

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DE SAAD DAHLAB BLIDA-1



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département De Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé

MEMOIRE DE MASTER EN BIOLOGIE

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Chef d'option : Dr. SAADI L.

THEME

**Rôle du stress oxydatif dans les altérations
pulmonaires induites par sepsis chez la souris.**

Présenté par

Casasni Youcef

et

Gacem Nessrine

Soutenu publiquement le 23 /09/2020, devant le jury composé de :

M^{me} Mokrane A.	Maitre de Conférences B	USDB1	Présidente
M^{me} Kanan A.	Maitre Assistante A	USDB1	Examinatrice
M^{me} Rahim I.	Maitre de Conférences B	USDB1	Promotrice
M^{me} AÏSSANI-EL FERTAS R.	Maitre de Conférences B	USDB1	Co-promotrice

Promotion 2019/2020

Remerciements

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

Nous avons l'honneur et le plaisir d'exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice M^{me} le Dr. RAHIM IBTISSEM, Maître de Conférences à l'USDB1, pour sa précieuse aide, ces orientations et le temps qu'elle nous a accordé pour notre encadrement.

Nous remercions notre Co-Promotrice M^{me} le Dr. AÏSSANIEL-FERTAS RADIA, Maître de Conférences à l'USDB1, pour son aide et sa compréhension ainsi que sa patience.

Nous remercions vivement les membres du jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre modeste travail. M^{me} MOKRANE, M^{me} KANANE, veuillez trouver ici l'assurance de notre profonde gratitude et l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

Nous adressons, aussi, nos sincères remerciements à M^{me} le Pr. SAADI LEILA, professeur et chef du département BPC à l'USDB1 pour la confiance et l'aide qu'elle nous a accordé.

Un grand merci à tous les enseignants que nous avons rencontrés durant notre parcours universitaire.

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

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

*A ma très **chère mère***

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré
d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.*

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

*Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études.
pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour. Qu'ALLAH te protège et
te*

donne la santé, le bonheur et longue vie.

*A la mémoire de mon **chère père***

*Ce travail est dédié à mon chère **papa** ,décédé très tôt , qui m' a toujours pousser et motivé
dans mes études .*

*J'espère , du monde qui est sien maintenant , il apprécie cet humble geste comme preuve de
reconnaissance de la part de sa grande fille qui a toujours prié pour le salut de son âme .*

Puisse dieu , le tout puissant ,de l'avoir en sa sainte miséricorde.

*A ma petite sœur adorée **SIRINE** et toutes mes petites cousines **Melissa** , , **Fouzia**
,Khadidja, chahrazed et mes tous petits cousins **Kenzy** et **Mohamed** pour leurs petits mots
d'amour et de soutiens .*

*A mes ancles **Zaki** et **Youcef** , ainsi que **Sidahmed** qui ont toujours été la pour moi .*

*A **Nessrine** une personne qui a une place spéciale dans mon cœur , une grande sœur.*

*Qui a été à mes cotés tous au long de cette année dure et qui a partager avec nous beacoup
de choses .*

*En particulier à Mon binôme **Youcef** un frère qui a toujours veiller à me soutenir et à
m'aider mille merci à lui.*

*Et à toute la promos **BMC** que j'aime tant un par un .*

NESSRINE

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

A mon très cher Père.....

Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie ,je **t'aime tellement** ...

A ma très chère mère

Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie tu m'a toujours soutenue

A mes très chères sœuretet mon frèreje vous souhaite tous le bonheur du monde.

A mon binôme **NESSRINE** pour tous les souvenirs pendant les années d'études ensemble surtout

les deux dernières années tu a une place dans mon cœur, t'es plus qu'une sœur.

YOUCEF

Le sepsis est un problème de santé mondiale, associant une exacerbation de la réponse de l'hôte vis-à-vis de l'agent infectant, un stress oxydatif et une défaillance d'organes. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme sévère de lésions pulmonaires aiguës (ALI, *Acute Lung Injury*) et survient chez 25% à 50% des patients atteints de sepsis.

L'objectif de notre méta-analyse, portant sur 16 travaux de recherche, est de mettre en exergue l'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par sepsis, dans différents modèles animaux d'une part, et d'autre part le rôle de la mélatonine dans la prévention de ceux-ci.

Les résultats montrent que le sepsis induit une mortalité chez les animaux et que la mélatonine prévient cette mortalité. La mélatonine réduit également la charge bactérienne dans les poumons et les liquides de lavage broncho-alvéolaire et péritonéal des animaux septiques.

Le sepsis induit une réponse inflammatoire systémique et pulmonaire associée à un stress oxydatif pulmonaire. La réponse inflammatoire est caractérisée par une augmentation du nombre de leucocytes (neutrophile, macrophage) des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, et IFN- γ). La mélatonine exerce un effet anti-inflammatoire systémique et diminue le nombre de leucocytes et de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) dans le sérum des animaux.

Le stress oxydatif induit par sepsis est caractérisé par une augmentation du taux des marqueurs pro-oxydant (MPO, MDA, NO) associé à une diminution des taux de marqueurs anti-oxydants (SOD, catalase, GSH) dans le poumon. La mélatonine exerce un effet antioxydant et rétablit la balance prooxydant/antioxydant.

Les résultats histologiques confirment une destruction de l'architecture du tissu pulmonaire, associé une forte activation de la réponse immuno-inflammatoire, avec une infiltration massive des leucocytes et la formation d'un œdème pulmonaire. La mélatonine prévient les dégâts pulmonaires induits par sepsis.

Ces aboutissements stimulent des éventualités très prometteuses quant à l'utilisation thérapeutique de la mélatonine comme traitement du sepsis.

Mots clés : Sepsis, stress oxydatif, inflammation, mélatonine, poumon.

Sepsis is a global health problem, combining an exacerbation of the host's response to the infectious agent, oxidative stress and organ failure. Acute respiratory distress syndrome (ARDS), a severe form of acute lung injury (ALI), occurs in 25% to 50% of patients with sepsis.

The objective of our meta-analysis on 16 research works is to highlight the involvement of oxidative stress in pulmonary alterations induced by sepsis in different animal models on the one hand, and on the other hand the role of melatonin in the prevention of these.

The results show that sepsis induces mortality in animals and that melatonin prevents this mortality. Melatonin also reduces the bacterial load in the lungs and bronchoalveolar and peritoneal lavage fluids of septic animals.

The oxidative stress induced by sepsis is characterized by an increase in the level of pro-oxidant markers (MPO, MDA, NO) associated with a decrease in the levels of anti-oxidant markers (SOD, catalase, GSH) in the lung. Melatonin exerts an antioxidant effect and restores the prooxidant / antioxidant balance.

The histological results confirm a destruction of the architecture of the lung tissue, associated with a strong activation of the immune-inflammatory response with massive infiltration of leukocytes and the formation of pulmonary edema. Melatonin prevents lung damage caused by sepsis.

These achievements stimulate very promising possibilities for the therapeutic use of melatonin as a treatment for sepsis

Keywords: Sepsis, oxidative stress, inflammation, melatonin, lung.

ملخص:

تعفن الدم مشكلة صحية عالمية، حيث تجمع بين تفاقم استجابة المضيف للعامل المعدي والإجهاد التأكسدي وفشل الأعضاء. متلازمة الضائقة التنفسية الحادة (ARDS)، وهي شكل حاد من الإصابات الرئوية الحادة (ALI)، تحدث في 25% إلى 50% من مرضى.

الهدف من التحليل على 16 بحثا هو تسليط الضوء على مشاركة الإجهاد التأكسدي في التغيرات الرئوية التي يسببها تعفن الدم وهذا يظهر في نماذج حيوانية مختلفة من ناحية، ومن ناحية أخرى دور الميلاطونين في الوقاية منها.

أظهرت النتائج أن تعفن الدم يؤدي إلى الموت من خلال التجارب على الحيوانات وأن الميلاطونين يمنع هذه الوفيات. كذلك يقلل الميلاطونين أيضًا من الحمل البكتيري في الرئتين وسوائل غسل القصبات الهوائية لحيوانات.

يؤدي تعفن الدم إلى استجابة التهابية جهازية ورئوية مرتبطة بالإجهاد التأكسدي الرئوي. تتميز الاستجابة الالتهابية بزيادة في عدد الكريات البيضاء (العدلات، الضامة) المستكينات المؤيدة للالتهابات ($TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ و $IL-6$ و $IFN-\alpha$) يمارس الميلاطونين تأثيرًا جهازيًا مضادًا للالتهابات ويقلل من عدد الكريات البيضاء والمستكينات المؤيدة للالتهابات ($TNF-\alpha$) ، $IL-1\beta$ ، $IL-6$ التي ظهرت في مصل للحيوانات.

يتميز الإجهاد التأكسدي الناجم عن تعفن الدم بزيادة في مستوى الواسمات المؤيدة للأكسدة (MPO)، (MDA)، المرتبطة بانخفاض مستويات الواسمات المضادة للأكسدة، الكاتالاز، في الرئة. الميلاطونين له تأثير مضاد للأكسدة ويعيد توازن مضادات الأكسدة.

تؤكد النتائج النسيجية تدمير بنية أنسجة الرئة، المرتبط بتنشيط قوي للاستجابة الالتهابية المناعية مع تسلل هائل لخلايا الدم البيضاء وتشكيل وذمة رئوية. والميلاطونين يمنع تلف الرئة الناجم عن تعفن الدم.

تحفز هذه الإنجازات إمكانيات واعدة للغاية للاستخدام العلاجي للميلاطونين كعلاج لتعفن الدم.

الكلمات المفتاحية: تعفن الدم، الإجهاد التأكسدي، الالتهاب، الميلاطونين، الرئة.

Figure	Titre	Page
Figure 1 :	Diagramme comparatif des définitions de sepsis décrites par les conférences de consensus de 1991 et 2016	4
Figure 2 :	Réponse immuno-inflammatoire au cours du sepsis	5
Figure 3 :	Altération des fonctions immunitaires (immunodépression) au cours du sepsis	8
Figure 4 :	Production des espèces réactives de l'oxygène/ de nitrogène (ROS/RNS) et leur neutralisation par des antioxydants	10
Figure 5 :	Biosynthèse de la mélatonine à partir de L-Tryptophane	13
Figure 6 :	Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants et antiapoptotique de la mélatonine	16
Figure 7 :	Effet de la mélatonine sur le sepsis induit par CLP chez les souris C57BL/6 et les rats sprague –Dawley	26
Figure 8 :	Effet de la mélatonine sur la charge bactérienne induite par CLP chez les souris C57BL/6	27
Figure 9 :	Effet de sepsis sur le taux de cytokines inflammatoires sériques, pulmonaires et du liquide broncho-pulmonaire	30
Figure 10 :	Effet de sepsis et de la mélatonine sur l'activité Myéloperoxydase (MPO)	34
Figure 11 :	Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux Malondialdhyde (MDA) pulmonaire et sérique	38
Figure 12 :	Effet de sepsis sur le taux de monoxyde d'azote (NO)	40
Figure 13 :	Effet de sepsis sur l'activité catalase et superoxyde dismutase (SOD) au niveau pulmonaire	43
Figure 14 :	Effet de sepsis sur le taux de glutathion (GSH) pulmonaire	45
Figure 15 :	Effet de la melatonine sur les dommages pulmonaires sur le sepsis induit par CLP chez les souris	47
Figure 16 :	Résultats histologiques du parenchyme pulmonaire à 72 après CLP chez le rat Sprague-Dawley	47
Figure : 17	Œdème pulmonaire induit par sepsis	49
Figure 18 :	Effet de la mélatonine dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis	52

Tableau	Titre	Page
Tableau I :	Matériels et méthodes	17
Tableau II :	Taux de protéines et de leucocytes du liquide de lavage broncho-pulmonaire	28
Tableau III :	Taux de cytokines inflammatoires systémiques et pulmonaires	29
Tableau IV :	Taux leucocytes et de cytokines systémiques	32
Tableau V :	Activité MPO pulmonaires et Péritonéale	34
Tableau VI :	Taux de MDA pulmonaires et sériques	36
Tableau VII :	Taux de NO pulmonaires et de pression artérielle moyenne (MAP)	40
Tableau VIII :	Activité catalase et SOD pulmonaires et sériques	40
Tableau IX :	Taux de glutathion pulmonaire	41
Tableau X :	Taux d'eau et d'œdème pulmonaires	48

ADNmt : Acide désoxyribo Nucleique mitochondirale

ALI :Acute Lung Injury

AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique

AP-1 : Activator protein 1

ATP : Adénosine Mono Phosphate

CD4 : Cluster de Différenciation des lymphocytes T4

CD8 : Dcluster de Différenciation des lymphocytes T8

CFU : Colony Forming Unit

CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée

CLP : Cecal Ligation Puncture

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

DCs : Dendritic Cells

GSH :Gluthation

GRd : Gluthation réductase

HE : Hématoxyline Eosine

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule (CD54)

ICR :Imprinting Control Region

IKK : IκB kinase

IL-6 : Iterleukine -6

iNOS :Oxyde Nitrique Synthase

IRF 3 : Interferon Regulatory Factor 3

LPS : Lipopolysaccharides

MDA : Malondialdéhyde

MPO : Myéloperoxidase

MYD88 : Myeloid Differentiation primary response 88 .

NF- κ B : Nuclear Factor κ B

NO : Monoxyde d'azote

NO_x :NAPH Oxydase

PBS : Phosphate Buffered Saline

Perf :Perforation

PN :polynucléaire

PRR : Patherns Recognition Receptors

RNS : Reactive Nitrogen species

ROR (alpha , beta , gamma) : RAR-related orphan receptor

ROS : Reactive oxygen Species

SDRA : Le syndrome de détresse respiratoire aigüe

SIRS :Syndrome deRéponse inflammatoire Systémique

SOD :Superoxyde Dismutase

TIRAP : adapter molecule associated with toll-like receptors

TLRs :Tool Like Receptors

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

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule.

Introduction	1
Chapitre 1 : Rappels bibliographiques	3
I .Sepsis	3
I.1.Définition du sepsis	3
I.2.Physiopathologie du sepsis	5
I.2.1.Phase hyper –inflammatoire	6
I.2.2.Phase d’immunodépression	7
I.3.Dysfonctionnement pulmonaire associée au sepsis	8
I.4.Stress oxydant cellulaire et sepsis	9
I.4.1.Définition du stress oxydant	9
I.4.2.Systemes pro- oxydant/antioxydant	9
I.4.3.Role du stress oxydant dans le sepsis	11
I.5.Modèles de sepsis	11
I.6.Mélatonine	12
I.6.1. Biosynthèse de la mélatonine	12
I.6.2.Mécanisme d’action de la mélatonine	13
I.6.3.Effets physiologique de la mélatonine	14
I.6.3.1. Effets antioxydant de la mélatonine	15
I.6.2.Effet régulateur de l’homéostasie mitochondriale	15
I.6.3.3.Effets sur le system immunitaire	15
I.6.4.Role thérapeutique de la mélatonine dans le sepsis	16
Chapitre 2 .Matériels et méthodes	17
II .1.Matériel	17
II.1.1.Matériel biologique	17
II.1.2.Matériel non biologique	17
II.2.Méthodes	20
II.2. 1.Evaluation de la survie des animaux	20
II.2. 2.Evaluation de la charge bactérienne	21

II.2.3. Etude de la réponse inflammatoire systémique et pulmonaire	21
II.2.3.1 Dosage des proteines du BALF	21
II.2.3.2. Dosage des leucocytes du BALF	21
II.2.3.3. Dosage des cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, INF gamma)	22
II.2.4. Etude du stress oxydant	22
II.2.4.1. Dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO)	22
II.2.4.2. Dosage du taux de malondialdhyde (MDA)	22
II.2.4.3. Dosage du taux de monoxyde d'azote (NO)	23
II.2.4.4. Dosage de l'activité superoxyde (SOD)	23
II.2.4.5. Dosage de l'activité catalase	23
II.2.4.6. Dosage du taux glutathion (GSH)	23
II.2.5. Etude histologique	23
II.2.5.1. Coloration hématoxyline –éosine	23
II.2.5.2. Evaluation du taux d'odème pulmonaire (ratio Wet/Dry)	24
II.2.5.3. Permeabilité vasculaire	24
Chapitre 3.Résultats et discussion	25
III.1.Résultats	25
III.1.1. La mélatonine réduit la charge bactérienne au cours de sepsis	26
III.1.2 . La mélatonine réduit une réponse inflammatoire systémique et pulmonaire	26
III.1.3. Le sepsis induit une réponse inflammatoire systémique et pulmonaire	27
III.1.4. La mélatonine diminue la réponse inflammatoire systémique induite par sepsis	31
III.1.5. Effet du sepsis et de la mélatonine sur l'activité myéloperoxydase (MPO), marqueur d'infiltration des neutrophiles	33
III.1.6. Effets du sepsis et de la mélatonine sur le taux de malondialdhyde (MDA), marquer de peroxydation lipidique	36
III.1.7. Effets du sepsis et de la mélatonine sur le taux NO, marqueur de l'activité NOS	39
III.1.8. Effets du sepsis et de la mélatonine sur l'activité catalase et superoxyde dismutase	41

III.1.9. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de glutathion réduit	44
III.10. La mélatonine prévient les dommages oxydatifs et inflammatoires pulmonaires par sepsis	46
III.2. Discussion générale	50
IV. Conclusion	53
V. Références bibliographiques	54

Introduction

Le sepsis est un syndrome de réponse inflammatoire systémique complexe et mortel, causé par une infection bactérienne, virale ou parasitaire. Plus de 30 millions de sepsis sont enregistrés chaque année, dans le monde avec un taux de mortalité des patients avoisinant les 40% (**Napolitano, 2018; Qiu et al., 2019**).

Jusqu'à aujourd'hui aucune thérapie ne semble efficace pour traiter le sepsis. Tous les essais thérapeutiques se sont révélés inefficaces voire délétères. La mortalité élevée et l'absence d'un traitement efficace reviennent à la physiopathologie complexe et ambiguë du sepsis. Ceci constitue, à l'heure actuelle, un défi majeur pour les chercheurs afin de définir, et cerner la physiopathologie de cette affection et la traiter de manière appropriée (**Laroye, 2017 ; Salomão et al., 2019**).

Le sepsis affecte plusieurs systèmes (redox, immunitaire, coagulation, métabolique ...) et organes (poumon, cœur, foie, rein,...) (**Pang et al., 2019 ; Danielski et al., 2020**). Le poumon est l'organe le plus vulnérable lors du syndrome septique. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme sévère de lésions pulmonaires aiguës (ALI, *Acute Lung Injury*), survient chez 25% à 50% des patients atteints de sepsis (**Bedirli et al., 2007 ; Choudhury et al., 2015**).

Un déséquilibre du système redox (oxydant /antioxydant) mène à un état de stress oxydatif caractérisé par une surproduction des ROS/RNS (**Migdal et Serres, 2011**).

La complexité du syndrome septique exige une molécule avec un effet pléiotrope comme la mélatonine (**Claustrat et al., 2015**).

Dans le cadre du projet de fin d'études, il nous a été proposé d'étudier à l'aide d'un modèle un modèle murin de sepsis polymicrobien, l'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induite par sepsis et l'effet de la mélatonine sur ces derniers. Nous avons pour objectifs de :

- ✓ Le développement d'un modèle murin de sepsis polymicrobien.
- ✓ Evaluer la réponse immuno-inflammatoire systémique au cours du sepsis par dosage de la CRP, FNS...
- ✓ Evaluer le statut redox pulmonaire par dosage des marqueurs de stress oxydatif, pro-oxydants (MDA, MPO, NO) et antioxydants (Catalase et GSH).

- ✓ Etudier les dommages pulmonaires induits par sepsis par une étude histologique.
- ✓ Evaluer les effets antioxydants et anti-inflammatoires de la mélatonine sur le sepsis induit par CLP.

La survenue de la pandémie au SARS-Cov2 et l'expansion de la COVID-19, avec le confinement qui s'en est suivi, a contraint les structures sanitaires et universitaires à arrêter toute activité. Nous avons ainsi effectué une méta-analyse de 16 travaux de recherche afin de répondre aux objectifs mentionnés précédemment.

I. Sepsis

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

En 2017, 11 millions de cas de décès par sepsis ont été signalés dans le monde parmi 48,9 millions cas enregistré. Le taux de mortalité était plus élevé chez les hommes comparés aux femmes (164,2/100 000 contre 134,1/100 000). Les nouveau-nés et les enfants ayant un âge <5ans (20,3 millions cas) ainsi que les personnes âgées de plus de 20ans (23,7 millions cas) étaient les plus touchés par le sepsis (**Rudd et al., 2020**).

I.1. Définition du sepsis

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

Le sepsis est un syndrome physiopathologique complexe et hétérogène, qui est causé par une réponse déséquilibrée et excessive de l'hôte à une infection.

En 1991, la première définition consensuelle du sepsis a été le Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SIRS) à une infection microbienne, avec SIRS attesté par la présence d'au moins deux critères parmi les 4 suivants: (i) température >38°C ou <36°C, (ii) fréquence cardiaque >90 battements/minute, (iii) fréquence respiratoire >20 cycles/minute ou pression artérielle en CO₂ <32 mmHg, (iv) nombre de globules blancs >12 000 cellules/μL ou <4 000 cellules/μL ou présence d'au moins 10% de granuleux immatures (**Singer et al., 2016**). Le SIRS pourrait s'aggraver en sepsis sévère (sepsis et dysfonctionnement d'un organe) puis en choc septique (sepsis et hypotension sévère) (**Bone et al., 1992**) (**Figure 1**).

Cette définition a connue deux mises à jours en 2001 et en 2016 et l'association entre l'inflammation et l'infection ainsi que les critères de SIRS ont été abandonnés (**Levy et al., 2001 ; Singer et al., 2016**). En effet, une réaction de l'hôte à une infection implique non seulement l'activation des réponses pro et anti-inflammatoires, mais également des modifications des voies non immunologiques (cardiovasculaire, autonome, neurologique, hormonal, métabolique et coagulation). De plus, l'utilisation de 2 critères de SIRS ou plus pour identifier le sepsis a été considéré d'une spécificité et une sensibilité inadéquates, étant

donné que la fièvre, la tachycardie, la tachypnée et les modifications des globules blancs pourraient refléter une infection seulement (Singer et al., 2016)

Le sepsis est maintenant défini comme un dysfonctionnement mortel d'organes causé par une réponse dysrégulée de l'hôte à l'infection. Il est aggravé en choc septique, caractérisé par des anomalies circulatoires, cellulaires et métaboliques particulièrement profondes augmentant le risque de mortalité (Singer et al., 2016).

Les nouveaux critères cliniques du sepsis incluent une infection suspectée ou confirmée avec un dysfonctionnement d'organe, identifié par une augmentation de deux points ou plus du score SOFA (*the Sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment*) (Tableau I).

Un score clinique simplifié et rapide appelé quickSOFA (qSOFA), utilisé en milieu extrahospitalier, est basé sur deux des critères cliniques suivants : (i) fréquence respiratoire ≥ 22 cycles/min, (ii) pression artérielle systolique ≤ 100 mm Hg (iii) Altération des fonctions supérieures (encéphalopathie ou syndrome confusionnel, score de Glasgow <14).

