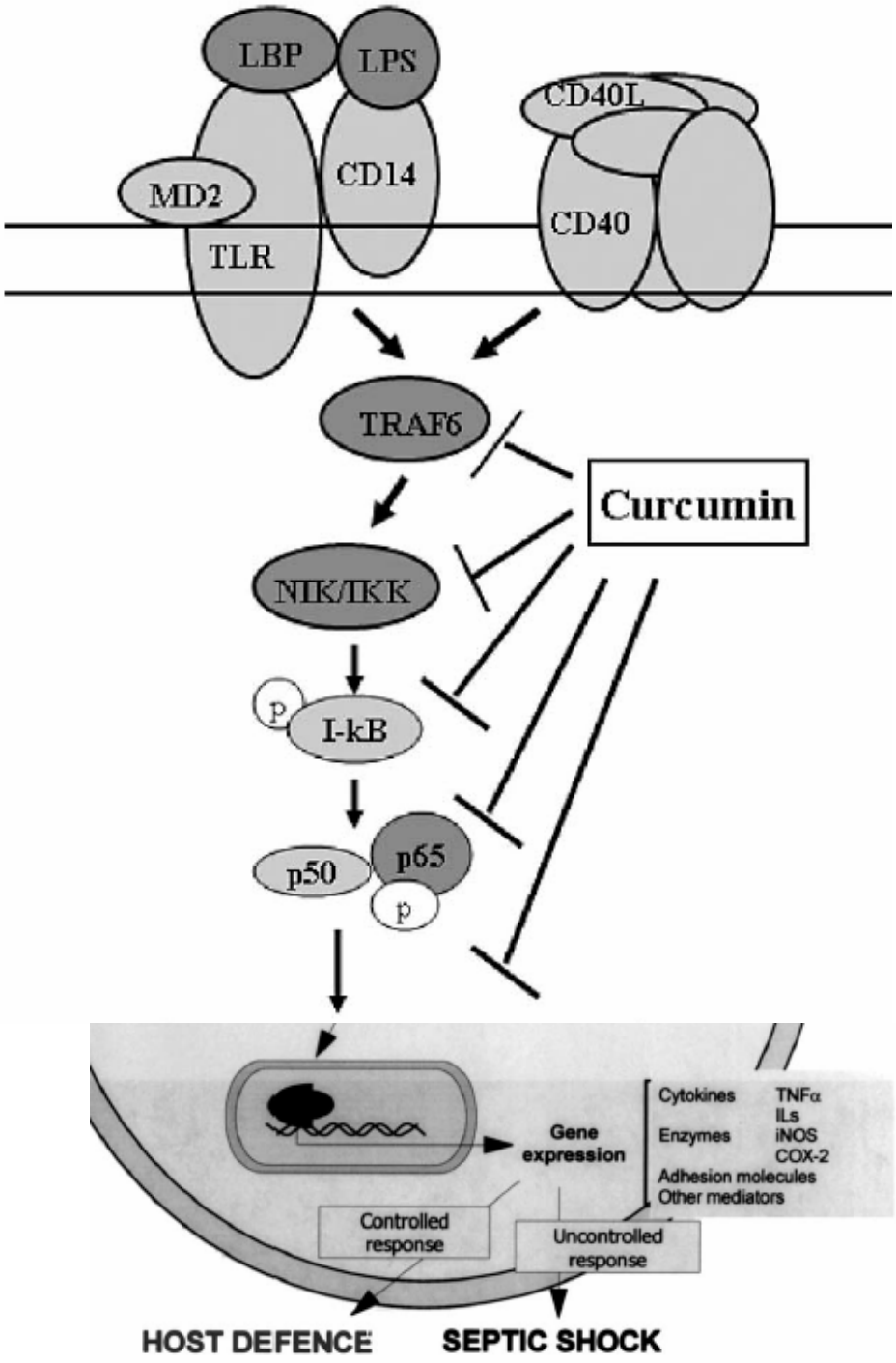


Figure 17 : molécules cible de la curcumine dans la voie d'activation du NF-κB par TLR-4/ CD40 (Bright, 2007).

I.4.L'aspirine
I.4.1.Définition

L'aspirine ou acide acétylsalicylique est un produit de synthèse, dont le constituant principal est l'acide salicylique qui est extrait à partir de l'écorce de saule blanc d'un arbre appartenant à famille des Salicacées, *Salix alba L*. (**Figure 18**)

L'aspirine est un anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS), qui fait partie de la famille des salicylés. Sa formule chimique est $C_9H_8O_4$, et sa masse molaire est de 180.15 g/mole (Moulin, 1998).

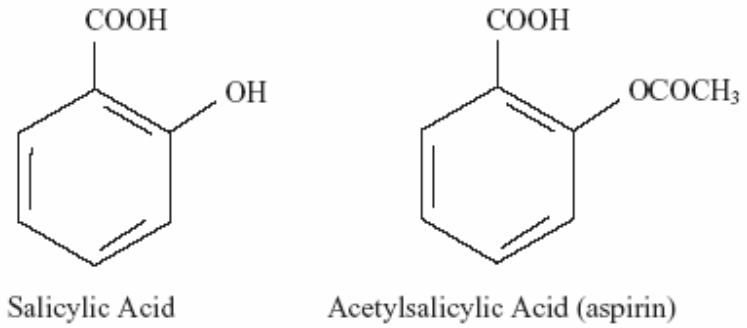


Figure 18 : structure chimique de l'acide salicylique (acide o-hydroxybenzoïque) et de l'acide acétylsalicylique ou aspirine (Awtry et Loscalzo., 2007).

I.4.2.Mécanisme d'action de l'aspirine

L'effet biologique reconnu de l'aspirine est l'inhibition de la prostaglandine G/H synthase-1 et -2 ou cyclooxygénase (COX-1 et COX-2), enzymes qui catalysent la biotransformation de l'acide arachidonique (AA) membranaire en prostaglandines (PGs) et thromboxanes (TXs). Cet effet inhibiteur supporte ses propriétés anti-inflammatoire, antalgique, antipyrétique et antiagrégante (Williams et DuBois., 1996 ; Patrono et Coll., 2001).

Les COX-1 et -2 sont des protéines hydrophobes localisées principalement dans les membranes du réticulum endoplasmique et du noyau (Mitchell et Warner., 1999). Ces deux isoformes sont codées par des gènes situés respectivement sur les chromosomes 9 et 1 humains (Brooks et Coll., 1999).

Les deux protéines présentent 60% d'homologie. Leur site catalytique est bifonctionnel, et formé par un site cyclooxygénase, et un site peroxydase contigus (Brooks et Coll., 1999).

La COX-1 est l'iso enzyme constitutive, présente dans toutes les cellules. Elle intervient dans de nombreux processus physiologiques (protection gastro-intestinale, régulation de l'hémodynamique rénale, activation et agrégation plaquettaire, homéostasie vasculaire) (Morita et Coll., 1995). Cependant, des arguments expérimentaux suggèrent que la COX-1 est également impliquée dans la réaction inflammatoire (Wallace et Coll., 1998).

La COX-2 est une isoforme inductible. Elle est activée par des cytokines pro inflammatoires (interleukine-1, et TNFα), et des lipopolysaccharides bactériens dans les cellules endothéliales, fibroblastes et leucocytes neutrophiles (Mardini et Coll., 2001). L'expression de la COX-2 est constitutive au niveau de la macula densa du rein, dans la prostate, et le cerveau (Steinmeyer, 2000).

Cependant, le mode d'expression (constitutive et/ou inductible), la diversité de la répartition tissulaire, et l'implication des COX dans les processus physiopathologiques est complexe.

Les COX catalysent la bis-dioxygénation de l'acide arachidonique (AA) en prostaglandines G_2 (PGG_2), dont la réduction produit la prostaglandine H_2 (PGH_2). La PGH_2 est le précurseur des prostanoïdes cycliques des mammifères, prostaglandines PGE_2, PGD_2, $PGF_{2\alpha}$, prostacycline PGI_2 et thromboxane A_2 (TXA_2), produits par l'action des PG synthases (Smith, 1992 ; Awtry et Loscalzo., 2007). (**Figure 19**)

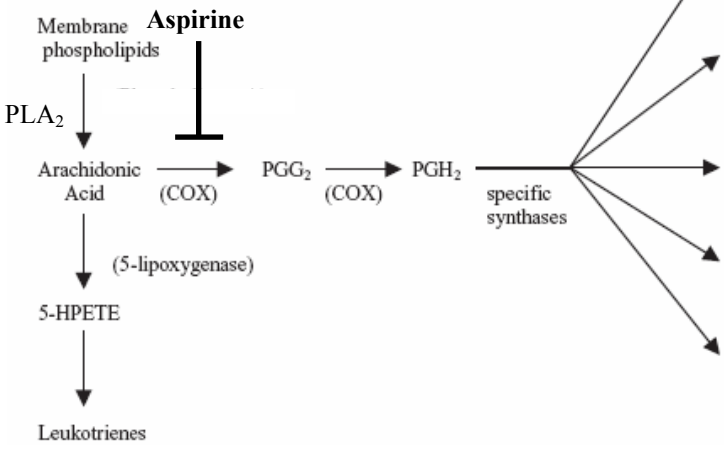
Lors d'une réaction inflammatoire, ces médiateurs lipidiques TXA_2, PGI_2, PGs favorisent et maintiennent la réaction inflammatoire (Awtry et Loscalzo., 2007).

Le principal effet thérapeutique de l'aspirine découle de son action inhibitrice sur la synthèse de prostaglandines par inactivation de la cyclooxygénase (COX) (Antman et Coll., 2005).

A de forte (1000 mg/jour) doses, l'aspirine inhibe la COX1/2 de manière irréversible par acétylation définitive et sélective d'un résidu sérine (Ser529 de la COX-1 et Ser516 de la COX-2 chez l'Homme). L'acétylation du résidu sérine conduit à un changement de conformation du site actif de l'enzyme qui devient incapable de lier son substrat AA, ce qui se traduit par une inhibition de la production des prostaglandines et thromboxanes (Lecomte et Coll., 1994 ; Smith et DeWitt., 1995 ; Forster et Parratt., 1996).
De plus, il a été démontré que l'aspirine à de forte dose inhibe la translocation de facteur de transcription NF-κB vers le noyau (Tak et Firestein., 2001).

A de faible dose (20-283 mg/jour), l'aspirine est un antiagrégant, un inhibiteur sélectif de la COX-1 des plaquettes. L'inhibition de la COX-1 résulte en une inhibition de la production de thromboxane TXA2 qui favorisent l'agrégation plaquettaire tout en respectant au moins partiellement la COX-1 endothéliale responsable de la synthèse des PGE et PGI2 qui inhibent l'agrégation plaquettaire (Forster et Parratt., 1996 ; Patrono et Coll., 2001 ; Capone et Coll., 2004).
Le TXA2 est un agent agrégeant et vasoconstricteur, responsable de la formation de thrombose. Il intensifie l'ischémie myocardique et augmente les dommages cellulaires, principalement par son effet sur l'agrégation plaquettaire et sur le flux sanguin coronaire (vasoconstriction) (Awtry et Loscalzo., 2007).

L'effet cardiovasculaire bénéfique de l'aspirine résulte principalement de son action antithrombotique (Awtry et Loscalzo., 2007). Cependant Hoffmann et Forster (1991) ont montré qu'une dose de 30 mg inhibe par plus de 95% l'agrégation plaquettaire, cette dose est efficace pour prévenir l'infarctus du myocarde ainsi que les accidents ischémiques (Hoffmann et Forster., 1991 ; Forster et Parratt., 1996).
L'effet dose de l'aspirine n'est pas encore clair (Awtry et Loscalzo., 2007).



Thromboxane A_2	Increased platelet aggregation Vasoconstriction
Prostaglandin I_2 (Prostacyclin)	Decreased platelet aggregation Increased renal blood flow Vasodilation Inhibition of gastric acid secretion
Prostaglandin E_2	Increased renal blood flow Vasodilation Naturesis Inhibition of gastric acid production
Prostaglandin D_2	Increased renal blood flow Inhibition of gastric acid secretion
Prostaglandin $F_{2\alpha}$	Decreased progesterone Increased uterine contraction Vasoconstriction Bronchoconstriction

Figure 19 **:** Métabolisme de l'acide arachidonique, et site d'action de l'aspirine (Awtry et Loscalzo.,2007).

Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II .1.1. Réactifs

- Acide acétylsalicylique ou aspirine (Sigma)
- Curcumine (Sigma)

II.1.2.Matériel biologique

- Rats : Albinos adulte (*Rattus norvegicus*, souche *Wistar*) de sexe femelle et d'un poids moyen 200±74 g.

Condition d'hébergement : Température moyenne25 ºC, humidité ambiante.

Régime alimentaire : Aliment granulé (glucides 49,80% ; protéines 34.50% ; lipides 10% et complexe minéral vitaminé : 5.70%) et eau du robinet

- *Escherichia coli* K_{12} préparée par le laboratoire de Génétique de la FSB/USTHB.

II.2.Méthodes

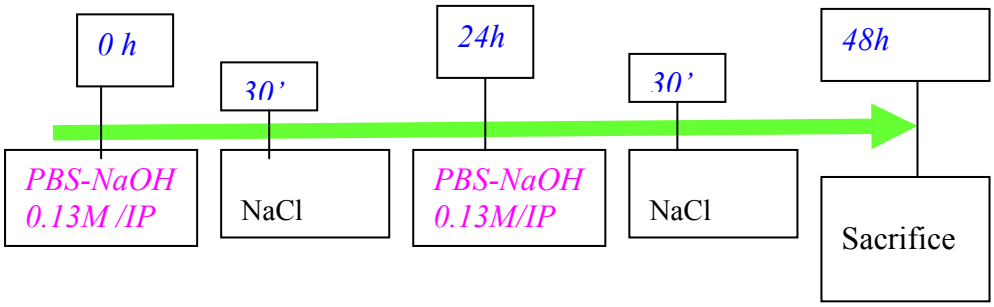
II.2.1.Protocole pharmacologique

L'implication du stress oxydatif dans la défaillance myocardique, après choc septique par *Escherichia coli* a été étudiée à l'aide de l'aspirine, un anti inflammatoire non stéroïdien inhibiteur sélectif de la cyclooxygénase 1 et la curcumine, un antioxydant naturel et inhibiteur de la cyclooxygénase 2 et de la 5-lipooxygénase. Le protocole expérimental a été réalisé sur 2 jours avec 4 lots de rats blancs femelles adultes, d'un poids moyen de 200±74 g. Les rats sont pesés avant et après traitement.

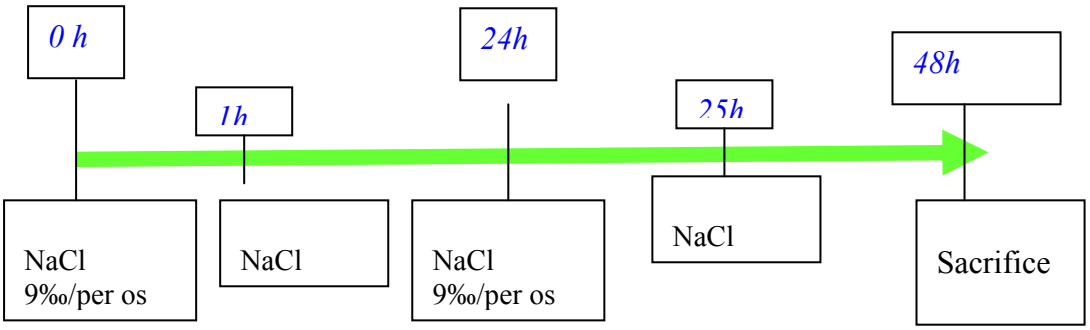
- **Lot contrôle (Lot 1)** :

Les rats témoins reçoivent par voie intrapéritonéale (IP) 1ml de véhicule d'*Escherichia coli* inactivée, de l'aspirine (Eau physiologique 9‰ stérile) par voie orale (*per os*) ou de la curcumine (Tampon PBS-NaOH 0.13M), par voie intrapéritonéale (IP).

- Contrôle Curcumine



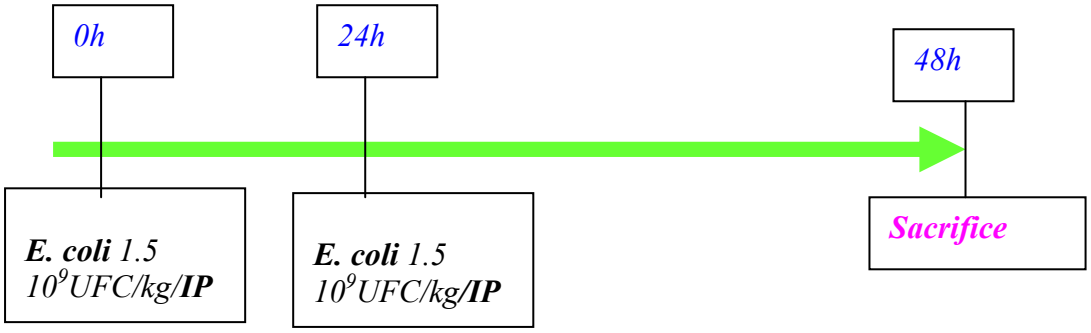
- Contrôle aspirine :



- **Lot septique traité par *Escherichia coli* (Lot 2)**

Plusieurs études ont montré sur des modèles expérimentaux animaux que l'administration de *Escherichia coli* inactivée ou via son LPS seul peut induire un choc septique. Les lésions atteignent préférentiellement le ventricule gauche (Parker et Coll., 1984 ; Genaud et Coll., 2001 ; Fink, 2002; Rozenberg et Coll., 2006 ; Salma et Maizel, 2006 ; Supinnski et Callahan., 2006)

Les rats reçoivent par voie intrapirétonéale deux doses de1, 5 10^9 UFC/kg d'*Escherichia coli* inactivée dans 1ml d'eau physiologique stérile à 24h d'intervalle. Les animaux sont sacrifiés par anesthésie (Chloroforme), 24h après la deuxième injection.



-Préparation d'Escherichia coli

La souche de référence K_{12} appelée également « souche de laboratoire » est ensemencée dans un bouillon cœur-cerveau. Le milieu est incubé pendant une nuit (18h) à 37°C. La croissance bactérienne est arrêtée en phase exponentielle, après 18 h. La charge bactérienne mesurée est de prés de 10^8UFC/ml.

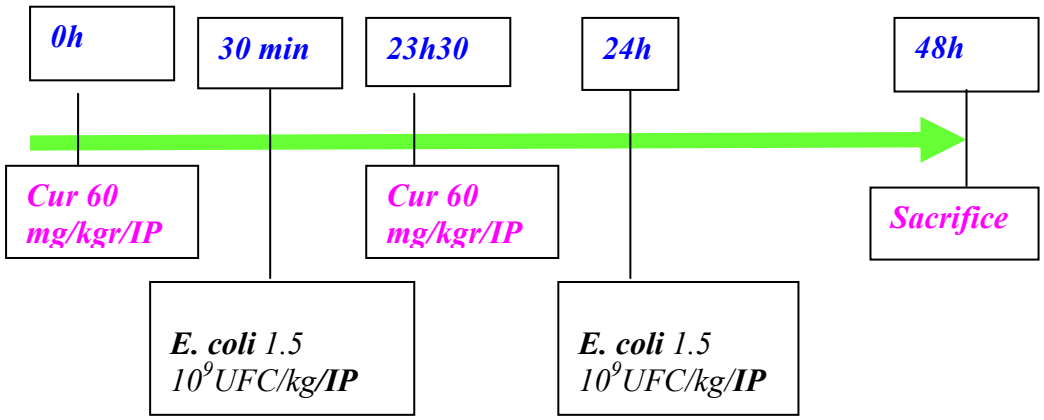
Les bactéries en suspension sont inactivées par la chaleur humide à une température de 120°C, pendant 20 min (autoclave).

Après refroidissement, le milieu est centrifugé à 12000 g, 5min, +4 °C. Le culot bactérien est repris dans de l'eau physiologique stérile. La concentration bactérienne est ajustée à 1.5 10^9 UFC/ml.

- **Lot traité par la curcumine et *Escherichia coli* (Lot 3)**

Les rats reçoivent par voie intra péritonéale, 60mg/kg de la curcumine dissoute dans un tampon PBS–NaOH 0.13M, pH7.4. $1{,}5.10^9$ UFC/kg d'*Escherichia coli,* sont administrés par voie intra péritonéale (J1), 30 min plus tard. Les animaux ont subi le même traitement après 24 heures (J2).

Les rats sont sacrifiés le troisième jour, c'est à dire 24h après le deuxième traitement.



- **Lot traité par l'aspirine et *Escherichia coli* (Lot 4)**

Les rats reçoivent par voie orale 30 mg/kg d'aspirine préparée dans de l'eau physiologique 9 ‰ stérile, 1 heure avant administration de $1{,}5.10^9$ UFC/Kg d'*Escherichia coli* par voie intra péritonéale (J1). Les animaux ont été soumis aux mêmes traitements après 24 heures (J2).

Les rats sont sacrifiés le troisième jour, 24h après le deuxième traitement.

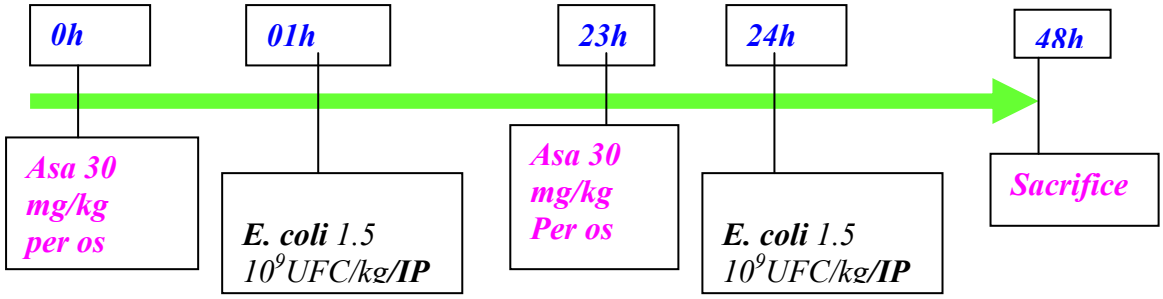


Tableau 02 : Protocole pharmacologique

Jours / Lots	Jour 01 (J1)	Jour 02 (J2)	Jour 03 (J3)
Lot contrôle	1ml de véhicule : NaCl 9‰ stérile ou tampon PBS-NaOH 0.13M	1ml de véhicule : NaCl 9‰ stérile ou tampon PBS-NaOH 0.13M	sacrifice
Lot septique	1ml/IP : *Escherichia coli* inactivée 1.5 10^9UFC/kg	1ml/IP : *Escherichia coli* inactivée 1.5 10^9UFC/kg	sacrifice
Lot prétraité par l'aspirine 30 mg/kg	1ml/100g *per os:* aspirine 30 mg/kg après 1h 1ml/IP: *Escherichia coli* inactivée1.5 10^9UFC/kg	1ml/100g *per os:* aspirine 30 mg/kg après 1h 1ml/IP: *Escherichia coli* inactivée1.5 10^9UFC/kg	sacrifice
Lot prétraité par la curcumine 60 mg/kg	1 ml/IP : curcumine 60 mg/kg .après 30 min1ml/IP : *Escherichia coli* inactivée1.5 10^9UFC/kg	1 ml/IP : curcumine 60 mg/kg .après 30 min1ml/IP : *Escherichia coli* inactivée1.5 10^9UFC/kg	sacrifice

Les rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques sont autopsiés. Le cœur et le mésentère sont rapidement prélevés et lavés avec de l'eau physiologique 9‰ stérile à +4°C.

- Le cœur est pesé puis le ventricule droit est sectionné. Le ventricule gauche (VG) est pesé et conservé dans de l'eau physiologique 9 ‰ stérile à - 40 °C pour l'étude biochimique.

- Les VG destinés à l'étude histologique sont fixés dans du formol à 10% puis conservés dans un liquide d'attente (alcool 70°), après 24 h.

- Le sang des animaux soumis aux différents protocoles est prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA 2.6%, puis centrifugé à 3000g, 10 min à 4°C. Le sérum est récupéré et conservé à -40°C pour une étude biochimique.

II.2.2.Etude biochimique

II.2.2.1.Préparation de l'homogénat tissulaire

L'homogénéisation des ventricules gauches des rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques est réalisée à 4°C, à l'aide d'un homogénéisateur type UltraturaxT_{25} à 9500 tours/min (3X10 secs) dans 10 volumes de tampon phosphate 50 mM, pH 7,2 contenant 0,5% de cetyltriméhyl ammonium bromide (CTAB).

