

Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement
le 22 octobre 2019

Par Mr Philippe BOTHOREL

Né le 28 septembre 1986 à Saint Renan, Finistère.

**Immature granulocytes quantification by flow
cytometry as a diagnostic marker for sepsis in
preterm neonates**

Thèse dirigée par le

Docteur Laure PONTIER

Examineurs :

Mme LIENHARDT-ROUSSIE Anne, PU-PH, Pédiatre
Mr GUIGONIS Vincent, PU-PH, Pédiatre
Mr FEUILLARD Jean, PU-PH, Hématologie biologique
Mme MONS Fabienne, PH, Pédiatre
Mme PONTIER Laure, PH, Pédiatre

Présidente du jury
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse



Faculté de Médecine

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 22 octobre 2019

Par Mr Philippe BOTHOREL

Né le 28 septembre 1986 à Saint Renan, Finistère.

**Immature granulocytes quantification by flow
cytometry as a diagnostic marker for sepsis in
preterm neonates**

Thèse dirigée par le

Docteur Laure PONTIER

Examineurs :

Mme LIENHARDT-ROUSSIE Anne, PU-PH, Pédiatre

Mr GUIGONIS Vincent, PU-PH, Pédiatre

Mr FEUILLARD Jean, PU-PH, Hématologie biologique

Mme MONS Fabienne, PH, Pédiatre

Mme PONTIER Laure, PH, Pédiatre

Présidente du jury

Examineur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

Le 1 novembre 2018

| | |
|------------------------------|---|
| ABOYANS Victor | CARDIOLOGIE |
| ACHARD Jean-Michel | PHYSIOLOGIE |
| ALAIN Sophie | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| ARCHAMBEAUD Françoise | MEDECINE INTERNE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020) |
| AUBARD Yves | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| AUBRY Karine | O.R.L. |
| BEDANE Christophe | DERMATO-VERNEREOLOGIE |
| BERTIN Philippe | THERAPEUTIQUE |
| BORDESSOULE Dominique | HEMATOLOGIE (Surnombre jusqu'au 31-08-2020) |
| CAIRE François | NEUROCHIRURGIE |
| CHARISSOUX Jean-Louis | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE |
| CLAVERE Pierre | RADIOTHERAPIE |
| CLEMENT Jean-Pierre | PSYCHIATRIE d'ADULTES |
| COGNE Michel | IMMUNOLOGIE |
| CORNU Elisabeth | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE |
| COURATIER Philippe | NEUROLOGIE |
| DANTOINE Thierry | GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT |
| DARDE Marie-Laure | PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE |

| | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| DAVIET Jean-Christophe | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| DESCAZEAUD Aurélien | UROLOGIE |
| DES GUETZ Gaëtan | CANCEROLOGIE |
| DESSPORT Jean-Claude | NUTRITION |
| DRUET-CABANAC Michel | MEDECINE et SANTE au TRAVAIL |
| DURAND-FONTANIER Sylvaine | ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE) |
| ESSIG Marie | NEPHROLOGIE |
| FAUCHAIS Anne-Laure | MEDECINE INTERNE |
| FAUCHER Jean-François | MALADIES INFECTIEUSES |
| FAVREAU Frédéric | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| FEUILLARD Jean | HEMATOLOGIE |
| FOURCADE Laurent | CHIRURGIE INFANTILE |
| GAUTHIER Tristan | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| GUIGONIS Vincent | PEDIATRIE |
| JACCARD Arnaud | HEMATOLOGIE |
| JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile | IMMUNOLOGIE |
| LABROUSSE François | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| LACROIX Philippe | MEDECINE VASCULAIRE |
| LAROCHE Marie-Laure | PHARMACOLOGIE CLINIQUE |
| LIENHARDT-ROUSSIE Anne | PEDIATRIE |
| LOUSTAUD-RATTI Véronique | HEPATOLOGIE |
| LY Kim | MEDECINE INTERNE |

| | |
|--------------------------------|--|
| MABIT Christian | ANATOMIE |
| MAGY Laurent | NEUROLOGIE |
| MARIN Benoît | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| MARQUET Pierre | PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE |
| MATHONNET Muriel | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| MELLONI Boris | PNEUMOLOGIE |
| MOHTY Dania | CARDIOLOGIE |
| MONTEIL Jacques | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE |
| MOREAU Jean-Jacques | NEUROCHIRURGIE |
| MOUNAYER Charbel | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| NATHAN-DENIZOT Nathalie | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| NUBUKPO Philippe | ADDICTOLOGIE |
| OLLIAC Bertrand | PEDOPSYCHIATRIE |
| PARAF François | MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE |
| PLOY Marie-Cécile | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| PREUX Pierre-Marie | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| ROBERT Pierre-Yves | OPHTALMOLOGIE |
| SALLE Jean-Yves | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| SAUTEREAU Denis | GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE |
| STURTZ Franck | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |