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

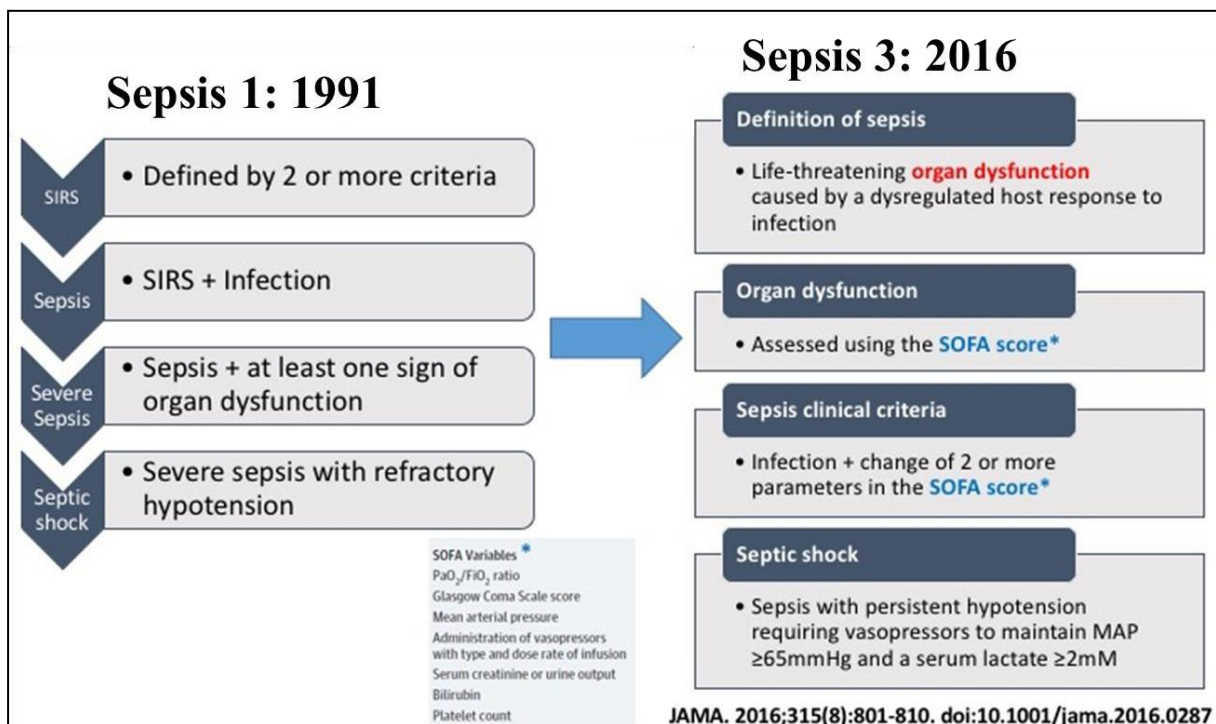


Figure 1. Diagramme comparatif des définitions de sepsis décrite par les conférences de consensus de 1991 et 2016 (Singer et al., 2016).

I.2. Physiopathologie du sepsis

Le sepsis est le résultat d'une activation excessive et maintenue du système immunitaire par des stimuli à la fois infectieux et non infectieux. La réponse de l'hôte durant les syndromes septiques est une succession de phases hyper inflammatoires et de phases d'immunodépression.

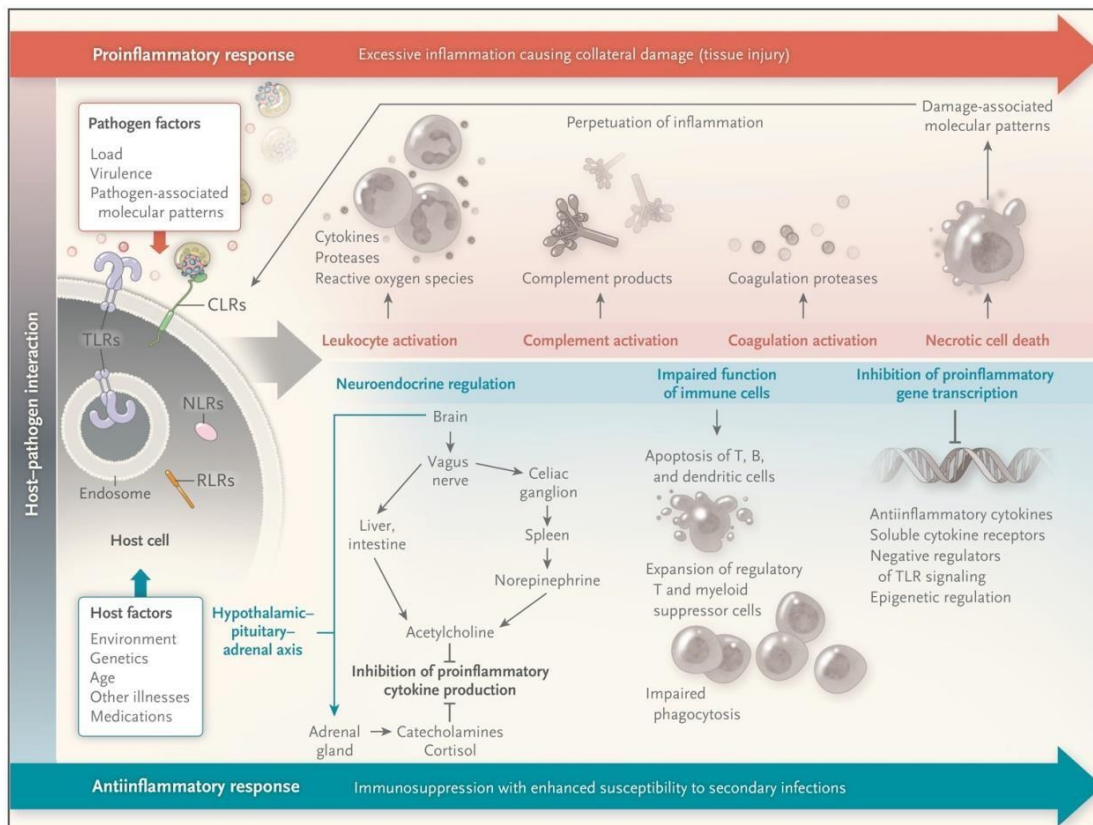


Figure 2. Réponse immuno-inflammatoire au cours du sepsis (Derek et al., 2013). La réponse de l'hôte lors du sepsis est caractérisée à la fois par des réponses pro-inflammatoires (en haut du panneau, en rouge) et des réponses immunosuppressives anti-inflammatoires (en bas du panneau, en bleu). La direction, l'étendue et la durée de ces réactions sont déterminées à la fois par les facteurs de l'hôte (par exemple, les caractéristiques génétiques, l'âge, les maladies coexistantes et les médicaments) et les facteurs pathogènes (par exemple, la charge microbienne et la virulence). Les réponses inflammatoires sont initiées par l'interaction entre les motifs moléculaires associés aux pathogènes exprimés par les agents pathogènes (PAMPs) et les récepteurs de reconnaissance de formes exprimés par les cellules hôtes à la surface cellulaire PRRs (récepteurs de type Toll [TLR] et récepteurs de lectine de type C [CLR]), sur la membrane plasmique, sur l'endosome (TLR) ou dans le cytoplasme (récepteurs de type gène 1 inductibles par l'acide rétinoïque [RLR] et récepteurs de type domaine d'oligomérisation se liant aux nucléotides [NLR]). La conséquence d'une inflammation exagérée est une lésion tissulaire collatérale et la mort nécrotique des cellules, ce qui entraîne la libération de modèles moléculaires associés aux dommages (DAMPs), des molécules dites de danger qui perpétuent l'inflammation au moins en partie en agissant sur les mêmes récepteurs PRRs qui sont déclenchés par des agents pathogènes.

I.2.1. Phases hyper-inflammatoires

Au cours du syndrome septique, le système immunitaire inné reconnaît par les récepteurs « PRR » (*Patterns Recognition Receptors*) des motifs hautement conservés spécifiques des pathogènes ou « PAMPs » (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou des motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires ou « DAMPs » (Alarmines, *Damage-Associated Molecular Patterns*). Il résulte de cette interaction une réaction inflammatoire qui débute par une phase pro-inflammatoire contrebalancée par une phase anti-inflammatoire excessive, maintenue et non équilibrée (**Figure 2**).

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

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

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

Les lymphocytes T effecteurs migrent vers le site infectieux et participent, de par leurs activités helper et cytotoxiques à l'amplification de la réponse immunitaire et à l'élimination des pathogènes et des cellules infectées. L'immunité humorale n'est pas en reste, puisque des anticorps immuns sont générés après activation, prolifération et différenciation des LB. Ces anticorps sont une fraction soluble très importante puisqu'elle est capable de neutraliser le germe infectieux et d'induire des mécanismes spécifiques tels que, l'activation du système du complément, l'opsonisation et l'ADCC (**Grimaldi, 2014**) (**Figure 2**).

Les réponses inflammatoires caractéristiques du sepsis comprennent également l'activation du système du complément, du système de coagulation et de l'endothélium vasculaire, dont les fonctions sont étroitement interconnectées et trans-réglées (**Van der Poll et al., 2017**). Une forte activation de ces derniers contribue au dysfonctionnement endothéliale, au défaut d'apport en oxygène dans les tissus (hypoxie), la formation de thromboses microvasculaires secondaires à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), au défaillances d'organes et éventuellement à la mort (**Bougle et Annane, 2007 ; Tesniere et al., 2008 ; Cimolai et al., 2015**).

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

I.2.2. Phase d'immunodépression

La deuxième phase de la réponse de l'hôte dans le syndrome septique est la phase d'immunodépression. Il s'agit d'une suppression immunitaire caractérisée par une altération des cellules immunitaires innées et adaptatives (apoptose, altérations fonctionnelles et modifications phénotypiques), qui ne seront plus capable de combattre l'infection. Des études indiquent que le sepsis est associé à une forte déplétion des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) et B et des cellules dendritiques (DC) qui subissent une apoptose ainsi qu'une reprogrammation des cellules présentatrice de l'antigène (monocytes/macrophages) (**Boomer et al., 2011 ; Hotchkiss et al., 2013**) (**Figure 3**).

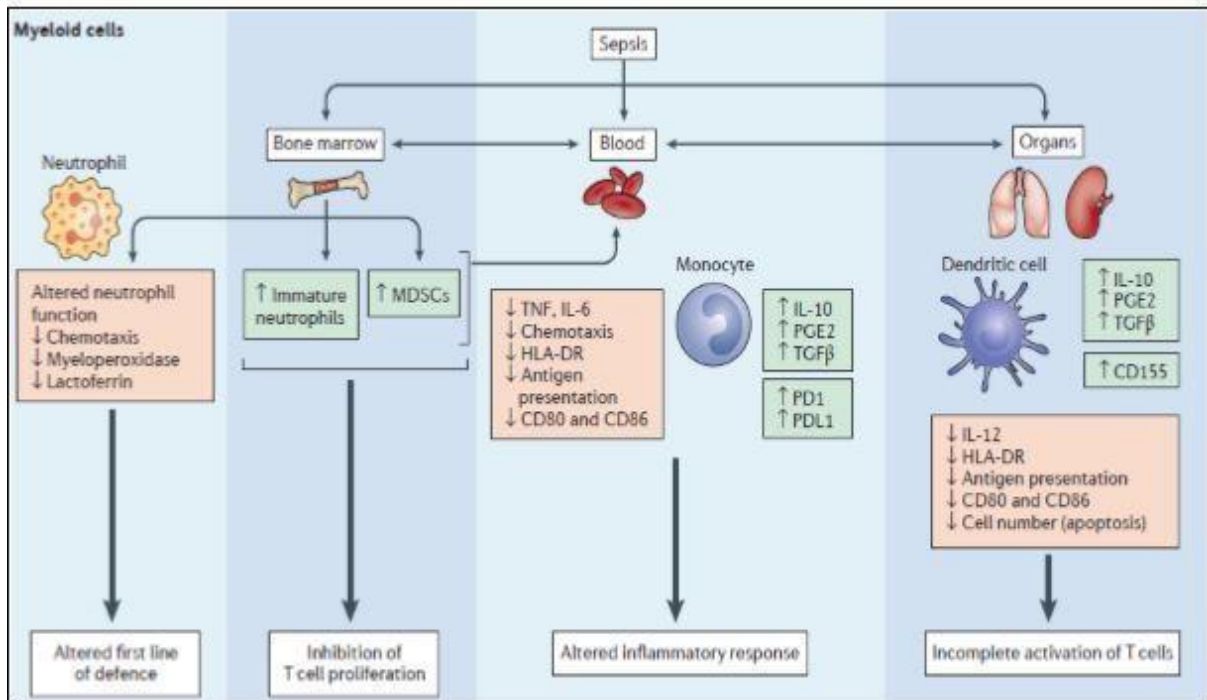


Figure 3. Altération des fonctions immunitaires (immunodépression) au cours du sepsis (Venet et Monneret., 2017). La réponse immunitaire innée est modifiée après sepsis chez les patients ainsi que dans les modèles murins. Ces altérations immunitaires se produisent non seulement dans le sang, mais également dans la moelle osseuse et dans les organes distants du site initial de l'infection. Ces altérations incluent, (i) une libération excessive, par la moelle osseuse, de neutrophiles immatures et de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (ii) des altérations fonctionnelles des neutrophiles matures, (iii) des altérations phénotypiques et fonctionnelles des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques, (iv) ces altérations concernent des fonctions effectrices diminuées, la production accrue de médiateurs anti-inflammatoires et une augmentation de l'expression des inhibiteurs des points de contrôle immunitaires. Ces modifications sont délétères pour l'hôte, elles entraînent une diminution de la réponse de première intention contre l'infection et une modification des fonctions des lymphocytes T.

I.3. Dysfonctionnement pulmonaire associé au sepsis

Le poumon est l'organe le plus vulnérable lors du syndrome septique. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une forme sévère de lésions pulmonaires aiguës (ALI, *Acute Lung Injury*), survient chez 25% à 50% des patients atteints de sepsis (Cohen, 2002). L'ALI est caractérisé par un œdème alvéolaire, une insuffisance respiratoire hypoxémique aiguë et une réponse inflammatoire pulmonaire accrue (Bedirli et al., 2007 ; Choudhury et al., 2015).

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

Malheureusement et malgré des décennies de recherche, il n'existe aucune stratégies de prévention ni de thérapie efficaces pour l'ALI en raison des complications de l'étiologie et de la pathogenèse de l'ALI.

I.4. Stress oxydant cellulaire et sepsis

I.4.1. Définition du stress oxydant

Dans des conditions physiologiques, une production contrôlée et à des doses raisonnables des espèces réactives de l'oxygène/nitrogène (ROS/RNS) est indispensable à de nombreuses fonctions physiologiques comme la signalisation cellulaire, la mort cellulaire programmée et la réponse immunitaire (**Ye *et al.*, 2015 ; Belaïch, 2016**). Le taux des ROS/RNS est maintenu à des concentrations physiologiques grâce à un équilibre entre leur production par le système pro-oxydant et leur élimination par le système antioxydant.

Cependant, un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydant/antioxydant, en faveur d'une surproduction de ROS/RNS, pourrait survenir lorsque les défenses anti-oxydantes sont surmené par l'augmentation des oxydants ou affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants. Cette rupture de l'homéostasie redox est appelée stress oxydant (**Kirschvink *et al.*, 2008 ; Migdal et Serres, 2011**).

I.4.2. Systèmes pro-oxydant/antioxydant

Les ROS/RNS cellulaires sont générés principalement par la chaîne respiratoire mitochondriale mais également par des enzymes dont la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et la NOSynthase.

Les ROS résultent d'une réduction de l'oxygène moléculaire (O_2) alors que les RNS sont issus de l'azote (N). Ainsi, la réduction électronique de l'oxygène donne l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui constitue une espèce radicalaire toxique à de forte concentration. Ainsi, le système

antioxydant s'adapte aux taux de ROS et l'anion superoxyde est rapidement transformé par une réaction de dismutation en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), catalysée par une enzyme antioxydante la superoxyde dismutase (SOD). Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas en soi un radical mais une molécule oxydante, il est lui-même toxique et capable de donner naissance, *via* des réactions de type « réaction de Fenton », à la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, le radical hydroxyle $\cdot OH$. Le peroxyde d'hydrogène est transformé en eau par la catalase (CAT) et par le système antioxydant de glutathion peroxydase/ Glutathion réduit (GPx/GSH) (Bouguirne, 2012 ; Shah *et al.*, 2014).

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

Les ROS/RNS produites altèrent les molécules cellulaires (ADN, protéines, lipides et glucides) conduisant au dysfonctionnement d'organes caractéristique de sepsis (Galley, 2011 ; Nagar, 2018).

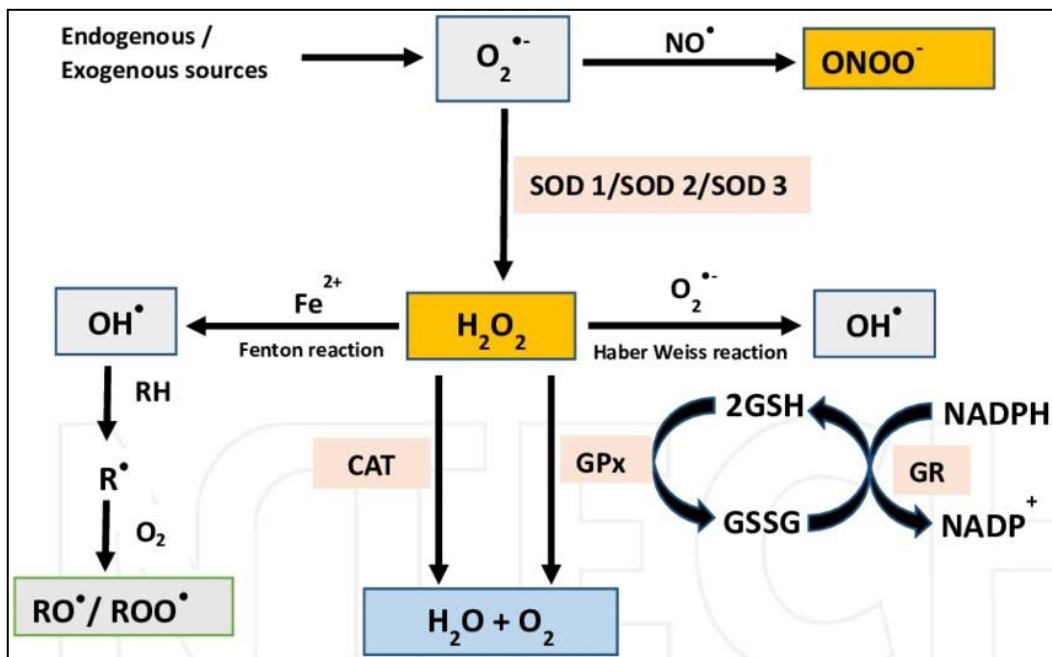


Figure 4. Production des espèces réactives de l'oxygène/ de nitrogène (ROS/RNS) et leur neutralisation par des antioxydants (Olawale *et al.*, 2015). CAT : catalase; GPx : glutathion peroxydase; GR : glutathion réductase; SOD:superoxyde dismutase; RH : lipide membranaire; R., radical alkyle.

I.4.3. Rôle du stress oxydant dans le sepsis

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

Néanmoins, l'importance du stress oxydatif est sous-estimée malgré les preuves de son rôle central dans la pathogénèse du sepsis. La notion de stress oxydatif n'a pas été soulignée dans les directives de la dernière conférence de consensus de 2016.

I.5. Modèle de sepsis

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

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

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

Le modèle de péritonite est celui qui est le plus souvent utilisé. Il s'agit d'une ligature et ponction cœcale (CLP). Ce modèle, décrit il y a plus de trente ans, consiste à exposer le cæcum pour le ligaturer puis le perforer avec une aiguille. Ce modèle comporte à la fois une

infection bactérienne mais également une atteinte ischémique du tube digestif (**Bouroche, 2012**).

Le modèle monobactérien est aussi utilisé pour induire le sepsis, par injection d'une dose sublétales d'une suspension bactérienne en intra-péritonéale ou en intraveineuse. Une variété d'espèces bactériennes est utilisée pour induire le sepsis particulièrement le Gram négatif à leur tête *Escherichia coli*. Théoriquement toutes les bactéries à Gram négatif pathogène opportunistes pour l'homme peuvent être utilisées dans des modèles murins de sepsis. Nous citons : *Klebsiella pneumoniae* (**Toky et al., 2003**), *Serratia marsescens* (**Iwaya et al., 2005**), *Salmonella* (**Mathur et al., 2012**).

I.6. Mélatonine

La mélatonine ou N-acétyl-5-méthoxytryptamine », fut isolée et identifiée pour la première fois en 1958 par un dermatologue Américain, Aaron Lerner. Il s'agit d'une neurohormone principalement synthétisée par l'épiphyse ou glande pinéale. Son nom vient du grec μελας [*melas*]= noir et πονος [*tonos*]= tension qui signifie concentration, revient au fait qu'elle éclaircit la peau de grenouille, par agrégation des mélanophores (**Lerner et al., 1959**).

I.6.1. Biosynthèse de la mélatonine

Bien que principalement synthétisée par la glande pinéale, la mélatonine peut également être synthétisée dans des proportions infimes par d'autres organes et tissus tels que la rétine, le tractus gastro-intestinal, les follicules pileux épithéliaux, la peau, la rétine, les globules rouges et les plaquettes (**Favero et al., 2017**).

La mélatonine est synthétisée et sécrétée chez tous les mammifères selon un rythme circadien dont le pic plasmatique coïncide toujours avec une période d'obscurité. Elle est synthétisée dans les pinéalocytes dans la glande pinéale à partir du L-tryptophane. Le L-tryptophane est d'abord hydroxylé en 5-hydroxytryptophane par la L-tryptophane hydroxylase avant d'être décarboxylé par un aminoacide décarboxylase pour donner la sérotonine (5-hydroxytryptamine). La sérotonine est ensuite N-acétylée par la N-acétyl-transférase (NAT) et O-méthylée par l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) pour donner la mélatonine (**Claustrat et al., 2015**). Une fois produite, la mélatonine est rapidement libérée dans le sang veineux pour accéder à tous les tissus, les compartiments cellulaires et les fluides (**Venegas et al., 2012 ; Acuña Castroviejo et al., 2014**). Cependant, le profil

plasmatique de la mélatonine varie de façon journalières, annuelles, interindividuelles (selon le chronotype) mais aussi au cours de la vie d'un même individu.

La demi-vie d'absorption est de 0,4 heure et les taux augmentent dans le plasma au bout de 30 min à 3 heures (Villette, 2017).