Après trois cycles de congélation-décongélation, les homogénats sont centrifugés 20 min à 10000g, 4°C. Les surnageants ainsi récupérés sont conservés à -40 C°, jusqu'aux dosages (Blandizzi et Coll., 2005).

II.2.2.2.Dosage des protéines

La concentration des protéines dans les différents échantillons est mesurée par la méthode colorimétrique de Bradford, (1976).

Le colorant utilisé est le Bleu de Coomassie G_{250}. Il s'associe au groupement amine des acides aminés. Les complexes formés ont un maximum d'absorption à 595nm (Bradford, 1976).

La concentration protéique est proportionnelle à l'intensité de l'absorption, elle est déterminée à partir d'une courbe étalon établie au préalable avec du BSA 0.1%.

II.2.2.3. Dosage des marqueurs de stress oxydatif

Plusieurs marqueurs biochimiques du stress oxydatif ont été dosés.

Les activités myeloperoxydase (MPO, enzyme marqueur de l'infiltration leucocytaire), catalase (CAT, enzyme du système antioxydant cellulaire), NOSynthase (NOS, taux de monoxyde d'azote, NO), lactate déshydrogénase (LDH) et phosphatase alcaline (PAL) (enzymes marqueurs de lésions et nécroses) ont été dosés dans les homogénats de ventricule gauche, prélevés sur les rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques.

Les taux de malondialdéhyde (MDA, marqueur de la peroxydation lipidique), de glutathion (GSH, anti-oxydant) ont été dosés parallèlement.

Les activités de deux marqueurs de toxicité, lactate déshydrogénase (LDH) et phosphatase alcaline (PAL), ainsi que le taux du NO, du MDA ont été également mesurés dans les plasmas préparés à partir de sang prélevés sur les rats des différents lots.

- Les effets du choc septique ont été mesurés sur la perméabilité et la respiration de mitochondries, préparées à partir d'homogénats de ventricules gauches des rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques.

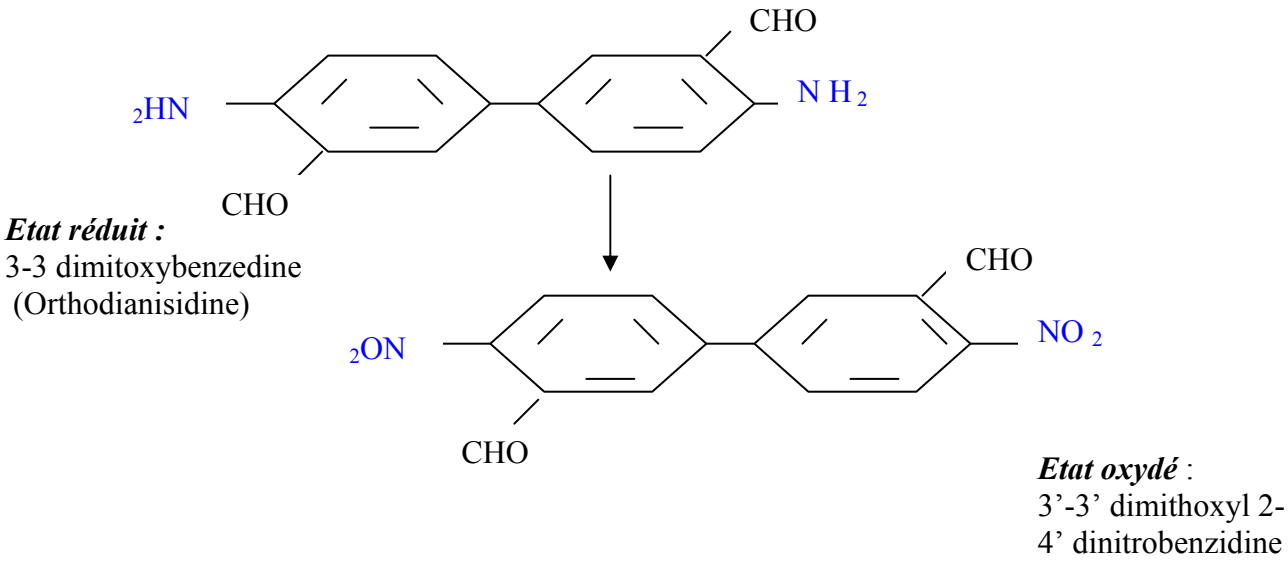
II.2.2.3.1. Dosage de l'activité de la myeloperoxydase (MPO)

La MPO est une peroxydase hémique (EC 1.11.1.7) caractéristique des granules primaires des PN (Serteyn et Coll., 2003).

L'infiltration des tissus par les PN est mesurée par le dosage de l'activité peroxydase de la MPO qui oxyde l'orthodianisidine, un substrat chromogène en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en milieu acide. L'orthodianisidine oxydée absorbe fortement à 460 nm.

100µl d'homogénat tissulaire est mélangé avec 1ml de tampon phosphate 50 mM pH 5.4, 0.167 mg/ml d'orthodianisidine. La réaction est déclenchée par l'addition de 0.0005% d'H_2O_2. L'activité MPO est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 460nm (Krawisz et Coll., 1984).

La cinétique de la réaction est suivie pendant 2 min à 30°C. L'activité MPO est exprimée en µmoles d'H_2O_2 transformées/min/mg de protéines.



Etat réduit :
3-3 dimitoxybenzedine
(Orthodianisidine)

Etat oxydé :
3'-3' dimithoxyl 2-
4' dinitrobenzidine

Figure 20 : Réaction d'oxydation de l'orthodianizidine (Dewald et Baggiollini., 1986).

II.2.2.3. 2. Dosage de l'activité catalase

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

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

L'activité catalase (Hydrogen-peroxide oxydoréductase, EC 1.11.1.7) est mesurée dans 100µl d' homogénat tissulaire en présence d'H_2O_2 10 mM et 1.5 ml de tampon phosphate 50mM, pH 7.0 à 25°C, pendant 2 min. La réaction est déclenchée par l'addition de 10 mM H_2O_2. L'activité la catalase (CAT) est mesurée par augmentation de l'absorbance à 240 nm (Starrs et Coll., 2001).
L'activité enzymatique exprimée en U/min/mg de protéines.
Une unité de catalase correspond à K
- K : (2,3/t) (log A1/A2) où,
- t : temps en seconde ;
- A1 : Absorbance à temps zéro
- A2 : Absorbance à 2 minutes

II.2.2.3.3.Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion réduit a été réalisé selon la méthode d'Ellman, (1959).
Cette méthode est basée sur la formation d'une couleur jaune quand l'acide dithionitrobenzoïque (DNTB, réactif d'Ellman) se lie à des groupements sulfhydriles (Padmondabhan et Coll., 2006).

150µl d'homogénat tissulaire sont mélangés avec 300µl d'acide sulfosalicylique 5% à 4°C puis vortexés pendant 1heure à 4°C. La réaction est arrêtée par centrifugation à 300g, pendant 10min, à +4°C. Le culot est éliminé.

200 µl de surnageant de la dernière centrifugation sont mélangés avec 800µl de tampon phosphate 0.2M, pH8 et 100µl de réactif d'Ellman 0.04 %. Le mélange est incubé pendant 8 min à l'abri de la lumière.

La lecture de la densité optique se fait à 412 nm contre un blanc à base de tampon d'homogénéisation et la concentration tissulaire en GSH est exprimée en µmoles par mg de protéines (Padmondabhan et Coll., 2006).

II.2.2.3.4. Dosage du taux de malondialdehyde (MDA)

Le malondialdehyde (MDA) est un index direct de la peroxydation lipidique.

La réaction de dosage du malondialdehyde, repose sur la formation en milieu acide à chaud entre le malondialdehyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment rose absorbant à 532 nm (Lefèvre et Coll., 1998).

100 µl d'homogénat tissulaire sont ajoutés à un mélange réactionnel contenant 750µl d'acide acétique 20% pH 3.5, 750µl d'acide thiobarbiturique 0,8%, 100µl de sodium dodecylsulfate 8,1%. Le volume réactionnel est complété à 2.0 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 4000g 10 min et à +4°C. La densité optique est mesurée à 532 nm contre un blanc à base de tampon d'homogénéisation (Rozenberg et Coll., 2006).

La concentration tissulaire en MDA est exprimée en nmoles/mg de protéines.

- Le même protocole est appliqué pour le dosage du taux de MDA au niveau sérique.

II.2.2.3.5.Dosage du monoxyde d'azote (NO)

L'activité NOSynthase (NOS, EC 1.14.13.39) est estimé par le dosage du NO, ce dosage du monoxyde d'azote (NO) est réalisé de manière indirecte par la détermination des taux de nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-), deux produits de dégradation oxydative du NO après une réaction rapide avec l'oxygène ou l'anion superoxyde (Grand et Coll.,2001).

$$2\ NO + O_2 \longrightarrow 2\ NO2$$

$$2\ NO_2 + H_2O \longrightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H^+$$

$$NO + O_2^- \longrightarrow OONO \longrightarrow NO_3^-$$

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

Les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une fonction amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque (rose) qui absorbe à 540 nm (Grand et Coll., 2001 ; Sun et Coll., 2003).

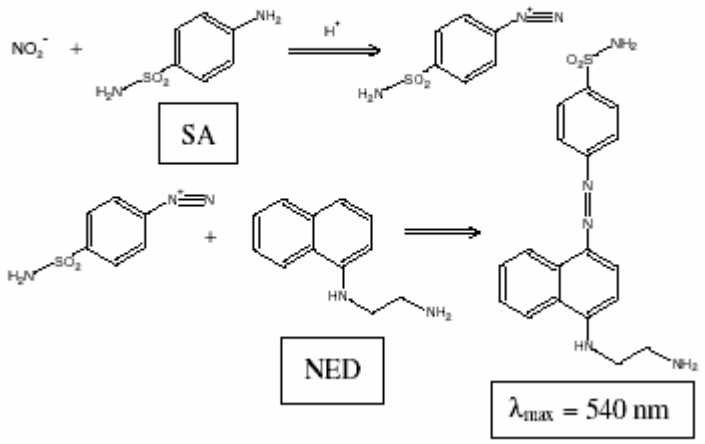


Figure 21: Réaction de Griess (Sun et Coll., 2003)

- *Réduction des nitrates en nitrites*

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

La réduction des nitrates a été réalisée par le cadmium (agent réducteur) sur des homogénats préalablement déprotéinisés selon la réaction suivante (Sun et Coll., 2003):

$$NO_3^- + H_2O + Cd \longrightarrow NO_2^- + Cd^{2+} + 2OH^-$$

Les concentrations tissulaires en nitrites sont déterminées à partir d'une courbe étalon établie au préalable avec une solution de $NaNO_2$ 100µM.

Dosage du NO_2^- et NO_3^- réduit

400µl du réactif de Griess sont ajoutés à 400µl de surnageant des homogénats déprotéinisés selon la méthode de Grand et Coll., (2001). Le mélange est incubé pendant 15 minutes et la lecture se fait à 546 nm contre un blanc à base de tampon d'homogénéisation (Sun et Coll., 2003).

Le taux nitrite et nitrate total est un indice de production du NO et il est exprimé en µmoles/mg de protéines.

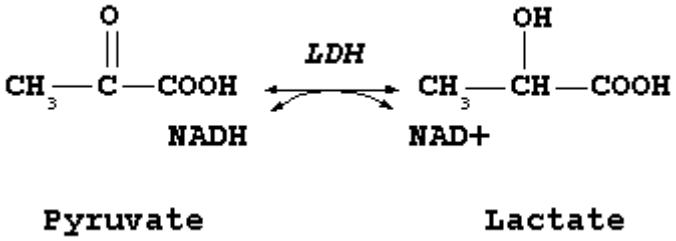
Le monoxyde d'azote NO a été également dosé dans le sérum par les mêmes protocoles. La concentration en NO sérique est exprimée en µM de nitrites/ mg de protéines.

II.2.2.4. Dosage des marqueurs de cytotoxicité

II.2.2.4.1.Activité lactate déshydrogénase, LDH

La lactate déshydrogénase (oxydoréductase, EC 1.1.1.27, LDH) est présente dans la plupart des tissus en quantité importante (cœur, reins, foie, muscles, rate, poumons, utérus, globules rouges…). Elle catalyse l'oxydation réversible du L-lactate en pyruvate, en présence de NAD^+ comme coenzyme (Kobayashi et Coll., 2001).

La mesure de l'activité LDH repose sur la transformation du pyruvate en lactate. L'augmentation de l'absorbance à 340 nm due à la réduction parallèle du NAD^+ en NADH, (H^+) est mesurée à 340 nm, à 30°C (Wahlefed ,1983).



L'activité LDH est mesurée par le protocole suivant :
2 g de tissu sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur type « Ultraturax »T_{25} à 9500 tours/min (3X10 sec) dans 8 ml du tampon phosphate 10 mM, pH 7,5. L'homogénat est centrifugé (14000 g, 30 min à +4°C). Le surnageant est récupéré puis dilué aux 1/200ème dans du tampon phosphate 0.01 M, pH 7.5.

Le milieu réactionnel contenant 100 µl de NAD^+ 6mM et 2.4 ml de L-lactate 16.51 M dans du tampon phosphate sodique 10 mM, pH 9.0, est incubé 5 min à 30°C.

La réaction est déclenchée par l'addition de 100 µl de surnageant tissulaire au milieu réactionnel et la vitesse de formation du NADH est suivie pendant 3 min (Wahlefeld, 1983).

L'activité LDH est exprimée en µmoles de NADH formées/ min/ mg protéines (Théfenne et Coll., 2001).

L'activité LDH plasmatique a été dosée avec un Kit (Spinreact, S.A, Santa coloma. Espagne. ISO 9001). Elle est exprimée en mU/min/mg de protéines.

II.2.2.4.2.Activité phosphatase alcaline (PAL)

L'activité phosphatase alcaline a été mesurée dans les homogénats de ventricules gauches et du sérum des rats avec un kit (Spinreact, S.A, Santa coloma .Espagne. ISO 9001) selon la réaction suivante :

$$\text{p-nitrophenyl-phosphate} \xrightarrow{\text{PAL}} \text{p-nitrophenol+phosphate}$$

Le milieu réactionnel contenant 10 mM de p-nitrophenyl-phosphate dans du tampon diéthanolamine 1M, pH 10.4 contenant 0.5 mM de chlorure de magnezium est incubé 5 min à 30°C.

La réaction est déclenchée par l'addition de 100 µl de surnageant tissulaire au milieu réactionnel et le taux de p-nitrophenol formé est mesuré à 405 nm.

L'activité PAL est exprimée en mU/ min/ mg protéines.

II.2.2.5 .Etude des marqueurs de dysfonctionnement mitochondrial et d'apoptose cellulaire

Un défaut d'utilisation de l'oxygène par les mitochondries ou «cytopathie hypoxique», serait responsable de la défaillance cardiaque et le décès des patients septiques (Nevière, 2008).

L'ultrastructure et le fonctionnement des mitochondries sont perturbés dans de nombreux modèles de choc septique (Nevière, 2008).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) par ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) précède une mort cellulaire programmée par apoptose ou nécrose (Zamzami et Coll., 2005).

Dans cette partie de notre étude, l'implication d'un stress oxydatif dans le dysfonctionnement mitochondrial lors du choc septique a été réalisée par la mesure de la perméabilité et de la respiration des mitochondries myocardique du ventricule gauche.

II.2.2.5.1.Préparation des mitochondries cardiaques

Les ventricules gauches (VG) des rats soumis aux protocoles pharmacologiques décrits ci-dessus sont prélevés immédiatement après sacrifice. Ils sont broyés à 4 °C 3 fois 30 secondes à l'aide d'un homogénéisateur type Ultraturax T_{25}, dans un tampon pH 7.2 contenant du saccharose 50 mM, du mannitol 200 mM, du KH_2PO_4 5 mM, de l'EDTA 1mM, du MOPS 5 mM et de la BSA 0.1%.

L'homogénat est centrifugé à 500 g pendant 5 min, à +4 °C, afin d'éliminer les débris et les noyaux cellulaires. Le surnageant est centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le culot contenant les mitochondries est lavé 2 fois avec le même tampon. Le culot de mitochondries brutes est remis en suspension dans le tampon de gonflement ou de respiration selon la méthode de Somasundaram et Coll., (1997).

La concentration protéique de la suspension brute de mitochondries, a été déterminée par la méthode de Bradford, (1976).

II.2.2.5.2.Etude de l'effet d'*E. coli* inactivée en absence ou en présence de la curcumine ou de l'aspirine sur le gonflement ou la perméabilité mitochondriale :

L'étude de l'effet de divers traitements pharmacologiques sur l'ouverture des pores de transition de perméabilité des mitochondries cardiaques, a été réalisée par la mesure du gonflement, par Spectrophotométrie selon la méthode de Famaey, 1973 ; avec modification. Les mitochondries sont préincubés à 30°C pendant 5 min dans le tampon de gonflement (Saccharose 50 mM, mannitol 200 mM, KH_2PO_4 5 mM, tampon MOPS 5 mM). La variation de l'absorbance à 540 nm est suivie pendant 5 min. Elle est exprimée en unité de densité optique/min/mg de protéines (UDO/min/mg de prot).

II.2.2.5.3.Etude de l'effet d'*E. coli* inactivée en absence ou en présence de la curcumine ou de l'aspirine sur la respiration mitochondriale

L'étude de l'implication des mitochondries dans la défaillance myocardique induite par *E. coli* a été réalisée par la mesure de la respiration mitochondriale, en utilisant le ferricyanure comme accepteur final artificiel des électrons (accepteur arteficiel). La réduction du ferricyanure a été mesurée par spectrophotométrie à 420 nm (Forman et Wilson., 1982).

$$\text{Cytochrome } c^{+2} + \text{Ferricyanure} \rightarrow \text{Cytochrome } c^{3+} + \text{Ferrocyanure}$$

La réaction est mesurée à 25° C dans un tampon de respiration contenant du MOPS 15 mM pH 7.2, KCl 150 mM, EDTA 5 mM, $K_3Fe(CN)_6$ 1 mM et KCN 50 mM.

La respiration déclenchée par addition du substrat (Glutamate 5 mM et malate 5 mM) est suivie pendant 5 min. La variation de l'absorbance à 420 nm est exprimée en unité de densité

optique/ min et par mg de protéines (µmoles de $K_3Fe(CN)_6$ réduit/min/mg de prot) (Forman et Wilson., 1982).

II.2.3 .Etude histologique

Les fragments de ventricules gauches des rats témoins et de rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques, sont découpés et fixés dans du formol 10 % pendant 24 heures. Après lavage à l'eau courante, les pièces sont déshydratées, puis éclaircies par passages successifs dans des bains d'alcools de degrés croissants (70°, 90°et 100°) et de butanol, d'une durée moyenne de 10 min.

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

Le mésentère fixé dans du formol 10% est lavé après 24h 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.

II.3.Etude statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée par le test de Student pour les petits échantillons.

- $p > 0,05$: la différence n'est pas significative.
- $0,05 > p > 0,01$: la différence est significative *.
- $0,01 > p > 0,001$: la différence est très significative **.
- $p < 0,001$: la différence est hautement significative ***.

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion
III.1.Résultats

Ce travail a porté sur l'étude de l'implication du stress oxydatif dans la défaillance myocardique induite par choc septique avec *E. coli* inactivée, in vivo.

La modulation de la toxicité a été entreprise à l'aide de 2 molécules

- la curcumine, un antioxydant et polyphénol naturel scavenger des ROS et inhibiteur de la 5-LOX, de la (COX2) et de la iNOS.
- l'aspirine, un AINS, inhibiteur sélectif de la COX1

L'étude biochimique a ciblé le ventricule gauche (VG) et le sang (sérum) pour le dosage des :

- marqueurs généraux de toxicité et de nécrose cellulaire comme la LDH et PAL.
-marqueurs du stress oxydatif, avec la MPO index de l'infiltration leucocytaire, le MDA marqueur global de la peroxydation lipidique, le NO marqueur de l'activité NOSynthase,
- marqueurs du pool antioxydant, la catalase et le GSH.

Les sérums ont été testés pour les marqueurs de toxicité (PAL, LDH) et de stress oxydatif. (MDA et NO).

Les effets du choc septique sur l'intégrité fonctionnelle des mitochondries ont été abordés par l'étude de la respiration et de la perméabilité des mitochondries myocardiques du ventricule gauche.

Une étude histopathologique sur le VG a été faite dans le but de confirmer les résultats de l'étude biochimique. Une étude histopathologique a été également réalisée sur le mésentère dans le but d'observer l'infiltration leucocytaire induite par une administration intra péritonéale d'*E. coli* inactivée.

III.1.1. Résultats de l'étude biochimique

Différents travaux ont montré l'implication du stress oxydatif dans l'inflammation aiguë conduisant au dysfonctionnement cardiaque (VG) lors d'un choc septique induit par *Escherichia coli* (*E. coli)* ou par son endotoxine (LPS) (Chagnon et Coll., 2005 ; Hayashi et Coll., 2005 ; Rozenberg et Coll., 2006 ; Supinski et Callahan., 2006).

Le principal mécanisme impliqué est une rupture de l'homéostasie redox en faveur des systèmes pro oxydants. Une perte de poids corporel et une hypertrophie cardiaque, ont été observées chez les rats, 48 h après l'administration de l'endotoxine (LPS) d'*E. coli* (Rozenberg et Coll., 2006). L'hypertrophie cardiaque est le résultat de l'atteinte des fibres musculaires par une toxicité mitochondriale. Elle conduit à une mort des cardiomyocytes par apoptose.

La variation du poids des rats a été suivie par des pesées avant et après traitement des rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques. Le cœur et le ventricule gauche ont été également pesés après sacrifice.

Le tableau suivant (**Tableau 3)** représente le poids en gramme des rats avant et après divers traitements, la variation du poids après traitement ΔP, le ratio poids du cœur en milligramme sur le poids de l'animal en gramme et le ratio poids du VG en milligramme sur le poids de l'animal en gramme.