| | |
|--------------------------------------|---|
| TCHALLA Achille | GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT |
| TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre | ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES |
| VALLEIX Denis | ANATOMIE |
| VERGNENEGRE Alain | EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION |
| VERGNE-SALLE Pascale | THERAPEUTIQUE |
| VIGNON Philippe | REANIMATION |
| VINCENT François | PHYSIOLOGIE |
| WEINBRECK Pierre | MALADIES INFECTIEUSES |
| YARDIN Catherine | CYTOLOGIE et HISTOLOGIE |

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

| | |
|------------------|---|
| BRIE Joël | CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE |
|------------------|---|

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| AJZENBERG Daniel | PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE |
| BALLOUHEY Quentin | CHIRURGIE INFANTILE |
| BARRAUD Olivier | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |
| BOURTHOUMIEU Sylvie | CYTOLOGIE et HISTOLOGIE |
| BOUTEILLE Bernard | PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE |
| DURAND Karine | BIOLOGIE CELLULAIRE |
| ESCLAIRE Françoise | BIOLOGIE CELLULAIRE |
| HANTZ Sébastien | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE |

| | |
|--------------------------------|--|
| JACQUES Jérémie | GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE |
| JESUS Pierre | NUTRITION |
| LE GUYADER Alexandre | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE |
| LIA Anne-Sophie | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| QUELVEN-BERTIN Isabelle | BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE |
| RIZZO David | HEMATOLOGIE |
| TERRO Faraj | BIOLOGIE CELLULAIRE |
| WOILLARD Jean-Baptiste | PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE |

P.R.A.G.

| | |
|-----------------------|---------|
| GAUTIER Sylvie | ANGLAIS |
|-----------------------|---------|

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

| | |
|---------------------------|---|
| BUCHON Daniel | (Maintenu en fonction jusqu'au 31.08.2019) |
| DUMOITIER Nathalie | (Responsable du département de Médecine Générale) |

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

| | |
|--------------------------------------|---|
| HOUDARD Gaëtan | (du 1 ^{er} septembre 2016 au 31 août 2019) |
| LAUCHET Nadège | (du 1 ^{er} septembre 2017 au 31 août 2020) |
| PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule | (du 1 ^{er} septembre 2018 au 31 août 2021) |

PROFESSEURS EMERITES

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| ADENIS Jean-Paul | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| ALDIGIER Jean-Claude | du 01.09.2018 au 31.08.2020 |

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| BESSEDE Jean-Pierre | du 01-09-2018 au 31-08-2020 |
| BONNAUD François | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| DE LUMLEY WOODYEAR Lionel | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| DENIS François | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| GAINANT Alain | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| MERLE Louis | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| MOULIES Dominique | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| VALLAT Jean-Michel | du 01.09.2017 au 31.08.2019 |
| VIROT Patrice | du 01.09.2018 au 31.08.2019 |

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 1^{er} novembre 2018

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

| | |
|------------------------------|--|
| AUDITEAU Emilie | EPIDEMIOLOGIE (CEBIMER) |
| BAUDRIER Fabien | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| CHARISSOUX Aurélie | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| DAURIAT Benjamin | HISTOLOGIE, EMBRIOLOGIE ET CYTOGENETIQUE |
| DERBAL Sophiane | CHIRURGIE ANATOMIE |
| DOUCHEZ Marie | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| DUCHESNE Mathilde | ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES |
| FAYE Piere-Antoine | BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| HUMMEL Marie | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| KONG Mélody | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| MARQUET Valentine | HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE |
| PIHAN Franck | ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION |
| RIVAILLE Thibaud | CHIRURGIE-ANATOMIE |
| TALLA Perrine | BIOLOGIE CELLULAIRE |
| TCHU HOI NGNO Princia | BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE |

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

| | |
|---------------------------------|--|
| ARMENDARIZ-BARRIGA Matéo | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| AUBLANC Mathilde | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |

| | |
|------------------------------------|---|
| AZAÏS Julie | MEDECINE INTERNE A |
| BAUDONNET Romain | OPHTALMOLOGIE |
| BEEHARRY Adil | CARDIOLOGIE |
| BLOSSIER Jean-David | CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE |
| BOSETTI Anaïs | GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT |
| BOUSQUET Pauline | PEDIATRIE |
| CHAMPIGNY Marie-Alexandrine | PEDIATRIE |
| CHRISTOU Niki | CHIRURGIE DIGESTIVE |
| COLOMBIÉ Stéphanie | MEDECINE INTERNE A |
| COMPAGNAT Maxence | MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION |
| DARNIS Natacha | PEDOPSYCHIATRIE |
| DE POUILLY-LACHATRE Anaïs | RHUMATOLOGIE |
| DIDOT Valérian | CARDIOLOGIE |
| EL OUAFI Zhour | NEPHROLOGIE |
| EVRRARD Bruno | REANIMATION |
| FAURE Bertrand | PSYCHIATRIE d'ADULTES |
| FAYEMENDY Charlotte | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| FROGET Rachel | CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE (pédiatrie) |
| GHANEM Khaled | ORL |
| GEYL Sophie | GASTROENTEROLOGIE |
| GOUDELIN Marine | REANIMATION |
| GUTIEREZ Blandine | MALADIES INFECTIEUSES |

| | |
|-----------------------------|--|
| HARDY Jérémy | CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE |
| KRETZSCHMAR Tristan | PSYCHIATRE d'ADULTES |
| LACOSTE Marie | MALADIES INFECTIEUSES |
| LAFON Thomas | MEDECINE d'URGENCE |
| LAHMADI Sanae | NEUROLOGIE |
| LEGROS Maxime | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| LEHMANN Lauriane | GASTROENTEROLOGIE |
| MARGUERITTE François | GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE |
| MARTINS Elie | CARDIOLOGIE |
| MICLE Liviu-Ionut | CHIRURGIE INFANTILE |
| MOWENDABEKA Audrey | PEDIATRIE |
| ORLIAC Hélène | RADIOTHERAPIE |
| ORSONI Xavier | UROLOGIE |
| PLAS Camille | MEDECINE INTERNE B |
| PRUD'HOMME Romain | DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE |
| QUILBE Sébastien | OPHTALMOLOGIE |
| ROUCHAUD Aymeric | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE (NRI) |
| SALLE Henri | NEUROCHIRURGIE |
| SANGLIER Florian | RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE |
| SIMONNEAU Yannick | PNEUMOLOGIE |

TRICARD Jérémy

CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
MEDECINE VASCULAIRE

VAIDIE Julien

HEMATOLOGIE CLINIQUE

CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE

VITALE Gaetano

CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
MEDECINE VASCULAIRE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

CARLESSO-CROUZIL Olivia

SEVE Léa

CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE – MEDECINE GENERALE

RUDELLE Karen

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

LERAT Justine

O.R.L. (du 1er mai 2016 au 31 octobre 2020)

MATHIEU Pierre-Alain

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et
TRAUMATOLOGIQUE
(du 1er mai 2016 au 31 octobre 2020)

Un souhait

*Que les progrès incessants qui nous éloignent parfois de
la clinique ne nous fassent jamais perdre de vue que
derrière chaque chiffre de biologie et chaque cliché
d'imagerie se cache le cœur de notre engagement
et le fruit de notre motivation : un enfant.*

*Sans l'implication de l'ensemble de l'équipe
médicale (médecins, internes et infirmières), du
support logistique du Dr El Hamel et de la
motivation sans faille du Dr Ponthier cette étude
n'aurait pas pu aboutir.*

*Je leur adresse ici toute ma reconnaissance et mes
plus sincères remerciements.*

Remerciements

À Mme le Docteur Laure Ponthier,

Merci de la confiance et du soutien indéfectible que tu m'as accordé pour ce projet et pour bien d'autres encore. Je me souviendrais toujours de la première échocardiographie que je t'ai vue réaliser en néonatalogie, ce jour-là j'ai compris quelle direction prendre. Tu as sans cesse été un modèle pour ma pratique et je suis heureux de pouvoir continuer à apprendre de tes enseignements en post-internat. Je suis sûr qu'avec nos centres d'intérêts convergents nous avons encore beaucoup de projets à mener !

À Mme le Professeur Anne Lienhardt-Roussie,

Je vous remercie pour l'écoute, le soutien que vous m'avez accordé tout au long de cet internat. Merci pour la confiance dont vous me faites part en m'offrant la possibilité de poursuivre ma route au sein de votre belle équipe. Merci pour votre bienveillance.