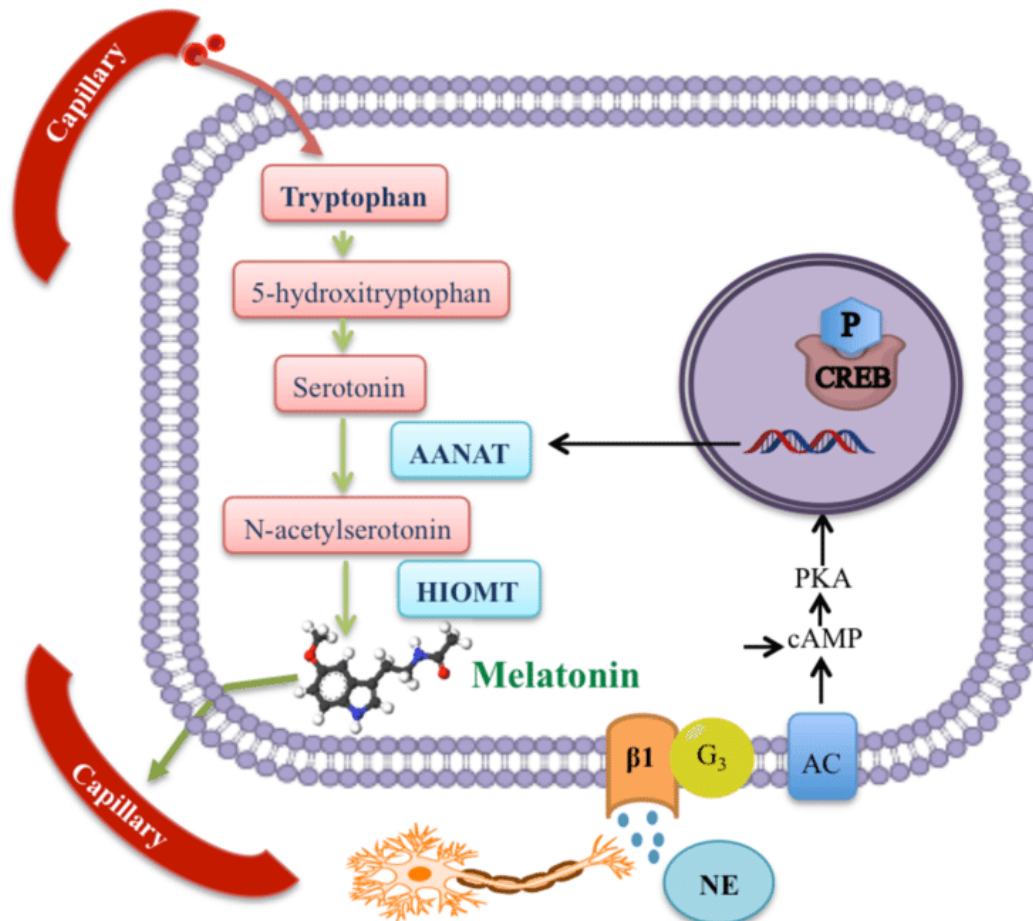


Figure 5. Biosynthèse de la mélatonine à partir de L-Tryptophane (Awad Alkozi, 2019).

AANAT : arylalkylamine N-acétyltransférase; AC : adénylate cyclase; HIOMT : hydroxyindole-O-méthyltransférase; cAMP :cyclic adenosine monophosphate; CREB : cAMP response element-binding protein; NAS : N-acetyl 5-méthoxytryptamine; NE : norépinephrine; PKA : protéine kinase A.

I.6.2. Mécanisme d'action de la mélatonine

Tout comme d'autres hormones, la mélatonine agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires et nucléaires. Toutefois, la mélatonine pourrait agir par d'autre mécanismes, parmi lesquels : interaction avec des protéines cytosoliques, interaction avec les mitochondries, neutralisation des ROS/RNS (Acuña Castroviejo et al., 2007).

- **Les récepteurs membranaires**

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

- **Les récepteurs nucléaires**

La mélatonine ne semble pas se lier qu'à des récepteurs membranaires, mais également à des sites de liaisons intracellulaires. Elle est dotée d'une forte lipophilie, ce qui lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires (**Ambroise-Thomas, 1998**). Un récepteur nucléaire mélatoninergique a été identifié. Il fait partie de la famille de la superfamille des récepteurs nucléaires orphelins RZR/ROR (*retinoid-related orphan receptor/retinoid Z receptor*), constitué de trois sous-types (α , β et γ) (**Wang et al., 2015**). Le ROR α est ubiquitaire et est largement exprimé dans les tissus périphériques, en particulier le foie, les muscles et dans les leucocytes sanguins. Le ROR β est exprimé dans le cerveau au niveau de la glande pinéale, de l'hypothalamus et du thalamus alors que le ROR γ est exprimé dans les muscles squelettiques, le thymus, le pancréas, la prostate, le cœur et le foie.

Ces récepteurs nucléaires orphelins pourraient jouer un rôle dans l'action immunomodulatrice de la mélatonine (**Wang et al., 2015**). Ces facteurs de transcriptions régulent de nombreux processus biologiques comme le développement embryonnaire, le rythme circadien, les processus de différenciation et de prolifération cellulaire, la réponse immunitaire et le métabolisme cellulaire. Ceci aurait pour effet la régulation de l'expression d'enzymes anti-oxydantes, telles que la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GRd) et la superoxyde dismutase (SOD), et la régulation négative des enzymes pro- oxydantes, telles que les NOS, en particulier les iNOS (**Sarti et al., 2013**).

I. 6. 3. Effets physiologiques de la mélatonine

Le rôle de la mélatonine dans l'homéostasie du corps humain n'est pas encore bien connu. Néanmoins différentes études ont permis de mettre en évidence l'influence de celle-ci sur

différents processus physiologiques. Ainsi, l'action principale de la mélatonine *in vivo*, semble-t-elle être en rapport avec la synchronisation des rythmes nycthémeraux liée à l'environnement.

I.6.3.1. Effets antioxydants de la mélatonine

La mélatonine est une molécule riche en électrons, et est capable de céder ces électrons pour neutraliser directement les ROS/RNS dont : le radical hydroxyle OH•, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le peroxy-nitrite (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001). En outre, la mélatonine active le système antioxydant et stimule l'expression des enzymes antioxydantes. Elle régule l'expression de la catalase, et de la SOD et augmente l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GRd) (Acuña Castroviejo *et al.*, 2007 ; Ortiz *et al.*, 2014). Elle stimule le cycle de glutathion (GSH) et régule ainsi la balance du glutathion oxydé (GSSG)/glutathion réduit (GSH) (Urata *et al.*, 1999).

I.6.3.2. Effets régulateurs de l'homéostasie mitochondriale

La mélatonine s'accumule dans les mitochondries à des concentrations élevées, où elle élimine les ROS/RNS. Elle protège également la cardiolipine de l'oxydation et prévient les complexes des chaînes respiratoires, ainsi que l'ADNmt des attaques des radicaux libres, protégeant ainsi le port de transition de perméabilité membranaire (mPTP), empêchant l'apoptose cellulaire (Sarti *et al.*, 2013). Cependant, l'effet régulateur de l'homéostasie mitochondriale de la mélatonine ne semble pas se limiter à son pouvoir antioxydant exercer à l'intérieur de la mitochondrie, mais également à de multiples effets sur la mitochondrie, parmi lesquels : l'augmentation de la biogenèse mitochondriale, la prévention de l'apoptose par modulation de l'homéostasie du calcium (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2017).

I.6.3.1. Effets sur le système immunitaire

La mélatonine exerce un effet immunostimulant *via* l'activation des récepteurs de haute affinité exprimés à la surface des cellules immunocompétentes (lymphocytes et neutrophiles circulants et lymphocytes T helper). Il a été rapporté, qu'en se liant aux cellules immunocompétente et surtout au niveau des LT CD4+, la mélatonine pourrait stimuler la synthèse de lymphokines (IL-2, IFN- γ), ainsi que des peptides opioïdes et moduler les fonctions immunitaires. De plus, les IFN- γ augmentent la production de la mélatonine par les lymphocytes T humains et les macrophages *in vitro* (Bruls *et al.*, 2000 ; Devavry, 2011).

I.6.4. Rôle thérapeutique de la mélatonine dans le sepsis

Les effets bénéfiques de la mélatonine dans le sepsis ont été démontrés aussi bien dans des études sur des modèles animaux et sur des patients. Ceci pourrait être expliqué par l'effet pléiotrope, antioxydant, anti-inflammatoire, anti-apoptotique, que présente la mélatonine (Wei Hu et al., 2017). Plusieurs études rapportent cet effet protecteur :

- La mélatonine inhibe la réponse inflammatoire et diminue la mortalité induite par le sepsis dans différents modèles de sepsis (Fink et al., 2014 ; Rahim et al., 2017 ; Wei Hu et al., 2017).
- La mélatonine administrée chez des patients atteints de sepsis prévient la mortalité, réduit le stress oxydatif, améliore l'état clinique et les paramètres biochimiques des patients (Gitto et al., 2001 ; El Fragy et al., 2015 ; Madrid-Navarro et al., 2015).

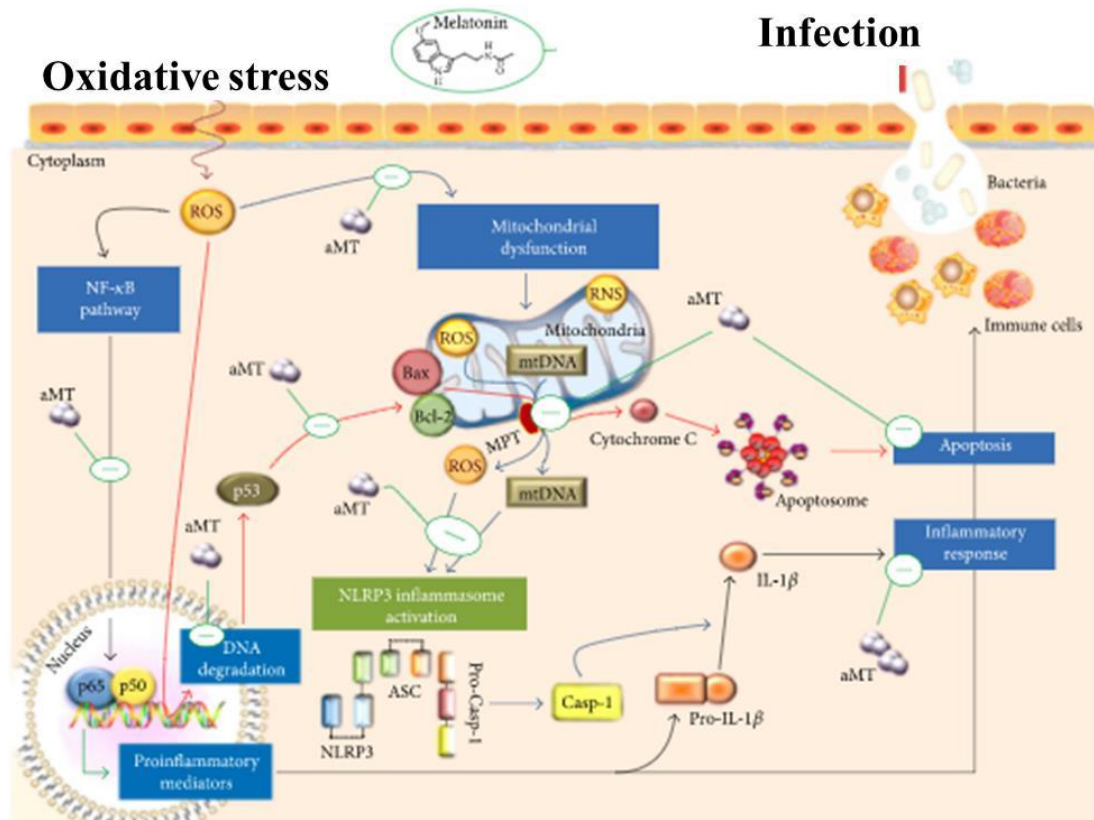


Figure 6. Schéma récapitulatif de certains mécanismes moléculaires à la base des effets anti-inflammatoires, antioxydants et antiapoptotiques de la mélatonine. aMT : mélatonine, adaptée de (Favero et al., 2017).

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Biologie Cellulaire et Moléculaire, nous devons réaliser un travail de recherche sur les altérations pulmonaires stress oxydant-dépendante induite par sepsis ainsi que le rôle de la mélatonine. Ce travail devait se réaliser en collaboration avec 3 laboratoires :

- ✓ Laboratoire de pédagogie Biologie Cellulaire et Moléculaire de la FSB de l'université de Blida 1.
- ✓ Laboratoire de pharmacologie cellulaire et signalisation de la FSB-USTHB.
- ✓ Laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC d'Alger

La survenue de la pandémie au SARS-Cov2 et l'expansion de la COVID-19 a profondément touché plusieurs secteurs, notamment l'enseignement supérieur et la recherche scientifiques, dans le monde et en Algérie. Dans ces circonstances, exacerbées par le confinement total de la wilaya de Blida, premier foyer de l'infection et lieu de notre résidence, notre travail est limité à une méta-analyse.

Ainsi, notre étude est une méta-analyse de 16 travaux de recherche dont 15 articles et un mémoire de master. Ces travaux de recherche répondent à nos objectifs axés sur :

- L'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par sepsis dans différents modèles animaux.
- Le rôle de la mélatonine dans la prévention du stress oxydatif, de la réponse inflammatoire et des altérations pulmonaires induits par sepsis.

II.1. Matériel

Nous avons élaboré une synthèse des différents travaux de recherche mentionnée en tableau I. Différents modèles murins de souris (C57BL/6, BALB/c, ICR *Imprinting Control Region*) ou de rats (Wistar, Sprague–Dawley) ont été utilisés. Des modèles expérimentaux de sepsis polymicrobien (CLP, *Cecal Ligation Puncture* ou FIP, *Feces-Injection-in-Peritoneum*) ou par endotoxémie (LPS, *LipoPolySacharide*) ont été également élaboré (**Rahim et al., 2012 ; Chen et al., 2014 ; An et al., 2016 ; Chen et al., 2018 ; Hong et al., 2018 ; Cardoso- Sousa et al., 2019 ; Cinar et al., 2019 ; Kingir et al., 2019 ; ;Li et al., 2019 ; Qin et al., 2019 ; Xu et al., 2019a ; Xu et al., 2019b ; Akbulut et al., 2020 Ibrahim et al., 2020 ; Kostakoglu et al., 2020 ; Wang et al., 2020**).

Tableau I : Récapitulatif des 16 études utilisées en méta-analyse.

Etude	Espèces	Sexe/ (n/groupe)	Modèle de sepsis	Traitement
Rahim et al., 2012	Rats Wistar (200 ±97g)	Mâle ♂ (n=7)	FIP (24h/72h) 200 mg/kg/ip Poumon	- Protocole :2 lots (C, FIP 24h/72h). Les rats ont été sacrifiés après 24h 72h de sepsis. - Paramètres : Histologie du poumon H-E ; stress oxydatif pulmonaire (MPO MDA, GSH, catalase) .
Chen et al., 2014	Rat Sprague–Dawley (350-400 g)	Mâle ♂ (n=10)	CLP+aMT(72) Poumons	- Protocole : 3 lots (CS, CLP, CLP+Mel); la mélatonine administrée à 20mg/kg/ip à 30min puis 50mg/kg/ip à 6h, 24h. - Sacrifice après 72h de CLP. - Paramètres : Survie, IL-6, GB sérique ; Histologie du poumon H-E.
An et al., 2016	Rat Sprague–Dawley (220-250g)	Mâle ♂ Survie 7j (n=20) Dosage (n=8)	CLP+aMT(48h) sérum	- Protocol :3lots(C,CLP,CLP+Mel) ;la mélatonine administrée à 300mgr/kg/ip à 3h,6h,12h,18h,24h.Animaux sacrifiés après 48h de CLP. - Paramètres :Catalase , SOD,MDA , TNF α , IL-1 β dans le sérum.
Chen et al., 2018	Rat Sprague–Dawley (180–220 g)	Mâle ♂ (n=6)	CLP (18h) Poumon	- Protocole :2 lots : CS, contrôle Sham ; CLP 18h. - Paramètres : Histologie du poumon H-E ; Stress oxydatif pulmonaire (MDA)
Hong et al., 2018	Souris C57BL/6	Mâle ♂ (n=10)	LPS (4h) (4mg/kg/ip) ; FIP (6h) (3.75g/kg, i.p) Poumon, sérum	- Protocole : 4 lots (C, FIP 6h; C, LPS 4h). Les souris ont été sacrifiées après 4h de LPS et après 6h de FIP. - Paramètres : survie; Histologie du poumon H-E; stress oxydatif pulmonaire (MPO, MDA, GSH, SOD) ; Cytokines sériques (IL-6, TNF- α).
Cardasso-Soussa et al., 2019	Rats Wistar (260g)	Mâle ♂	CLP (12h) Poumon droit BALF	- Protocole :2lots :contrôle Sham ;CLP24h. - Paramètres : Cytokines pro-inflammatoire IL-1 β et IFN γ , protéines dans le BALF (liquide fluide) de lavage broncho – alvéolaire) ;Histologie pulmonaire H-E ;stress oxydatif(MDA,SOD,catalase) pulmonaire.
Cinar et al., 2019	Rats wistar (250-300g)	Femelle ♀ (n=6)	CLP (12h) poumons	- Protocole : 2lots (CS,CMel CLP,CLP+Mel). - paramètres : histologie du poumons H-E ; stress oxydatif pulmonaire (MDA).
Li et al., 2019	Souris C57BL/6 (20-25g)	Mâle ♂ (n=9)	CLP (12 /24h) Poumons , sérum	- Protocol :2lots(CS,CLP 12h /24h) de CLP. Les souris ont été sacrifiées après 48h de CLP. - paramètres : survie, Histologie du poumons H-E ; stress oxydatif pulmonaire (MPO ,MDA,GSH,SOD),cytokines sérique (IL-6, TNF- α).

Qin et al., 2019	Souris BALB/c (20-25 g)	Femelle ♀	LPS (48h) (4mg/kg/intratrachéal)-4ml/kg Poumon, BALF, Sérum	- Protocole :2 lots (C, LPS 48h). Les souris ont été sacrifiées après 48h de LPS. - Paramètres : Histologie du poumon H-E ; cytokines sériques (IL6, TNF-α).
Xu et al., 2019a	Souris C57BL/6	Mâle ♂ (n=10)	CLP +aMT (24h) Poumon	- Protocole : 3lots (CS, CMel CLP, CLP+Mel); la mélatonine administrée à 50mg/kg/ip 30min avant CLP puis 50mg/kg/ip à 30min après CLP. Les souris ont été sacrifiées après 24h de CLP. - Paramètres : Survie; Histologie du poumon H-E, charge Bactérienne pulmonaire, dans le BALF et le péritoine ; MPO active dans le péritoine.
Xu et al., 2019a	Souris C57BL/6	Mâle ♂ (n=10)	CLP +aMT (24h) Poumon	- Protocole : 3lots (CS, CMel CLP, CLP+Mel); la mélatonine administrée à 50mg/kg/ip 30min avant CLP puis 50mg/kg/ip à 30min après CLP. Les souris ont été sacrifiées après 24h de CLP. - Paramètres : Survie; Histologie du poumon H-E, charge Bactérienne pulmonaire, dans le BALF et le péritoine ; MPO active dans le péritoine.
Xu et al., 2019b	Souris C57BL/6 (20-25 g)	Mâle ♂ (n=10)	CLP (24h) Poumon	- Protocole :2 lots (CS, CLP 24h). Les souris ont été sacrifiées après 24h de CLP. - Paramètres : survie; Histologie du poumon H-E, stress oxydatif pulmonaire (MPO, MDA, NO, SOD) ; Cytokines sériques (IL-6, TNF-α).
Wang et al., 2020	Souris ICR(20-25 g)	Femelle ♀	LPS (24h) (8mg/kg/ip)-2mg/ml Poumon, BALF, Sérum	- Protocole :2 lots (C, LPS 24h). Les souris ont été sacrifiées après 24h de LPS. - Paramètres : Histologie du poumon H-E, stress oxydatif sérique (SOD MDA) Protéines, leucocytes et Cytokines (IL6, IL-1β, TNF-α) dans le BALF.
Akbulut et al.,2020	Rats Wistar (200-300g)	Mâle ♂ n=18	CLP-aMT (12h/24h) sérum	- Protocol: 3lots:Cs , controle Sham; CLP 12h de lumière ; CLP 24h de lumière. -Effet d'une privation de la mélatonine sur le sepsis . - Les animaux soumis à un cycle de lumière blanche continue (202lux) pendant 24h pendant 10j, et sacrifier à 12h et 24h. - Paramètres : Survie , leucocytes, MDA.
Ibrahim et al.,2020	Rats Wistar (200+/-97g)	Mâle ♂ (n=10)	CLP(24) Poumons ,BALF,Sérum	-2lots (CS,CLP24h). les rats ont été sacrifié 24h après CLP. - paramètres : Histologie du poumon H-E ; stress oxydatif pulmonaire (SOD ;MDA ;GSH).taux de proteines et de leucocytes dans le BALF ; cytokines sérique (IL-6).

Kostaoglu et al.,2020	Rats Sprague-Dawley (290+/-10g)	Femelle ♀ (n=8)	CLP(16h) poumons	-Protocol :2lots (C,CLP,16h). Les rats ont été sacrifiés après 16h de CLP. -paramètres :Histologie du poumons H-E ;stress oxydatif pulmonaire (MDA,GSH,MPO) ; cytokines pulmonaires (IL-1β , TNF-α).
Wang et al .,2020	Souris ICR(20-25g)	Femelle ♀	LPS(24h) (8mg/kg/ip)-2mg/ml Poumon,BALF,sérum	-Protocol:2lots(CS,CLP24). Les souris ont été sacrifiées après 24h de LPS. -Paramètres :Histologie du poumons H-E,stress oxydant pulmonaire (SODMDA,GSH) ; taux de proteines ,leucocytes; cytokines (IL-6, IL-1β , TNF-α).

BALF : liquide (fluide) de lavage broncho-alvéolaire ; CLP : Cecal Ligation Puncture ; CS : contrôle Sham ; GSH : Glutathion réduit ; H-E : hématoxyline-éosine ; MPO : Myéloperoxydase ; MDA: Maldondialdéhyde, NO : monoxyde d'azote ; PerF : liquide (fluide) péritonéal ; SOD : Superoxyde dismutase.

II.2. Méthodes

1. Evaluation de la survie des animaux

La survie et la mortalité des animaux septiques ont été étudiées dans différents modèles expérimentaux. Toutefois nous avons choisi de présenter uniquement deux études qui ont mis en évidence l'effet de la mélatonine sur la mortalité des animaux septiques.

Dans la première étude de **An et al. (2016)** trois groupes de rats Sprague–Dawley ont été utilisés :

- Un groupe de rats contrôle-Sham ($n=20$) qui subissent une chirurgie sans ligature ou perforation cæcale.
- Un groupe de rats septiques ($n=20$) qui ont été sujets à une ligature et ponction cæcale (CLP). Il s'agit d'un modèle de sepsis polymicrobien le plus utilisé, décrit il y a plus de trente ans, et qui consiste à exposer le cæcum pour le ligaturer puis le perforer avec une aiguille (**Bouroche, 2012**).
- Un groupe de rats septiques traités par une dose 30mg/kg/ip de mélatonine ($n=20$) injectée à 3h, 6h, 12h, 18h, et à 24h après CLP. Le taux de survie des animaux a été suivi pendant 7 jours (**An et al., 2016**).