Tableau 03: Effet d'un traitement par la curcumine 60 mg/kg ou par l'aspirine 30 mg/kg sur le poids des rats et des cœurs soumis à un choc septique par *E. coli*

Traitements	Témoin	*E coli* 1,5 10^9UFC/kg	*E coli* + aspirine	*E. coli* + curcumine
Poids initial (g)	216.21±18	204.6±3	226.7±9	216.51±10
Poids après 48h (g)	221.1±12	195±5	227.5±14	212±10
ΔP	+5	-9	+0.8	-4
Ratio PC/Pc	2.6±0.05	3±0.1	2.7±0.1	2.56±0.04
Ratio PVG/Pc	2.20±0.04	2.7±0.04	2.29±0.1	2.19±0.01

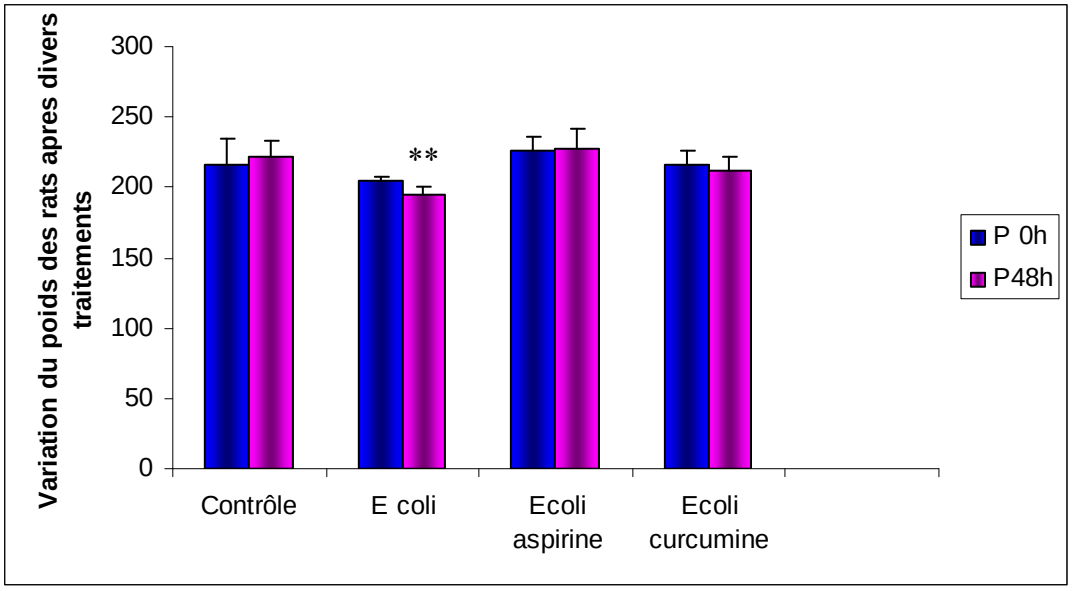


Figure 22 : Effets des différents traitements sur le poids des rats blancs. ***P<0.01, poids à temps 0h (avant traitement) comparé au poids à 48h (après traitement).*

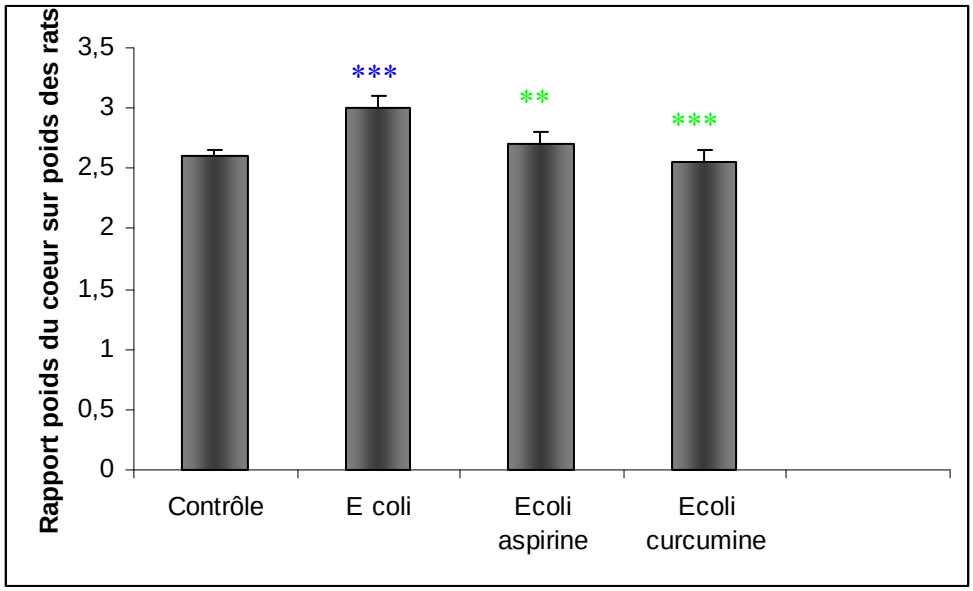


Figure 23 : Effets des différents traitements sur le poids du cœur. *** *P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles,* ** *P<0.01,* *** *P<0.001 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

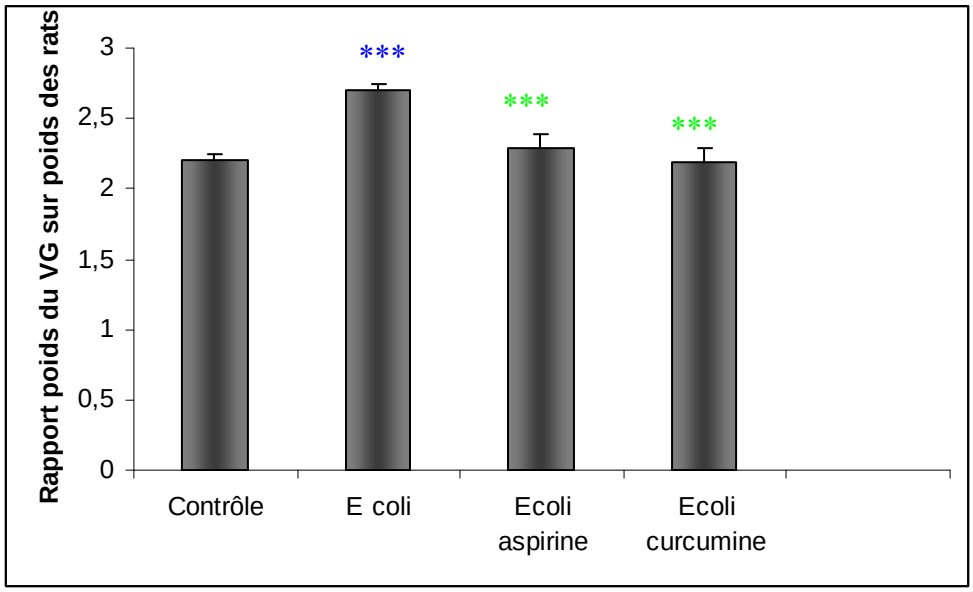


Figure 24 : Effets des différents traitements sur le poids du ventricule gauche VG. *** *P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles,* *** *P<0.001 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Les résultats montrent (**Figure 22, 23,24 et Tableau 3**) une diminution du poids corporel associée une augmentation du poids du cœur chez les rats traités par *E. coli* inactivée 1.5 10^9UFC/kg, comparé aux rats témoins. Cette observation a été rapportée par Rozenberg et Coll., (2006).

L'augmentation du poids du cœur reflète une hypertrophie des muscles cardiaques après traitement par *E. coli* inactivée, qui provoque une dilatation et une altération des propriétés contractiles ventriculaires.

Le poids des rats prétraités à l'aspirine 30 mg/kg, une heure avant injection de *E. coli* et de leurs cœurs sont inchangés (**Figure 22, 23,24 et Tableau 3**).

De même, le poids des rats prétraités à la curcumine 60 mg/kg, 30 min avant injection de *E. coli*, et de leurs cœurs sont inchangés (**Figure 22, 23,24et Tableau 3**).

III.1.1.1. Modulation par la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg de la défaillance myocardique, après un choc septique induit par E. coli

III.1.1.1.1.Implication du lactate déshydrogénase LDH, marqueur de cytotoxicité

Le taux de lactate déshydrogénase a été mesuré dans les différents homogénats du ventricule gauche ainsi qu'au niveau sérique et les résultats de ce dosage sont représentés dans les figures suivantes (**Figure 25et 26**) :

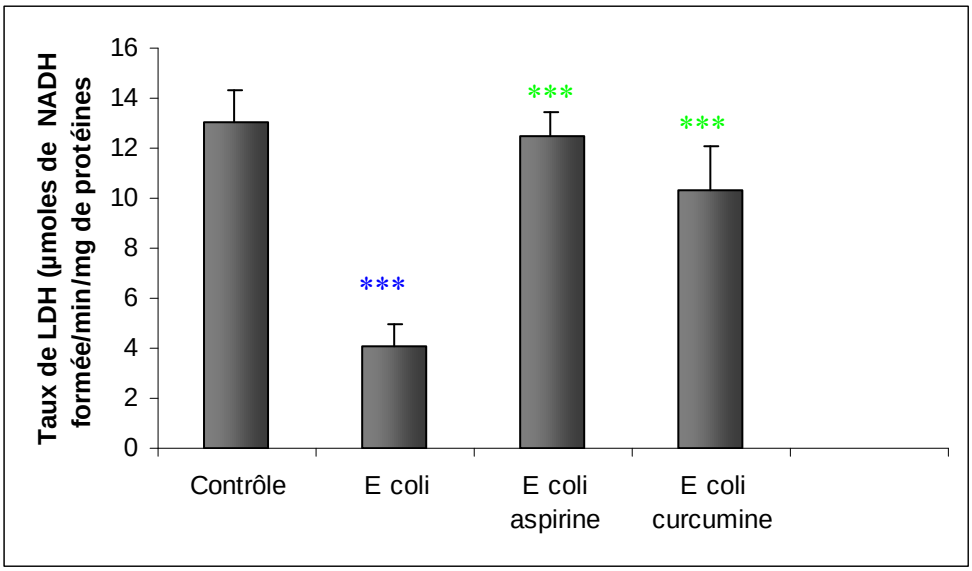


*Figure 25: Taux de lactate déshydrogénase dans le ventricule gauche des rats, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg.****P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles, ****P<0.001 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

L'activité basale lactate déshydrogénase dans le ventricule gauche est de 13.03± 1.29 µmol de NADH formée/min/mg de prot (100%± 9.9%).

Cette activité diminue de 68.4 % suite à un traitement par *E. coli* $1.5.10^9$UFC/kg et atteint un taux de 4.11±0.8 µmol de NADH formée/min/mg de prot (31.60%± 6.15%).

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg semble avoir un effet sur cette diminution observée chez le groupe de rats septiques, l'activité LDH augmente de 64.02 % comparé aux rats septique et elle est de 13.5± 2 µmol de NADH formée/min/mg de prot (95.62%±14.16%).

L'activité LDH chez le groupe de rats prétraités à la curcumine 60 mg/kg, est de 10.33± 1.75 µmol de NADH formée/min/mg de prot (79.26%±13.42%), cette activité est deux fois plus élevée que celle des rats septiques (4.11± 0.8 µmol de NADH formée/min/mg de prot) et elle est proche de celle du contrôle (13.03± 1.29 µmol de NADH formée/min/mg de prot).

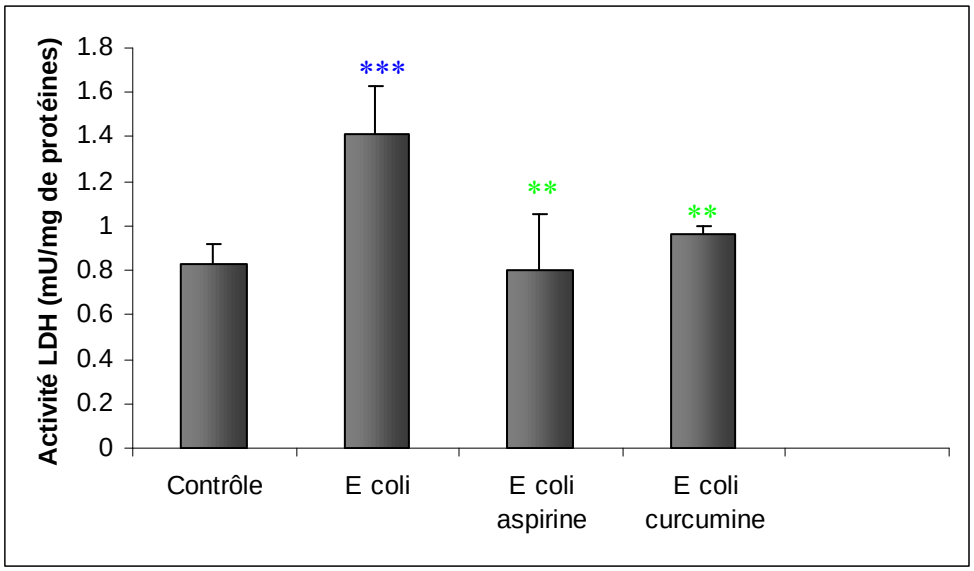


Figure 26: Taux de lactate déshydrogénase dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg. ****P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles,* ***P<0.01 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

L'activité LDH basale dans le sérum est de 0.83±0.09 mU /mg de prot (100%±10.8 %). Elle augmente de 69.87 % chez les rats traités par *E. coli* $1.5.10^{9}$UFC/kg et atteint 1.41±0.22 mU/mg de prot (169.87%±26.5 %).

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg diminue l'augmentation observée chez le groupe de rats septiques, l'activité LDH est similaire à celle des rats contrôles et elle est de 0.8± 0.25 mU/mg de prot (96.38%±30%).

L'activité LDH chez le groupe de rats prétraités à la curcumine 60 mg/kg, est de 0.96 ±0.02 mU/min/mg de prot (116.56%±2.42%).

III.1.1.1.2. Implication de la phosphatase alcaline PAL, marqueur de cytotoxicité

L'activité phosphatase alcaline a été également mesurée dans les différents homogénats du ventricule gauche et dans le sérum des animaux.
Les résultats de ce dosage sont représentés dans les figures suivantes (**Figure 27et 28**) :

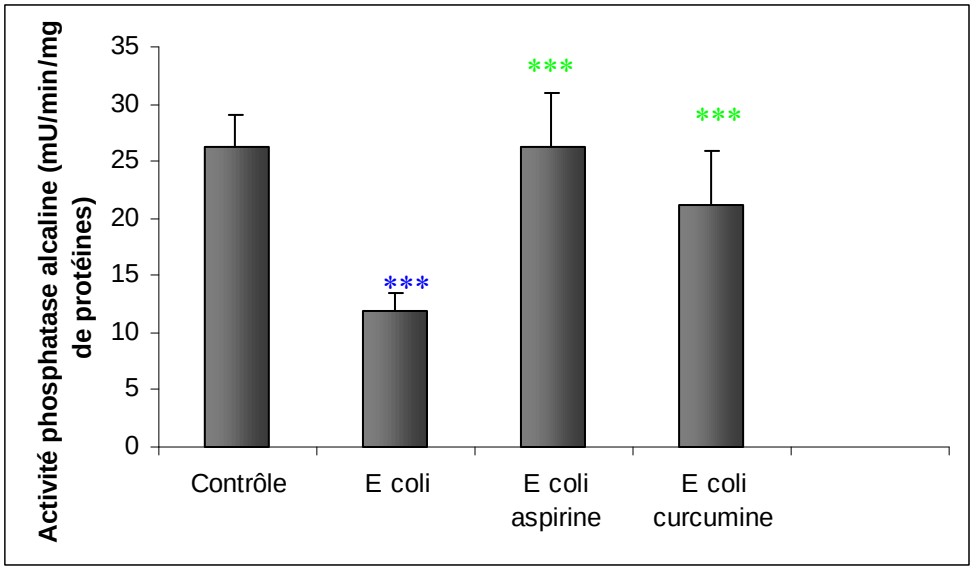


*Figure 27: Taux de phosphatase alcaline dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg. ***P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles, ***P<0.001 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

L'activité basale de la phosphatase alcaline (PAL) dans le ventricule gauche est de 26.28± 2.8 mU/min/mg de prot (100%± 10.6%). Cette activité est réduite de moitié (54.4%) suite à un traitement par *E. coli* $1.5.10^9$UFC/kg et atteint un taux de 11.98±1.53 mU/min/mg de prot (45.6%± 5.8%).

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg restaure chez le groupe de rats septiques, l'activité PAL au niveau contrôle avec une valeur de 26.24± 2.8mU /min/mg de prot (99.8%±10.6%).

L'activité PAL chez le groupe de rats prétraités à la curcumine 60 mg/kg est de 21.22±4.7 mU/min/mg de prot (80.76%±17.9%). Cette activité est 35.16% plus élevée que celle des rats septiques et proche de celle du contrôle (26.28±2.8 mU/min/mg de prot).

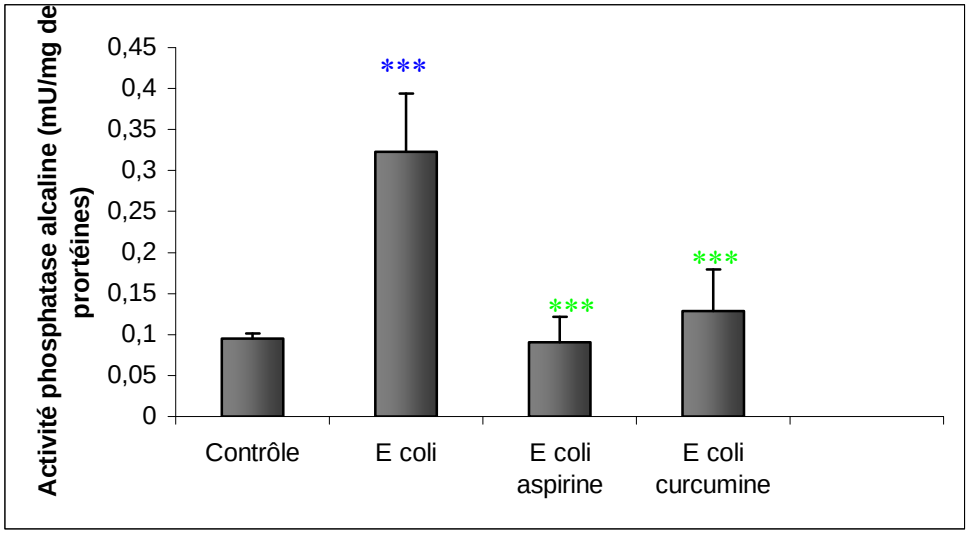


Figure 28: Taux de phosphatase alcaline PAL dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg. ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats contrôles,* ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

L'activité PAL au niveau du sérum des rats contrôles est de 0.095± 0.005mU/mg de prot (100%±5.26%), elle augmente de 239.1% chez le groupe de rats septiques traités par E. coli $1.5.10^9$UFC/kg et atteint un taux de 0.323±0.07 mU/mg de prot (339.1%±73.5%).

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg ou à la curcumine 60 mg/kg réstaure de 244.09% et 204.37% le taux de PAL sérique des valeurs respectives de 0.090± 0.03mU/mg de prot (95.01%±31.7%) et de 0.128±0.05 mU/mg de prot (134.73%±52.6%).

III.1.1.1.3.Implication de la myeloperoxydase, MPO, marqueur de l'infiltration des PN

La myeloperoxydase, MPO est impliquée dans le développement d'un stress oxydatif. Son activité enzymatique est responsable de la formation d'acide hypochloreux, un puissant agent oxydant. Une augmentation de l'activité MPO sera le témoin d'une activation des PNs et donc de la présence d'une inflammation aiguë (Serteyn Coll., 2003).

Le dosage de l'activité MPO a été réalisé dans les homogénats tissulaires de ventricules gauches. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante (**Figure 29**) :

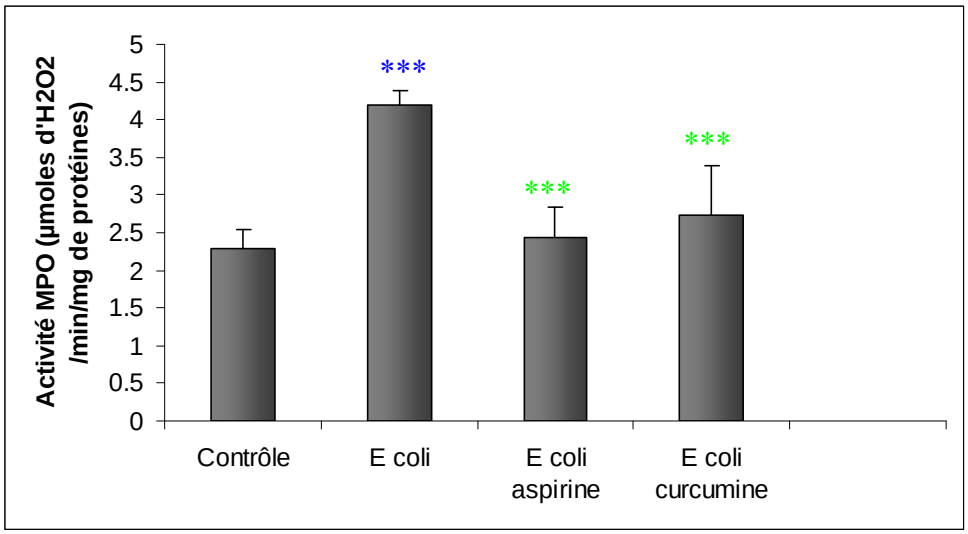


Figure 29: Activité myeloperoxydase dans le ventricule gauche des rats témoins, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg. ****P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles,* ****P<0.001 comparé au groupe de rats traités par E. coli*

L'activité basale de la MPO dans le ventricule gauche est de 2.28±0.26 µmol d'H_2O_2/min/mg de prot (100%±11.4% d'activité). Ce taux augmente après l'injection d'*E. coli* 1,5 10^9 UFC/kg pour atteindre un taux de 4.18±0.21 µmol d'H_2O_2/min/mg de prot, soit 183.13%± 9.2% du taux basal.

Chez le groupe de rats prétraités avec l'aspirine 30 mg/kg, l'activité MPO est réduite à 2.43±0.4 µmol d'H_2O_2/min/mg de prot (106.53%± 17.5%), ce qui correspond à une diminution de 76.6% par rapport au lot ayant reçu *E. coli* inactivée seule.

De même, un prétraitement avec la curcumine 60mg/kg a réduit l'activité MPO au niveau basale, cette activité est de 2.74±0.65 µmol d' H_2O_2/min/mg de prot (119.87%± 28%).

III.1.1.1.4. Implication du malondialdéhyde MDA, marqueur de peroxydation lipidique

Le taux du malondialdéhyde, MDA marqueur de la peroxydation lipidique a été dosé dans les homogénats tissulaires du ventricule gauche. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante (**Figure 30**) :

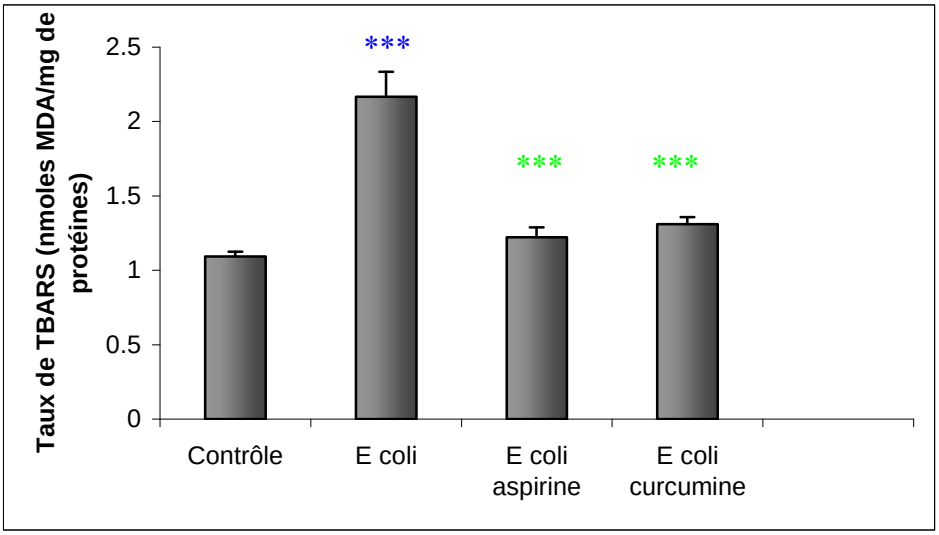


Figure 30: Taux de malondialdéhyde dans le ventricule gauche des rats témoins, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg. ***P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles,* ***P<0.001 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Le taux de MDA dans les homogénats de ventricules gauches des rats témoins est de 1.09±0,03 nmoles/mg de prot (100%±2.75%). Ce taux atteint 2.16±0,16 nmoles/mg de prot (198.16%±14.6%) chez le lot traité par *E. coli* seule et correspond à une augmentation de 98.16%.

Chez les rats prétraités avec la curcumine 60 mg/kg, le taux de MDA égal à 1.31±0,04 nmoles/mg de prot (120.2%±3.7%), diminue de 78.31% comparé aux rats traités par *E. coli* seule.

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg atténue de 86.34% l'augmentation observée chez les rats traités par *E. coli.* Ce taux est de 1.22±0,06 nmoles/mg de prot (111.9%±5.5%).

Le taux de MDA a été dosé dans le sérum des rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante (**Figure 31**) :

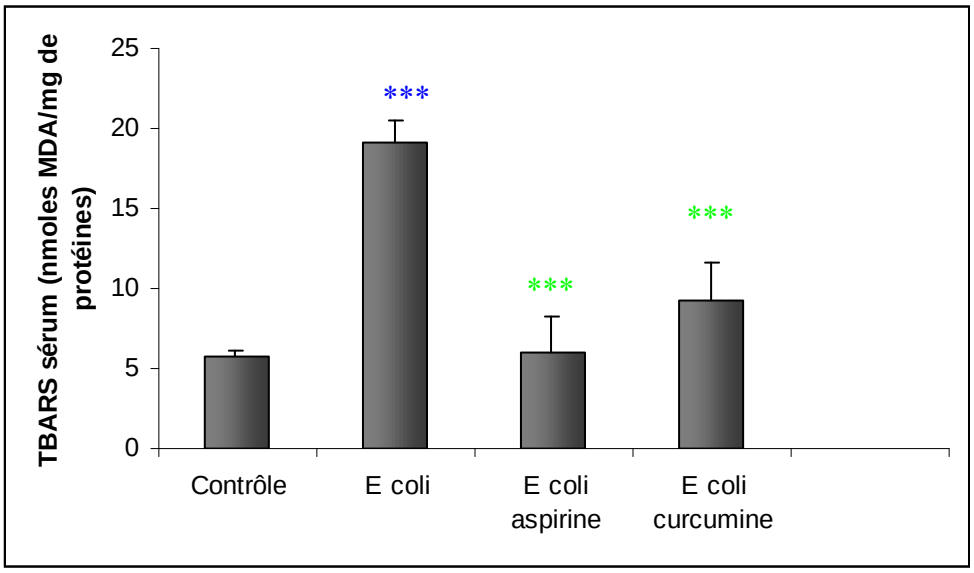


Figure 31: Taux de malondialdéhyde dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg. ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats contrôles,* ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Le taux de MDA dans le sérum des rats témoins est de 5.81±0,32 nmoles/mg de prot (100 %±5.5 %). Il augmente de trois fois pour atteindre 19.09 ±1.45 nmoles/mg de prot chez le lot traité par *E. coli* seule (328.58 %±24.9 %).

Chez les rats prétraités avec la curcumine 60 mg/kg, le taux de MDA est de 9.21±2.3 nmoles/mg de prot (158.5%±39.6 %). Il diminue de 170.02%, comparé au lot de rats traités par *E. coli* seule pour atteindre un taux proche de celui du contrôle.

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg atténue de 225.35% l'effet d'*E. coli.* Ce taux est de 6.00±2.3 nmoles/mg de prot (103.29%±39.6 %), un taux similaire à celui du lot contrôle.

III.1.1.1.5.Implication du monoxyde d'azote NO, estimation de l'activité NOS myocardique

L'activité NO synthase dans le ventricule gauche et dans le sérum des rats soumis aux différents traitements pharmacologiques a été estimée par le dosage des métabolites stables du monoxyde d'azote (NO), les nitrites NO_2^- et nitrates NO_3^-

Dosage des nitrites totaux NO_2^-dérivés du NO

Les résultats du dosage des nitrites au niveau du ventricule gauche sont représentés dans la figure suivante (**Figure 32**) :

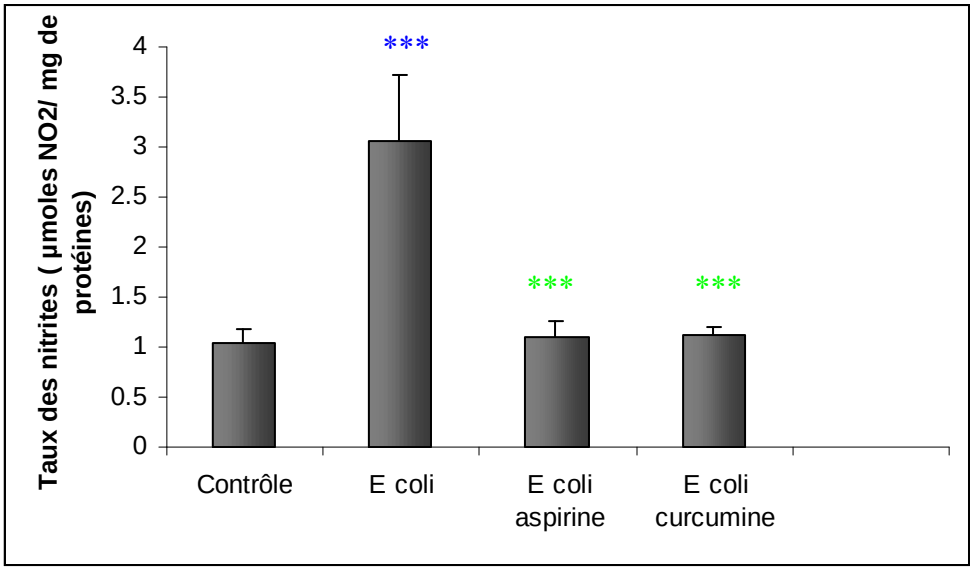


Figure 32: Taux de nitrites dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg. ***P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles,* ***P<0.001 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Le taux de nitrites mesuré dans les homogénats de ventricule gauche chez les rats témoins est de 1.04±0,14 µmol/mg de prot (100%±13.4%).

Un traitement par *E. coli* 1.5 10^9UFC/kg seule fait passer cette concentration de 1.04±0,14 µmol/mg de prot chez le groupe de rats contrôle à 3.06±0.65 µmol/mg de prot (294.23 %±62.5%) chez les rats septiques, représentant une augmentation de 194.23 %.

Un prétraitement avec la curcumine 60 mg/kg permet de diminuer le taux nitrites de 185.53 % pour atteindre une concentration de 1.12 ±0.08 µmol/mg de prot (107.7%±7.7%), proche de valeur témoin.

Un prétraitement avec l'aspirine 30 mg/kg, réduit le taux de nitrites à 105.28%±14. % du taux contrôle, soit 1.10 ±0.15 µmol/mg de prot.

Les résultats du dosage des nitrites au niveau du sérum sont représentés dans la figure suivante (**Figure 33**) :

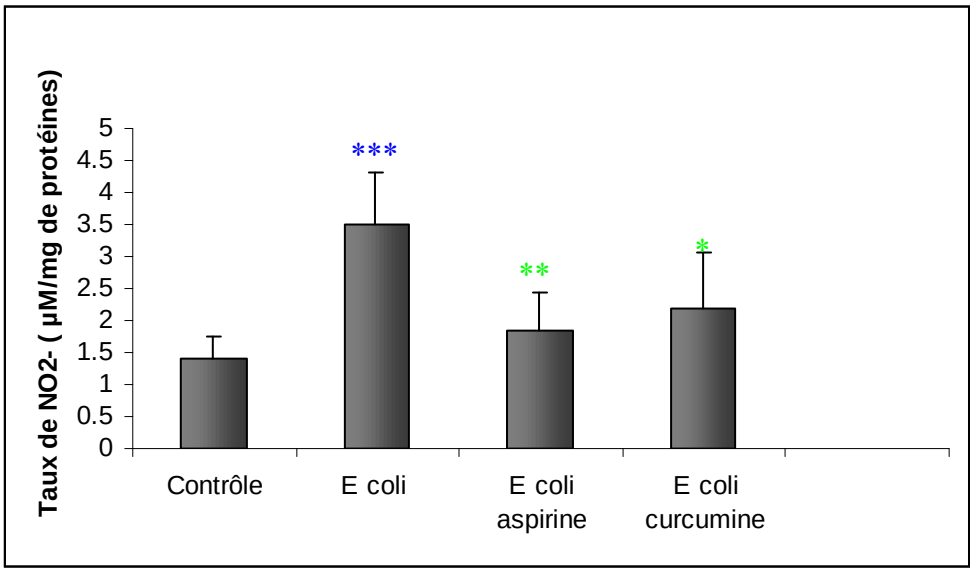


Figure 33 Taux de nitrites dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg ou à l'aspirine 30 mg/kg. ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats contrôles,* **$P<0.01$, *$P<0.05$ *comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Le taux sérique en nitrites des rats témoins est de 1.4±0,3 µM/mg de prot (100 % ± 21.4%). Cette concentration a augmenté de 147.12 % après un traitement par *E. coli* 1.5 10^9UFC/kg avec une concentration de 3.49 ± 0.83 µM/mg de prot (249.3 % ± 58.7%).

Un prétraitement avec la curcumine 60 mg/kg permet de diminuer ce taux de 92.1% pour atteindre une concentration de 2.18 ±0.8 µM/mg de prot (155.7 % ± 57.1%).

Un prétraitement avec l'aspirine 30 mg/kg, atténue aussi l'augmentation du NO induite par *E. coli* inactivée. Le taux du NO est de 1.85 ± 0.58 µM/mg de prot (132.14%±41.4 %), cette concentration est proche de celle des rats contrôles 1.4±0,3 µM/mg de prot.

Dosage des NOx, nitrates NO_3^- et nitrites totaux NO_2^-

Les résultats du dosage des nitrites et des nitrates au niveau du ventricule gauche sont représentés dans la figure suivante (**Figure 34**) :

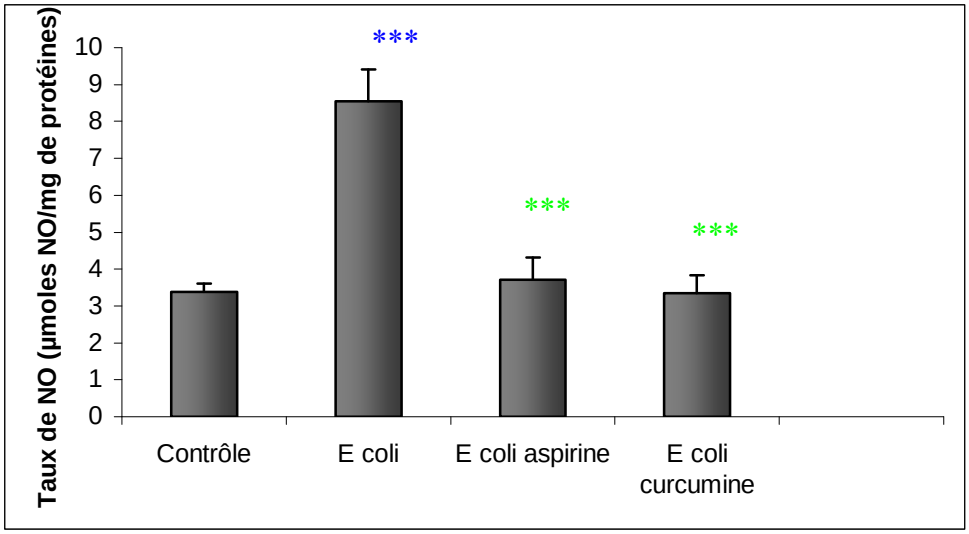


Figure 34: Taux de nitrites et nitrates dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg. ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats contrôles,* ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

La concentration en nitrites totaux/nitrate au niveau du ventricule gauche chez les rats contrôles est de 3.38± 0.23 µmol/mg de prot (100%± 6.8%). Cette concentration a augmentée de 153.25% après un traitement par *E. coli* inactivée (1.5 10^9UFC/kg) avec un taux de 8.56±0.86 µmol/mg de prot (253.25%± 83.7%).

Un prétraitement avec la curcumine 60 mg/kg permet de diminuer le taux du NO de 154.34 % et retrouve une concentration basale de 3.33± 0.4 µmol/mg de prot (98.8%± 11.8%).

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg, atténue l'augmentation du NO induite par *E. coli* inactivée pour atteindre une concentration proche du lot contrôle 3.70± 0.6 µmol/mg de prot (109.7%± 17.8%).

Les résultats du dosage nitrites totaux/ nitrates au niveau du sérum sont représentés dans la figure suivante (**Figure 35**) :

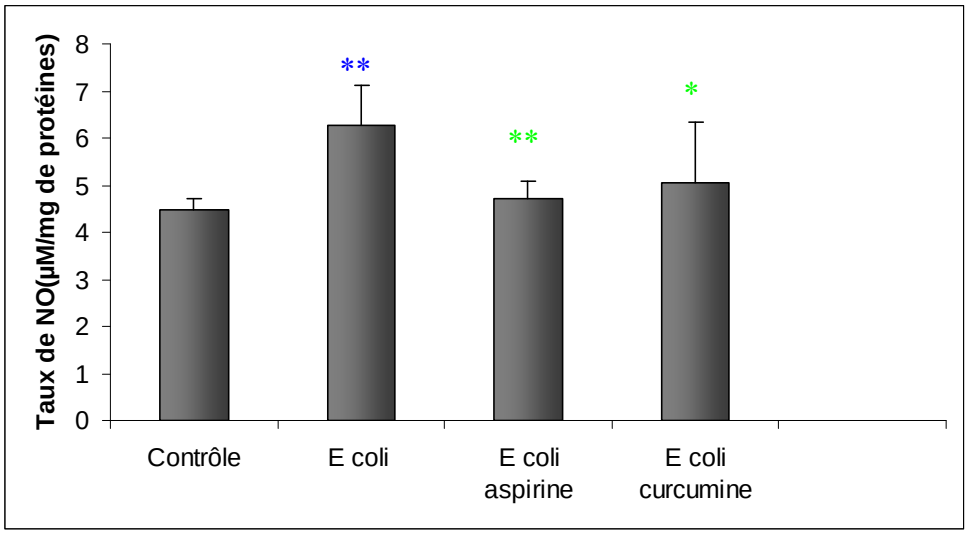


Figure 35: Taux de nitrites totaux et nitrates dans le sérum des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg. $^{**}P<0.01$ *comparé au groupe de rats contrôles,* $^{*}P<0.05$ *comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

La concentration sérique en nitrite/nitrate des rats contrôles est de 4.47±0,26 µM/mg de prot (100%± 5.8%). Cette concentration a augmentée de 40.43 % après un traitement par *E. coli* 1.5 10^9UFC/kg avec un taux de 6.27±0.83 µM/mg de prot (140.43 % ± 18.6%).

Un prétraitement avec la curcumine 60 mg/kg permet de diminuer l'effet de *E. coli* sur le taux de NO de 27.54% avec une valeur de 5.04 ±1.3 µM/mg de prot (112.7 % ± 29%).

Un prétraitement avec l'aspirine 30 mg/kg, atténue de 34.7% l'augmentation du NO induite par *E. coli*. Le taux du NO est de 4.72 ± 0.3µM/mg de prot (105.7%±1.4 %), cette concentration est proche de celle des rats contrôles 4.46±0,26 µM/mg de prot (99.8 % ± 5.8%).

III.1.1.1.6.Implication de la catalase, marqueur du système antioxydant

L'activité catalase a été également mesurée dans les homogénats tissulaires du ventricule gauche, les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante (**Figure 36**) :

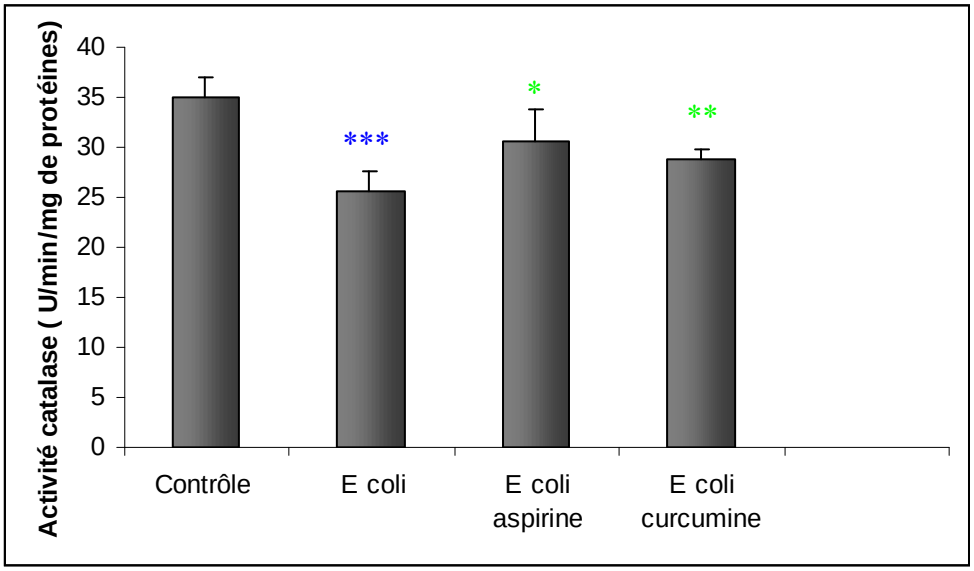


Figure 36: Activité catalase CAT dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités a la curcumine 60 mg/kg, prétraités à l'aspirine 30 mg/kg. ***P<0.01 comparé au groupe de rats contrôles,* **P<0.01,* *P<0.05 comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

L'activité catalase CAT est de 35.06±1.9 U/min/mg protéines pour les rats témoins (100%±5.4%), elle diminue de 27.27% et atteint 25.5±2.09 U/min/ mg protéines (72.73±6%) chez les rats ayant reçu *E. coli* inactivée seule.

Un prétraitement à la curcumine 60 mg/kg conduit à une augmentation de l'activité catalase de 9.26% par rapport à celle du lot traité par *E. coli* seule. L'activité catalase dans ce cas est de 28.75 ± 0.95 U/min/mg de prot (81.99±2.7%).

Un prétraitement à l'aspirine 30mg/kg diminue de 14.71%l'augmentation de l'activité catalase observée chez les rats traités par *E. coli* seule. Cette activité est de 30.66±3.2 U/min/mg de prot (87.44±9.1%), elle semble être proche de celle des rats contrôles.

III.1.1.1.7.Implication de glutathion GSH, marqueur du système antioxydant

Le taux de glutathion a été également mesuré dans les différents homogénats du ventricule gauche et les résultats de ce dosage sont représentés dans la figure suivante (**Figure 37**) :

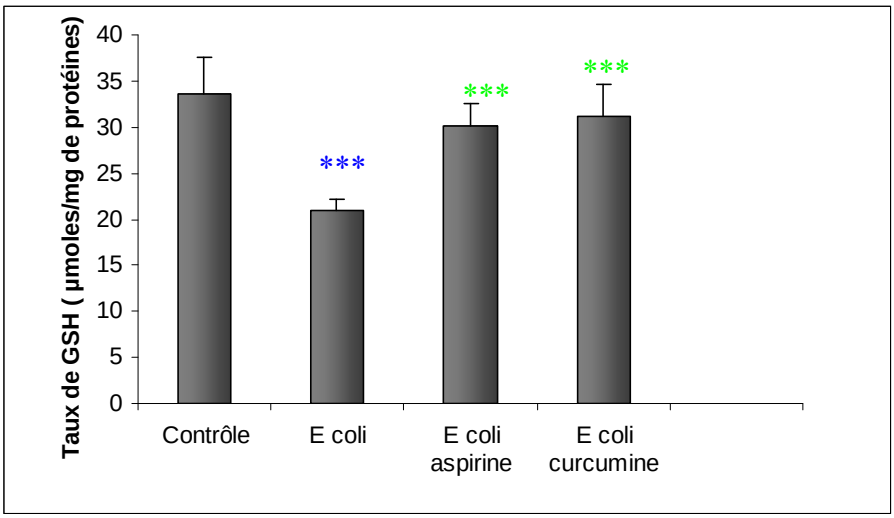


Figure 37: Taux de glutathion GSH dans le ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, ou à l'aspirine 30 mg/kg. ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats contrôles,* ***$P<0.01$*, comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Le taux de GSH chez les rats contrôles est de 33.5±4 µmol/mg protéines (100%±12%) et de 20.9±1.1 µmol /mg de prot (62.4%±3.3%) chez les rats traités par *E. coli* seule 1.5 10^9UFC/kg. Ceci correspond à une diminution de 37.58%.

Un prétraitement à la curcumine 60 mg/kg montre une augmentation de la GSH de 30.76% par rapport aux animaux ayant reçu *E. coli* seule. Son taux dans ce cas est de 31.1 ± 3.6 µmol/mg protéines (92.7%± 10.7%) et il est similaire à celui des rats contrôles 33.5±4 µmol/mg protéines.

De même les rats prétraités à l'aspirine avant administration d'*E. coli* présentent un taux de GSH de 30 ± 2.4 µmol /mg de prot (89.59% ± 7.16 %) qui représente une augmentation de 27.17% comparé aux rats traités par *E. coli* seule.

III.1.1.2.Implication des mitochondries dans le dysfonctionnement myocardique, après un choc septique à E. coli

III.1.1.2.1. Modulation de la perméabilité des mitochondries du ventricule gauche, après un choc septique à E. coli par la curcumine ou par l'aspirine

Les résultats de l'étude de la perméabilité des mitochondries myocardiques du ventricule gauche sont représentés dans la figure suivante (**Figure 38**) :

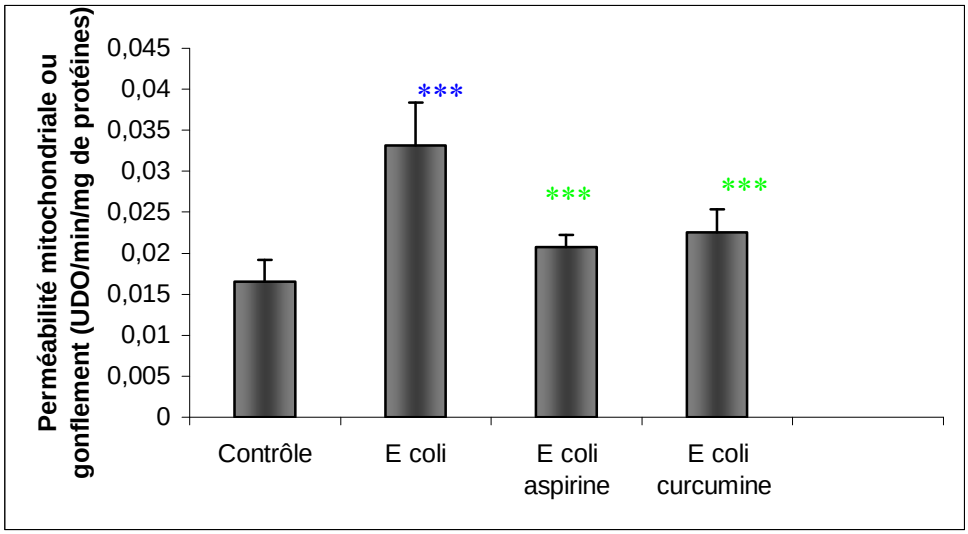


Figure 38 : Gonflement des mitochondries myocardiques du ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, ou à l'aspirine 30 mg/kg. ***P<0.001 comparé au groupe de rats contrôles, ***P<0.01, comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Dans les homogénats du ventricule gauche, nous avons noté une augmentation de 100% de la perméabilité mitochondriale entre les deux lots, contrôle et traité par *E. coli* seule. Cette valeur passe de 0.0165±0.002 UDO/min/mg de prot (100%±12%) à 0.033±0.005 UDO/ min/mg de prot (200%±30%).

L'augmentation du taux de perméabilité chez les rats traités par *E. coli* reflète le gonflement des mitochondries par entrée d'eau après ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) mitochondriale, conséquence à la dépolarisation de la membrane mitochondriale.

Un prétraitement à la curcumine 60 mg/kg 30 min avant injection *d'E. coli* réduit de 66.67% la perméabilité des mitochondries cardiaques observée chez les rats traités par *E. coli* seule tout en restant supérieure au témoin avec une valeur de 0.022±0.002 UDO/ min/mg de prot (133.33%±12%).

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg, 60 min avant injection *d'E. coli* atténue également de 75% le gonflement des mitochondries cardiaques observé chez les rats traités par *E. coli* seule et atteint un taux de 0.020±0.001 UDO/min/mg de prot (121.21%±6%), un taux proche de celui des rats témoins 0.0165±0.002 UDO/min/mg de prot.

III.1.1.2.2. Modulation de la respiration des mitochondries du ventricule gauche, après un choc septique à E.coli par la curcumine ou par l'aspirine

Les résultats de l'étude de l'activité respiratoire des mitochondries myocardique du ventricule gauche sont représentés dans la figure suivante (**Figure 39)** :

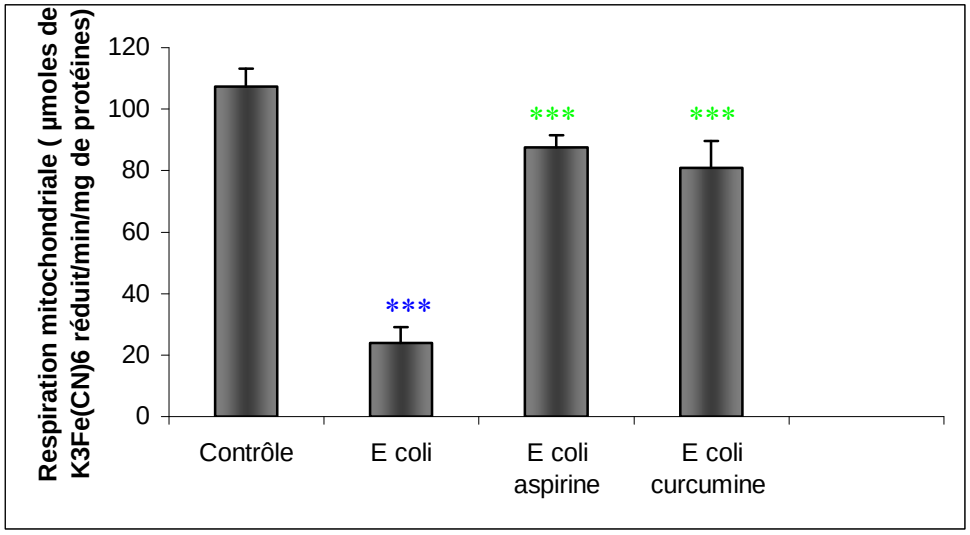


Figure 39: Activité respiratoire des mitochondries myocardiques du ventricule gauche des rats contrôles, septiques, prétraités à la curcumine 60 mg/kg, ou à l'aspirine 30 mg/kg. ***$P<0.001$ *comparé au groupe de rats contrôles,* ***$P<0.01$*, comparé au groupe de rats traités par E. coli.*

Les mitochondries cardiaques des rats contrôles présentent une activité respiratoire de 107.34±5.7 µmol de $K_3Fe(CN)_6$ réduits /min/mg de prot (100%±5.3%). Un traitement avec *E. coli* 1.5 10^9 UFC/kg atténue l'activité respiratoire de 77.73 % comparé au rats contrôles avec un taux respiratoire de 23.9±5.1µmoles de $K_3Fe(CN)_6$ réduit /min/mg de prot (22.27%±4.7%).