Dans la deuxième étude de **Xu et al. (2019a)** deux groupes de souris C57BL/6 ont été utilisés :

- Un groupe de souris septiques induit par CLP ($n=10$).
- Un groupe de souris septiques traité par 50 mg/kg/ip de mélatonine ($n=10$) administrée 30 minutes avant et 30 minutes après CLP. Le taux de survie des animaux a été suivi pendant 4 jours (**Xu et al., 2019a**).

2. Evaluation de la charge bactérienne

Dans le but d'estimer la virulence bactérienne ainsi que le rôle antiseptique de la mélatonine, la charge bactérienne a été déterminé dans les homogénats pulmonaires, le liquide (fluide) de lavage broncho-alvéolaire (BALF) et dans le liquide péritonéal (PerF).

Les poumons des souris C57BL/6 ont été homogénéisés dans 1 mL de PBS, puis 50 μ L d'homogénats ont été cultivé sur gélose au sang. Le fluide péritonéal et BALF ont été aussi cultivés sur gélose au sang après 24h de CLP. Le nombre CFU dans chaque boîte est obtenu après dénombrement de toutes les colonies bactériennes (**Xu et al., 2019a**).

3. Etude de la réponse inflammatoire systémique et pulmonaire

3.1. Dosage des protéines du BALF

Le liquide (fluide) de lavage broncho-alvéolaire a été récolté par aspiration d'eau physiologique injecté à raison 1mL dans la trachée des animaux anesthésié.

Le taux de protéine dans le BALF a été mesuré par méthode colorimétrique de Bradford ou par Kit (**Cardoso-Sousa et al., 2019 ; Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020**).

3.2. Dosage des leucocytes du BALF

Le nombre de leucocytes a été déterminé dans le BALF des animaux (souris ICR ou rats Wistar). Le BALF a été centrifugé (1000 rpm, 10 min/4°C) et le culot cellulaire est remis en suspension dans du PBS ou d'eau physiologique. Les cellules sont ensuite dénombré par hémocytomètre (**Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020**). Le nombre de neutrophile et macrophage a été déterminé sur frottis cellulaires colorés avec Wright – Giemsa (**Wang et al., 2020**).

3.3. Dosage des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL6, INF- γ)

Le taux des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL6, INF- γ) dans le sérum, le poumon et le BALF des animaux a été mesuré par des kits ELISA commerciaux (Cardoso- Sousa *et al.*, 2019; Kingir *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2019 ; Qin *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2019b ; Ibrahim *et al.*, 2020 ; Kostakoglu *et al.*, 2020).

4. Etude du stress oxydatif

4.1. Dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO)

La MPO est une peroxydase caractéristique des granules primaires des Polynucléaires Neutrophiles (PN) (Serteyn *et al.*, 2003). Il s'agit d'un marqueur de l'accumulation et de l'activation des neutrophiles. Ainsi l'infiltration des poumons par les neutrophiles a été recherchée en dosant l'activité peroxydase de la MPO.

Le dosage de l'activité MPO dans les homogénats pulmonaires a été réalisé soit par des kits ELISA commerciaux ou selon les méthodes décrites par Krawisz *et al.* (1984) et Rui *et al.* (2005) (Rahim *et al.*, 2012 ; Kingir *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2019a; Xu *et al.*, 2019b).

Le dosage de la MPO active dans le liquide (fluide) péritonéal (PerF) a été réalisé après culture des neutrophiles péritonéaux. Le PerF a été récupéré après lavage de cavité péritonéale des souris par du PBS stérile. Le fluide péritonéal est ensuite centrifugé (1700 rpm, 5min/4°C), lavé avec du PBS puis mis en culture cellulaire. Le taux de MPO active a été mesuré par kit ELISA dans le milieu de culture (Hong *et al.*, 2018).

4.2. Dosage du taux de malondialdéhyde (MDA)

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

Le dosage du taux de MDA a été réalisé à l'aide de kits commerciaux, ou selon les méthodes (Mihara *et Uchiyama.*, 1978 ; Ohkawa *et al.*, 1979)

4.3. Dosage du taux de monoxyde d'azote (NO)

L'activité NOSynthase est estimée par le dosage du NO, ce dosage est réalisé de manière indirecte par la détermination des taux de nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-) (**Grand et al.,2001**). Le dosage du taux de NO a été fait par des kits commerciaux.

4.4. Dosage de l'activité Superoxyde Dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases sont des métalloprotéines qui représentent la première ligne de défense antioxydante contre le stress oxydatif, catalysant la conversion du radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène (**Fridovich, 1974**).

L'activité SOD a été mesurée soit en utilisant des kits commerciaux ou selon les méthodes (**McCord et Fridovich., 1969 ; Diniz Vilela et al.,2016**).

4.5. Dosage de l'activité catalase

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

L'activité catalase a été mesurée selon les méthodes (**Fossati et al.,1980 ; Aebi, 1984**) ou à l'aide de kits commerciaux.

4.6. Dosage du taux de glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un tripeptide (L-.glutamyl-L-cystéinyl glycine) qui joue un rôle central dans le système antioxydant cellulaire (**Sies, 1999**). Sous sa forme réduite (GSH), le glutathion est un donneur d'électron pour réduire le glutathion oxydé (GSSG) produit lors d'un stress oxydant. Il intervient également comme donneur d'atomes d'hydrogènes dans les réactions catalysées par les glutathion peroxydases (**Cossu et al., 1997**).

Le taux de GSH a été dosé selon les méthodes (**Ellman, 1959 ; Sedlak, 1968**) ou par kits commerciaux.

5. Etude Histologique

5.1. Coloration Hématoxyline-Eosine (H-E)

Les poumons des animaux, soumis aux différents protocoles pharmacologiques, furent découpés puis fixés dans formol à 4%, pendant 24h. Les pièces ont été déshydratées par

passage successifs dans des bains d'alcools à degrés croissants (70°, 90° et 100°) suivis d'un bain de toluène.

Des blocs ont été confectionnés, après imprégnation des fragments fixés à la paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été faites à l'aide d'un microtome (Américain Optical) et colorées à l'hématoxyline-éosine (Chen et al., 2014 ; Xu et al., 2019a).

5.2. Evaluation du taux d'œdème pulmonaire (ratio wet/dry)

Les poumons ont été pesés immédiatement après le prélèvement afin de déterminer le poids humide (Wet). Ils sont ensuite séchés dans un four à une température de 60 à 80 C° pendant 24 à 72h puis pesés pour obtenir le poids sec (Dry) (Chen et al., 2018 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ; Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020). Le taux d'œdème pulmonaire pourrait être évalué par :

- Ratio wet/dry : poids humide divisé par le poids sec (Zhang et al., 2017),
- Teneur en eau pulmonaire (%) : $(\text{poids humide} - \text{poids sec}) / \text{poids humide} \times 100$ (Chen et al., 2018).

5.3. Perméabilité microvasculaire pulmonaire

La perméabilité microvasculaire pulmonaire a été évaluée par le colorant Bleu Evans selon la méthode de (Zheng et al., 2016). En bref, une solution de Bleu Evans à 0.4% a été injectée dans la veine caudale 30 min avant l'euthanasie des souris. Les poumons ont été, ensuite, homogénéisés, mélangés au formamide, incubé à 60 °C pendant 16h, puis centrifugés 20 000 g à 4 ° C pendant 5 min. Le surnageant est utilisé pour déterminer la concentration de Bleu Evans par spectrophotométrie (620, 740 nm).

La perméabilité microvasculaire a été évaluée par la fuite de bleu Evans dans les tissus pulmonaires comme suit : bleu Evans (ug)/poids pulmonaire (g) x 10/30. Elle est exprimée en µg EB/g poumon / min (Hong et al., 2018).

III. Résultats et Discussion

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche fondamentale des mécanismes physiopathologiques du sepsis. Pour ce faire, nous avons élaboré une synthèse de différents travaux de recherche réalisée sur des modèles murins. Ces études ont porté sur :

- L'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par sepsis.
- Le rôle de la mélatonine dans la prévention du stress oxydatif, de la réponse inflammatoire et les dommages oxydatifs induits par sepsis.

Dans ce qui suit nous allons présenter et interpréter les résultats des différents travaux comme suit :

- Nous présenterons d'abord le rôle de la mélatonine dans l'augmentation de la survie des animaux septiques.
- Ensuite, nous procéderons à l'analyse des propriétés anti-inflammatoires de la mélatonine.
- Enfin, nous discuterons l'effet de la mélatonine dans la prévention du stress oxydatif et des dommages oxydatifs pulmonaires induits par sepsis.

III.1. Résultats

1. La mélatonine atténue la mortalité induite par sepsis

Le rôle de la mélatonine dans la prévention de la mortalité induite par sepsis a été démontré par deux différents modèles murins. Dans le premier modèle de souris C57BL/6, la mélatonine a été administrée à raison de 50 mg/kg/ip, 30 minutes avant et 30 minutes après CLP et le taux de survie a été suivi pendant 4 jours (**Figure 7 /A**) (**Xu et al., 2019a**). Dans le deuxième modèle de rats Sprague–Dawley, une dose plus faible de 30mg/kg/ip de mélatonine a été injectée à 3h, 6h, 12h, 18h, et à 24h après CLP et le taux de survie a été suivi pendant 7 jours (**Figure7 /B**) (**An et al., 2016**).

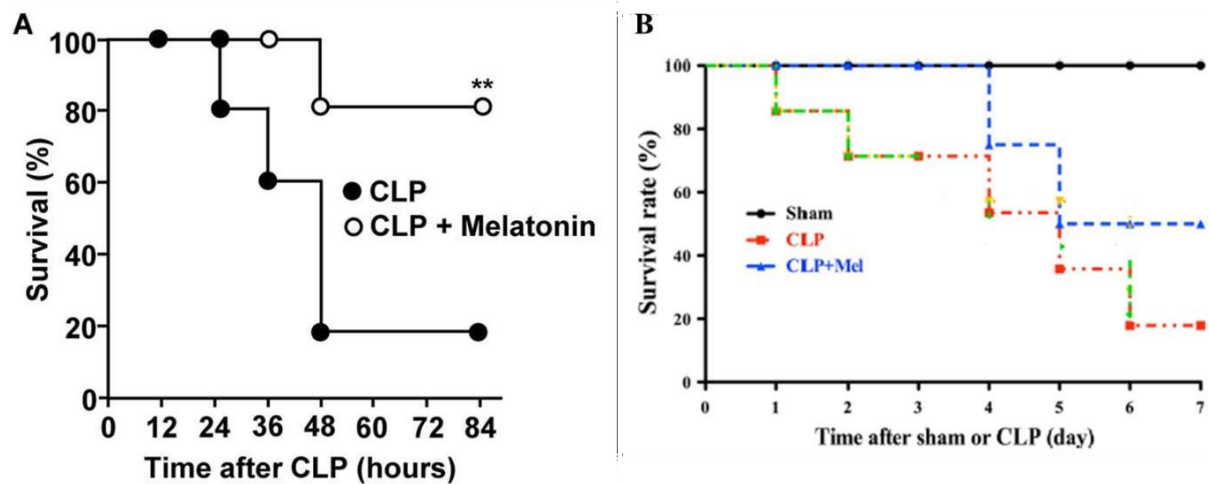


Figure 7 : Effet de la mélatonine sur le sepsis induit par CLP chez les souris C57BL/6 et les rats Sprague–Dawley. A: Des souris C57BL/6 ($n=10/groupe$) ont reçu une injection de 50 mg/kg/ip de mélatonine 30 minutes avant et 30 minutes après CLP et le taux de survie a été suivi pendant 4 jours. B : Des rats Sprague–Dawley ($n=20/groupe$) ont reçu une dose de 30mg/kg/ip de mélatonine à 3h, 6h, 12h, 18h, et à 24h après CLP et le taux de survie a été suivi pendant 7 jours. CLP: *cecal ligation and puncture*, Mel: mélatonine. ** $P < 0,01$ vs CLP (An et al., 2016; Xu et al., 2019a).

Les résultats des deux études montrent que le sepsis induit une mortalité des animaux et que la mélatonine prévient cette mortalité. Dans le modèle de souris C57BL/6, le sepsis induit une mortalité de 80% des animaux après 48h de CLP, alors qu’avec la mélatonine ce taux diminue à 20% après 48h de CLP (**Figure 7/A**). De même, dans le modèle de rats Sprague–Dawley, le sepsis induit une mortalité de près de 80% des animaux après 6 jours de CLP et la mélatonine augmente le taux de survie à 50% (**Figure 7/B**).

2. La mélatonine réduit la charge bactérienne au cours de sepsis

La charge bactérienne a été déterminé après culture des homogénats pulmonaires, du liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) et dans le liquide péritonéal (PerF), dans le but d’estimer la virulence bactérienne ainsi que le rôle antiseptique de la mélatonine. Le modèle utilisé dans cette étude est un modèle de souris C57BL/6. La mélatonine a été administrée à raison de 50 mg/kg/ip, 30 minutes avant et 30 minutes après CLP. Les animaux ont été sacrifiés 24h après CLP et les poumons, le BALF et le PerF ont été récupérés et mis en culture (Xu et al., 2019a).

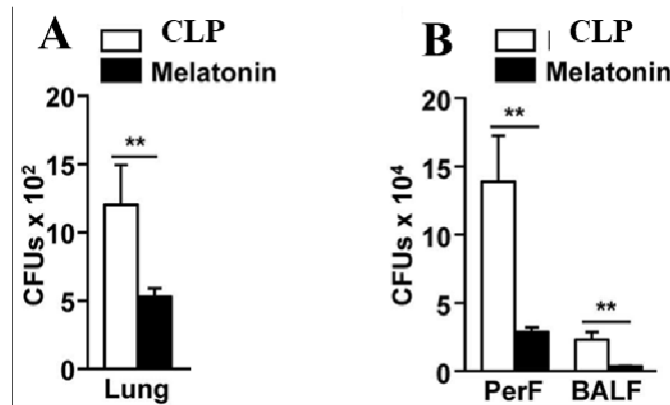


Figure 8 : Effet de la mélatonine sur la charge bactérienne induite par CLP chez les souris C57BL/6. (A) Les unités formant des colonies bactériennes (UFC) ont été mesurées dans l’homogénats du poumon, 24 h après CLP. (B) Les UFC dans le liquide péritonéal (PerF) et le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF). Les données représentent la moyenne de six échantillons indépendants (deux souris par expérience, pour un total de trois expériences). ** $P < 0,01$ vs CLP (Xu et al., 2019a).

Le sepsis induit une augmentation de bactéries aussi bien dans le poumon (**Figure 8/A**), que dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) et le liquide péritonéal (PerF) (**Figure 8/B**). Le traitement par la mélatonine réduit la charge bactérienne près de 2 fois dans le poumon (**Figure 8/A**), 5 fois dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) et plus de 4 fois dans le liquide péritonéal (PerF) (**Figure 8/B**).

2. Le Sepsis induit une réponse inflammatoire systémique et pulmonaire

Le sepsis est un syndrome de réponse inflammatoire systémique excessive contre une infection. L’ampleur de la réponse inflammatoire pourrait être déterminée au niveau systémique et pulmonaire par la mesure des paramètres inflammatoires parmi lesquels : le nombre de cellules immunitaires et le taux de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, et IFN- γ).

Le tableau II représente le taux de protéines et le nombre de cellule immunitaires dans le BALF. Ces résultats sont issus de trois études avec deux modèles de sepsis : le modèle de CLP induit chez des rats Wistar (Cardoso-Sousa et al., 2019 ; Ibrahim et al., 2020) et de LPS administré à 8 mg/kg/ip chez des souris ICR (Wang et al., 2020). Les animaux ont été sacrifiés 24h après induction de sepsis.

Tableau II : Taux de protéines et de leucocytes du liquide de lavage broncho-pulmonaire (Cardoso-Sousa et al., 2019 ; Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020)

Paramètres	Contrôle	Sepsis	Références
	<i>Contrôle</i>	<i>CLP</i>	Cardoso-Sousa et al., 2019
Protéine BALF (µg/µl)	0.90±0.12	0.90±0.12	
	<i>Contrôle</i>	<i>CLP</i>	Ibrahim et al., 2020
Protéine BALF	2.12±0.24	4.72±0.72***	
Leucocytes BALF (x10 ⁶)	1.8±0.4	7.2±0.8***	Wang et al., 2020
	<i>Contrôle PBS</i>	<i>LPS (8mg/kg) 24h</i>	
Protéine BALF (mg/ml)	0.413±0.03	0.626±0.03**	
Leucocytes/ml *10 ⁵ BALF	3±0.08	8.66±0.08**	
Neutrophiles /ml *10 ⁵ BALF	0.92±0.08	4.16±0.08**	
Macrophages/ml *10 ⁵ BALF	0.35±0.01	2.55±0.05**	

BALF : liquide (fluide) de lavage broncho-alvéolaire (*Bronchoalveolar lavage*). ***P* <0,01, ****P* <0,001 vs Contrôle.

Le taux de protéines augmente significativement dans le BALF de 122.6% et de 51.6% après 24 de CLP et injection de LPS respectivement (Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020) alors qu’il reste inchangé après 24h CLP (Cardoso-Sousa et al., 2019). Le nombre de leucocytes augmente également de 300% (4 fois) après CLP dans le BALF des rats et de 188.7% (2.9 fois) après injection de LPS dans le BALF des souris. Le nombre de neutrophiles augmente de 352.2% (4.5 fois) tandis que le nombre de macrophage augmente de 628.6% (7.3 fois) dans le BALF des souris septiques.

Le tableau II et la figure 9 représentent le taux de cytokines inflammatoires (TNF-α, IL- 1β, IL-6, et IFN-γ) dans le sérum, le BALF et les poumons des animaux dans différents modèles de sepsis (CLP et LPS).

Tableau III : Taux de cytokines inflammatoires systémiques et pulmonaires (Cardoso-Sousa et al., 2019; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Qin et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020 ; Kostakoglu et al., 2020)

Paramètres	Contrôle		Sepsis		Références
	Contrôle		CLP		Xu et al., 2019b CLP 24h
Température (°C)	0h	24h	0h	24h	
	37.0±0.5	37.1±0.2	37.1±0.1	30.1±0.2*	
TNF-α (pg/ml) Serum	56.66±0.33		170±10*		
IL-6 (pg/ml) Serum	50±3.44		150±6.86*		
	Contrôle		Sepsis		Ibrahim et al., 2020 CLP 24h
IL-6 (pg/ml) Serum	41.9 ± 1.9		65.5 ± 2.7 ***		
	Contrôle		Sepsis		Li et al., 2019 CLP 12h-24h
	12h	24h	12h	24h	
TNF-α (pg/ml) Serum	25±3.75	25±8.75	362.51±37.5***	500±37.5***	
IL-6 (ng/ml) Serum	0.133 13.3 pg	0.22 2.20pg x100	8.88±1.33* ** 8880pg	11.44±2* ** 114.40x10 0pg	
	Contrôle		Sepsis		Cardoso-Sousa et al., 2019 CLP 24h
IL-1β (pg/ml) BALF	4.83±0.96		89.03±4.83*		
IFN-γ (pg/ml) BALF	23.22±3.87		37.41±3.87*		
	Contrôle		Sepsis		Kingir et al., 2019 CLP 24h
TNF-α poumon (pg/ml)	0.44±0.006		0.54±0.01*		
IL-1β poumon (pg/ml)	1.73±0.04		2.04±0.04**		
	Contrôle		Sepsis		Kostakoglu et al., 2020 CLP 16h
TNF-α (ng/g tissu)	0.81 ± 0.16		0.98 ± 0.21		
	Contrôle		LPS (4mg/kg) 48h		Qin et al., 2019 LPS 48h
TNF-α (pg/ml) Poumon	78.57±14.28		571.42±42.85**		
IL-6 (pg/ml) Poumon	57.14±14.28		385.71±28.57**		

BALF : liquide (fluide) de lavage broncho-alvéolaire (Bronchoalveolar lavage). *P <0,05, **P

<0,01, ***P <0,001 vs Contrôle.

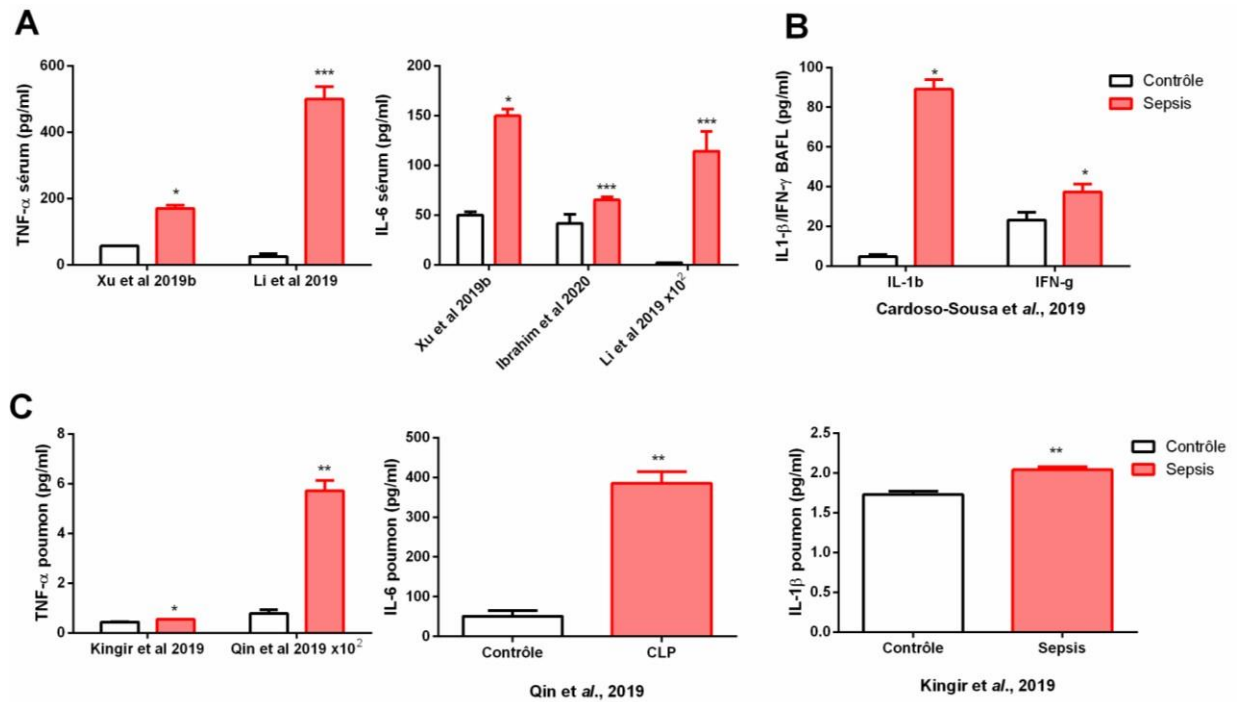


Figure 9 : Effet de sepsis sur le taux de cytokines inflammatoires sériques, pulmonaires et du liquide broncho-pulmonaire. A : taux de TNF- α et de l'IL-6 sériques après 24h de CLP. B : taux de cytokines IL-1 β et IFN- γ dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire BAFL. C : taux de TNF- α , l'IL-6, et de l'IL-1 β pulmonaires après 24h de CLP ou 48h de LPS. CLP: *cecal ligation and puncture*. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs Contrôle (Cardoso-Sousa et al., 2019; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Qin et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ; Ibrahim et al., 2020 ; Kostakoglu et al., 2020)

Le taux de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, et IFN- γ) augmente significativement après sepsis, aussi bien dans le sérum que dans le poumon et le liquide de lavage broncho- alvéolaire. Le sepsis augmente le taux de TNF- α sérique de 200% (3 fois) et de 1900% (20 fois) chez les souris C57BL/6 après 24h de CLP (Tableau III ; Figure 9/A) (Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b). Le taux de TNF- α pulmonaire augmente également de 22.7% (1.2 fois) après 24h de CLP, chez les rats Sprague–Dawley et de 627.3% (6.6 fois) après 48h de sepsis, par injection de 4 mg/kg/intratrachéale de LPS chez les souris BALB/c (Tableau III ; Figure 9/C) (Kingir et al., 2019 ; Qin et al., 2019) .