Chez les rats prétraités à la curcumine 60 mg/kg, 30 min avant injection d'*E. coli,* l'activité respiratoire est de 80.99±8.7 µmole de $K_3Fe(CN)_6$ réduit /min/mg de prot (75.44%±8.1 %), correspondant à une augmentation de 58.72% comparé aux rats traités par *E. coli* seule. Cette activité respiratoire est proche de celle observée chez les rats témoins 107.34±5.7 µmole de $K_3Fe(CN)_6$ réduit /min/mg de prot.

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg, 60 min avant injection d'*E. coli* permet de rétablir l'activité respiratoire, qui atteint 87.47±4.1 µmole de $K_3Fe(CN)_6$ réduit /min/mg de prot (81.48%±3.8%), cette activité respiratoire est proche de celle observée chez les rats contrôles 107.34±5.7 µmole de $K_3Fe(CN)_6$ réduit /min/mg de prot.

III.1.2.Résultats de l'étude histologique
III.1.2.1.Histologie du myocarde :

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à deux organes, le cœur, plus exactement le myocarde du ventricule gauche, qui assure la majeure partie de l'activité cardiaque et qui est le plus atteint dans cette pathologie, et le mésentère qui est une membrane richement vasculaire et qui nous permet de mieux visualiser la migration leucocytaire (PN, macrophages) au site inflammatoire (péritoine).

Les coupes histologiques ont été réalisées à partir du ventricule gauche VG des cœurs prélevés sur des rats soumis aux différents protocoles pharmacologiques, des rats contrôles traités par du NaCl 9‰ stérile ou du PBS-NaOH 0,13M, des rats traités par deux doses de 1.5 10^9 UFC/kg d'*Escherichia coli* seule, des rats prétraités à la curcumine 60 mg/kg, 30 min avant injection d'*Escherichia coli* 1.5 10^9 UFC/kg et des rats prétraités par l'aspirine 30 mg/kg, 60 min avant injection d'*Escherichia coli* 1.5 10^9UFC/kg.

Les coupes de 5µm du VG ont subit une coloration à l'hématoxyline-éosine H&E et observées par microscope photonique muni de caméra numérique. Cette coloration de base permet de distinguer les formes cellulaires, les noyaux de différentes cellules prennent avec l'hématoxyline une couleur noir-bleu, alors que le cytoplasme se colore en rouge-rose avec l'éosine (Martoja et Martoja., 1967), un changement de l'architecture cellulaire de base de l'organe étudié sera donc clair.

III.1.2.1.Histologie du myocarde des rats témoins

Le myocarde des rats contrôles (**Figures 40 et 41**) montre une architecture normale sans aucune lésion ou infiltration cellulaire ou modification structurale. Une architecture d'un 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.

Ces micrographies sont semblables à ceux rapportées par la littérature (wheater et Coll., 2001).

III.1.2.2.Histologie du myocarde des rats traités par E.coli

Le myocarde des rats ayant reçu 1.5 10^9UFC/kg d'*Escherichia coli*, montre des anomalies structurales comparé aux rats contrôles.

Des dommages sévères sont observés caractérisés par une hypertrophie (h) des cardiomocytes (**Figure 43 et 45**), et une mort cellulaire (**Figure 46, 47, 48 et 49**), avec une dégénérescence des fibres musculaires et une augmentation de l'espace intercellulaire (**Figure 43, 44, 46 et 47**) ; de larges foyers hémorragiques (H) (**Figure 42, 43 et 44**), œdème (**Figure 50**) et une infiltration leucocytaire (**Figure 44, 45 et 50**).

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.

III.1.2.3.Histologie du myocarde des rats ayant reçu un prétraitement par la curcumine ou par l'aspirine avant induction du choc septique par E.coli

Le myocarde du ventricule gauche des rats prétraités par la curcumine 60 mg/kg, injectée par voie intrapéritonéale 30 min avant l'injection d'*Escherichia coli* 1.5 10^9UFC/kg montre

des zones d'hémorragies moins intense que celles observées dans le myocarde des rats traités par *E. coli* inactivée seule. L'architecture des cardiomyocytes est proche de celle de myocarde témoins sans nécrose ou lésion tissulaire et de faibles zones hémorragiques (**Figure 51, 52, 53 et 54**).

Le myocarde du ventricule gauche des rats prétraités par l'aspirine 30 mg/kg, administrée par voie orale (per os) 60 min avant l'injection d'*Escherichia coli* 1.5 10^9 UFC/kg montre une architecture proche de celle du myocarde des rats contrôles (**Figure 55 et 56**).

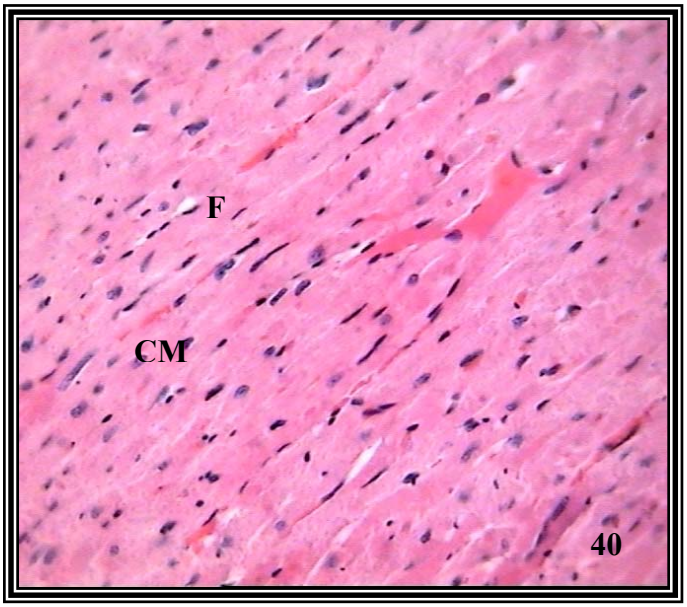
Figure 40: Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc contrôle.
Coloration : H&E ; G Objx40.

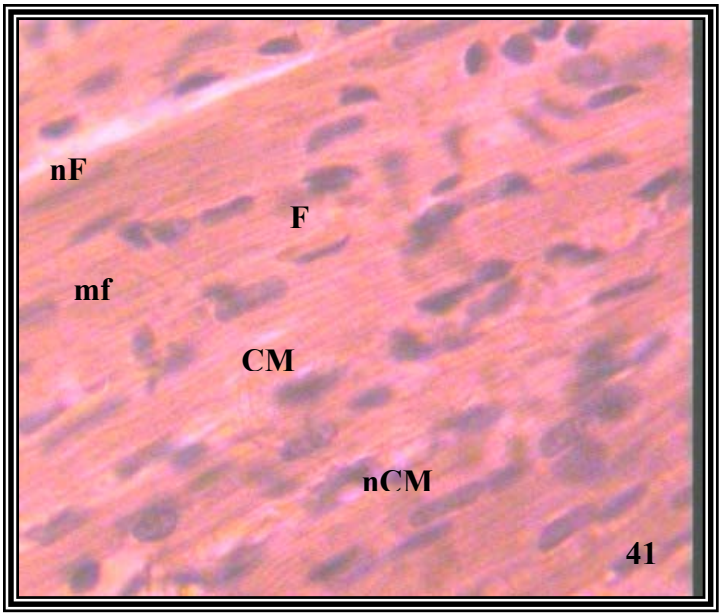
Figure 41: Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc contrôle.
Coloration : H&E ; G Objx100.

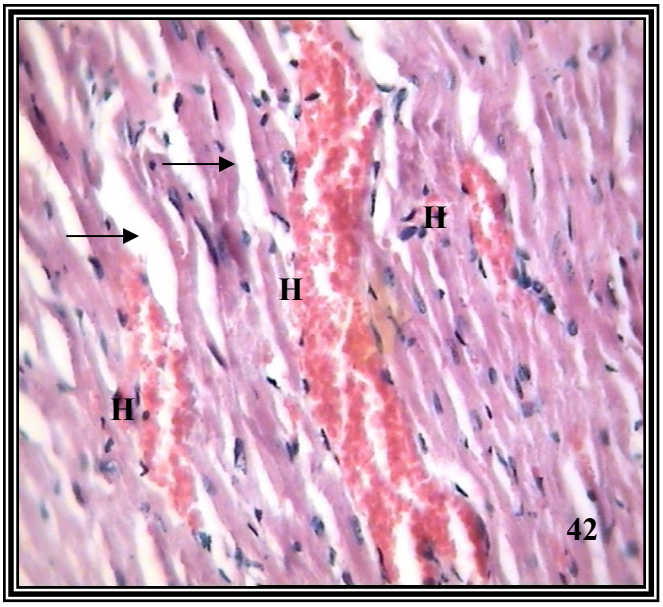
Figure 42 et 43: Micrographies d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc septiques traités par *E. coli* inactivée
Coloration : H&E ; 42 G Objx40, 43 G Objx100.
Montrent de larges foyers hémorragiques, et une augmentation de l'espace intercellulaire.

Figure 44 et 45: Micrographies d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc septiques traités par *E. coli* inactivée
Coloration : H&E ; G Objx100.
Montrent une infiltration leucocytaire dans le myocarde de VG.

CM: cardiomyocytes, mf: myofilament, nCM: noyau de cardiomyocyte, nf: noyau de fibroblaste, H: hémorragie, L: infiltration leucocytaire, ⟶ : Espace intercellulaire.


F
CM
40


nF
F
mf
CM
nCM
41


H
H
H
42

H
43

L
44

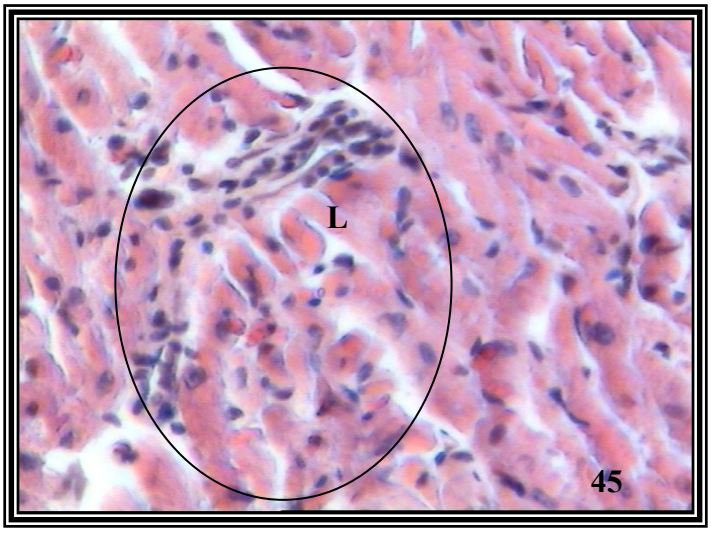

L
45

Figure 46, 47, 48 et 49: Micrographies d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc septiques traités par *E. coli* inactivée

Coloration : H&E ; 46 et 48 G Objx40, 47 et 49 G Objx100.

Montrent une mort cellulaire, une perte de noyau des cardiomyocytes, avec une dégénérescence des cellules musculaires

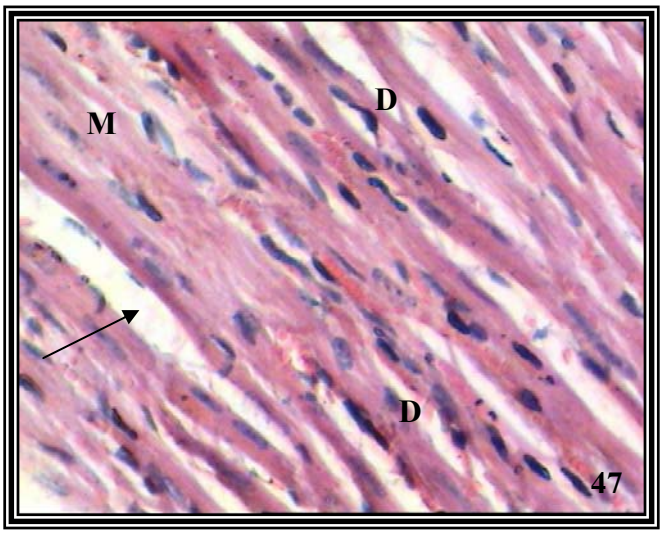
Figure 50: Micrographie d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc septiques traités par *E. coli* inactivée

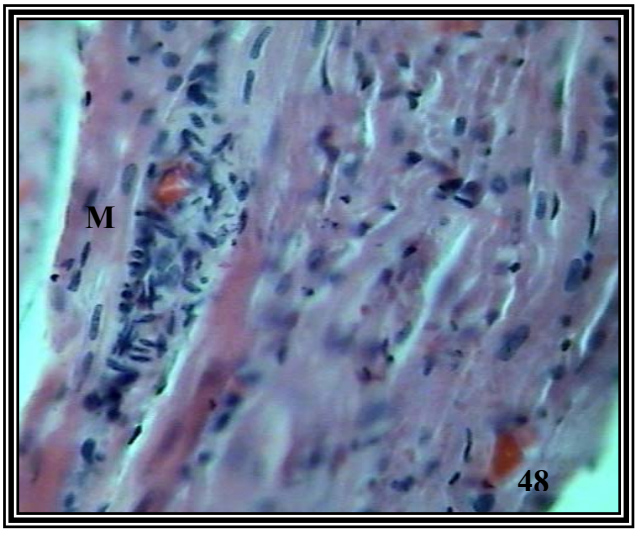
Montre un œdème associé à une infiltration leucocytaire.

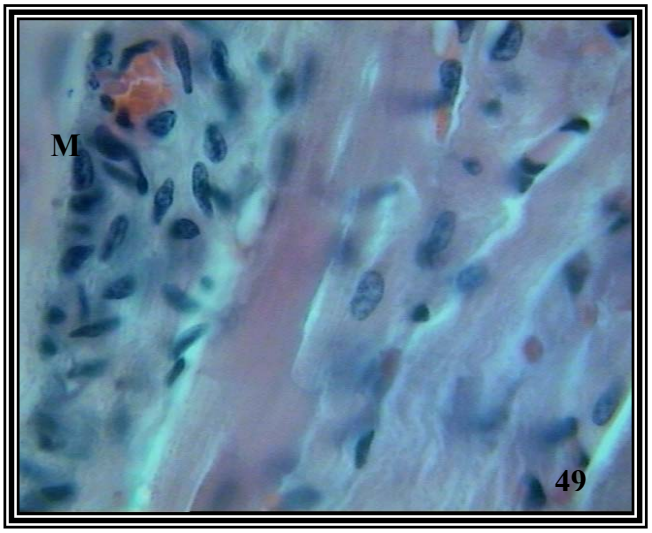
Coloration : H&E ; G Objx100.

D : dégénérescence des cellules musculaires, M : mort cellulaire des cardiomyocytes, oe : œdème, L : infiltration leucocytaire

D
M
D
M
D
M
46


M
D
D
47


M
48


M
49

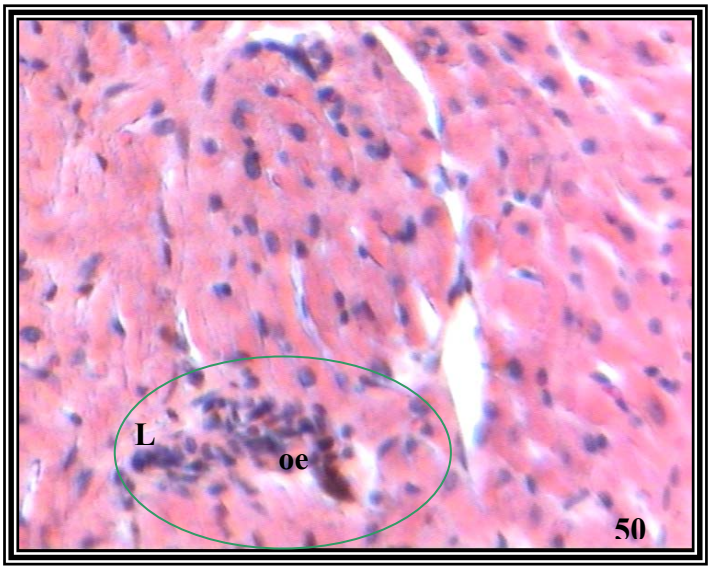

L
oe
50

Figure 51, 52, 53 et 54: Micrographies d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc prétraités par la curcumine 60 mg/kg 30 minutes avant induction du choc septique par *E. coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg

Coloration : H&E ; 51 et 52G Objx40, 53 et 54 G Objx100.

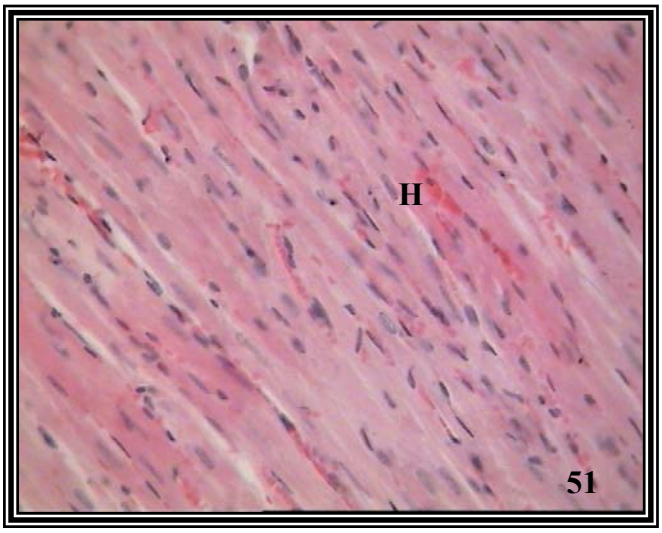
Montrent de faibles zones d'hémorragies.

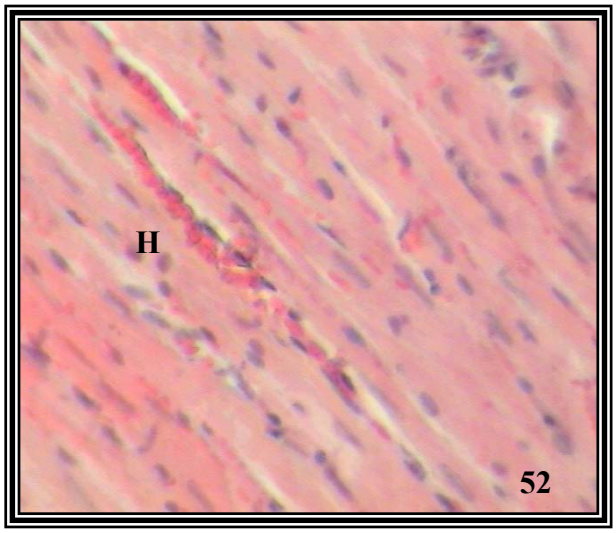
Figure 55 et 56 : Micrographies d'une coupe longitudinale du myocarde de ventricule gauche des rats blanc prétraités par l'aspirine 30 mg/kg, 60 minutes avant induction du choc septique par E. coli inactivée 1.5 10^9 UFC/kg

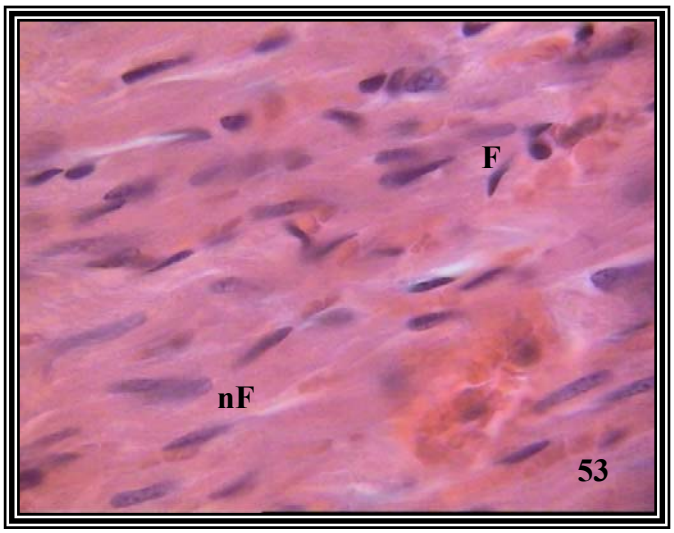
Montrent de architecture similaire à celle de myocarde du VG témoin.

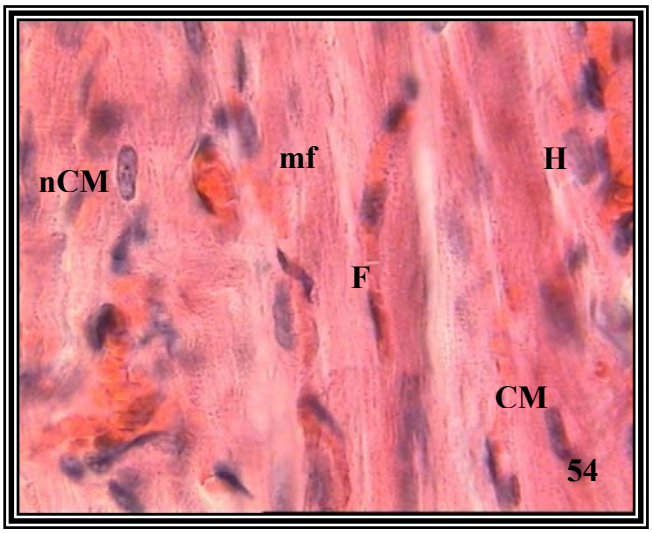
Coloration : H&E ; 55 Gx40, 56 G Objx100.

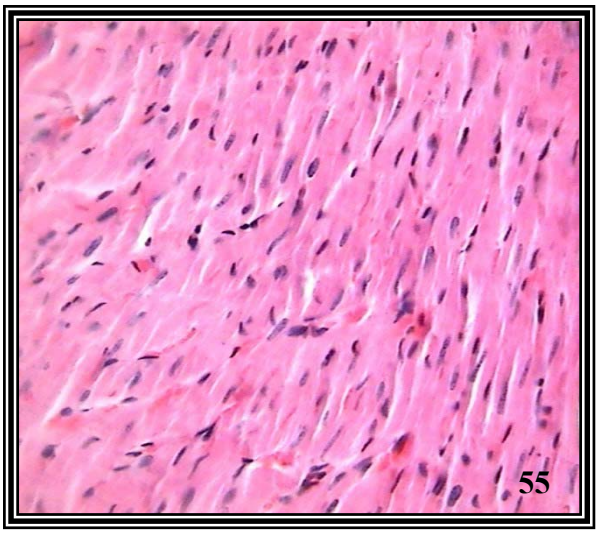
CM: cardiomyocytes, mf: myofilament, nCM: noyau de cardiomyocyte, nf: noyau de fibroblaste, H: hémorragie.


H
51


H
52


F
nF
53


nCM
mf
H
F
CM
54


55

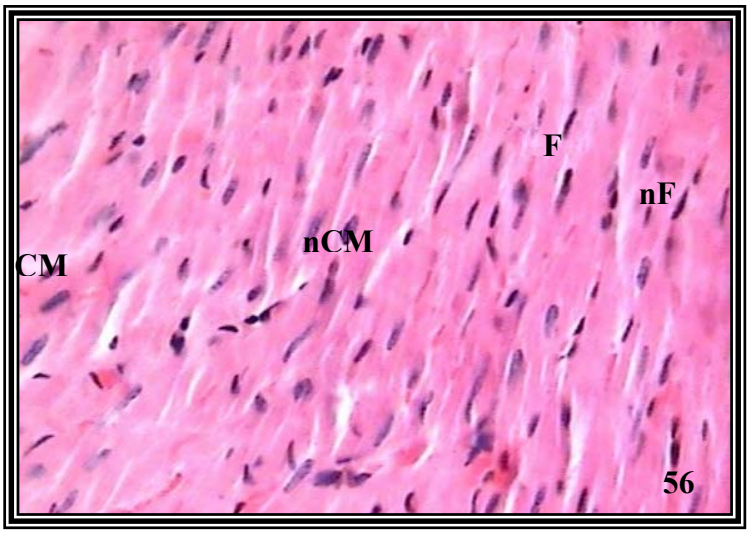

F
nF
CM
nCM
56

Figure 57 et 58 : Micrographie du mésentère des rats blancs témoins

Coloration : H&E ; 57 Gx40, 58 G Objx100

Figure 59, 60, 61 et 62 : Micrographie du mésentère des rats septiques traités par *E. coli* inactivée

Coloration : H&E ; Gx40.

Montrent une infiltration leucocytaire (neutrophile, macrophage et mastocyte), une activation des fibroblastes et des mastocytes.