De même, le taux d'IL-6 sérique augmente significativement de 200% (3fois) (Xu et al., 2019b) et de 5100% (52 fois) (Li et al., 2019) chez C57BL/6 après 24h de CLP et de 56.3% (1.6) après 24h de CLP chez les rats Wistar (Ibrahim et al., 2020) (Tableau III ; Figure 9/A).

Il augmente également de 575% (6.7 fois) dans le poumon des souris BALB/c septiques après 48h d'injection de 4mg/kg/ intratrachéale (**Tableau III ; Figure 9/C**) (**Qin et al., 2019**) .

Par ailleurs, le taux de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β augmente de 17.9% (0.2 fois) dans le poumon des rats Sprague–Dawley après 24h de CLP (**Tableau III; Figure 9/B**) (**Kingir et al., 2019**) et de 1743.3% (18.4 fois) dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire des rats Wistar après 24h de CLP (**Tableau III ; Figure 9/C**) (**Cardoso-Sousa et al., 2019**). Le sepsis induit également une augmentation de 61.1% (0.6 fois) du taux d'IFN- γ dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire après 24h de CLP chez les rats Wistar (**Tableau III ; Figure 9/C**) (**Cardoso-Sousa et al., 2019**).

Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, et IFN- γ sont directement impliquées dans la thermogénèse (**Lee et al., 2012**). Cependant si dans la majorité des cas de sepsis on observe une hyperthermie, il existe dans environ 10 % des cas une réponse hypothermique à l'infection (**Arons et al., 1999**). Le sepsis induit une hypothermie chez les souris C57BL/6 après 24h de CLP, la température des souris diminue de 7°C pour atteindre 30.1 \pm 0.2 °C, comparée au groupe contrôle qui présente une température de 37.0 \pm 0.5 °C (**Tableau III**) (**Xu et al., 2019b**).

La libération massive de cytokines pro-inflammatoires démontrée dans les différents travaux indique la présence d'une tempête ou d'un orage cytokinique caractéristique de l'état hyper-inflammatoire du sepsis.

3. La mélatonine diminue la réponse inflammatoire systémique induite par sepsis

L'effet anti-inflammatoire de la mélatonine a été largement démontré dans plusieurs pathologies dont le sepsis. Le tableau IV représente le taux de leucocytes et de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) systémique de deux études de sepsis induit par CLP chez les rats Sprague–Dawley. Différents protocoles d'administration de mélatonine ont été entrepris : Dans l'étude de **Chen et al.** (2014), la mélatonine a été administrée à raison de 20 mg/kg/ip, 30 minutes puis à 50mg/kg/ip à 6h, et 24h après CLP et les rats ont été sacrifiés 72h après sepsis (**Chen et al., 2014**) ; Dans l'étude de **An et al.** (2016) une dose de 30mg/kg/ip de mélatonine a été injectée à 3h, 6h, 12h, 18h, et à 24h après CLP et les rats ont été sacrifiés 48h après sepsis (**An et al., 2016**).

Tableau IV : Taux leucocytes et de cytokines systémiques (Chen et al., 2014 ; An et al., 2016)

Paramètres	Contrôle			Sepsis			Sepsis + Mel			Références	
Leucocytes sériques (x10 ³ /mm ³)	Contrôle			CLP			CLP+Mel			Chen et al., 2014 CLP 72h	
	0h	6h	7h	0h	6h	7h	0h	6h	72h		
	1.0 ± 1.7	0.0 ± 1.2	.9 ± 1.2	1.2 ± 1.3	5 ± 1.2*	13.0 ± 1.5*	1.5 ± 1.9	15.3 ± 1.1*	12.5 ± 1.5*		
IL-6 (pg/ml)	0h	6h	18h	6h	18h	72h	0h	6h	18h	72h	An et al., 2016 CLP 48h
	0h	6h	18h	6h	18h	72h	0h	6h	18h	72h	
	.28 ± 1.49	.2 ± 2.9	.4 ± 2.7	.0 ± 1.	.3 ± 2	82 ± 103**	51 ± 146**	5.4 ± 50.8**	± 1.9	177 ± 116***	
TNF-α (pg/ml)	Contrôle			CLP			CLP+Mel			An et al., 2016 CLP 48h	
IL-1β (pg/ml)	10.71±1.42			32.85±0.71**			21.42±1.42##				
	9.28±0.35			34.28±1.07**			21.42±1.07##				

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 vs Contrôle ; ##P < 0,01, ###P < 0,001 vs CLP.

Comme nous l'avons mentionné précédemment dans les tableaux II et III, le nombre de leucocytes et de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IL-6) augmentent significativement après sepsis.

Le nombre de leucocytes augmente significativement de 65% (0.65 fois) à 6h et à 72h après sepsis comparé aux groupes contrôles. Le traitement par mélatonine, diminue le nombre de leucocytes de 7.3% et de 3.8% à 6h et 72h respectivement comparé aux groupes CLP. Toutefois, cette diminution n'est pas significative (Chen et al., 2014).

Comparé aux groupes contrôles, le taux d'IL-6 augmente après 6h (19.8 fois), 18h (16 fois) et 72h (15.9 fois) chez les rats septiques mais il diminue significativement après traitement par mélatonine à 18h (14.6%, 0.8 fois) et à 72h (25.8%, 0.7 fois) (Tableau IV) (Chen et al., 2014).

Le sepsis augmente également les taux de TNF-α et d'IL-1β de 206,7% (3 fois) et 269.4% (3.7 fois) respectivement, comparé au groupe contrôle. La mélatonine réduit significativement

les taux de TNF- α de 34,8% (0.65 fois) et d'IL-1 β de 37.5% (0.62 fois) comparé au groupe septique (**Tableau IV**) (**An et al., 2016**).

Ces résultats montrent les propriétés anti-inflammatoires de la mélatonine. La mélatonine prévient l'orage cytokinique et transforme l'état d'hyper-inflammatoire du sepsis en un état inflammatoire modéré.

6 Effet du sepsis et de la mélatonine sur l'activité myéloperoxydase (MPO), marqueur d'infiltration des neutrophiles

La myéloperoxydase (MPO) est une hémoprotéine stockée dans les granules azurophiles des neutrophiles. Elle synthétise de l'acide hypochloreux et d'autres oxydants réactifs pour éliminer les bactéries ingérées. Ainsi, la MPO est un composant important de l'immunité innée et l'un des principaux piliers de l'activité antibactérienne des neutrophiles (**Winterbourn et al., 2005; Klebanoff, 2005**). Les neutrophiles sont les premières cellules à réagir dans la défense immunitaire de l'hôte. Ainsi, le taux de MPO a été mesuré dans les poumons et dans le fluide péritonéal des animaux dans différents modèles de sepsis et traitement par mélatonine (**Tableau IV**). Trois modèles de sepsis ont été utilisés : dans le premier le sepsis a été induit par CLP chez des souris C57BL/6 ou des rats Sprague–Dawley et qui ont été sacrifiés après 24h de CLP (**Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019a; Xu et al., 2019b**) ; dans le deuxième, le sepsis a été induit par injection de 4mg/kg/ip de LPS chez les souris C57BL/6 et les souris ont été sacrifiées après 4h de sepsis (**Hong et al., 2018**) ; dans le troisième modèle, le sepsis a été induit par injection de matières fécales dans le péritoine chez des souris C57BL/6 qui sont sacrifiées après 6h ou chez des rats Wistar qui sont sacrifiées après 24h ou 72h après sepsis (**Rahim et al., 2012 ;Hong et al., 2018**).

Tableau V: Activité MPO pulmonaires et péritonéale (Rahim et al., 2012 ;Hong et al., 2018; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019a; Xu et al., 2019b)

Paramètres	Contrôle		Sepsis		Sepsis+ Mel	Références
	Contrôle		CLP		CLP+Mel	Xu et al., 2019a CLP 24h
MPO active PerF	0.1-0.133		1.53 ±0.33**		3.73 ±0.8	
	Contrôle		CLP		-	Xu et al., 2019b CLP 24h
MPO (U/g) Poumon	9.52±0.57		80±7.62***		-	
	Contrôle		CLP		-	Kingir et al., 2019 CLP 24h
MPO (U/g tissu) poumon	0.9±0.066		1.4±0.05***		-	
	Contrôle (sham)		CLP		-	Li et al., 2019 CLP 12h-24h
	12h	24h	12h	24h		
MPO (U/g prot) poumon	51.85 ±7.40	51.85 ±2.22	240.74±44.4 4***	348.15±29.6 3***	-	
	Contrôle FIP	Contrôle LPS	FIP 6h 3.75g/kg, i.p	LPS 4h 4mg/kg/ip	-	Hong et al., 2018
MPO (U/g tissu) poumon	5.16±0.66	2.16±0.13	15.33±2.16*	15.40±2.70*	-	
	Contrôle		FIP		-	Rahim et al., 2012 FIP 24h-72h
	24h	72h	24h	72h	-	
MPO (µmoles/min/mg de prot) poumon	0.181 ± 0.001	0.181 ± 0.001	0.273 ± 0.03***	0.21 ± 0.02*	-	

FIP: feces-injection-in-peritoneum. PerF : liquide (fluide) péritonéal. p<0,05,**p<0,01 vs contrôle

, ##p<0.01 vs Sepsis.

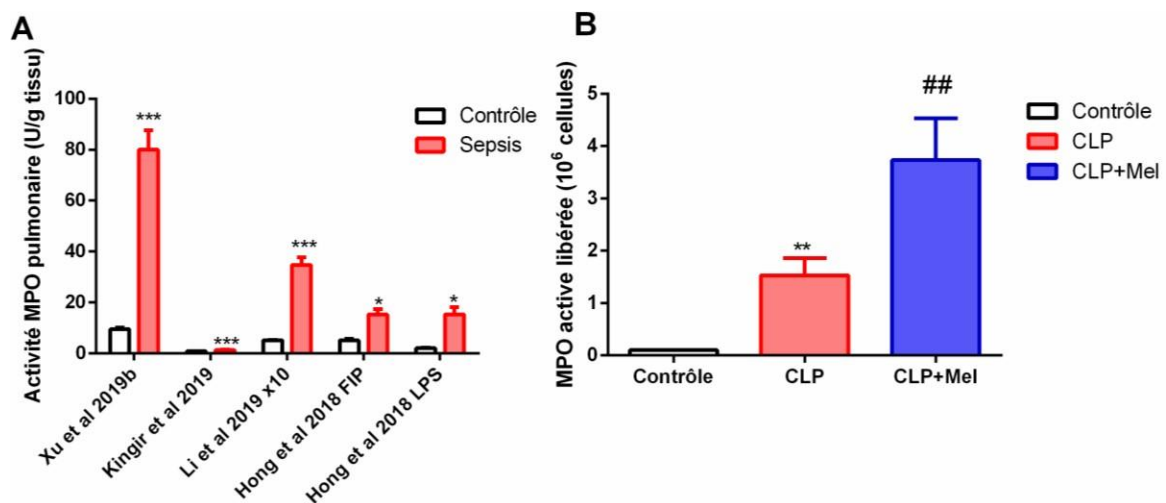


Figure 10 : Effet de sepsis et de la mélatonine sur l'activité Myéloperoxydase (MPO). A : Activité MPO pulmonaire. B : Taux de myéloperoxydase dans le liquide (fluide) péritonéal (PerF). *P<0,05 , **P<0,01 vs contrôle , ##P<0.01 vs Sepsis (**Rahim et al., 2012 ; Hong et al., 2018; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019a; Xu et al., 2019b**).

L'activité myéloperoxydase augmente significativement après sepsis dans les poumons des animaux. Cette augmentation est différente d'un modèle à un autre en fonction de l'animal utilisé du temps du sacrifice, et comment le sepsis a été induit. L'activité MPO augmente de 742.1% (8.4 fois) et de 55.5% (0.55 fois) chez les souris C57BL/6 et les rats Sprague–Dawley, respectivement après 24h de CLP comparé aux groupes de contrôles (**Kingir et al., 2019 ; Xu et al., 2019b**). De même, l'activité MPO augmente de 364.3% (4.6 fois) après 12h de CLP chez les souris C57BL/6 et continue à augmenter après 24h de CLP. L'augmentation est estimée à 571.4% (6.7 fois) (**Li et al., 2019**) . Il semble que l'activité MPO connait une stabilité après 24h de sepsis où nous avons noté une augmentation similaire à 72h à celle observée à 24h après induction de sepsis par FIP (**Tableau V ; Figure A**) (**Rahim et al., 2012**).

L'activité MPO augmente de 197.1% (3 fois) après 6h d'induction de sepsis par FIP et de 613% (7.1 fois) après 4h d'induction de sepsis par LPS chez les souris C57BL/6, comparés aux groupes contrôles. Ceci suggère que le modèle d'induction de sepsis influence significativement l'activité MPO (**Tableau V ; Figure 4/A**) (**Hong et al., 2018**).

L'activité MPO augmente également de 1430% (15.3 fois) dans le liquide péritonéal (PerF) des souris C57BL/6 et encore plus après traitement par la mélatonine. L'augmentation est estimée à 143.8% (2.4 fois) (**Tableau V ; Figure 4/B**) (**Xu et al., 2019a**). Ces données suggèrent que la mélatonine exerce un effet antimicrobien par activation de la libération de la MPO et le développement de NETs (*Neutrophil Extracellular Trap*) (**Xu et al., 2019a**).

L'augmentation du taux de MPO dans le poumon lors du sepsis confirme l'infiltration pulmonaires par les neutrophiles, et reflète la sévérité des dommages oxydatifs causés par les neutrophiles dans les organes (**Li et al., 2019**).

Il a été démontré que le dosage de la MPO plasmatique, pourrait être utilisée comme biomarqueur de diagnostic différentiel entre un SIRS sans infection et un sepsis, et qui pourrait prédire la mortalité des patients atteints de sepsis. Lors d'un sepsis, les neutrophiles libèrent le contenu de leurs granules, contenant la MPO et des ROS dont l'acide

hypochloreux, dans le plasma afin de combattre l'agent pathogène. La MPO et les ROS formés par la MPO peuvent endommager les cellules natives sanguines ainsi que les organes (ElGammasy et al., 2015 ; Schrijver et al., 2017). De plus, l'acide hypochloreux, un oxydant puissant a été impliqué dans la destruction des bactéries (Nathan, 2002) et la destruction des tissus par induction de nécrose et d'apoptose (Klebanoff, 2005).

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

7. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de malondialdéhyde (MDA), marqueur de peroxydation lipidique

Le stress oxydatif induit la peroxydation des lipides membranaires, ce qui génère divers produits finaux de décomposition tels que le malondialdéhyde (MDA). Le MDA est un aldéhyde de faible poids moléculaire résultant d'attaques de radicaux libres sur des acides gras polyinsaturés lors de la dégradation de phospholipides membranaires cellulaires (Draper et Hadley, 1990; Dalle-Donne et al., 2006). Ainsi, le taux de MDA a été mesuré dans les poumons et dans le sérum des animaux (souris C57BL/6, ICR ; Rats Wistar et Sprague–Dawley) dans différents modèles de sepsis (CLP, LPS, FIP) et traitement par mélatonine (Tableau V) .

Tableau VI : Taux de MDA pulmonaires et sériques (Rahim et al., 2012 ;An et al., 2016 ; Chen et al., 2018 ; Hong et al., 2018 ;Cardoso-Sousa et al., 2019; Cinar et al., 2019 ; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020 ; Kostakoglu et al., 2020 ; Wang et al., 2020)

Paramètres	Contrôle	Sepsis	CLP+ Mel	Références
MDA (nmoles/ml) sérum	4.28±0.17	16.07±0.71**	7.14±0.71##	An et al., 2016 CLP 48h
	Contrôle	CLP	-	Wang et al., 2020 LPS 8mg/Kg 24h
MDA (nmoles/ml) sérum	24±2	37.5±0.7**	-	Cinar et al., 2019 CLP 12h
	Contrôle	CLP	-	
MDA (nmoles/mg prot) poumon	1.54±0.36	4.63±0.54* 200,6% 3x	-	

	Contrôle		CLP		-	Kostakoglu et al., 2020 CLP 16h
MDA (nmoles/g tissu poumon)	13.24 ± 2.34		16.04 ± 1.89** 21,1%		-	
	Contrôle		CLP		-	Cardoso-Sousa et al., 2019 CLP 24h
MDA (nmoles/mg prot) poumon	0.075±0.0025		0.098±0.0125 30%		-	
	Contrôle		CLP		-	Chen et al., 2018 CLP 18h
MDA (nmoles/mg prot) poumon	5.83 ±1.04		17.5 ±1.25**200,2% 3x		-	
	Contrôle		CLP		-	Xu et al., 2019b CLP 24h
MDA (U/mg prot) poumon	2.88±0.29		10±0.59* 247,2% 3.5x		-	
	Contrôle		CLP		-	Kingir et al., 2019 CLP 24h
MDA (nmoles/g tissu poumon)	17.14±0.71		28.57±4.28** 66.7%		-	
	Contrôle		CLP		-	Ibrahim et al., 2020 CLP 24h
MDA (nmoles/g tissu) Poumon	3.24±0.20		8.97±0.58*** 176.8% 2.8x		-	
	Contrôle		CLP		-	Li et al., 2019 CLP 12h-24h
MDA (nmoles/mg prot) poumon	12 h	24h	12h	24h	-	
	18.46±2.3	20.77±1.92	29.61±1.92*** 60.4%	32.31±1.92*** 55.6%	-	
MDA (µmoles/mg prot) poumon	Contrôle	Contrôle LPS	FIP 6h	LPS 4h	-	Hong et al., 2018 FIP 6h /LPS 4h
	386.36±181.81	428.57±214.28	1954.54±409.09*405.9% 5x	1892.85±107.14* 341.7% 4.4x	-	
	Contrôle		FIP		-	Rahim et al., 2012 FIP 24h-72h
MDA (nmoles /mg de prot) poumon	24 h	72h	24h	72h	-	
	0.71±0.04	0.71±0.04	1.23 ± 0.07*** 73.2%	1.32 ± 0.09*** 85.9%	-	

FIP: feces-injection-in-peritoneum. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs contrôle, ##P<0.01 vs

Sepsis

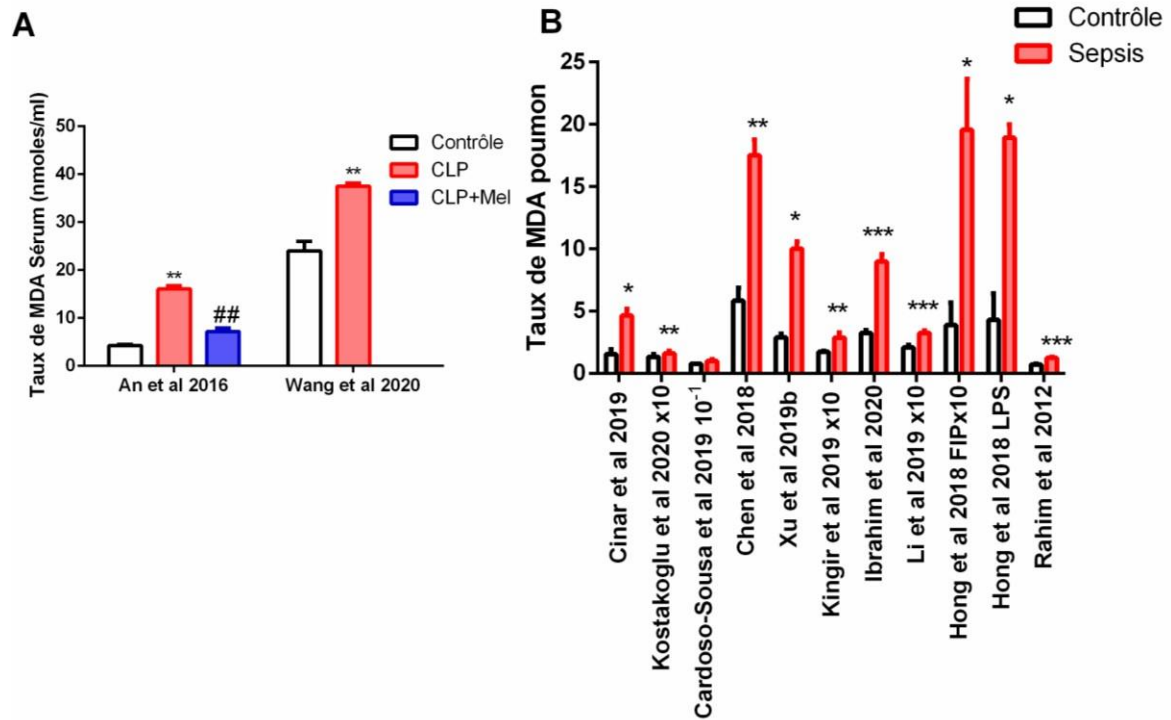


Figure 11 : Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de Malondialdéhyde (MDA) pulmonaires et sériques. A : taux de MDA sérique ; B : taux de MDA poulmonaire. *P<0,05 ,**P<0,01, ***P<0,001 vs contrôle ,##P<0.01 vs Sepsis (Rahim et al., 2012 ;An et al., 2016 ; Chen et al., 2018 ; Hong et al., 2018 ;Cardoso-Sousa et al., 2019; Cinar et al., 2019 ; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020 ; Kostakoglu et al., 2020 ; Wang et al., 2020).

L'ensemble des résultats montrent une augmentation du taux de MDA aussi bien dans le sérum que dans les poumons des animaux. Comparé aux groupes contrôles, le taux de MDA sérique augmente de 56.2% (0.56 fois) et de 275.5% (3.7 fois), après 24h et 48h de sepsis par LPS et CLP respectivement (An et al., 2016 ; Wang et al., 2020). Ce taux diminue de 55.6% (2.25 fois) après 48h chez les rats Sprague–Dawley traités par la mélatonine, comparés aux rats septiques (Tableau VI , Figure 11/A) (An et al., 2016).

Le taux de MDA augmente également dans les poumons après induction de sepsis par CLP, LPS ou FIP. Il augmente de 60.4% et 200,6% (3 fois) après 12h de CLP chez les souris C57BL/6 et les rats Wistar, respectivement, comparés aux groupes contrôles (**Cinar et al., 2019 ; Li et al., 2019**). Chez les rats Sprague–Dawley, le taux de MDA augmente de 21,1% et de 200,2% (3 fois) après 16h et 18h de CLP respectivement (**Chen et al., 2018 ; Kostakoglu et al., 2020**). Après 24h de CLP, l'augmentation du taux de MDA pulmonaire varie de 30%, à 247,2% (3.5 fois) chez les animaux septiques (souris C57BL/6, rats Wistar et Sprague–Dawley) comparés aux groupes contrôles (**Tableau VI , Figure11 /B**) (**Cardoso-Sousa et al., 2019; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020 ; Kostakoglu et al., 2020**). Le taux de MDA augmente de 341.7% (4.4 fois) et 405.9% (5 fois) après 4h de sepsis par injection de LPS et 6h d'injection de FIP chez les souris C57BL/6 comparés aux groupes de contrôles (**Hong et al., 2018**). L'augmentation du taux de MDA est estimé à 85.9% après 72h de sepsis induit par FIP chez les rats Wistar comparé au contrôle (**Tableau VI , Figure 11/B**) (**Rahim et al., 2012**).

L'induction de la peroxydation lipidique lors du sepsis a été largement démontré chez l'Homme et dans divers modèles animaux (**Rahim, 2009 ; Lorente et al., 2013 ; Toufekoula et al., 2013 ; Lorente, 2015**).

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

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

7. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de NO, marqueur de l'activité NOS

Le monoxyde d'azote (NO) est un agent oxydant synthétisé par la NO synthase (NOS) à une forte concentration lors d'un stress oxydatif. L'activité NOS dans les poumons des animaux soumis aux différents protocoles pharmacologiques, pourrait être été estimée par le dosage des métabolites stables du NO, les nitrites NO_2^- et nitrates NO_3^- (**Tableau VI**).

Tableau VII : Taux de NO pulmonaires et de pression artérielle moyenne (MAP) (Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020)

Paramètres	Contrôle-sham		CLP		Références
NO (µmoles/mg prot) Poumon	3.41±0.48		13±1.25*		Xu et al., 2019b CLP 24h
NO(nmoles/g tissu) Poumon	11.39±0.09		33.35±0.68***		Ibrahim et al., 2020 CLP 24h
MAP (mm Hg)	0h	24h	0h	24h	Xu et al., 2019b CLP 24h
	±1.0	±6.0	±2.0	±6.0 *	

MAP : pression artérielle moyenne. *P<0,05, ***P<0,001 vs contrôle.

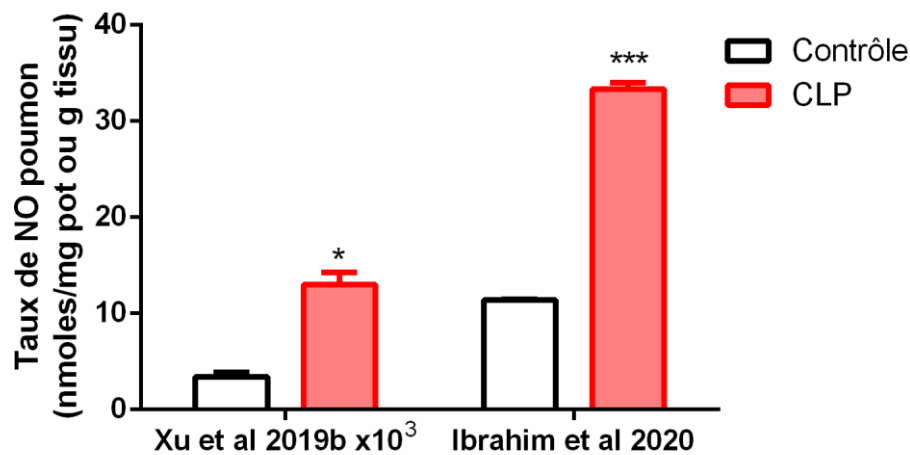


Figure 12 : Effet de sepsis sur le taux de monoxyde d’azote (NO). *P<0,05, ***P<0,001 vs contrôle (Xu et al., 2019b ; Ibrahim et al., 2020).

Le sepsis par CLP augmente significativement le taux de NO de 281.2% (3.8 fois) et de 192.8% (2.9 fois) chez les souris C57BL/6 et les rats Wistar, respectivement, comparés aux groupes contrôles (Tableau VII , Figure 12) (Xu et al., 2019b ; Ibrahim et al., 2020).

Il a été suggéré que l’activation de l’iNOS induirait une augmentation importante du NO plasmatique et serait impliquée dans la vasodilatation et donc l’hypotension artérielle observée au cours du sepsis (Luiking et al., 2010 ; Besnier et al., 2015). Ainsi, une forte réduction de la pression artérielle moyenne a été observée chez les souris C57BL/6 septiques et a été estimée à 57.8% (2.4 fois) comparé au groupe contrôle (Xu et al., 2019b).

Le rôle du NO dans la pathogénèse septique a été largement démontré aussi bien chez l’homme que dans des modèles animaux (Rahim, 2009 ; Qiu et al., 2019). Des taux de NO significativement élevés ont été observés chez les patients septiques, et ce dès le premier jour d’admission, comparé aux volontaires sains. Cette constatation était corrélée à la gravité du

tableau clinique et aux taux de TNF α . La production de NO diminuait ensuite progressivement chez les patients survivants d'environ 25 % à 15 jours de l'admission, tandis qu'elle augmentait chez les patients non survivants (**Besnier et al., 2015**).

Le NO participe à la genèse de l'état de choc et est responsable de dysfonctions macro- et microvasculaires, ainsi que myocardiques. De plus, il semble impliqué dans les phénomènes d'infiltration leucocytaire et d'activation plaquettaire. Enfin, dans certaines situations pathologiques, le NO participe à la formation d'un de ses dérivés, le peroxy-nitrite (ONOO-), présentant des propriétés bactéricides, mais également toxiques sur le métabolisme mitochondriale et cellulaire. Il serait donc potentiellement impliqué dans la défaillance d'organes et l'immunodépression tardive du sepsis (**Besnier et al., 2015**).

8. Effet du sepsis et de la mélatonine sur l'activité catalase et Superoxyde dismutase

La Superoxyde dismutase (SOD) et la catalase sont deux enzymes anti oxydantes qui jouent un rôle important dans la détoxification des ROS. La SOD catalyse la conversion du radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, qui est ensuite dégradé en eau par la catalase. Par conséquent, un déséquilibre dans le système antioxydant pourrait être à l'origine d'un stress oxydatif. Les résultats de dosage des activités SOD et catalase dans les sérums et les poumons des animaux soumis aux différents protocoles pharmacologiques, sont représentés dans le tableau VII .

Tableau VIII :Activité catalase et SOD pulmonaires et sériques (**Rahim et al., 2012 ;An et al., 2016 ;Cardoso-Sousa et al., 2019; Cinar et al., 2019; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020**)

Para mètres	Contrôle-sham	CLP	CLP+Mel	Référ ences
Catal ase sérum (U/ml)	24.44±1.11	13.88±0.55** 43.2% 1.8x	17.77±1.11## 28% 1.28x	An et al., 2016 CLP 48h
SOD sérum (U/ml)	255.55±8.33	113.88±5.55** 55.4% 2.2x	205.55±5.55## 80.5% 1.8x	
Activité SOD (U/ml) sérum	1.38±0.033	0.4±0.066**71% 3.4x		Wang et al., 2020 LPS 8mg/Kg 24h
Catal Ase (10 ⁴ U/mg prot)	11.81±3.63	37.27±5.45*215.6% 3.1x	-	Cardoso-Sousa et al., 2019 CLP

poumon					24h
SOD (U/mg prot) poumon	0.97±0.128		1.15±0.128 18.5%		-
Activité catalase (U/g tissu) Poumon	50.93±1.15		20.97±1.45***58.8% 2.4x		Ibrahim et al., 2020 CLP 24h
Activité SOD (U/g tissu) Poumon	1047±42.61		592.5±41.56***43.4% 1.8x		
SOD activity (U/mg prot) Poumon	78.09±3.8		51.42±1.71*34.1% 1.5x		-
SOD activity (U/mg prot) poumon	59.42±1.02		5.71±0.57*90.4% 10.4x		Xu et al., 2019b CLP 24h
Activité SOD (U/mg prot) poumon	12h	24h	12h	24h	Cinar et al., 2019 CLP 12h
	19.7 6±1.9	19.28 ±0.95	9.52±0.95*** 51.8% 2.1x	8.09±0.95** *58% 2.4x	
Activité Catalase (U/min/mg de prot) poumon	24h	72h	24h	72h	Li et al., 2019 CLP 12h-24h
	11.31 ± 2.2	11.3 1 ± 2.2	5 ± 2.6**55.8% 2.3x	7,66 ± 1.3*32.3% 1.5x	

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs contrôle, ##P<0.01, ###P<0.001 vs Sepsis.

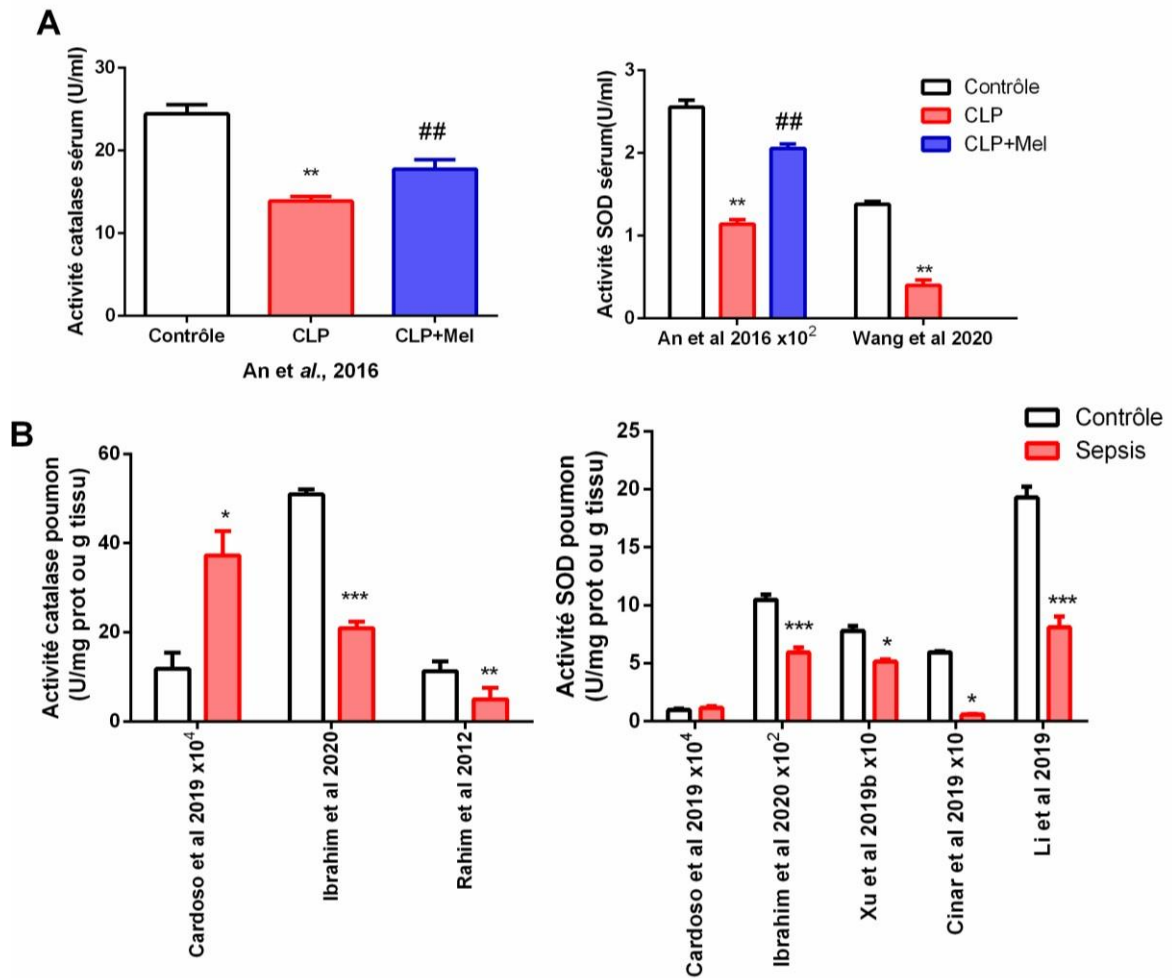


Figure 13 : Effet de sepsis sur l'activité catalase et superoxyde dismutase (SOD) sériques et pulmonaires. A : activité catalase et SOD au niveau du sérum. B : Activité catalase et SOD au niveau du poumon. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs contrôle, ##P<0.01, ####P<0.001 vs Sepsis (Rahim et al., 2012 ;An et al., 2016 ;Cardoso-Sousa et al., 2019; Cinar et al., 2019; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020).

L'activité SOD diminue significativement de 55.4% (2.2 fois) et de 71% (3.4 fois) au niveau du sérum des rats Sprague–Dawley et de souris ICR après 48h et 24h de sepsis, respectivement. Aussi, l'activité catalase sérique diminue de 43.2% (1.8 fois) chez les rats Sprague–Dawley septiques après 48h de CLP. La mélatonine restaure l'activité SOD et l'activité catalase sériques de 80.5% (1.8 fois) et 28% (1.28 fois) respectivement, après 48h de CLP (Tableau VIII, Figure 13/ A) (An et al., 2016 ; Wang et al., 2020).

L'activité SOD pulmonaire diminue de 51.8% (2.1 fois) et de 90.4% (10.4 fois) chez les souris C57BL/6 et les rats Wistar respectivement, après 12h de CLP comparée aux groupes contrôles (Cinar et al., 2019; Li et al., 2019). Après 24h de sepsis par CLP, l'activité SOD

continue a diminué significativement de 34.1% (1.5 fois) et de 58% (2.4 fois) chez les souris C57BL/6 septiques, et de 43.4% (1.8 fois) chez les rats Wistar septiques comparés aux groupes de contrôles (Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ; Ibrahim et al., 2020). Cependant, Cardoso-Sousa et al. (2019) n’ont observé aucun changement de l’activité SOD pulmonaire contrairement à une augmentation de 215.6% (3.1 fois) de l’activité catalase après 24h de sepsis par CLP (Cardoso-Sousa et al., 2019). Par ailleurs, Ibrahim et al. (2020) et Rahim et al. (2012) ont observé une diminution significative de l’activité catalase pulmonaire de 58.8% (2.4 fois) et de 32.3% (1.5 fois), respectivement, chez les rats Wistar après 24h et 72h de sepsis (Tableau VIII, Figure 13/B) (Rahim et al., 2012 ; Ibrahim et al., 2020).

Ces résultats pourraient indiquer un état de stress oxydatif instauré lors du sepsis. Ces différences dans les résultats qui varient d’une diminution à une augmentation ou une stabilité des activités SOD et catalase, pourraient être expliquées par la différence des modèles d’induction de sepsis et le temps de sacrifice des animaux.

Le dosage des activités de SOD et catalase pourrait être considérée comme un marqueur de mauvais pronostic chez les patients septiques (Molina et al., 2017 ; Kumar et al., 2018).

9. Effet du sepsis et de la mélatonine sur le taux de glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un constituant important des mécanismes de protection intracellulaire contre divers stimuli nocifs, notamment le stress oxydatif. Ce tripeptide, constitue un cofacteur de la glutathion peroxydase (GPx), une enzyme antioxydante sélénium-dépendante qui dégrade le H₂O₂ en eau. Les résultats de dosage de GSH dans les poumons des animaux soumis aux différents protocoles pharmacologiques, sont représentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Taux de glutathion pulmonaire (Rahim et al., 2012 ; Cinar et al., 2019; Kingir et al., 2019 ;Li et al., 2019 ; Kostakoglu et al., 2020)

Paramètres	Contrôle-sham		CLP		Références
GSH (nmoles/mg prot) poumon	5.16±0.16		2.25±0.16* 56.4% 2.3x		Cinar et al., 2019 CLP 12h
GSH (µmoles/g tissu) poumon	10.26 ± 2.06		14.07 ± 2.46** 37.1% 1.4x		Kostakoglu et al., 2020 CLP 16h
GSH (moles/g tissu) poumon	1.5±0.10		1.28±0.10		Kingir et al., 2019 CLP 24h
GSH (µmoles/mg prot) poumon	12h	24h	12h	24h	Li et al., 2019 CLP 12h-24h
	140±15	138.46	78.46±21.	49.23±9.2	

	.4	±9.23	53** 44% 1.8x	3*** 64.4% 2.8x	
GSH (μ moles/mg de prot) poumon	24h	72h	24h	72h	Rahim et al., 2012 FIP 24h-72h
	6,18 ± 0,6	6,18 ± 0,6	4,41 ± 0,4** 28.6% 1.4x	3,44 ± 0,2*** 44.3% 1.8x	

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs contrôle.

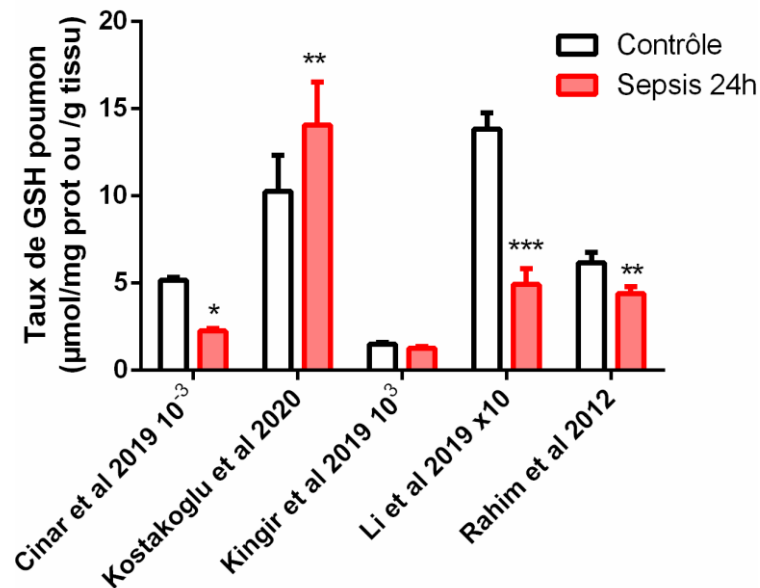


Figure 14 : Effet de sepsis sur le taux de glutathion (GSH) pulmonaire. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs contrôle (Rahim et al., 2012 ; Cinar et al., 2019; Kingir et al., 2019 ;Li et al., 2019 ; Kostakoglu et al., 2020).

Le taux de GSH pulmonaire diminue de 44% (1.8 fois) et de 56.4% (2.3 fois) après 12h de CLP chez les souris C57BL/6 et les rats Wistar respectivement (Cinar et al., 2019 ; Li et al., 2019). Il diminue encore plus après 24h de sepsis induit par CLP chez les souris C57BL/6 et par FIP chez les rats Wistar. La diminution du taux de GSH est de 64.4% (2.8 fois) chez les souris C57BL/6 et de 28.6% (1.4 fois) chez les rats Wistar comparés aux groupes contrôles. Après 72h de sepsis induit par FIP, le taux de GSH continue a diminué de 44.3% (1.8 fois) chez les rats Wistar septiques comparé au groupe contrôle (Tableau IX , Figure 14) (Rahim et al., 2012 ; Cinar et al., 2019; Li et al., 2019).

Néanmoins, Kingir et al. (2019) n’ont observé aucun changement du taux de GSH pulmonaire chez les rats Sprague–Dawley septiques après 24h de CLP alors que Kostakoglu et al. (2020) ont démontré une augmentation significative de 37.1% (1.4 fois) du taux de son

taux chez les rats Sprague–Dawley septiques après 16h de CLP (**Tableau IX, Figure 14**) (**Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Kostakoglu et al., 2020**).

Les différences des résultats du taux de GSH pulmonaires observées dans les différentes études, pourraient être expliquées par la différence des modèles animaux utilisés. Ces résultats indiquent un déséquilibre dans le taux de GSH pulmonaire qui définit l'instauration d'un état de stress oxydatif. Le glutathion est consommé au cours du processus de dégradation du peroxyde d'hydrogène par la GPx et doit être reconstitué afin que la cellule empêche l'accumulation de H₂O₂ à des niveaux toxiques. La reconstitution du glutathion n'est toutefois pas favorisée pendant les périodes d'hypermétabolisme prolongé et d'insuffisance calorique, qui accompagnent souvent des maladies graves telles que le sepsis entraînant l'épuisement des réserves de glutathion (**Sener et al., 2005**). De plus, le GSH a des effets sur l'immunité, il est souvent considéré comme anti-inflammatoire, car il inhibe la production et l'effet de plusieurs cytokines et chimiokines inflammatoires. Les patients septiques montrent une déplétion du taux de GSH, qui pourrait constitué un marqueur d'un mauvais pronostic (**Villa et al., 2002 ; Pravda, 2014**).

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

10. La mélatonine prévient les dommages oxydatifs et inflammatoires pulmonaires induits par sepsis

Dans notre synthèse nous nous sommes également intéressées à l'étude histologique par une coloration à l'hématoxyline-éosine des poumons des animaux traités par différents protocoles pharmacologiques. 14 études ont présenté des résultats histologiques du poumons (**Rahim et al., 2012 ; Chen et al., 2014 ; Chen et al., 2018 ; Hong et al., 2018 ; Cardoso- Sousa et al., 2019 ; Cinar et al., 2019 ; Kingir et al., 2019 ; Li et al., 2019 ; Qin et al., 2019 ; Xu et al., 2019a ; Xu et al., 2019b ; Ibrahim et al., 2020 ; Kostakoglu et al., 2020 ; Wang et al., 2020**). Toutefois, nous avons choisi de présenter uniquement les résultats histologiques des études qui se sont intéressées non seulement au sepsis mais aussi aux effets de la mélatonine (**Figures 15 et 16**).

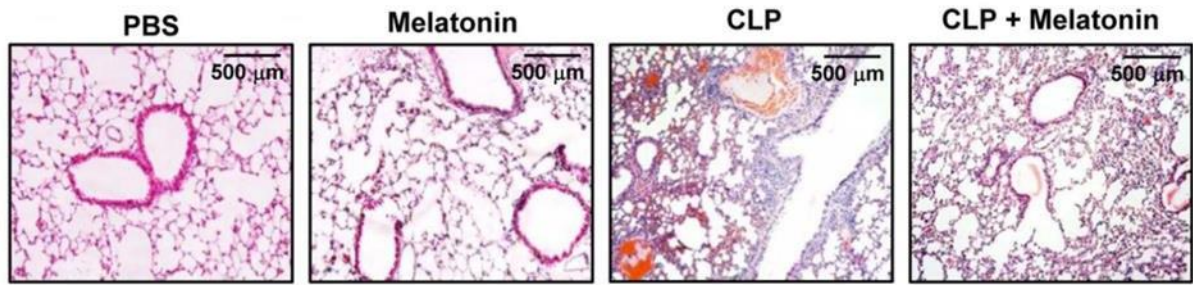


Figure 15 : Effet de la mélatonine sur les dommages pulmonaires sur le sepsis induit par CLP chez la souris. Des souris C57BL/6 ont reçu une injection de 50 mg / kg de mélatonine 30 minutes avant CLP. Trente minutes après la chirurgie, les souris ont de nouveau reçu la même concentration de mélatonine. Coloration à l'hématoxyline et de l'éosine (H&E) des poumons 24 h après CLP (Xu et al., 2019a).