F : fibroblaste, E : cellule endothéliale, M : cellule mastocytaire, VS : vaisseau sanguin, L : infiltration leucocytaire**,** Mf : macrophage, PN : polymorphonucleaire neutrophile.

III.1.2.2. Histologie du mésentère

Le mésentère a été prélevé au niveau de la paroi abdominale après sacrifice des rats soumis aux différents traitements. Cette membrane fine richement vascularisée permet une meilleure observation de l'infiltration leucocytaire au cours de l'inflammation aiguë induite par *Esherichia coli* inactivée.

Le mésentère des rats témoins contient essentiellement des fibroblastes (F), des cellules endothéliales (E) constituant les vaisseaux sanguin et des fibres de collagène (**Figure 57 et 58**).

Le mésentère des rats traités par 1.5 10^9 UFC/kg d'*Esherichia coli* inactivée montre des signes d'une inflammation aiguë caractérisée par une activation des fibroblastes (F), des mastocytes (M) et une importante infiltration leucocytaire (L), principalement des polynucléaires neutrophiles (PN) et des macrophages (Mf). (**Figure 59, 60, 61 et 62**)

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

L'activation des fibroblastes se traduit par synthèse de la matrice extracellulaire.
Il serait donc intéressant de faire la coloration de trichrome de Masson.

Un prétraitement à l'aspirine 30 mg/kg (**Figure 65 et 66**), diminue l'infiltration leucocytaire, et réduit l'activation des fibroblastes observée après un choc septique induit par *Esherichia coli*.

Un prétraitement à la curcumine 60 mg/kg (**Figure 63 et 64**), diminue également l'infiltration leucocytaires et l'activation des fibroblastes.

Figure 57 et 58 : Micrographie du mésentère des rats blancs témoins

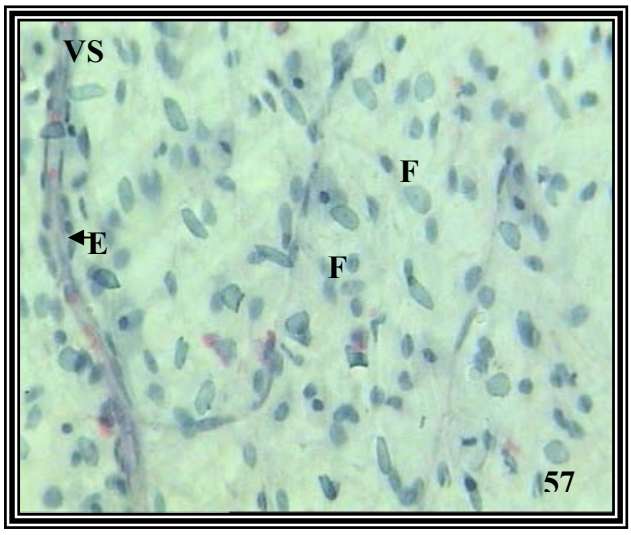
Coloration : H&E ; 57 Gx40, 58 G Objx100

Figure 59, 60, 61 et 62 : Micrographie du mésentère des rats septiques traités par *E. coli* inactivée

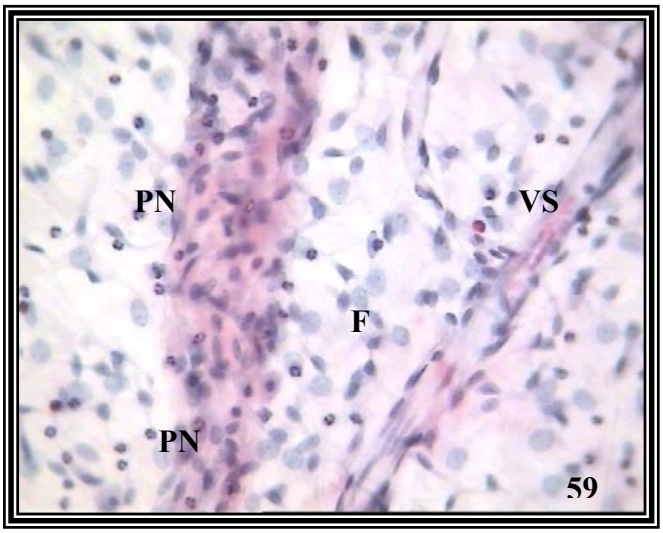
Coloration : H&E ; Gx40.

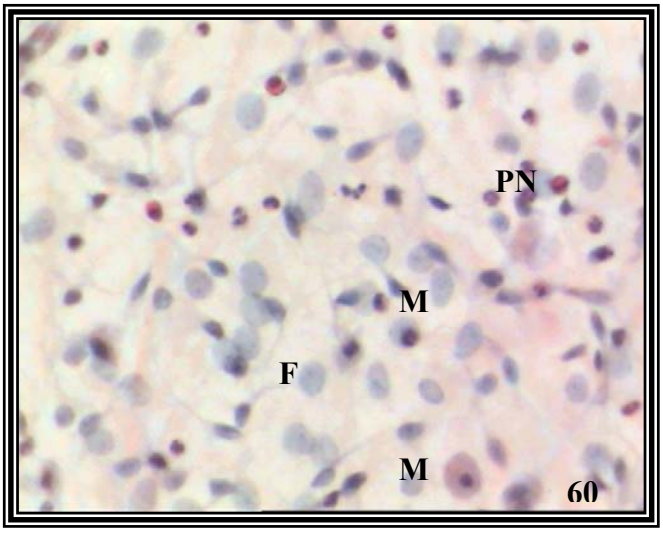
Montrent une infiltration leucocytaire (neutrophile, macrophage et mastocyte), une activation des fibroblastes et des mastocytes.

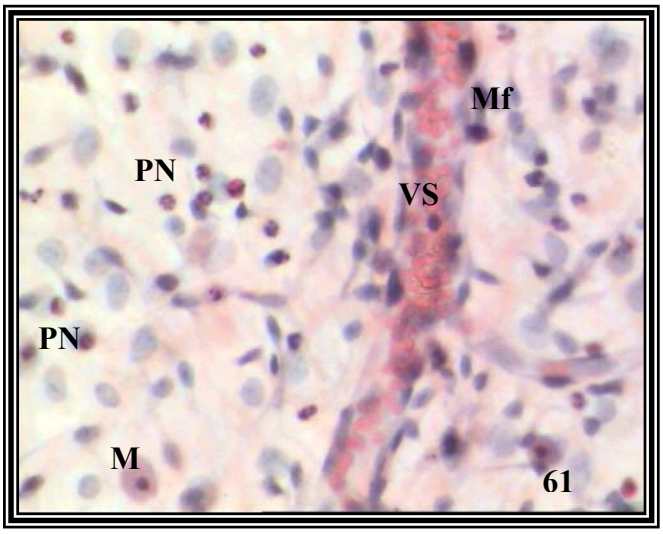
F : fibroblaste, E : cellule endothéliale, M : cellule mastocytaire, VS : vaisseau sanguin, L : infiltration leucocytaire**,** Mf : macrophage, PN : polymorphonucleaire neutrophile.


VS
F
E
F
57

m
m
F
F
58


PN
VS
F
PN
59


PN
M
F
M
60


Mf
PN
VS
PN
M
61

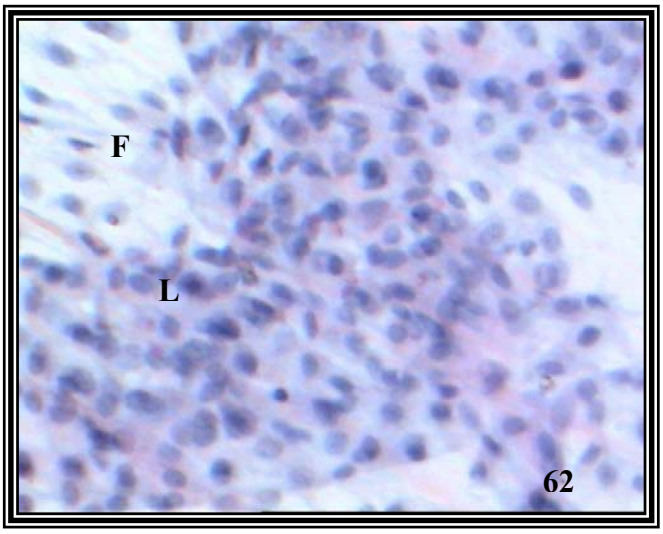

F
L
62

Figure 6 3 et 64 : Micrographie du mésentère des rats prétraités par la curcumine 60 mg/kg, 30 minutes avant induction du choc septique par *Escherichia coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg

Coloration : H&E ; Gx40.

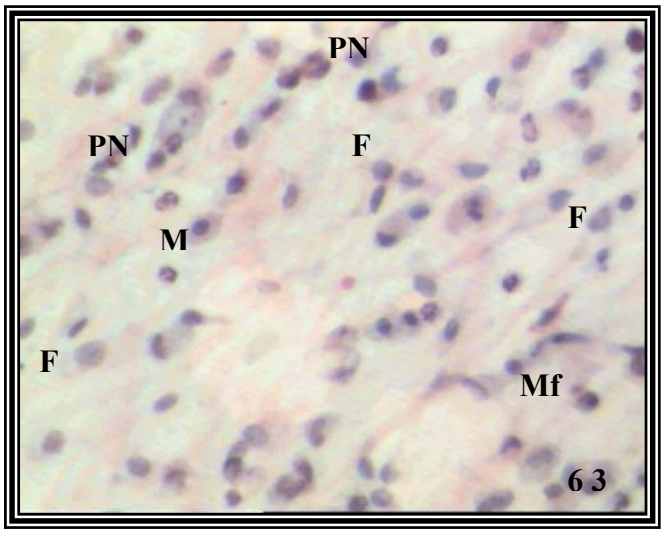
Montrent une diminution de l'infiltration leucocytaire et une réduction l'activation des fibroblastes induit par *Escherichia coli* inactivée.

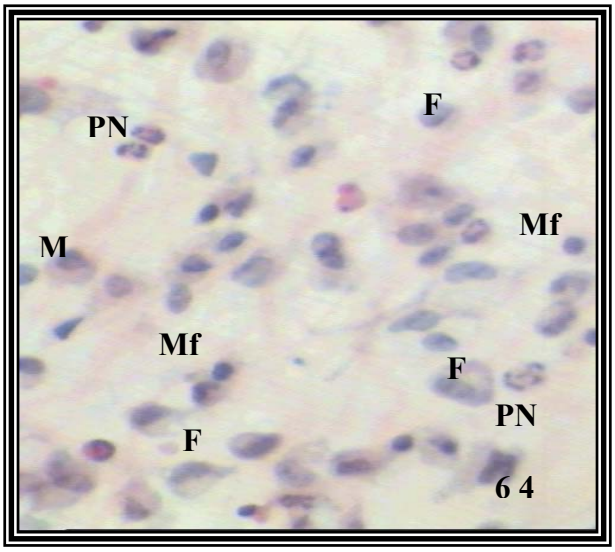
Figure 65 et 66 : Micrographie du mésentère des rats prétraités par l'aspirine 30 mg/kg, 60 minutes avant induction du choc septique par *Escherichia coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg.

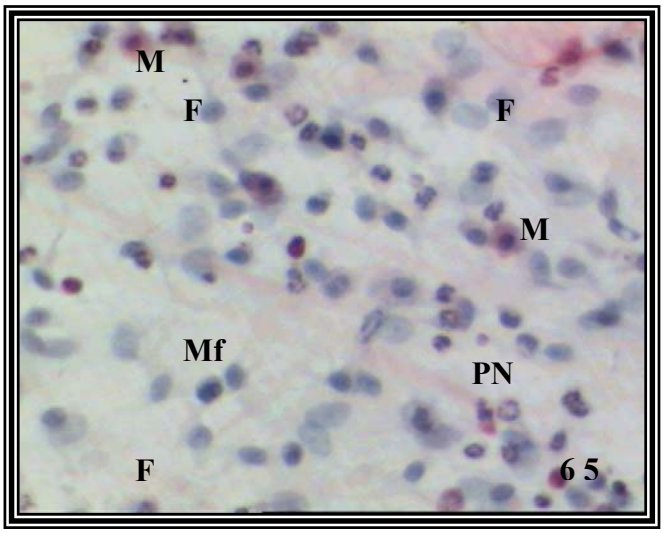
Coloration : H&E ; Gx40.

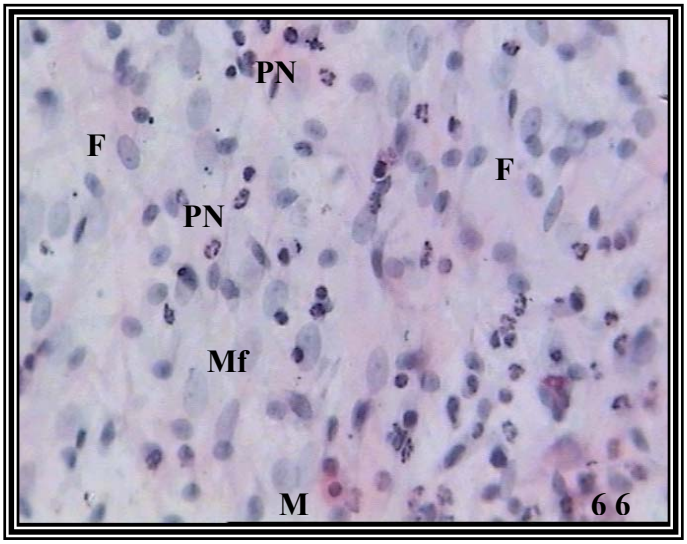
Montrent également une diminution de l'infiltration leucocytaire et une réduction l'activation des fibroblastes induit par *Escherichia coli* inactivée.

F : fibroblaste, E : cellule endothéliale, M : cellule mastocytaire, VS : vaisseau sanguin, L : infiltration leucocytaire**,** Mf : macrophage, PN : polymorphonucleaire neutrophile.


PN
PN
F
F
M
F
Mf
6 3


F
PN
Mf
M
Mf
F
PN
F
6 4


M
F
F
M
Mf
PN
F
6 5


PN
F
F
PN
Mf
M
6 6

III.2.Discussion

Les dommages oxydatifs jouent un rôle majeur dans le choc septique induit par *E.coli* (LPS) qui est connue par son action d'augmenter la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Ben-Shaul et Coll., 2001) et des produits de peroxydation lipidique dont, le MDA au niveau du cœur (Luster, 1998).

Le but de cette étude est d'evaluer l'effet d'un prétraitement avec deux molécules thérapeutiques : la curcumine douée d'activités anti-inflammatoire et antioxydante et l'aspirine, un anti inflammatoire non stéroïdien, AINS, sur le stress oxydatif déclenché par choc septique.

Dans cette étude, des paramètres biochimiques indicatifs de stress oxydatif (NO, MDA, CAT, GSH) ont été explorés afin d'étudier le stress oxydatif installé au niveau du ventricule gauche après induction de choc septique par une bactérie inactivée (*Escherichia coli* 1.5 10^9 UFC/kg) chez des rats blancs femelles adultes.

Deux doses sont administrées à 24 heures d'intervalle. La toxicité myocardique induite par *E.coli* s'est traduite par un stress oxydatif caractérisé par une augmentation de 98% du taux de MDA et de 194% du taux de NO (nitrites/nitrates).

Parallèlement, les marqueurs du potentiel antioxydant sont réduits. L'activité catalase et le taux de GSH sont respectivement de 27% et 38% inférieurs aux taux VG témoins.

Une augmentation de 184.54% du taux de MDA, de 184.11% du taux de nitrites et de 40.31% du taux de nitrites/nitrates a été également mesurée dans les sérums des rats traités par *Escherichia coli* inactivée comparés aux rats contrôles. Ces résultats concordent avec ceux de Rozenberg et Coll., (2006)

La surproduction du NO présente un effet délétère sur le cœur, ceci est observé *in vivo* et *in vitro* dans plusieurs modèles dont le modèle animale, cœur isolé et cardiomyocytes (Finkel et Coll., 1992; Yokoyama et Coll., 1993; Stein et Coll., 1996 ; Spanier et Mc Donough., 2000 ;Rozenberg et Coll., 2006 ; Slama et Maizel., 2006).

Le NO est impliqué dans le dysfonctionnement de myocarde, l'apoptose et dans l'inhibition de la chaine respiratoire qui peut constitue une source de ROS (Li et Coll., 2009).

Dans la situation physiopathologique du choc septique, le dysfonctionnement cardiovasculaire induit par choc septique associé au stress oxydatif peut être expliqué par plusieurs mécanismes (Grocott-Mason et Shah Most., 1998). :

- La production massive des ROS dans le cœur :
  -au cours du syndrome d'ischémie-reperfusion secondaire à la diminution du flux sanguin dans le tissu cardiaque,
  - suite à une altération des sources physiologiques majeurs des ROS qui sont les microsomes, les peroxisome et la mitochondrie (Cadenas et Coll., 1998)
  - ou par activation de la xanthine oxydase (Magder, 2006).
- L'activation du facteur de transcription kappa-B (NF-κB) qui peut induire plusieurs gènes, incluant la iNOS, la COX-2, les molécules d'adhésions, et les cytokines

proinflammatoires. Ces derniers sont impliqués directement dans la cardiomyopathie septique (Haudek et Coll., 2001; Zingarelli et Coll., 2003).

- Une réponse inflammatoire excessive par induction des gènes codant aux médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 (Luster, 1998). Ces médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire, stimulent l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales et joue le rôle de chimioattractant de PNs. L'infiltration des neutrophiles aggrave la situation et cause plus de dommages par génération de ROS, NO ou péroxynitrite (ONOO-) (Goode et Coll., 1995; Novelli, 1997).

- La synthèse du TNF-α et la libération extensive des ROS tel que le monoxyde d'azote (NO) (Yoshida et Coll., 1994; Muller-Werdan et Coll., 1998). Le NO libéré est dû à l'induction de la iNOS par le TNF-α (Yoshida et Coll., 1994; Wu et Coll., 2001). Ces molécules contribuent à la cardiodepression et à la transmission des signaux de mort par apoptose au niveau des cardiomyocytes (Muller-Werdan et Coll., 1998).

- L'induction de la iNOS sous l'effet de différentes cytokines de l'inflammation (IL-1β, TNFα, IFNγ et IL-6) (Balligand et Coll., 1995) ou d'endotoxine (Luss et Coll., 1995) est à l'origine d'une production quantitativement très importante de monoxyde d'azote au niveau des cardiomyocytes (Kelly et Coll., 1996).

  Certains études attribuent à cette hyperproduction du monoxyde d'azote la dysfonction myocardique et vasculaire observée au cours du choc septique (Finkel et Coll., 1992; Stein et Coll., 1996; Joe et Coll., 1998). Le mécanisme par lequel le monoxyde d'azote modulerait la fonction cardiaque au cours du choc septique est multiple :

- modification de l'activité des protéines-kinases ;
-altération de la chaîne respiratoire (source d'ATP)
- modulation de la réponse du myocyte au calcium intracytosolique ;
- diminution de la production d'AMPc;
- régulation de l'expression et de l'activité de la NOS (Mac Micking et Coll., 1995).

- L'activation de la COX-2 conduit à la synthèse des prostaglandines PGE2 un fort chimioatractant des neutrophiles, les PNs activés peuvent être à leurs tours une source de PGE2 et de ROS en plus des monocytes et des macrophages. Il a été rapporté dans une étude expérimentale que les PNs activés in vitro par une variabilité d'agents proinflammatoires dont le LPS expriment la forme inductible de l'enzyme COX-2 et synthétisent le PGE2 et le thromboxane A2 (Pouliot et Coll., 1998).

L'étude histopathologique du myocarde de ventricule gauche de rats septiques montre une infiltration leucocytaire au niveau du myocarde, caractérisé dans sa majorité par des neutrophiles. Ceci est confirmé par le dosage biochimique de la MPO enzyme marqueur de l'accumulation leucocytaire (Sumitra, 2001), l'activité de cette enzyme augmente de 183% chez le groupe de rats septiques comparés au groupe contrôle ce qui reflète une réaction inflammatoire au niveau du myocarde des rats après une cytotoxicité par LPS.

Au cours du choc septique, de nombreuses observations ont montré une perturbation de la chaîne respiratoire à type de diminution de la respiration (Nevière, 2008).

Une diminution de 78 % de la respiration mitochondriale a été observée chez les rats septiques comparés aux rats contrôles, cette diminution peut être due à l'action délétère du NO ou du péroxynitrite qui interfèrent au niveau de la chaîne respiratoire.

Le NO est un agent oxydant très puissant qui participe activement à l'atteinte mitochondriale septique. Le NO interagit directement avec la chaîne respiratoire en inhibant de façon puissante sélective et réversible le complexe cytochrome oxydase par compétition avec l'oxygène. Les espèces comme le péroxynitrite (ONOO-) ont des effets inhibiteurs plus faibles, non sélectifs mais irréversibles au niveau des complexes I, II et III. Le complexe I peut être inhibé par des phénomènes de S-nitrosation (addition de NO sur un groupement thiol) et de nitration (addition de NO sur un résidu tyrosine) (Brown et Borutaite., 2007).

La diminution de la respiration est accompagnée avec une augmentation de 192 % de la perméabilité des mitochondries des rats septiques comparés aux contrôles.

La transition de perméabilité pourrait être due à l'ouverture d'un canal non spécifique, le pore de transition de perméabilité (PTP) (Bernardi et Coll., 2006). Ce canal, normalement fermé, s'ouvre en présence d'une augmentation de la concentration matricielle de calcium ou de phosphate inorganique, d'un stress oxydatif. L'ouverture du PTP est à l'origine à la fois du processus d'apoptose mais aussi de nécrose (Nevière., 2008).

Le dysfonctionnement des mitochondries contribue à une production excessive des ROS. Ceci est dû à l'action de NO sur la chaîne respiratoire résultant en un excès de transfert d'électron sur l'oxygène moléculaire et formation d'anion superoxyde (Radi et Coll., 2002).

Le taux élevé du calcium cytosolique au niveau du cœur, induit la génération des ROS par les mitochondries (Thompson et Coll., 2000).

Les ROS conduisent au dysfonctionnement mitochondriale. Il a été démontré que les ROS conduisent à la formation des pores dans la membrane externe mitochondriale (Kim et Coll., 2003) conduisant à l'activation de la voie apoptotique caspase 9 mitochondriale. La caspase 9 active à son tour la caspase effectrice 3 qui conduit au clivage des protéines contractiles et/ou à l'apoptose des cardiomyocytes (Supinski et Callahan., 2006)

Les études histopathologiques du myocarde de ventricule gauche des rats septiques montrent une nécrose des cardiomyocytes, associée à un œdème, une infiltration leucocytaire et de larges zones hémorragiques. Ces résultats sont en accord avec d'autres études sur le choc septique qui confirme la présence d'une nécrose de cardiomyocytes, un œdème, et une hémorragie au niveau du myocarde (Hsu et Coll., 2004).

La perte des cardiomyocytes par nécrose est aussi confirmée par le dosage biochimique des marqueurs de cytotoxicité LDH et PAL où nous avons observés une diminution de l'activité enzymatique LDH et PAL de 68% et 54% respectivement au niveau du ventricule gauche de groupe de rats septiques. Parallèlement une augmentation de l'activité enzymatique LDH et PAL de 69.87 % et de 239.1% respectivement au niveau du sérum des rats septiques comparé au groupe de rats contrôles a été observée.
Cette perte cellulaire peut être expliquée par le dysfonctionnement mitochondriale associé au stress oxydatif observé .

Certaines études ont montré les effets positifs du traitement avec différents antioxydants qui ont prouvé leurs efficacités en augmentant le taux de survie dans une cytotoxicité au LPS (Sewerynek et Coll., 1996; Cadenas et Coll., 1998).

Dans cette étude nous avons utilisé la curcumine pour ces propriétés préventives prouvés dans plusieurs maladies dont le vieillissement, les maladies chroniques et inflammatoires.

Nos résultats montrent qu'un traitement préventif des rats septiques (traités par *Escherichia coli* inactivée 1.5 10^9 UFC/kg) par 60 mg/kg de curcumine (ip) et ceci 30 min avant induction du choc septique permet :

- une diminution de 63.3% de l'activité MPO;
- une diminution de 78.31% du taux de MDA cardiaque VG et de 170% du taux de MDA au niveau du sérum ;
- une diminution de 185,5% du taux des nitrites au niveau du ventricule gauche et de 92% au niveau du sérum ;
- une diminution de 154.3% du taux des nitrites/nitrates au niveau du ventricule gauche et de 27.5% au niveau du sérum ;
- une augmentation de 30.8% du taux de GSH au niveau du ventricule gauche ;
- une augmentation de 9.3% de l'activité catalase au niveau du ventricule gauche;
- une augmentation de 47.7% de l'activité LDH au niveau du ventricule gauche et une diminution de 53.3% au niveau du sérum ;
- une augmentation de 35.16% de l'activité PAL au niveau du ventricule gauche et une diminution de 204.4% au niveau du sérum ;
- une diminution de 64.4% de la perméabilité des mitochondries du ventricule gauche ;
- une augmentation de 58.8% de l'activité respiratoire des mitochondries du ventricule gauche, en comparaison avec le groupe de rats septiques.