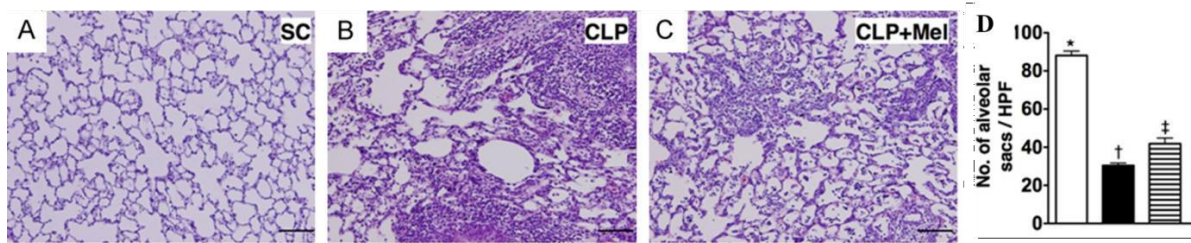


Figure16 : Résultats histopathologiques du parenchyme pulmonaire à 72h après CLP chez le rat Sprague–Dawley. A : Groupe Contrôle sham (SC) ; B : Groupe septique par CLP ; C : Groupe septique traité par la mélatonine 20mg/kg/ip à 30min puis 50mg/kg/ip à 6h, 24h ; D : Résultats analytiques du nombre de sacs alvéolaires. Gx100, Coloration H & E ; barre d'échelle 100 µm. CLP = ligature caecale et ponction; Mel = mélatonine (Chen et al., 2014).

L'ensemble des résultats histologiques montrent une architecture du tissu pulmonaire chez les animaux contrôles similaire à celle des animaux contrôle mélatonine, sans lésions tissulaires ou modifications structurelles. La paroi alvéolaire est intacte, la lumière alvéolaire est bien visible et les cloisons inter-alvéolaires sont régulières. On note aussi, la présence des pneumocytes I et II, ainsi que les macrophages alvéolaires (**Figures15 et 16/A**).

Les animaux septiques montrent une destruction de l'architecture du tissu pulmonaire avec des collapsus alvéolaire sévère, altération des parois alvéolaires, un rétrécissement de la lumière alvéolaire, une diminution significative du nombre des sacs alvéolaires (**Figure 16/D**), une infiltration massive des leucocytes, des lésions hémorragiques (**Figures 15 et 16/B**) associées à un Œdème interstitiel et alvéolaire pulmonaire (**Tableau X ; Figure 15**).

Le traitement par la mélatonine, préserve l'architecture du tissu pulmonaire avec une architecture similaire à celle des animaux contrôle. On note en comparaison avec les animaux septiques une diminution de l'infiltration leucocytaire, une absence des hémorragies, des lésions parenchymateuses avec une paroi alvéolaire moins épaisse, une lumière alvéolaire plus grande et un nombre de sacs alvéolaires plus élevé. Ainsi, la mélatonine protège les tissus pulmonaires des lésions et des dommages oxydatifs et inflammatoires induits par sepsis (**Figures 15, 16/C et D**).

Le tableau suivant représente le taux d'eau ou d'œdème pulmonaire ainsi que la perméabilité vasculaire dans les poumons des animaux septiques.

Tableau X : Taux d'eau et d'œdème pulmonaires (Chen et al., 2018; Li et al., 2019 ; Xu et al., 2019b ;Ibrahim et al., 2020 ; Wang et al., 2020).

Paramètres	Contrôle		CLP		Références
Contenu d'eau (%) Poumon	59.3±8.47		84.74±8.47* 42.9% 1.4x		Chen et al., 2018 CLP 18h
Ratio Poumon Wet/dry	1.3±0.025		1.95±0.071*50% 1.5x		Xu et al., 2019b CLP 24h
Ratio Poumon Wet/dry	4.11 ± 0.33		6.28 ± 0.44***52.8% 1.5x		Ibrahim et al., 2020 CLP 24h
Ratio Poumon Wet/dry	<i>12h</i>	<i>24h</i>	<i>12h</i>	<i>24h</i>	Li et al., 2019 CLP 12h-24h
	4.35± 0.23	4.23± 0.09	4.82±0. 09* 10.8%	5.05±0.4 1* 19.4%	
	<i>Contrôle PBS</i>		<i>LPS (8mg/kg) 24h</i>		Wang et al., 2020 LPS 24h
Ratio Poumon Wet/dry	4.46±0.15		5.53±0.3**24% 1.2x		
Perméabilité vasculaire (Evan's blue µg/g lung tissue/min)	<i>Contrô le FIP</i>	<i>Contrô le LPS</i>	<i>FIP 6h</i>	<i>LPS 4h</i>	Hong et al., 2018 FIP 6h/LPS 4h
	3.39± 0.53	3.26± 0.612	16.96± 1.78* 400.3% 5x	9.28±2.4 4* 184.7% 2.8x	

*P<0,05,**P<0,01, ***P<0,001 vs contrôle.

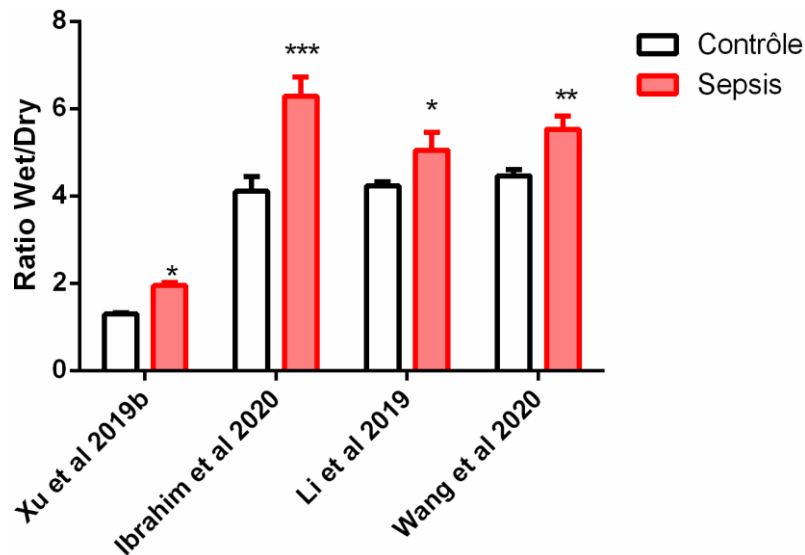


Figure 17 : Œdème pulmonaire induit par sepsis. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs contrôle (Chen *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2019b ; Ibrahim *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2020).

Le taux d'œdème pulmonaire augmente de 10.8% après 12h de sepsis par CLP chez les souris C57BL/6 comparées au groupe contrôle (Li *et al.*, 2019). Ce taux augmente de 42.9% (1.4 fois) après 18h de CLP chez les rats Sprague–Dawley comparés au groupe contrôle (Chen *et al.*, 2018). Il augmente d'avantage de près de 50% après 24h de sepsis par CLP chez les souris C57BL/6 et les rats Wistar (Xu *et al.*, 2019b ; Ibrahim *et al.*, 2020). Aussi, le taux d'œdème pulmonaire augmente de 24% après 24h d'injection de 8mg/kg/ip de chez les souris ICR (Wang *et al.*, 2020) (Tableau X, Figure 17).

La mélatonine inhibe la formation d'œdème pulmonaire après 24h de CLP chez les souris C57BL/6 (Xu *et al.*, 2019a)

La perméabilité vasculaire pulmonaire augmente également de 184.7% (2.8 fois) après 4h d'injection de LPS et de 400.3% (5 fois) après 6h d'injection de FIP chez les souris C57BL/6 comparées aux groupes contrôles (Tableau X).

Ces résultats concordent avec les résultats histologiques qui montrent une forte infiltration leucocytaire et une apparition d'œdème chez les animaux septiques ce qui est expliqué par l'augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire.

IV. Discussion générale

Dans la présente méta-analyse nous avons démontré l'implication du stress oxydatif dans les altérations pulmonaires induites par le sepsis. Ce stress oxydatif est caractérisé par une augmentation des marqueurs pro-oxydants (MPO, MDA, NO) et une diminution d'anti-oxydant (SOD, catalase, GSH).

Le poumon est un organe sensible et considéré comme le premier organe majeur touché par le sepsis. L'atteinte pulmonaire durant le syndrome septique conduit à des lésions pulmonaires aiguës (ALI, acute lung injury) ou à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*), une forme plus sévère que ALI (**Phua et al., 2002 ; Bao et al., 2010 ; Chen et al., 2018**).

L'ALI/ARDS sont associés à une mortalité importantes chez les patients. Il a été démontré que ces phénotypes sont dus essentiellement à des infections à Gram négatif. Les PAMPS (dont le LPS des bactéries à Gram négatif) bactériens activent les récepteurs PRRs (TLRs) et induisent plusieurs voies de signalisation, impliquées dans la réponse inflammatoire. Ceci a pour conséquence l'installation des lésions pulmonaires (**Zhang et al., 2011 ; Dushianthan et al., 2012; Butt et al., 2016**).

Le NF- κ B constitue le facteur de transcription clé de la réponse inflammatoire, induite au cours du sepsis. Il régule l'expression de plus de 200 gènes tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β), des chimiokines (IL-8), des molécules d'adhésion (ICAM-I, VCAM-1), des molécules nécessaires à l'activation des cellules T, des enzymes pro-oxydantes (iNOS, Cox-2), des enzymes antioxydantes (SOD, GPx), des molécules anti-apoptotiques (Bcl2) et des facteurs de coagulation (facteur tissulaire) (**Leentjens et al., 2013**).

Les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , et TNF α), exercent un feedback positive et activent la voie NF- κ B intensifiant la réponse inflammatoire et conduisant à l'état hyperinflammatoire caractéristique du sepsis (**Liu et Malik., 2006**).

Le système immunitaire tente de rétablir cette réponse hyper-inflammatoire délétère et d'éliminer l'agent pathogène, par activation du système immunitaire inné, accumulation de neutrophiles et de macrophages, sécrétion de cytokines, recrutement des lymphocytes T et B, et formation d'anticorps. Néanmoins, cette réponse cause encore plus de dommages collatéraux pulmonaires entraînant ainsi une anergie des mécanismes de défense de l'hôte, une

défaillance rapide du poumon et enfin une mortalité (**Idell, 2012 ; Chen et al., 2014 ; Wang et al., 2019**).

Parallèlement à la réponse immuno-inflammatoire, un stress oxydatif s'installe. Le stress oxydatif influence les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'inflammation et causent directement des lésions tissulaires (**Kvietys et Granger., 2012; Bedreag et al., 2015**).

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre de la balance redox à l'origine d'une surproduction de ROS/RNS. Son rôle dans la pathogénèse d'ALI/ARDS induit par sepsis est bien établi (**Guo et Ward., 2007 ; Wang et al., 2019**).

La réponse immuno-inflammatoire fait appel à des cellules immunitaires principalement les polynucléaires neutrophiles et les macrophages. Ces derniers produisent des ROS/RNS dans le but d'éliminer le pathogène (**Xu et al., 2019a**). Cependant, la production de ROS augmente également dans les cellules endothéliales et épithéliales du tissu pulmonaire (**Valavanidis et al., 2013**). Les ROS/RNS libérées amplifient la réponse inflammatoire, et endommagent les constituants cellulaires (ADN, lipides, protéines) conduisant à des lésions cellulaires et à des dommages pulmonaires (**Wang et al., 2019**).

En outre, les ROS/RNS modulent plusieurs voies de signalisation comme la voie NF- κ B et NRF-2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), dont l'activation amplifient la réponse inflammatoire et le stress oxydatif (**Zhou et al., 2001; Horton, 2003**).

Parallèlement, l'activation du Nrf2 par les ROS régule la réponse antioxydante par l'expression des gènes codants pour l'hème oxygénase 1 (HO-1), la glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GRd), la superoxyde dismutase (SOD) et pour des enzymes essentielles à la synthèse de glutathion (glutamate cysteine ligase) (**Kensler et al., 2007 ; Liu et al., 2017**).

Il a été démontré que le Nrf2 a un effet protecteur significatif sur les lésions pulmonaires hyperoxique (**Wiese et al., 2000 ; Wang et al., 2019 ; Xu et al., 2019**).

En plus de son rôle physiologique dans le catabolisme de l'hème, l'hème oxygénase possède des propriétés anti-inflammatoires grâce à la régulation positive de l'expression de l'interleukine 10 (IL-10). Aussi, l'HO-1 supprime le stress oxydatif en cas d'ALI /ARDS induit par sepsis, et le mécanisme possible pourrait être associée à l'activation de la voie PI3K / Akt ou la voie Nrf2 (**Yu et al., 2016; Leung et al., 2017 ; Zhang et al., 2017**).

L'ensemble des résultats de notre méta-analyse montrent également le rôle de la mélatonine dans la prévention de la mortalité, l'inhibition de la réponse inflammatoire et le stress oxydatif.

En effet, la mélatonine est une molécule pléiotrope avec un effet anti-inflammatoire, anti-oxydant et anti-apoptotique. La mélatonine neutralise les ROS et régule la réponse anti-oxydante Nrf2-dépendante (Rodriguez et al., 2004; Garcia et al., 2017 ; Rahim et al., 2017). En outre, la mélatonine réprime la réponse inflammatoire dépendante du NF-κB, rétablit l'homéostasie mitochondriale, et réduit les dommages pulmonaires sepsis-dépendants (Escames et al., 2003 ; García et al., 2015 ; Chen et al., 2018).

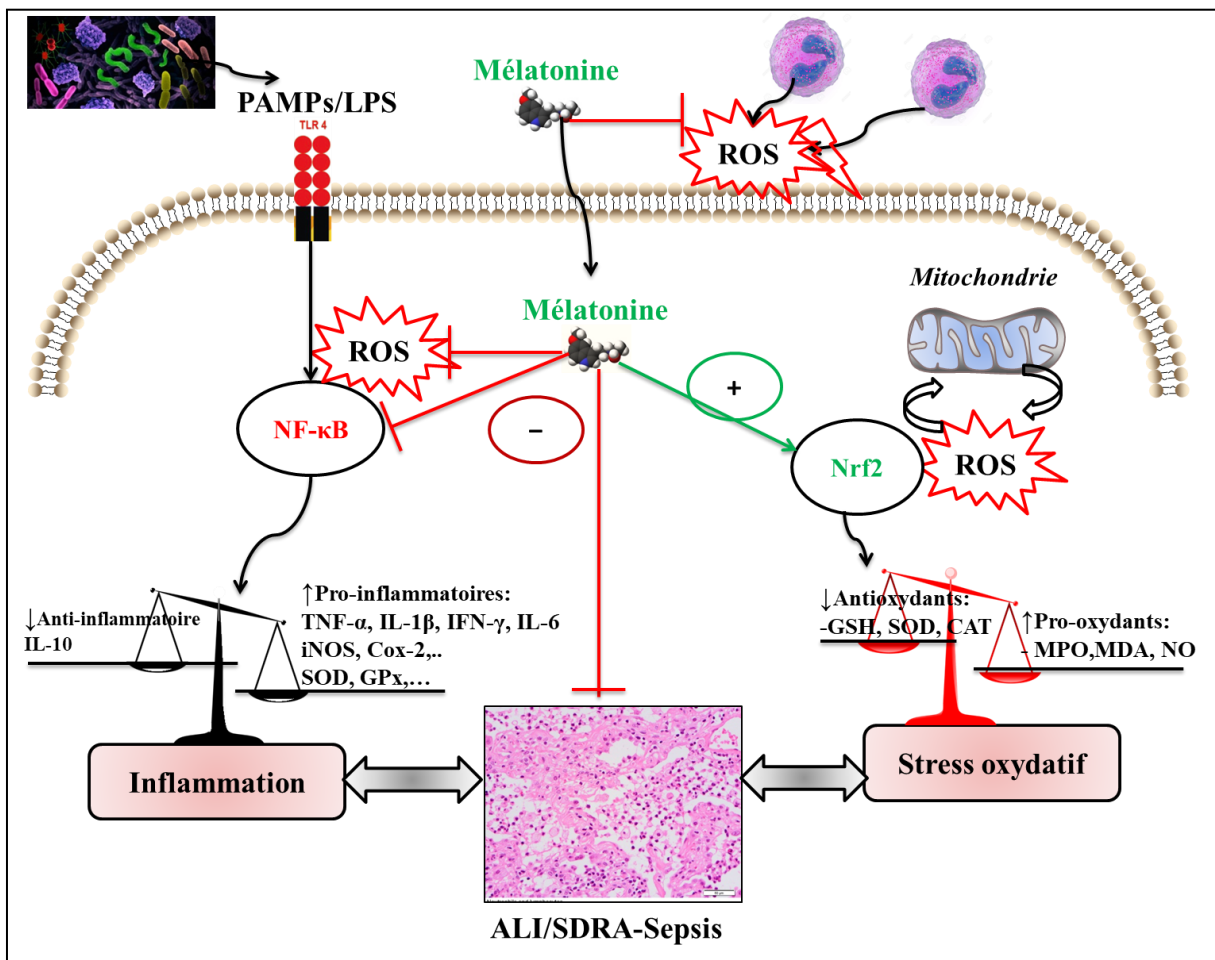


Figure 18 : Effet de la mélatonine dans la modulation du stress oxydatif de la réponse inflammatoire à l'origine d'ALI/SDRA induit par sepsis.

Conclusion

Nous avons montré à travers cette méta-analyse que :

La mélatonine réduit la mortalité induite par sepsis polymicrobien dans les différents modèles murins.

Le sepsis induit une augmentation de la charge bactérienne aussi bien dans le poumon que dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) et le liquide péritonéal (PerF). Le traitement par la mélatonine exerce un effet antimicrobien et réduit la charge bactérienne.

La réponse inflammatoire induite par sepsis est caractérisée par une augmentation du nombre de leucocytes (neutrophile, macrophage) dans le sérum et le BALF, et des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6, et IFN- γ) dans le sérum, le BALF et les poumons. La mélatonine exerce un effet anti-inflammatoire systémique et diminue le nombre de leucocytes et de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) dans le sérum des animaux.

Le sepsis induit un stress oxydatif caractérisé par une augmentation du taux des marqueurs pro-oxydant (MPO, MDA, NO) associé à une diminution des taux de marqueurs anti-oxydants (SOD, catalase, GSH) dans le poumon.

Le stress oxydatif associé à la réponse inflammatoire excessive provoque des dommages oxydatifs pulmonaire et un œdème pulmonaire. La mélatonine rétabli l'équilibre redox et prévient les dommages oxydatifs pulmonaire et la formation d'œdème.

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

En perspectives, il serait intéressant de :

- Etudier l'effet de la mélatonine sur notre modèle murin de souris.
- Explorer l'effet de la mélatonine sur le dysfonctionnement mitochondrial induit par sepsis.
- Etudier l'implication du stress oxydatif et l'effet de la mélatonine chez des patients septiques. .

A

- Acuna-Castroviego D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. (2001). Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *Journal of pineal research*, 30(2), 65-74.
- Acuna-Castroviego D, Navarro-Alarcon M, Ruiz Ojieda F, Blancu-Herrera M, Agil A. (2014). Melatonin and Metabolic regulation : a review food and function , 5(11) , 2806-2832.
- Acuña-Castroviejo; D. I. Rahim, C. Acuña-Fernández,• M. Fernández-Ortiz, J.Solera-Marín, R. K. A. Sayed, M. E. Díaz-Casado, I. Rusanova, L. C. López et G.Escames (2017). Melatonin, clock genes and mitochondria in sepsis. *Cellular andMolecular Life Sciences*. 123.
- Aebi Hugo. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Akbulut HF, Vatensev H, Skmenli T. (2020). Determination of melatonin deprivation impact on sepsis with acute phase reactants. *Journal of surgical research*, 247, 108-114.
- Ambroise-Thomas So. (1998). La Melatoine :role biologique ,intérêt et limites de l'usage Thérapeutique. Université Joseph Fourier -Grenoble I.
- An RU, Zhao L, Xi C, Li H, Shen GU, Zhang SH, Sun L. (2016). Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/AKT-dependent mechanism. *Basic Research in cardiology*, 111 (1), 8.
- Arnalich F, García-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C. (2000). Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect. Immun* ; 68: 1942-1945.
- Arnalich F, García-Palomero E, López J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C. (2000). Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect. Immun*; 68:1942-1945.
- Arons MM, Wheeler AP, Bernard GR, Christman BW, Russell JA, Schein R, Summer WR, Steinberg KP, Fulkerson W, Wright P, Dupont WD, Swindell BB. (1999). Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. *Ibuprofen in Sepsis Study Group.Crit Care Med*, 27(4), 699-707.
- Awad alkozi H, Navarro Gemma, Franco R, Pintor J. (2019). Melatonin and the control of intraocular pressure. *Progress in retinal and eye research*, 75, 100798.

B

- Bao S, Liu MJ, Lee B, Besecker B, Lai JP, Guttridge D, Knoell D. (2010). Zinc modulates the innate immune response in vivo to polymicrobial sepsis through regulation of NERF. *Physiological lung cell mol*, 298, 744-754.
- Bedirli A, Kerem M, pasaoglu H, Akyurek N, Tezcaner T, Elbey S, Memis L, Sakrak O. (2007). Bêta-Glucan attenuates inflammatory cytokine release and prevents acute lung injury in an experimental model of sepsis. *The european society for surgical research*, 27(4), 397-401.
- Bedreag OH, Rogobete AF, Sarandan M, Cradigati AC, Papurica M, Dumbuleu MC, Chira AM, Rosu OM and Sandes. (2015). D : Oxidative stress in severe pulmonary trauma in critical ill patients. Antioxidant therapy in patients with multiple trauma a review. *Anaesthesiol Intensive Ther*, 47: 351 359.
- Belaich R et Boujraf S. (2016). Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégie thérapeutiques. *Médecine des maladies métaboliques*, 10(1) 38-42.
- Benleulmi-Chaachou AB. (2014). Etude des partenaires protéiques associés aux homodimères et aux hétérodimères des récepteurs couplés aux protéines G. Université Paris –Sud.
- Besnier E, Delile E, Coquerel D, Tamion F. (2015). Les voies du monoxyde d’azote dans les sepsis. *Réanimation* 24(2), 191-200.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. (1992). American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* ; 20:864–874.
- Boomer J, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Briker TL, Jarman SD, Kresel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS. (2011). Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure, *Jama*, 306(23), 2594-2605.
- Bouglé A et Annane D. (2007). Physiopathologie du choc septique. *Antibiotiques* ; 9: 9-19.
- Bouguirne B. (2012). Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires : these de doctorat. Université toulouse 3.

-Bouroche GA.(2012). Pneumonies acquises sous ventilation mécanique dans les suites d'un sepsis sévère : particularité des infections intra-abdominales .Université Paris Descarte .

-Bruls E, Crasson M, Van retch O, Legros JJ. (2000). Melatonin physiological and therapeutic effects. *Revue medicale de liege*, 55(9), 862-870.

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

-Butt Y, Kurdowska A, Graig A, et al. (2016). Acute lung injury : A clinical and molecular review. *Archives*, 140(4), 345-350.