L'étude histopathologique montre que le myocarde du ventricule gauche des rats, ayant reçus un prétraitement par la curcumine, présente moins de dommages comparé au myocarde des rats septiques. Les lésions tissulaires sont atténuées avec de faibles zones hémorragiques, et absence d'infiltration leucocytaire et d'œdème.

L'effet préventif de la curcumine au cours du choc septique peut être expliqué :

- par inhibition de la iNOS, responsable de la production excessive du NO lors du choc septique,
- par inhibition de la COX-2 source de prostaglandines responsable de l'exacerbation de la réponse inflammatoire,
- par neutralisation (scavenging) des ROS particulièrement les radicaux superoxyde et hydroxyle,
- par inhibition de la peroxydation lipidique responsable des dommages radicalaires de l'ADN et des lipides contribuant à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose,
- par blocage du facteur de transcription NF-κB responsable de l'activation de la iNOS, la COX-2 et de cytokines proinflammatoires (IL-1β, TNFα, IFNγ et IL-6).

L'effet préventif de l'aspirine (30 mg/kg/*per os*) sur le dysfonctionnement de myocarde observé lors du choc septique induit par *E. coli* permet :

- une diminution de 76.6% de l'activité MPO;
- une diminution de 86.34 % du taux de MDA au niveau du ventricule gauche et de 225.3% du taux de MDA au niveau du sérum ;
- une diminution de 189% du taux des nitrites au niveau du ventricule gauche et de 15.77% au niveau du sérum ;
- une diminution de 43.44% du taux des nitrites/nitrates au niveau du ventricule gauche et de 34.8% au niveau du sérum ;
- une diminution de 52.01% du taux de GSH au niveau du ventricule gauche ;
- une augmentation de 14.71% de l'activité catalase au niveau du ventricule gauche;
- une augmentation de 64.02% de l'activité LDH au niveau du ventricule gauche et une diminution de 73.5% au niveau du sérum ;
- une augmentation de 56.3% de l'activité PAL au niveau du ventricule gauche et une diminution de 54.2% au niveau du sérum ;
- une diminution de 75% la perméabilité des mitochondries du ventricule gauche ;
- une augmentation de 59.21% de l'activité respiratoire des mitochondries du ventricule gauche, en comparaison avec le groupe de rats septiques.

L'étude histopathologique montre que le myocarde du ventricule gauche des rats prétraités par l'aspirine présente une architecture proche de celle du myocarde des rats contrôles.

L'effet de l'aspirine est dû à l'inhibition de la synthèse des TXA-2 par inactivation de la COX-1.

A une faible dose l'aspirine est un puissant antiagrégant plaquettaire, son effet préventif sur le choc septique induit dans notre modèle expirémentale est dû à cette activité antiagrégante qu'elle présente. Le choc septique est caractérisé par la formation de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée. La formation de microthromboses est responsable d'ischémie observée lors du choc septique conduisant à une surproduction des ROS et à une réponse inflammatoire excessive et prolongée.

Le stress oxydatif peut être le mécanisme clé dans la physiopathologie du choc septique, un traitement préventif par la curcumine 60mg/kg ou par l'aspirine 30mg/kg permettrait la protection des cardiomyocytes des dommages attribués au stress oxydatif lors du choc septique.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'étude de l'implication du stress oxydatif dans la défaillance myocardique par *Escherichia coli* inactivée a montré une perturbation des systèmes pro-oxydants et antioxydants en faveur d'un stress oxydatif. Ce stress oxydatif est caractérisé par une augmentation des marqueurs pro-oxydants MPO, MDA et NO associée à une baisse du pool antioxydants CAT et GSH.

Le stress oxydatif implique un dysfonctionnement mitochondrial, traduit par une augmentation de la perméabilité mitochondriale et une diminution de la respiration mitochondriale. Il est accompagné d'une toxicité myocardique, traduite par une réduction des activités lactate déshydrogénase (LDH) et phosphatase alcaline (PAL).

Un prétraitement par l'aspirine 30 mg/kg ou la curcumine 60 mg/kg avant l'induction du choc septique, prévient le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial et les désordres histologiques induits par *E.coli* inactivée.

En perspective, il serait intéressant d'étudier :

*Le mécanisme moléculaire de la surproduction de ROS par les mitochondries, induit par *E. coli* inactivée *in vivo*,

*L'effet d'*E. coli* sur les complexes de la chaîne respiratoire, et sur le potentiel membranaire des mitochondries *in vivo*,

*Le mécanisme d'action de l'effet protecteur de la curcumine ou l'aspirine,

*L'effet d'*E. coli* sur la voie apoptotique des caspases *in vivo*,

*L'effet combiné de deux traitements sur la défaillance myocardique induite par *E.coli* inactivée.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medcine Consensus Conference. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*; **20: 864-874.**

-Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007) .Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales .Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Rhumatisme*; **74 636–643.**

-Aggarwal B.B., Indra D., Ichikawa B.H., Ahn K.S., Sethi G., Sandur S.K., Natarajan C., Seeram N., and Shishodia S. (2006).Curcumin-Biological and Medicinal Properties. *book.fm* ; **7034: 297-368**.

-Aird W.C. (2003).The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*; **101: 3765–3777**.

-Albert C.J, Crowley J.R, Hsu F, Thukkani A.K, and Ford D.A. (2001). Reactive Chlorinating Species Produced by Myeloperoxidase Target the Vinyl Ether Bond of Plasmalogens. *The Journal of Biological Chemistry.* **26:958-965.**

-Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A.M., and Cook J.L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem ;* **27 : 260–265.**

-Albert C.J., Crowley J.R., Hsu F., Thukkani A.K., and Ford D.A. (2001). Reactive Chlorinating Species Produced by Myeloperoxidase Target the Vinyl Ether Bond of Plasmalogens. *The Journal of Biological Chemistry.* **26, 958-965.**

-Alberti C., Brun-Buisson C., Burchardi H., Martin C., Goodman S., Artigas A. (2002). Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med;* **28**:**108–121.**

-Ammon H. P., Safayhi H., Mack T., and Sabieraj J. (1993).Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *J Ethanopharmacol;* **38:113**.

- Antunes L. M., Darin J. D., and Bianchi Nde L. (2001).Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res*; **43:145–150.**

-Antman E. M., DeMets D., and Loscalzo J. (2005). Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation*; **112:759–770.**

-Apel K., and Hirt H. 2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Reviews of Plant Biology*; **55:373-99.**

-Arrigo A. P. (1999). Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med;* **27:936-944.**

-Assenmacher M., Lohning M., Scheffold A., Manz R.A., Schmitz J., Rad bruch A. (1998)

Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes. *Eur J Immunol*; **28:1534–1543**.

-Astiz M.E., DeGent G.E., Lin R.Y. (1995). Rackow E.C. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med*; **23: 265–271**.

-Astiz M.E., Rackow EC. (1998).Septic shock. *Lancet*; **351: 1501-1505**.

- Awasthi S., Pandya U., Singhal S. S., Lin J. T., Thiviyanathan V., Seifert W. E., Jr Awasthi Y. C., and Ansari G. A. (2000). Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact*; **128: 19–38.**

-Awtry E.H. and Loscalzo J. (2007). Aspirin. *Elsevier Science (USA);* **pp: 1099-1125.**

-Balk B.A. (1998).The septic syndrome.Definition and clinical implications. *Crit Care Clinics*; **5:1-8**.

-Balligand J.L., Ungureanu-Longrois D., Simmons W.W., Kobzik L., Lowenstein C.J., Lamas S. (1995). Induction of NO synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by IL-1 beta and IFN-gamma. *AmJ Physiol*; **268:H1293-303.**

-Banfi B., Malgrange B., Knisz J., Steger K., Dubois-Dauphin M., Krause K. H. (2004).NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*; **279: 46065−46072.**

-Basivireddy J., Jacob M., Ramamoorthy P., Pulimood A.B., and Balasubramanian K.A. (2004). Indotmethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. *Biochemical Pharmacology;* **65:683-695.**

- Barik A., Priyadarsini K. I. and Mohan H. (2003). Photophysical studies on binding of curcumin to bovine serum albumins. *Photochem Photobiol*; **77**:**597–603**.

-Bates D.W., Pruess, and K. E.and Lee T. H. (1995). How bad are bacteremia and sepsis? Outcomes in a cohort with suspected bacteremia. *Arch. Intern. Med*; **155:593-598.**

-Becker L.B, Hoek T.L., Shao Z.H., Li C.Q., and Schumacker P.T. (1999). Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am. J. Physiol*; **277: 2240-2246.**

Beckman J.S, Koppenol W.H.(1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol*; **271: 1424–1437**.

-Beltran A., Ottani A., Sandrini M. (2002). Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res;* **44: 437-450.**

-Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Zurovsky Y, Bergman M, Grossman S. (2001) .The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicology Letters*; **123:1–10.**

-Berger M.M., Chioléro R.L. (2001). Apport d'antioxydants en réanimation : pourquoi, lesquels, avec quels objectifs ? *Réanimation* ; **10 : 527-534.**

-Berger M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence .*Nutrition clinique et métabolisme* ; **20 : 48–53**.

-Berlett B.S., and Stadtman E.R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* ; **272 :20313-20316.**

-Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F.(2006). The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J*; **273:2077-2099**.

-Beutler B. (2000). TLR4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol*; **12: 20-26.**

-Bharti A. C., Donato N., Singh S., and Aggarwal B. B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaBand IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood;* **101:1053–1062**.

-Bharti A. C., Donato N., and Aggarwal B. B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol; **171:3863–3871***.

-Bierhaus A., Zhang Y., Quehenberger P., Luther T., Haase M., Muller M., Mackman N., Ziegler R., and Nawroth P.P. (1997).The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. *Thromb Haemost*;**77:772–782**.

-Blasius R., Duvoix A., Morceau F., Schnekenburger M., Delhalle S., Henry E., Dicato M. and Diederich M. (2004). Curcumin stability and its effect on glutathione S-transferase P1-1 mRNA expression in K562 cells. *Ann N Y Acad Sci*; **1030:442–448**.

-Bochkov V.N., Kadl A., Huber J. (2002) Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature*; **419: 77-81**.

-Bone R. C. (1991). The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med*; **115:457-469.**

-Bone R.C. (1994). Sepsis and its complications: The clinical problem. *Crit Care Med*; **22: 8-11.**

-Bouglé A., Annane D. (2007). Physiopathologie du choc septique**.** *Antibiotiques***; 9: 9-19.**

-Bradford M.M. (1976).A Rapid and sensitive Method for the Quantification of Microgram

Quantities of Protein Utilizing the Principale of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry;* **72:248-254.**
-Braun J.S., Novak R., Herzog K.H. (1999). Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med;* **5: 298-302**.

-Bright J.J. (2007). Curcumin and autoimmune disease.**pp:425-451**.

-Brooks P., Emery P., Evens J.F., Fenner H., Hawkey C.J., Patrono C., Smolen J., Breedveld F., Day R., Dougados M., Ehrich E.W., Gijon-Banos J., Kvien T.K., Van Rijswijk M.H., Warner T., and Zeidler H. (1999). Interpreting the clinical significance of the deferential inhibition of cyclooxygénase-1 and cyclooxygénase-2. *Rheumatol.* **38, 779-788.**

-Brooks P., Emery P., Evens J.F., Fenner H., Hawkey C.J., Patrono C., Smolen J., Breedveld F., Day R., Dougados M., Ehrich E.W., Gijon-Banos J., Kvien T.K., Van Rijswijk M.H., Warner T., and Zeidler H. (1999). Interpreting the clinical significance of the deferential inhibition of cyclooxygénase-1 and cyclooxygénase-2. *Rheumatol*; **38: 779-788.**

-Brown G.C. (1995). Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem*; **232:188-191.**

-Brown G.C., Borutaite V. (2002). Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*; **23:56-60.**

- Brown K.A., Brain S.D., Pearson J.D., Edgeworth J.D., Lewis S.M., Treacher D.F.(2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis *Lancet*; **368: 157–169.**

-Brown GC, Borutaite V. (2007).Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res*; **75:283-290.**

-Brzozowski T., Kwieciea S., Konturek P., Konturek1 S.J., Ptak A., Mitis-Musiol M, and Duda A. (2001). Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med Sci Monit*; **4: 592-599.**

-Bubici C., Papa S., Pham C.G., and Franzoso G. (2004). NF-kB and JNK. *Cell cycle*; **12:1524-1529.**

-Buonocore G., Groenendaal F. (2007) .Anti-oxidant strategies.*Seminars in Fetal &Neonatal Medicine*; **12: 287-295.**

-Cadenas S., Cadenas A.M. (2002) .Fighting the stranger-antioxidant protection against Endotoxin toxicity. *Toxicology*; **180: 45-63.**

-Cadet J., Yim M.B., Stadtman E.R., Yim M.B., Chock A. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation research; 424***: 9-21.**

-Chan M. M. (1995).Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol*; **49**:**1551–1556**.

-Cambarnous Y. (2004).Communications et signalisations cellulaires. *Ed Tec et Doc* ; **pp : 227-228.**
-Capone M.L., Tacconelli S., Sciulli M.G., Grana M., Ricciotti E., Minuz P., Di Gregorio P.,
Merciaro G., Patrono C., Patrignani P. (2004).Clinical Pharmacology of Platelet, Monocyte, and Vascular Cyclooxygenase Inhibition by Naproxen and Low-Dose Aspirin in Healthy Subjects. *Circulation*; **109:1468-1471.**

-Carlos T.M., and Harlan J.M. (1994) . Leucocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* **84: 2068-2101.**

-Carlson D.L., Willis M.S., White D.J., Horton J.W., Giroir B.P. (2005). Tumor necrosis factor-alphainduced caspase activation mediates endotoxin-related cardiac dysfunction. *Crit Care Med*; **33:1021–1028.**

-Chagnon F., Mtetz C.N., Bucala R., and Lesur O. (2005). Endotoxin-induced myocardial dysfunction: Effects of macrophages migration inhibitory factor neutralization. *Circ Res*; **96:1095-1102**.

-Chen L., Deterding L.J., Sturgeon B.E., Tomer K.B., and Ronald P. Mason. (2002). Protein Oxidation of Cytochrome c by Reactive Halogen Species Enhances Its Peroxidase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. **277:29781-29792.**

-Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S., Hoppel C.L and Lesnefsky E.J. (2003). Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. Central role of complex III. *The Journal of Biological Chemistery*; **278: 36027-36031.**

-Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Meir, E. G. V., Lambeth, J. D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*; **269:131−140.**

-Chopra M., Sharma A.C. (2007) .Distinct cardiodynamic and molecular characteristics during.early and late stages of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Life Sci;* **81:306–316.**

-Christman J.W., Lancaster L.H., Blackwell T.S. (1998). Nuclear factor-ķB: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med*; **24: 1131-1138.**

-Cinel I., Dellinger R.P. (2007) .Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin in Infect Dis*; **20:345–352.**

-Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M.,Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*; **13: 463–469.**

-Combarnous Y. (2004). Communications et signalisations cellulaires. *Ed TEC et DOC*.**pp:305.**
-Comhair S.A.A. and Erzurum S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung

diseases. American Journal of Physiological *Lung Cell Mol;* **283: 246-255.**

-Coopersmith C.M., Stromberg P.E., Dunne W.M. (2002). Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA;* **287: 1716-1721.**
-Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., and Vasseur P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependant glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, Unio tumidus, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ*. *Saf* ; **38 : 122-131.**

-Cross A.R., and Segal A.W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems*. Biochim Biophys Acta*; **28:1-22.**

-Edeas M. (2006). La curcumine .*Phytothérapie*; **5: 230–233**.

-Ejima K., Layne M.D., Carvajal I.M. (2003). Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB J*; **17: 1325-13257.**

-Erlich J, Fearns C, Mathison J, Ulevitch R.J, Mackman N. (1999). Lipopolysaccharide induction of tissue factor expression in rabbits. *Infect Immun*; **67**: **2540–2546.**

-Famaey J.P. (1973). Interaction between non-steroidal anti-inflammatory drugs and biological membrane. High amplitude pseudo-energized mitochondrial swelling and membrane permeability changes induced various non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol;* **22:2693-2705.**

-Fantuzzi L., Puddu P., Varano B., Del Corno M., Belardelli F., GessaniS. (2000).IFN-alpha and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN-gamma production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflame matory response of macrophages. *J Leukoc Biol*; **68:707–714.**

-Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. (2001). Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol;* **166**: **2018–2024**.

-Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.**pp :108-115.**

-Fernando L,P., Fernando A,N., Ferlito M., Halushka P.V., Cook J.A. (2000). Suppression of Cox-2 and TNF-alpha mRNA in endotoxin tolerance: effect of cycloheximide, antinomycin D, and okadaic acid. *Shock*; **14:128–133.**

-Fink M.P., Evans T.W. (2002). Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a Round Table Conference held in Brussels. *Int Care Med*; **28: 369–375**.

-Finkel M.S., Oddis C.V., Jacob T.D., Watkins S.C., Hattler B.G., Simmons R.L. (1992). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*; **257:387-389.**

-Forman N.G and Wilson D.F. (1982). Energetics and stoichiometry of oxidative phosphorylation from NADH to cytochrome c in isolated rat liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry;* **10:12908-12915.**

-Forster W and Parratt J.R. (1996).The Case for Low-Dose Aspirin for the Prevention of Myocardial Infarction: But How Low Is Low?*Cardiovascular Drugs and Therapy*;**10:727-734.**

-Fortenberry J.D. (1992). Immunopathologic responses in sepsis: The paradox of inflammation. *Semin Pediatr Infect Dis*; **3:244-254.**

-Garcea G., Jones D .J., Singh R. (2004) Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer*; **90: 1011-1015.**

-Genaud P.,Vinsonneau C., Cariou A . (2001). Dysfonction myocardique et sepsis: physiopathologie et perspectives thérapeutiques. *Réanimation*; **10:153-161.**

-Gibot S., Levy B., Neviere R., Cariou A., Lesur O. (2004). Myocardial dysfunctionand septic shock. *Med Sci*; **20:1115–1118**.

-Glauser M.P. (2000). Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. *Crit Care Med;* **28**:**4–8.**

-Gonzalez-Amaro R., Sanchez-Madrid F. (1999). Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Curt Rev Immunol*; **19: 389–429.**

-Gómez-Jiménez J., Salgado A., Mourelle M., Martín M.C., Segura R.M., Peracaula R., Moncada S. (1995).L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med*.; **23:253–258.**

-Goudable J., Favier A. (1997). Radicaux libres oxyg n s et antioxydants.*Nutr Clin Mdtabol*; **11:115-120.**

-Goode H.F., Cowley H.C., Walker B.E., Howdle P.D., Webster N.R.(1995). Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit. Care Med*; **23, 646-651**.

-Ghosh S., May M. J. and. Kopp E. B. (1998).NF-kappa B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*; **16:225.**

-Grocott-Mason R.M, Shah A.M. (1998). Cardiac dysfunction in sepsis: new theories and clinical implications. *Intensive Care Med*; **24: 286–295**.

-Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent J.L. (1999) .An open label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. *Crit Care Med*; **27:913–922**.

-Gupta B. and Ghosh B. (1999).Curcuma longa inhibits TNF-alpha induced expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells. *Int J Immunopharmacol*; **21**:**745–757.**

-Gutteridge JMC. (1995).Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*; **41:1919-1928**.

-Gulcubuk A., Altunatmaz K., Sonmez, K. Haktanir-Yatkin D., Uzun H., Gurel A., and Aydin S. (2006).Effects of curcumin on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*; **53: 49–54**.

-Haddad J.J. (2002).Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal*; **14:879–897**.

-Hack C.E., Hart M., Strack R.J.M. (1992). Interleukin-8 in sepsis: relation to shock and inflammatory mediators. *Infect Immun*; **60:350-358**.

- Han Y.J., Kwon Y.G., Chung H.T., Lee S.K., Simmons R.L., Billiar T.R., Kim Y.M. (2001). Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H2O2 and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide*; **5:504-513**.

-Halliwell B., Gutteridge JM., Cross CE. (1992). Free radicals, antioxidants and human disease. Where are we now? *J Lab Clin Med*; **119:598–620**.

-Halliwell B., and Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr;* **57:715-725.**

-Halliwell B. (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*; **44: 6-13.**

-Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine.3rd ed. Oxford: Oxford University Press/Clarendon Press.

-Halliwell B. (1987). Oxidant and human disease: Some new concepts. *FASEBJ;* **1: 358–364.**

-Halliwell B. (2006).Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*; **141:312-322.**

-Hamann L., Schumann R.R., Flad H.D., Brade L., Rietschel E.T., Ulmer A.J. (2000). Binding of lipopolysaccharide (LPS) to CHO cells does not correlate with LPS-induced NF-kappaB activation. *Eur J Immunol*; **30:211–216.**

-Han S.k., Kim K.P., Koduri R., Bittova L., and Cho W. (2001). Roles of Trp in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V pospholipasse. *J. Biol. Chem*; **274 :11881-11888.**

-Hashiguchi T., Kakihna Y., Isowaki S ., Kuniyoshi T., Kaminosono T., Nagata E ., Tobo K ., Tahara M., Okayama N., Arakawa Y., Kakihara Y.,Goromaru T ., Nakanishi N.,

Nakazawa H., and Kanamura Y. (2008).Systematic evaluation of nitric oxide, tetrahydrobiopterin, and anandamide levels in a porcine model of endotoxemia. *J Anesth*; **22:213–220.**

- Hasmeda M. and Polya G. M. (1996).Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by curcumin. *Phytochemistry*; **42**:**599–605**.

-Haudek S.B, Spencer E, Bryant D.D. (2001). Overexpression of cardiac I-kappaB alpha prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **280:962–968.**

-Hayashi F., Means T.K., Luster A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*; **102: 2660–2669.**

-Hayasji Y., Abe M., Murai A., Shimizu N., Okamoto I., Katsuragi T., and Tanaka K. (2005). Comparison of effects of nitic oxide synthase (NOS) inhibitors on plasma nitrite/nitrate levels and tissue NOS activity in septic organs. *Microbiol. Immunol*; **49:139-147.**

-Heinzel F. P., Rerko R. M., Ling P., Hakimi J., Schoenhaut D. S. (1994). Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. *Infect. Immun*; **62:4244-4249.**

-Hiemstra P. S., Eisenhauer P. B., Harwig S. S. L., Van Den Barselaar M. T., Van Furth R., Lehrer R. I. (1993). Antimicrobial proteins of murine macrophages. *Infect. Immun*; **61:3038-3046.**

-Hickey M. J., Sharkey K. A., Sihota E. G., Reinhardt P. H., MacMicking J. D., Nathan C., and Kubes P. (1997). Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J*. **11:955-964**.

-Hoffmann W, Forster W. (1991).Two years Cottbus reinfarction study with 30 mg aspirin per day. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; **44:159-169**.

-Hong J., Bose M., Ju J., Ryu J. H., Chen X., Sang S., Lee M. J., and Yang C. S. (2004). Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A (2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis;* **25:1671–1679**.

-Hsu B.G., Yang F.L., Lee R.P., Peng T.C., Harn H.J., Chen H.I. (2004). N-Acetylcysteine Ameliorates Lipopolysaccharide-lnduced Organ Damage in Conscious Rats.*J Biomed Sci*; **11:152-162.**

-Huang M. T., Lysz T., Ferraro T., Abidi T. F., Laskin J. D., and Conney A. H. (1991). Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res*; **51:813–819.**

-Huet O., Duranteau J. (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres Endothelial dysfunction: Involvement of reactive oxygen species. *Réanimation;* **17: 387-392.**

-Hull S. (1997).*Escherichia coli* lipopolysaccharide in pathogenesis and virulence. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: mechanisms* of virulence. *Cambridge University Press*: *Cambridge*; **145-167**.

-Ibbotson G.C., Doig C., Kaur J. (2001). Functional α4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nature Med*; **7: 465–470**.