C

-Cardoso-Sousa L, Aguiar E, Caixeta D, Vilela DA, Costa D, Silva T, Cunha TH, Faria P, Espindola F, Jardim A, Vieira AL, Oliveriara T, Goulart L, Sabino-Silva R, Mukhpoadhyay P. (2019). Effects of salbutamol and phlorizin on acute pulmonary inflammation and disease severity in experimental sepsis. *Plos one*, 14(9), e0222575.

-Chen HO, Chang CH, Lin KU, Sung PE, Chai HA, Zhen YE, Wu YI , Leu S, Tsai T, Chen CH, Chang HS. (2014). Melatonin augments apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell treatment against sepsis-induced acute lung injury. *American journal of translation reaserch*, 6(5), 439-458.

-Chen X, Cai X, Le R, Zhang M, Gu X, Shen F, Hong, Chen Z. (2018). Isoliquiritigenin protects against sepsis-induced lung and lives injury by reducing inflammatory repones, 496, 245-252.

-Chen XI, Wang YI, Xie X, Chen HO, Zhu QI, Ge Z, Wei HU, Deng JI, Xia ZH, Lian QI. (2018). Heme oxygenase-1 Redueced sepsis-Induced endoplasmic reteclium stress and acute lung injury. *Mediators of inflammation*, 2018, 1-10.

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

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

- Cinar IR, Sirin BU, Aydin PE, Toktay ER, Cadirci E, Halici I, Halici Z. (2019). Ameliorative effect of gossypin against acute lung injury in experimental sepsis model of rats. *Life Sciences*. 221, 327-334.
- Claustrat B et Lerton J. (2015). Melatonin : physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 61(2-3), 77-84.
- Cohen J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420, 885-891.
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in Freshwater bivalves, *unio tumidus*, as biomarkers of aquatic. *Ecotoxicology and environmental safety*, 38(2), 122-131.
- Costantino G, Cuzzocrea S, Mazzon E, et al. (1998). Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation *Eur J Pharmacol* ; 363:57-63.

D

- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* ; 52(4) : 601-23.
- Danielski LG, Giustina AD, Bofante S, Barichello T, Petronilho F. (2020). The NLRP3 inflammasome and its role in sepsis development. *springer*, 43(1), 24-31.
- Devavry SE. (2011). Récepteurs de la mélatonine : pharmacologie du récepteur ovin MT2, identification de leur activité constitutive et développement d'une approche par ARN interférent. Université François – Rabelais de Tours.
- Diniz V, Peixoto LG, Teixeira RR, Baptista NB, Caixeta DC, Souza AV, Machado HL, Pereira MN, Espindola FS. (2016). The role of metformin in controlling oxidative stress in muscle of diabetic rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Draper HH, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*; 186: 421-31.
- Draper HH, Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*; 186: 421-31.

-Dushianthan A, Cusack R, Goss V, Poste A, Grocott M. (2012). Clinical review : exogenous surfactant therapy for acute lung injury/ acute respiratory distress syndrome-where do we go from here ?. *Critical care*, 16, 238.

E

-ElGamasy .T M. A, Abushady NA M, Hamza MO T, Shaker R.(2015). Increased myeloperoxidase activity as an indicator of neutrophil-induced inflammation and sepsis in neonates.*Egypt J Pediatr Allergy Immunol* ; 13(1) :15-20.

-Ellman GL. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1), 70-77.

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

F

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

-Favero GA, Franceschetti LO, Bonomini FR, Fabrizio Rodella LU, and Rezzani RI. (2017). Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. *International Journal of Endocrinology*.

-Favero GA, Franceschetti LO, Bonomini FR, Fabrizio Rodella LU, and Rezzani RI. (2017). Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. *International Journal of Endocrinology*.

-Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolff Met al. (2014).Melatonin receptors mediate improvements of survival in a model of polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 42 : e22–e31.

-Fossati P, Prencipe L, Berti G. (1980). Determination of catalase in tissue homogenate. *Clin.chem*, 26, 227-231.

-Fridovich I, Georgy EM, Goscim SA. (1974). Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote. *Journal of bacteriology*, 117(2), 456-460.

G

- Galley HF. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British journal of anaesthesia*, 107(1), 57-64.
- García JA, Ortiz F, Miana J, Doerrier C, Fernandez-Ortiz M, Rusanova I, Escames G, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. 2017. Contribution of inducible and neuronal nitric oxide synthases to mitochondrial damage and melatonin rescue in LPS-treated mice. *J Physiol Biochem*; 73:235-244.
- García JA, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, Lopez LC, Acuna-Castroviejo D. 2015. Disruption of the NF-kappa B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor-alpha and blocks the septic response in mice. *FASEB J* ; 29 :38633875.
- Garcia JJ, Ryes-Gonzales M, Esteban-Zubero E, Almeida-souza P, Ruiz F, Tan DX. (2016). Melatonin's role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage : à review. *Pharmacological Research*, 105, 108-120.
- Gitto E, Karhownik M, Reites RJ, Xiantan D, Cuzzacrea S, Chirozzi P, Cardaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I. (2001). Effects of melatonin treatment in septic membranes. *Pediatric research*, 50(6), 756-760.
- Grand F, Gitton J, Goudable J. Optimisation des paramètres du dosage des nitrites sériques par la technique de griess. *Annals de biologie clinique*, 59(5), 559-565.
- Grimaldi DA. (2014). Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunodépression postinfectieuse. *Médecine humaine et pathologie*. Université René Descartes – Paris.
- Guo RF, Ward PA.(2007). Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid Redox Signal*, 11: 1991–2002.

H

- Hardeland R, Pandi-Perumal S.R. Cardinali D.P. (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* ; 38, 313-316.
- Hong GU, Zheng D, Zheng L, Ni RU, Wang GR, Fan GU, Lu Z, Peny TI. (2018). Administration of of nicotinamide riboside presents oxidative stress and organ injury in sepsis. *Free radical biology and medicine*, 123, 125-137.

-Horton JW. 2003. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma : the role of antioxidant therapy. *Toxicology* ; 189:75-88.

-Hotchkiss RS, Monneret G, Payln D. (2013). Immunosuppression in sepsis : a novel understanding of the disorder and new therapeutic approach. *The lancet infectious diseases* 13(3), 260-268.

-Huet O, Obata R, Aubron C, Spraul-Davit A, Charpentier J, Laplace C, Nguyen-Khoa T, Conti M, Vicaute E, Mira JP, Duranteau J. (2007). Plasma-induced endothelial oxidative stress related of the severity of septic shock. *Critical care medicine*, 35(3), 821-826.

I

-Ibrahim Y, Moussa RA, Bayoumi A, Ahmed A. (2020). Tocilizumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of sepsis via down-regulation of NF- κ B/JNK : possible role of P-glycoprotein. *Inflammopharmacology*, 28(1), 215-230.

-Idell S. (2012). Anticoagulants for acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 4: 517–520.

-Iwaya A, Nakagawa S, Iwakura N, Taneike I, Kurihara M, Kuwano T, Gondaira F, Endo M, Hotakeyama K, Yamamao T. (2005). Rapid and quantitative detection of blood *Serratia marcescens* by a real time PCR assay : Its clinical application and evaluation in a mouse infection model. *Microbiology letters*, 248(2), 163-170.

K

-Kingir ZE. (2018). Effects of dopagliflozin on experimental sepsis model in rats. *Turkish journal trauma and emergency surgery*, 25, 213-221.

-Kirshvink N, Moffarts B, Lekeux P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The veterinary journal*, 177(2), 178-191.

-Klebanoff SJ. (2005). Myeloperoxidase : friend and foe. *Journal of leukocyte biology* 77(5), 598-625.

-Kostakoglu U, Topcu AT, Atak M, Tumkaya LE, Mecantepe TO, Uydu HU. (2020). The protective effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor against cecal ligation and puncture-induced sepsis via oxidative stress and inflammation. *Life Sciences*, 241, 117051.

-Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Sivastava CK, Metha S, Jyoti A. (2018). Evaluation of oxidative stress and antioxidant status : Correlation with the severity of sepsis. *Scandinavian journal of immunology* 87(4), e12653.

-Kvietys PR and Granger. (2012). DN : Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med*, 52: 556 592.

L

-Laroye C, Gibat S, Reppel L, Bensoussan D. (2017). mesenchymal stromal/ stem cells : à new treatment for sepsis and septic shock. *Concise review*, 35(12), 2331-2339.

-Lee BH, Inui D, Suhl GY, Kim JY, Kwon JY, Park J, Tada K, Tanaka K, Ietsugu K, Uehara K, Dote K, Tajimi K, Morita K, Matsuo K, Hoshino K, Hosokawa K, Lee KH, Lee K. M , Takatori M, Nishimura M, Sanui M, Ito M, Egi M, Honda N, Okayama N, Shime N, Tsuruta R, Nogami S, Yoon S. H, Fujitani S, Koh SO, Takeda S, Saito S, Hong SJ, Yamamoto T, Yokoyama T, Yamaguchi T, Nishiyama T, Igarashi T, Kakihana Y, and Koh Y.(2012). Association of body temperature and antipyretic treatments with mortality of critically ill patients with and without sepsis : multi-centered prospective observational study.*Crit Care*, 16(1), R33.

-Leetjens J, Kox M, Van der hoeven J, Netea M, Pikkers. (2013). Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis : From immunosuppression to immunostimulation, Time for paradigme change ? *Pubmed*, 23590272.

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

-Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. (1959). Structure of Melatonin. *Journal of the american chemical society*, 81(22), 6084-6085.

-Leung WS, Yang ML, Lee SS, Kuo CW, Ho YC, Liu HW, Kuan YH. Protective effect of zerumobone reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury via antioxidative enzymes and NrF2/HO-1 pathway. *International immunopharmacology*, 46, 194-200.

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

-Li ZE, Jia Y, Freng YA, Cui R, Miao R, Zhang XI, Qu K, Liu CH, Zhang JI. (2019). Melatonin alleviates sepsis-induced injury by inhibiting pyroptosis and apoptosis in vivo and in vitro experiments. *Aging*, 11(4), 1226-1239.

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

-Liu S, Malik A. (2002). NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Lung cellular and molecular physiology*, 290(4), 622-645.

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

-Lorente LE, Martín MA M, Abreu-González P, Domínguez-Rodríguez AL, Labat LO, Díaz CE, Solé-Violán JO, Ferreres JO, María Borreguero-León JU, Jiménez AL, and Morera-Fumero AR . (2013). Prognostic Value of Malondialdehyde Serum Levels in Severe Sepsis: A Multicenter Study. *PLoS One* ; 8(1) : e53741.

-Lorente LE. (2015). New Prognostic Biomarkers of Mitochondrial Oxidative Stress in Septic Patients. *Archives of Critical Care Medicine*; 1 (2)- e3125.

-Luinking YC, Engelen MPKJ, Deutz N. (2010). Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 13(1), 97.

M

-Madrid-Navarro CJ, Sanchez-Galvez R, Martinez-Nicolas A, Marina R, Garcia JA, Madrid Ja, Rol MA. (2015). Disruption of circadian rhythms and delirium, sleep therapeutic implications for increased light-dark contrast. *Current pharmaceutical design*, 21(24), 3453-3468.

-Majno G. (1999). The ancient riddle of sepsis. *The journal of infectious diseases*, 163(5), 937-945.

-Mathur R, Oh H, Park SG, Seo J, Kobansky A, Hayden MS, Gosh S. (2012). A mouse model of salmonella typhi infection. *Cell*, 151(3), 590-602.

-McCord JM et Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase an enzymatic function for thionin. *Journal of biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.

-Migdal C et Serres M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)*, 27(4), 405-412.

-Molina VI, Dessauer BE, Rodrigo RA & Carvajal CR. (2017) Oxidative stress biomarkers in pediatric sepsis : a prospective observational pilot study. *REDOX REPORT ; VOL : 22, NO. 6*, 330–337.

-Motoyama, Takeshi MD, Okamoto, Kazufumi MD, Kukita, Ichirou MD, Hamaguchi, Masamichi MD, Kinoshita, Yoshihiro MD, Ogawa, Hisao MD. (2003). Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome, 31 (4), 1048-1052.

N

-Nagar H, Piao S, Kim CS. (2018). Role of mitochondrial oxidative stress in sepsis. *Acute and critical care*, 33(2), 65.

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

-Nathan A, Baker KH, Hegarty JP, Redmond B, Herson DS. (2002). Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, an ozone) on helicobacter pylori. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 981-984.

O

-Ohkawa H, Ohiski N, Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(12), 351-358.

-Olawale OA, Gbiri CA, Isaac SO. (2015). Stroke management : Informal Caregivers burdens and straints of caring for stroke survivors. *Annals of Physical and rehabilitation medicine* 58(2), 98-103.

-Ortiz FR, Garc JO, Castroviejo DR, Doerrier CA, Lopez AN, Venegas CA, Volt HU, Marta Luna-Sanchez MA, Lopez LU and Escames GE. (2014). The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrialimpairment during sepsis : inhibition of iNOS and preservationof nNOS. *J. Pineal Res ; 56:71–81*.

P

- Pahlavani N, Sedaghat A, Bagheri Moghaddam A, Mazloumi Kiapey S, Navashenag J, Jarahi L, Reazvani R, Nourouzy A, Nematy M, Safarian M, Ghayour-Mobarhan M. (2019). Effects of propolis and melatonin on oxidative stress, inflammation, and clinical status in patients with primary sepsis: Study protocol and review on previous studies. *Clinical Nutrition ESPEN*, 33, 125-131.
- Pang D, Bahir D, Carcillo J, K Nguyen T, Aneja R, et al. (2019). Role of damage-associated molecular patterns and uncontrolled inflammation in pediatric sepsis-induced multiple organ dysfunction syndrome. *Relaped*, 8(1), 25-31.
- Phaniedra A, Jestadi DB, Periyasamy L. (2015). Free radicals : Propeties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Phua J, Radia J, Adhikari N, Friedrich J, Fomler R, Sigh J, Scales D, Strather D, Li A, Jones A, Gattas D. (2002). Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time ? *Asystemic Review*, 1901152.
- Poujol FA. (2016). *Immunodépression acquise en réanimation : approche expérimentale et clinique des altérations lymphocytaire induites lors des syndromes septiques*, Université Claude Bernard –Lyon 1.
- Pravda JAY. (2014). *Metabolic theory of septic shock*. *World J Crit Care Med* ; 4 :3(2) : 4554.

Q

- Qi Y, Cao LI, Hu L. (2019). Sirtuin 6 mitigated LPS-induced human umbilical vein endothelial cells inflammatory reponses through modulating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Journal of cellular Biochemistry*, 120(7), 11305-11317.
- Qin Y, Cao L, Hu L. (2019). Sirtuin 6 mitigated LPS-induced human umbilical vein endothelial cells inflammatory reponses through modulating nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Journal of cellular biochemistry*, 1-13.
- Qiu PE, Yang LU, and Jin ZH. (2019). *Recent Advances in Studies of Molecular Hydrogen against Sepsis*. *Int J Biol Sci.* ; 15(6) : 1261–1275.

R

- Rahim I, Djerjouri B, Sayed RK, Fernandez-Ortiz M, Fernandez-Gil B, Hidalgo-Gutiérrez A, Lopez LC, Escames G, Reites RJ, Acuna-Castroviego D. (2017). Melatonin administration to wild type mice and nontreated NLRP3 mutant mice share similar inhibition of inflammatory response during sepsis. *Journal of pineal research*, 63(1), e12410.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*; 61:253-278.
- Reiter RJ, Tan DX, Galano A. (2014). Melatonin : exceeding expectations. *Physiology Bethesda* ; 24:325–333.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, et al. (2004). Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. *J Pineal Res* ; 36:1–9.
- Rudd E, Johnson CS, Agesa K, Scachelford K, Tsoi D et al. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017 : analysis for the global burden of disease study. *Sciencedirect*, 395(10219), 200-211.

S

- Salomao R, Ferreira BL, Salomao MC, Santos SS, Azenedo LCP, Bauniali MKC. (2019). Sepsis : evaluating concepts and challenges. *Brazilian journal of medical and biological research*, 52(4).
- Sano R et Reed JC. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1833: 3460–3470.
- Sarti PO, Magnifico MA, Altieri FA, Mastronicola DA, et Arese MA. (2013). New Evidence for Cross Talk between Melatonin and Mitochondria Mediated by a Circadian-Compatible Interaction with Nitric Oxide ; 14(6) : 11259–11276.
- Schrijver IT, Kemperman H, Roest M, Kesecioglu, J, Lange DW. Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. *Intensive care medicine experimental* 5(1), 1-9.
- Sedlak J et al. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem*, 25, 192–205.

- Sedlak J, Lindsay RH. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
- Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BC. (2005). Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* ; 35(1) :52-9.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Michalad AM, Dely-Dupont G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Med. Vét*, 147, 79-93.
- Shah N, Gupta RK, Patel AK, Choudhary AK, Chandra Y, Pakuwal U. (2014). Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer : a review. *Asian pacific journal of cancer prevention*, 15(11), 4405-4409.
- Sies H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology and medicine*, 27(9-10), 916-921.
- Singer M, Deutsman CS, Seymour CW, Shankas-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. (2016) The third international consensus definition for sepsis and septic shock (sepsis3). *Jama*, 315, 801-810.
- Spanidis Y, Goutzourelas N, Stagos D, Kolyva A, Gogos C, Bar-Or D, Kouretas D. (2015). Assessment of Oxidative Stress in Septic and Obese Patients Using Markers of Oxidation-reduction Potential. *in vivo*, 29(5), 595-600.

T

- Tesniere A, Pèned F, Mira JP. (2008). Immunité innée et sepsis: quand le danger vient de l'intérieur. Endogenous danger signal participate in immune system activation in sepsis; 17:379-386.
- Toky V, Sharma S, Arora BB, Chhibber S. (2003). Etablissement of sepsis model following implantation of *Klebsiella pneumoniae*-infected fibrin clot into the peritoneal cavity of mice. *Folia microbiologica*, 48(5), 665.
- Toufekoula RH, Papadakis VA, Tsaganos TH, Routsis CH, E Orfanos ST, Kotanidou AN, Carre DI, Raftogiannis MA, Baziaka FO and Giamarellos-Bourboulis EV.(2013). Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram C – negative bacteria: experimental and clinical evidence. *Critical Care* ; 17.

U

-Uchiyama M et Mihara M. (1978). Determination of molanaldehyde precursor in tissues by thiobabituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86(1), 271-278.

-Urata Y, Honwa S, Goto S, Todorki S, Lida T, Cho S, Honwa K, Kando T. (1999). Melatonin induces Y-glutanylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endotheliol cells. *Free radical biology and medecine* 27 (7-8), 838-847.

V

-Valavanidis, T. Vlachogianni, K. Fiotakis, S. Loridas. (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer : respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 3886–3907. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093886>.

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

-Venegas C, Garcia JA, Escames G, Ortiz F, Lopez A, Doerries C, Lopez LC, Reiter RJ. (2012). Extrapineal melatonin, analysis of its subcellular distribuion and daily flutuations. *Journal of pineal research*, 52(2), 217-227.

-Villete T, Barrau C, Swital M, Poletto E, Buryos M. (2017). Narrow Blue-Blocker eyewear significantly limits melatonin supression and sleeap quality reduction due to moderate light exposure before dedtime. *Investigative ophthalmology and visuel science*, 58 58), 4134-4136.

W

-Wang RI, Hui LI, Li XU, Hui ZH and Rui XI.(2015). Involvement of nuclear receptor RZR/ROR γ in melatonin-induced HIF-1 α inactivation in SGC-7901 human gastric cancer cells. *Oncology Reports* ; 34: 2541-2546.

-Wang WA, Yang XI, Chen QI, Guo MI, liu S, Liu J, Wang JI, Huang FE. (2020). Sinomenine attenuates septic-associated lung injury through the Nrf2-keap1 and autoplgy. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 72(2), 259-270.

-Wei Hu, Chao DE, Zhiqiang Ma, Dongjin WA, Chongxi Fan, Tian Li, Shouyin Di, Bing Gong, Reiter RU and Yang YA. (2017). Utilizing melatonin to combat bacterial infections and septic injury. *British Journal of Pharmacolog* ; 174 754–768.

-Weiss SL et Deutshman CS. (2014). Elevated malondialdehyde levels in sepsis-something to 'stress' about ? Critical Care. 18(2), 1-2.

-Wiesel P, Patel AP, DiFonzo N, Marria PB, Sim CU, Pellacani A, Maemura K, LeBlanc BW, Marino K, Doerschuk CM, et al. (2000). Endotoxin induced mortality is related to increased oxidative stress and end organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase 1 deficient mice. Circulation, 102: 3015 3022.

-Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ. (2006). Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome implications for microbial killing. Journal of biological chemistry 281(52) , 39860-39869.

X

-Xu J, Lei SH, Ye G. (2019). Dexmedetomidine attenuates oxidative/nitrative stress in lung tissues of septic mice partly via activating heme oxygenase-1. Experimental and Therapeutic medicine, 3071-3077.

-Xu L, Zhang W, Kwak M, Zhang L, Lee P, Jin J. (2019). Protective effect of melatonin against polymicrobial sepsis is mediated by the anti-bacterial effect of neutrophils. Frontiers in immunology, 10, 1371.

Y

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

-Ye L, Zheng Z, Jiang L, Gao Y, Tang L, Zhang M. (2015). The accuracy of preseosin for the diagnosis of sepsis from SIRS : a systematic review and meta-analysis. Annals of intensive care, 5(1), 48.

-Yu J, Wang Y, Li Z, Dong S, Wang D, Gong L, Shi J, Zhang Y, Liu D, Mu R.(2016). Effect of heme oxygenase-1 on mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS. Scientific reports, 6, 36530.

Z

-Zarjou A et Argaval A. (2011). Sepsis and acute kidney injury. Journal of the american society of nephrology, 22(6), 999-1006.

- Zhang B, Liu ZY, Li Y, Luo Y, Liu ML, Dong HY, Wang YX, Liu Y, Zhao PT, Jin FG, Li ZC. (2011). Antiinflammatory effects of matrine in LPS-induced acute lung injury in mice. *European journal of pharmaceucal Siences*, 44, 573-579.
- Zhang Q, Thamphiwatana S, Angsantikul P, Olson J, Luk Brian, Fang RH, Gao W, Nizet V, Zhang L. Macrophage-like nanoparticles concurrently absorbing endotoxins and poinflammatory cytokines for sepsis managment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43), 11493.
- Zhang Z, Zhou J, Song D, Sun Y, Liao C, and Jiang X. (2017). “Gastrodin protects against LPS-induced acute lung injury by activating Nrf2 signaling pathway,” *Oncotarget*, 8, 19, 32147–32156.
- Zheng D, Yu Y, Li M, Wang G, Chen R, Fan GC, Martin C, Xiong S, Peng T. (2016). Inhibition of MicroRNA 195 Prevents Apoptosis and Multiple-Organ Injury in Mouse Models of Sepsis. *J Infect Dis*, 213(10), 1661-70.
- Zheng D, Yu Y, Li M, Wang G, Chen R, Fan GC, Martin C, Xiong S, Peng T. (2016). Inhibition of MicroRNA 195 Prevents Apoptosis and Multiple-Organ Injury in Mouse Models of Sepsis, *J Infect Dis*, 213(10), 1661-70.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. 2001. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* ; 31:1405-1416.