-Imler J., Hoffmann J.A. (2001). Toll receptor in innate immunity. *Trend Cell Biol*; **11:304-311.**

-Imler J-L. (2004).Immunité innée et récepteurs Toll.Flammarion Medecine-Sciences. **pp : 1-9.**

-Ireson C., Orr S., Jones D. J., Verschoyle R., Lim C. K., Luo J. L., L. Howells, Plummer S., Jukes R., Williams M., Steward W. P., and Gescher A. (2001).Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res*; **61: 1058–1064.**

-Irie T., Muta T., Takeshige K. (2000). TAK1 mediates an activation signal from Toll-like receptor(s) to nuclear factorkB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett*; **467:160-164.**

-Jaeschke H**.** (1996). Chemokines, neutrophils, and inflammatory liver injury. *Shock*; **6:403-404.**

-Jaeschke H., and Smith C.W. (1997). Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J. Leukoc. Biol.* **61: 647–653.**

-Jaeschke H, Smith C.W, Clemens M.G, Ganey P.E, and Roth R.A. (1997). Mechanisms of inflammatory liver injury: Adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **139 : 213–226.**

-Jagetia G.C, Rajanikant G.K. (2004). Effect of curcumin on radiation-impaired healing of excisional wounds in mice. *J Wound Care*; **13:107-109.**

-Jagetia G.C, Rajanikant G.K. (2005). Curcumin treatment enhances the repair and regeneration of wounds in mice exposed to hemibody gamma-irradiation. *Plast Reconstr Surg;* **115: 515-528.**

-Janssens S., Beyaert R.A. (2002). Univesal role of MyD88 in TLR/IL-1R mediated signaling. *Trends Biochem Sci;* **27:474-482**.

-Javesghani D., Magder S.A., Barrerio E., Quinn M.T., Hussain S.N., (2002). Molecular characterization of a superoxide-generation NAD (P) H oxidase in ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med*; **165: 412-418.**

-Jiang H., Stewart C.A., Leu R.W. (1995). Tumor-derived factor synergizes with IFN-gamma and LPS, IL-2 or TNF-alpha to promote macrophage synthesis of TNF-alpha and TNF receptors for autocrine induction of nitric oxide synthase and enhanced nitric oxide-

mediated tumor cytotoxicity. *Immunobiology;* **192:321-342.**
-Jiao Y., Wilkinson J. t., Christine Pietsch E., Buss J. L., Wang W., Planalp R., Torti F.M ., and Torti S.V. (2006) .Iron chelation in the biological activity of curcumin. *Free Radical Biol Med*; **40**:**1152–1160**.

-Jobin C., Bradham, C.A., Russo M.P., Juma B., Narula A.S., Brenner D.A., and Sartor R.B. (1999). Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol*; **163: 3474–3483.**

-Joe E.K., Schussheim A.E., Longrois D. (1998). Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol*; **30: 303–315**.

-Kalpana C and Menon V. P. (2004). Modulatory effects of curcumin on lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. *Pol J Pharmacol*; **56: 581–586.**

-Karin M., Liu Z., and Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*; **9: 240–246.**

-Kilbourn R. (1997). Nitric oxide and shock.*Dis. Mon*; **43:281-348.**

-Kelly R.A, Balligand J.L, Smith T.W. (1996). Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res*; **79: 363-380.**

-Kevin L.G., Camara A.K., Riess M.L., Novalija E., and Stowe D. F. (2003). *Am. J. Physiol;* **284: 566-574.**

-Khadour F.H., Panas D., Ferdinandy P., Schulze C., Csont T., Lalu M.M., Whildhirt S.M., Schulz R. (2002). Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *AM. J Physiol Heart Circ Physiol*; **283:1108-1115**.

-Kikkawa I., Saito S., Tominaga K., Hoshino Y., Ooi Y., Nakano M.(1998). Lipopolysaccharide (LPS) stimulates the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by osteoclasts (OCL) in murine bone marrow cell culture. *Microbiol Immuno*; **142:591-598.**

Kim T.S., Yun B.Y., Kim I.Y.(2003).Induction of the mitochondrial permeability transition by selenium compunds mediated by oxidation of the protein thiol groups and generation of the superoxide. *Biochem Pharmacol*; **66:2301-2311.**

-Kim K.H., Park H.Y., Nam J.H., Park J.E., Kim J.Y., Park M.I., Chung K.O., Park K.Y., and Koo J.Y. (2005). The inhibitory effect of curcumin on the growth of human colon cancer cells (HT-29, WiDr) *in vitro*. *Korean J Gastroenterol;* **45: 277–284.**

-Kiuchi F., Goto., Sugimoto N., Akao N., KondoK., and TsudaY. (1993). Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; **41: 1640–1643.**

-Krawisz J.E, Sharon P., Stenson W.F. (1984). Quantitative assay for acute intestinal

inflammation based on myeloperoxydase activity. *Gastroenterology; 87***: 1344-1350.**
-Kroemer G., Dallaporta B., and Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol ;* **60 :619–642.**

-Krishnagopalan S., Kumar A., Parrillo J.E., Kumar A. (2002). Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr Opin Crit Care*; **8:376–388**.

-Kumar A., Haery C., Parrillo J.E.(2000). Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin*; **16:251–287**.

-Lancel S., Tissier S., Mordon S., Marechal X., Depontieu F, Scherpereel A., Chopin C., Neviere R. (2004). Peroxynitrite Decomposition Catalysts Prevent Myocardial Dysfunction and Inflammation in Endotoxemic Rats. *Journal of the American College of Cardiology*; **43: 2348–2358.**

-Lecomte M., Laneuville O., Ji C.1994).Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem*; **269:13207–13215**.

-Leone M, Bourgoin A, Antonini F, Albanèse J, Martin C. (2003). Quelles perspectives thérapeutiques dans le syndrome septique ? Which therapeutic prospects in the septic syndrome? *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation***; 22 : 9798-9808**.

-Leone M., Boutiere B., Camoin-Jau L., Albanese J., Horschowsky N., Mege J.L. (2002). Systemic endothelial activation is greater in septic than in traumatic-hemorrhagic shock but does not correlate with endothelial activation in skin biopsies. *Crit Care Med;* **30:808–814**.

-Levy M.M., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G. (2003).International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*; **29:530–538.**

-Li J. M., Shah A. M. (2003). Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem*; **278:12094−12100**.

-Li T., Li J., Liu J., Zhang P., Wu W., Zhou R., Li G., Zhang W., Yi M., Huang H. (2009). Polymerized placenta hemoglobin attenuates ischemia/reperfusion injury and restores the nitroso-redox balance in isolated rat heart. *Free Radical Biology & Medicine*; **46:397–405.**

-Lin J. K. and Shih C. A. (1994). Inhibitory effect of curcumin on xanthine dehydrogenase/ oxidase induced by phorbol-12-myristate-13-acetate in NIH3T3 cells. *Carcinogenesis*; **15**:**1717–2171**.

-Liu S.F.,Ye X., Malik A. B .(1999).Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation*; **100:1330–1337.**

-Liu Y., Fiskum G., and Schubert D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*; **80: 780-787.**

-Lizasoain I., Izasoain M.M., Moro M.A., Knowles RG., Darley-Usmar V., and Moncada S.

(1996). Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem. J* ; **314 : 877-880.**

-Logan-Smith M. J., Lockyer P. J., East J. M. and Lee A. G. (2001). Curcumin, a molecule that inhibits the Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum but increases the rate of accumulation of Ca2+. *J Biol Chem*; **276**: **46905–46911.**

-Lopez-Bojorquez L.N., Dehesa, A.Z., Reyes-Terán G. (2004). Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Septic Shock *Archives of Medical Research*; **35:465–479**.

-Luss H., Watkins S.C., Freeswick P.D., Imro A.K., Nussler A.K., Billiar T.R.(1995). Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiacmyocytes invivo and following cytokine exposure in vitro. *J Mol Cell Cardiol***; 27 :2015-2029.**

-MacMicking J.D., Nathan C., Hom G., Chartrain N., Fletcher D.S., Trumbauer M. (1995).Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell;* **81: 641–650.**

-Madan B. and Ghosh B. (2003). Diferuloylmethane inhibits neutrophil infiltration and improves survival of mice in high-dose endotoxin shock. *Shock*; **19: 91–96.**

-Magder S. (2006). Reactive oxyge species: Toxic molecules O_2 spark of life? *Critical Care;* **10:1-8**.

-Mahalingam S, Karupiah G. (1999). Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol. Cell Biol.* **77:469-475.**

-Menger M.D., Rucker M., Vollmar B. (1997).Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary ‘‘no-reflow’’. *Shock*; **8:2-7.**

-Massey V. (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem***; 269: 22459-22462.**

-Mardini I.A., Fitz I., and Gerald M. (2001). Selective inhibitors of cyclooxygenase-2. A growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol. Interv*; **1:30-38.**

-Mayer A.M.S., Spitzer J.A. (1991). Continuous infusion of *Escherichia coli* endotoxin in vivo primes superoxide anion release in rat polymorphonuclear leukocytes and Kupffer cells in a time-dependent manner. *Infect. Immun*. **59:4590-4598.**

- Mayer J., Hajek R., Vorlicek J., Tomiska M. (1995). Sepsis and septic shock: II, Traitment. *Support Care Cancer*; **3:111-119**.

-MedzhitovnR., Janeway C.A. (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*; **8:452-456**.

-Mitchell J.A.., and Warner T.D. (1999). Cyclooxygenase-2: pharmacology,hysiology, biochemestry and relevence to NSAID therapy. *Br.J.Pharmacol*; **128:1121-1132.**

-Moghaddas S., Hoppel C., and Lesnefsky E.J. (2003). Aging defect at the QO site of complex III augments oxyradical production in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys;* **414 :59-66.**

- Mollnes T.E., Brekke O.L., Fung M.(2002). Essential role of the C5a receptor in *E coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of infl ammation. *Blood*; **100: 1869–1877**.

-Morita I., Schindler M., Regier M.K. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem*; **270:10902–10908.**

-Mortensen R.F and Zhong W. (2000). Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *Journal of Leukocyte Biology;* **67: 495-500.**

-Moulin M. (1998).Pharmacologie. Ed Masson.**pp :225.**

-Murphy K., Haudek SB., Thompson M., Giroir B.P. (1998).Molecular biology of septic shock. *New Horiz*; **6:181–193.**

-Nansen A., Pravsgaard Christensen J., Marker O., Randrup Thomsen A. (1997). Sensitization.to lipopolysaccharide in mice with asymptomatic viral infection: role of T-cell-dependent production of interferon-γ. *J Infect Dis*; **176: 151-157.**

- Nathan C, Sporn M. (1991). Cytokines in context. *J Cell Biol*; **113:981–986**.

- Netea M.G., Jos W.M. Meer V., Deuren M., Kullberg B.J. (2003). Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends in Immunology*; **24:254-258.**

- Neviere R., Fauvel H., Chopin C. (2001). Caspase inhibition prevents cardiac dysfunction and heart apoptosis in a rat model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med***; 163:218–225.**

-Nevière R. (2008). Physiopathologie mitochondriale et syndrome septique : Mitochondrial dysfunction in sepsis.*Réanimation ;* **17 :185-191**.

-Nianyu L., Ragheb K., Lawler G., Sturgis J., Rajwa B., Melendez A., and Robinson J.P. (2003). Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *The Journal of Biological Chemistry* ; **10 :8516-8525.**

-Niitsu M., Ohya T., Xu X.S., and Samejima K. (1995). Identification Of N4-(2-Propenal) Spermidine As A Major Reaction Product Of Malondialdehyde And Spermidine. *Biol Pharm Bull*; **18:1162-1164.**

-Nirmala C, Anand S, Puvanakrishnan R. (1999). Curcumin treatment modulates collagen metabolism in isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*; **197: 31–37.**

-Nohl H. (1994). Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration. *Ann Biol Clin*; **52:199-204**.

-Padmanabhan M., Mainzen S., Prince P. (2006). Preventive effect of S-allylcysteine on lipid peroxides and antioxidants in normal and Isopoterenol-induced cardiotoxicity in rats: A histopathological study. *Toxicology;* **224:128-137.**

-Pan M.H., Huang T.M., and Lin J.K. (1999).Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*; **27: 486–494**.

-Pan M.H., Lin-Shiau S.Y., and Lin J.K. (2000).Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem Pharmacol*; **60: 1665–1676.**

-Parker M.M., Shelhamer J.H., Bacharach S.L., Green M.V., Natanson C., Frederick T.M.(1984). Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*; **100:483-489**.

-Parrillo J.E. (1993). Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New Engl. J. Med*;**328: 1471-1477.**

-Patrono C., Coller B., Dalen J.E. (2001). Platelet active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Ches*; **119: 39–63**.

- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999).L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin.*Vaisseaux, Coeur, Poumons* ; **4:1-7**.

-Plummer S.M., Holloway K.A., Manson M.M., Munks R.J., Kaptein A., Farrow S., and Howells L. (1999). Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*; **18:6013–6020**.

-Plummer S.M., Hill K.A., Festing M.F., Steward W.P., Gescher A.J., and Sharma R.A. (2001).Clinical development of leukocyte cyclooxygenase 2 activity as a systemic biomarker for cancer chemopreventive agents.*Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* ;**10:1295–1299.**

-Pouliot M., Gilbert C., Borgeat P., Poubelle P.E., Bourgoin S., Grassi J .(1998).Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. FASEB J; **12: 1109–1123.**

-Prasad N. S., Raghavendra R., Lokesh B. R., and Naidu K. A. (2004).Spice phenolics inhibit humanPMNL5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids***; 70: 521–528.**

-Preiser J-C. (2000). Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Alterations *Sepsis***; 4:99–109.**

-Priyadarsini K.I., Maity D.K., Naik G.H., Kumar M.S., Unnikrishnan M.K., Satav J.G., and Mohan H. (2003).Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med*; **35: 475–484.**

-Proctor R.A., Denlinger L.C., Bertics P.J. (1995).Lipopolysaccharide and bacterial virulence. In : Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C.,Wannemuehler M.J. (Eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 2nd Ed. Edition. ASM Press: Washington, **pp: 173-194.**

-Qureshi S.T., Gros P. and Malo D. (1999) .The *Lps* locus: Genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflamm res*; **48: 613–620.**

-Rabuel C., Renaud E., Brealey D. (2004). Human septic myopathy: induction of cyclooxygenase, heme oxygenase and activation of the ubiquitin proteolytic pathway. *Anesthesiology*; **101:583–590**.

-Rackow E.C., Astiz M.E. (1991). Pathophysiology and treatment of septic shock, *J.Am.Med.Assoc*; **266: 548-554.**

-Radi R., Cassina A., Hodara R. (2002). Nitric oxide and peroxynitrite interaction with mitochondria. *Biol Chem;* **383: 401-409.**

-Raetz C.R. (1990). Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem*; **59:129-170.**

-Ramirez Bosca A., Soler A., Carrion-Gutierrez M. A., Pamies Mira D., Pardo Zapata J., Diaz-Alperi J., Bernd A., Quintanilla Almagro E., and Miquel J. (2000).An hydroalcoholic extract of *Curcuma longa* lowers the abnormally high values of human-plasma fibrinogen.*Mech Ageing Dev*; **114**: **207–210**.

-Ramsewak R. S., DeWitt D. L., and Nair M. G. (2000).Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine*; **7**:**303–308.**

-Reddy A. C and Lokesh B. R. (1992).Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Mol Cell Biochem*; **111**:**117**.

-Reddy S., and Aggarwal B. B. (1994). Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett*; **341**:**19–22**.

-Rees D.D., Monkhouse J.L., Cambridge D., Moncada S. (1998) Nitric oxide and the haemodynamics profi le of endotoxin shock in the conscious mouse. *Br J Pharmacol*; **124: 540–546.**

-Ren J., Ren B.H., Sharma A.C. (2004). Sepsis-induced depressed contractile function of isolated ventricular myocytes is due to altered calcium transient properties. *Shock*; **18:285–288.**

-Reyes W.J., Brimioulle S., Vincent J.L. (1999).Septic shock without documented infection: an uncommon entity with a high mortality.*Intensive Care Med*; **25: 1267-1270**.

-Rietschel E.T., T. Kirikae F. U. Schade U. Mamat G. Schmidt H. Loppnow A. J. Ulmer U. Zähringer U. Seydel F. Di Padova M. Schreier and H. Brade. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. **8:217-225**.

-Roitt I. M. (1994). Immunity to infection. *In* I. M. Roitt (ed.), Essential immunology.

Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom: **p.243-271.**
-Roitt I., Brostoff J., Male D. (1997).Immunologie. 4th Ed. De Boeck and Lacier.p.406.
-Roos D., Van bruggen R., Meischel C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and infection*; **5: 1307-1315.**

-Rothstein J.L., Schreiber H. (1988) .Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA;* **85: 607-611.**

-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.**

-Rukkumani R., Sri Balasubashini M., and Menon, V. P. (2003).Protective effects of curcumin and photo-irradiated curcumin on circulatory lipids and lipid peroxidation products in alcohol and polyunsaturated fatty acid-induced toxicity. *Phytother Res*; **17: 925–929.**

-Sabroe I., Prince L.R., Jones E.C. (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol*; **170: 5268–5275**.
-Saez-Liorens X., McCracken G.H. (1993). Sepsis syndrome and septic shock in pediatrics: Current concepts of terminology, pathophysiology, and management.*J Pediatr*; **123:497-508.**

- Sasaki Y., Goto H., Tohda C., Hatanaka F., Shibahara N., Shimada Y., Terasawa K., and Komatsu K. (2003).Effects of curcuma drugs on vasomotion in isolated rat aorta. *Biol Pharm Bull*; **26**:**1135–1143**.

- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Ann Rev Immunol*; **23: 197−223.**

-Serteyn D., Grulke S., Franck T., Moutithys-Mickalad A., Deby-Dupont G. (2003). La myeloperxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Med. Vet*; **147:79-93.**

-Sewerynek E., Melchiorri D., Chen L., Reiter R.J. (1995).Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharyde-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Rad. Biol. Med*; **19: 903-909.**

-Sha W. C. (1998).Regulation of immune responses by NF-kappa B/Rel transcription factor. *J Exp Med;* **187:143**.

-Sies H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med*. **27:916-921.**

-Singh S. and Aggarwal B.B. (1995).Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) . *J Biol Chem*; **270: 24995–25000.**

-Skrzypczak-Jankun E., Zhou K., McCabe N. P., Selman S. H., and Jankun J. (2003). Structure of curcumin in complex with lipoxygenase and its significance in cancer. *Int J Mol Med*; **12:17–24.**

-Slama M., and Maizel J. (2006) .La dysfonction cardiaque au cours du sepsis : Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Réanimation*; **15:131–136.**

-Somasundaram S, Rafi S., Hayllar J, Sigthorsson G, Jacob M, Price A B, Macpherson A, Mahmod T, Scott D, Wrigglesworth J.M, and Bjarnason I. (1997). Mitochondrial damage: a possible mechanism ofthe "topical" phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut;* **41:344-353.**

-Smith W. L. (1992). Prostanoid biosynthesis and the mechanism of action. *Am J Physiol*; **263: 118–191.**

-Smith W. L., and DeWitt, D. L. (1995). Biochemistry of prostaglandin endoperoxidase H synthase-1 and -2 and their differential susceptibility to nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Semin Nephrol*; **15: 179–194.**

-Spanier A.J. and Mc Donough K.H. (2000). Dexamithasone blocks sepsis-inducsd protection of the heart from ischemia reperfusion injury. P.S.E.B.M; **223:82-87.**

-Sreejayan N. and Rao M.N. (1994). Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol*; **46:1013**.

-Sreejayan N. and Rao M.N. (1996).Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung*; **46:169–171.**

-Starrs A., Orgeig S., Daniels C. (2001). Antioxidant enzymes in the developing lungs of egg-laying and metamorphosing vertebrates. *The Journal of Experimental Biology;* **204: 3973-3981**.

-Stein B, Frank P., Schmitz W., Scholz H., Thoenes M. (1996). Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol*; **28:1631–1639.**

-Steinmeyer J. (2000). Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res* ; **2 : 379-385.**

-Sun J., Zhang X., Broderick M., and Fein H. (2003).Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay.*Sensors*; **3:276-284.**

-Szabo C., Salzman AL., Ischiropoulos H. (1995). Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett* ; **363:235-238**.

-Szewczyk A. and Vojtczakn L. (2002). Mitochondria as pharmacological target. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; **54:101-127.**

-Tak P.P., Firestein G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases.*J Clin Invest*; **107:7–11.**

-Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T. (1999).Differential roles of TLR2 and TLR4 in

recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*; **11: 443–451.**

-Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V.(2001). Phosphorylation-dependent alteration in myofilament Ca2+ sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart. *Am J Respir Crit Care Med*; **163:362–367**.

-Taylor F.B, Wada Jr, H, Kinasewitz G. (2000). Description of compensated and uncompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) responses (non-overt and overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal *Escherichia coli* sepsis and in the human model of endotoxemia: toward a better definition of DIC. *Crit Care Med*; **28:12–19.**

-Thompson M., Kliwer A., Maass D., Becker L., White D.J.,Brayant D., Arteaga G., Horton J., Giroir B.P. (2000). Increased cardiomyocyte intracellular calcium during endotoxin-induced cardiac dysfunction in guinea pigs. *Pediatr Res***; 47: 669-676.**

-Tomita M., Holman B. J., Santoro C. P., and Santoro T. J. (2005). Astrocyte production of the chemokine macrophage inflammatory protein-2 is inhibited by the spice principle curcumin at the level of gene transcription. *J Neuroinflammation* ; **2** : **8**.

-Tslotou A.G., Sakorafas G.H., Anagnostopoulos G., Bramis J. (2005).Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*; **11: 76-85**.

-Unnikrishnan M. K and Rao M. N. (1992).Curcumin inhibits nitrite-induced methemoglobin formation. *FEBS Lett*; **301:195–196**.

-Vallance P., Moncada S. (1993).Role of endogenous nitric oxide in septic shock. *New Horizons*; **1:77-86.**

-Vallet B., Tavernier B. (1999).Physiopathologie du choc septique. *Conférences d'actualisation,* **p. 691-703**.

-Vallet B., Wiel E. (2001). Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med*; **29:36–41.**

-Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J.C., and Kuiper J. (2003). Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock.*Clinical Microbiology Reviews*; **16: 379-414.**

-Van Bost S., Mainil J. (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'Escherichia coli :(III) Production de toxines.*Ann. Méd. Vét ;* **147 : 327-342.**

-Van Epps D. E., Simpson S. J., Johnson R. (1993). Relationship of C5a receptor modulation to the functional responsiveness of human polymorphonuclear leukocytes to C5a. *J. Immunol*; **150:246-252.**

-Víctor M.V, Guayerbas N, De la Fuente M. (2002).Changes in the antioxidant content of mononuclear leukocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress Molecular and

Cellular. *Biochemistry*; **229: 107–111.**
-Virdis A., Colucci R., Fornai M., Blanbizzi C., Duranti E.,Pinto S., Bernardini N., Segnani C., Anatonioli L., Taddei S., Salvetti A., Del Tacca M. (2005). Cyclooxygenase-2 inhibition inprovesvascular endothelial dysfunction in rat model of endotoxic shock: Role of inductible nitric-oxide synthase and oxidative stress.*JPET*; **312: 945-953.**

-Vitoux D., Chappuis P., Arnaud J., Bost M., Accominotti M., Roussel AM. (1996). Sélénium, glutathion peroxydase, peroxydes et fonctions plaquettaires. *Ann Biol Clin*; **54: 181-187.**

-Weber W. M., Hunsaker L. A., Roybal C.N., Bobrovnikova-Marjon E.V., Abcouwer S. F., Royer R. E., Deck L. M., and Vander Jagt D. L. (2006).Activation of NFkappaB is inhibited by curcumin and related enones. *Bioorg Med Chem*; **14: 2450–2461.**

-Wheater P.R., Young B., Heath J.W. (2001). Histologie fonctionnelle. Ed De Boeck Université

-Wheeler A.P., Bernard G.R. (1999).Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med*; **340: 207-214**.

-Wenzel R.P (1992) .Anti-endotoxin monoclonal antibodies - a second look. *N Engl J Med*; **326:1151-1153**.

-Yang X., Thomas D. P., Zhang X., Culver B. W., Alexander B. M., Murdoch W. J., Rao M. N., Tulis D. A., Ren J. and Sreejayan N. (2006). Curcumin inhibits platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell function and injury-induced neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; **26**: **85–90.**

-Yokoyama T., Vaca L., Rossen R.D., Durante W, Hazarika P., Mann D.L. (1993).Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*; **92:2303–2323.**

-Yong K.L., Linch D.C**.** (1993). Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor differentially regulates neutrophil migration across IL-1-activated and nonactivated human endothelium. *J. Immunol*; **150:2449-2456.**

-Zingarelli B, Sheehan M, Wong H.R. (2003). Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*; **31:105–111.**

-Zsila F., Bikadi Z., and Simonyi M. (2003). Unique, pH-dependent biphasic band shape of the visible circular dichroism of curcumin-serum albumin complex. *Biochem Biophys Res Commun*; **301**:**776–782**.