À Mr le Professeur Vincent Guignonis,

Je vous remercie pour la constance dans votre enseignement, la rigueur clinique et le raisonnement basé sur les preuves que vous avez su nous distiller pendant ces quatre années. Je vous remercie également pour l'esprit de synthèse que vous nous avez sans cesse rappelé par le maintenant bien célèbre « Au total, En pratique ».

À Mme le Docteur Fabienne Mons,

Merci de m'avoir fait découvrir une spécialité passionnante dont je ne soupçonnais quasiment pas l'existence lors de mon choix d'internat. Je suis persuadé que tu seras toujours là pour me rappeler l'importance d'une prise en charge axée sur la qualité des soins et le bien-être de nos tous petits.

À Mr le Professeur Jean Feuillard,

Merci de nous avoir offert l'opportunité de travailler sur un sujet aussi intéressant en nous ayant ouvert les portes de votre laboratoire. Vous et votre équipe avez pu nous apporter l'expertise nécessaire au bon déroulement de ce projet.

À Mme le Dr Estelle Guérin,

Merci pour les heures que tu m'as consacrées sans compter. Merci d'avoir démystifié la cytométrie de flux en quelques mots bien choisis.

À Mme le Dr Chahrazed El Hamel,

Merci pour ton implication constante dans ce projet et tes remarques toujours très pertinentes qui ont participé à enrichir ce travail.

À mes Mentors cardiopédiatres, Philippe, Elodie, Laure et Julien

Merci de votre patience à tous, merci de m'avoir supporté derrière votre épaule, merci d'avoir pris du retard sur vos consultations pour m'enseigner la cardiopédiatrie. Je vous serai toujours redevable du temps précieux que vous m'avez offert sans compter. Nos échanges ont toujours été constructifs et enrichissants et je vous en remercie.

Merci à mes co-internes préférés et qui sauront se reconnaître !

Je remercie l'ensemble des équipes médicales qui m'ont accueilli tout au long de cet internat de pédiatrie. J'ai eu la chance d'apprendre de chacun d'entre vous, infirmier(e)s, aide-soignant(e)s et médecins, et je vous en suis reconnaissant.

À Aurélie,

S'il n'y avait qu'un remerciement à faire il serait bien-sûr pour toi qui m'a accompagné, et soutenu pendant ces trop longues années d'enseignement supérieur. Merci de m'avoir prêté une confiance sans réserve. La plus belle des réussites restera d'avoir continué à construire avec toi et malgré ces années d'éternel étudiant, le plus beau des projets : notre famille !

Je te suis éternellement reconnaissant et redevable.

À mes filles Margot et Alphée,

Vous êtes mes trésors, ma motivation sans faille. Je vous aime.

À ma mère, mes calédoniens et ma belle-famille,

Quand je vous dis que ça se terminera un jour ! On y est ! Merci pour le soutien que vous m'avez accordé toutes ces années.

Aux Mauprivez,

Un grand merci à vous de m'avoir accueilli chez vous à bras ouverts pour un hiver Bordelais. Sans votre soutien logistique ma formation en cardio-pédiatrie n'aurait pas pu aboutir ! Nos échanges quotidiens enrichissants m'ont rendu l'éloignement moins pesant.

À mon club de relecteurs, Olivier, Marie-Laure et Pierre,

Merci pour la relecture de ce deuxième opus.

À mes amis, Merci.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction | 25 |
| I. Sepsis chez le prématuré : définitions | 26 |
| I.1. La prématurité | 26 |
| I.2. Le sepsis néonatal..... | 26 |
| I.3. Le sepsis précoce et le sepsis tardif | 27 |
| I.4. Expression clinique du sepsis néonatal | 28 |
| II. Immatures granuleux et sepsis néonatal | 31 |
| II.1. Granulopoïèse normale (Figure 1)..... | 31 |
| II.2. Modifications physiologiques de la granulopoïèse en cas de sepsis..... | 31 |
| III. La cytométrie de flux | 34 |
| III.1. Justification du choix de la technique analytique..... | 34 |
| III.2. Description de la technique analytique | 35 |
| Article..... | 37 |
| IV. Article summary | 38 |
| V. Introduction..... | 40 |
| VI. Methods..... | 43 |
| VI.1. Patients..... | 43 |
| VI.2. Multicolor flow cytometry (FCM) immunophenotyping | 43 |
| VI.3. Statistical analysis..... | 44 |
| VI.4. Ethical | 44 |
| VII. Results | 46 |
| VII.1. Patients characteristics | 46 |
| VII.2. FCM results..... | 47 |
| VIII. Discussion | 52 |
| IX. Conclusion..... | 55 |
| X. Acknowledgments | 56 |
| Bibliographie | 57 |
| Conclusion | 65 |
| Serment d'Hippocrate | 66 |

Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 Différents phénotypes de surface exprimés au cours de la granulopoïèse neutrophile. ³⁵⁻³⁷ | 33 |
| Figure 2 Gating strategy to identify leucocyte subsets and thresholds for immatures granulocytes with term neonates as control. | 45 |
| Figure 3 Chart flow of inclusions | 46 |
| Figure 4 ROC curve of immature granulocytes compared with CRP | 50 |
| Figure 5 ROC curves of mean fluorescence intensity of whole blood immature cells | 51 |
| Figure 6.1 Boxplot diagram showing distribution of CRP, CD64 ^{high} and IGs among different sepsis groups..... | 62 |
| Figure 6.2 Boxplot diagram showing distribution of CRP, CD64 ^{high} and IGs among different sepsis groups..... | 63 |
| Figure 7 Gating strategy of CD10 and CD16 granulocytes among CD45 without eosinophils. Comparison between expression of CD10 and CD16 in no septic patient and septic patient | 64 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| Table 1 Clinical characteristics of study groups..... | 47 |
| Table 2 Level of hematological and biochemical markers and neutrophil cell surface antigens at onset of the sepsis in various groups..... | 48 |
| Table 3 Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of markers using optimal cutoff values. | 49 |
| Table 4 Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of markers using optimal cutoff values for two combined diagnosis tests: CRP and nCD10 ^{low} | 50 |
| Table 5 Deduced cell types from the gating characteristics of each cell studied..... | 61 |
| Table 6 Antibodies used for multicolor flow cytometry | 61 |

Abréviations françaises

AG : Âge gestationnel

BPM : Battement par minute

CMF : Cytométrie de flux

CRP : C-Réactive Protéine

FSC : Forward light scatter

IGs : Immatures granuleux

INBP : Infection néonatales bactériennes précoces

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

SA : Semaine d'aménorrhée

SSC : Side scatter

Abréviations anglaises

AUC: Area under the curve

CRP: C-Reactive Protein

EOS: Early Onset Sepsis

EPT: Extremely preterm infants

FCM: Multicolour flow cytometry

GA: Gestational Age

IGs: Immatures granulocytes

LOS: Late Onset Sepsis

MFI: mean fluorescence intensities

MPT: Moderately preterm infants

NPV: Negative predictive value

NICU: Neonatal intensive care unit

nCD64^{high}: neutrophils with high CD64 expression

nCD10^{low}: neutrophils with low CD10 expression

nCD16^{low}: neutrophils with low CD16 expression

nCD10^{low}CD16^{low}: neutrophils with low CD10 and CD16 expression

PCT: Procalcitonin

PPV: Positive predictive value

ROC: receiver operating characteristics

Introduction

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail prospectif réalisé entre Juillet 2018 et Juin 2019 dans l'unité de réanimation néonatale et de néonatalogie de l'hôpital mère et Enfant de Limoges auprès des nouveau-nés prématurés d'âge gestationnel (AG) inférieur à 34 semaines d'aménorrhée. Cette étude a été proposée par le Pr Guignonis et dirigée par le Dr Ponthier. Ses fondements reposent sur des travaux menés par les équipes d'hématologie biologique et de réanimation adulte du CHU de Limoges qui ont déjà publié plusieurs articles concernant l'étude des populations d'immatures granuleux (IGs) au cours d'épisodes de sepsis en population adulte.^{1,2}

Cette thèse d'exercice a été rédigée de façon à pouvoir valoriser le travail effectué sous forme de publication scientifique. Elle s'articule en une première partie introductive destinée à préciser au lecteur des notions spécifiques afin d'améliorer la compréhension de la deuxième partie, constituée par l'article lui-même. Cette première partie permet également de justifier certains choix entrepris pour cette étude.

I. Sepsis chez le prématuré : définitions

I.1. La prématurité

L'Organisation mondiale de la santé définit la prématurité selon un terme de naissance inférieur à 37 semaines d'aménorrhée (SA). Elle considère ainsi trois niveaux de prématurité selon le terme : les extrêmes prématurés nés entre 24 et 28 SA, les grands prématurés entre 28 SA et 32 SA et la moyenne prématurité jusqu'à 37 SA.³ La dernière enquête périnatale nationale de 2016 rapporte une augmentation de l'incidence de la prématurité à 6% des naissances vivantes uniques.⁴

Malgré les progrès constants, des niveaux d'exigence et de qualité de soins toujours plus élevés en néonatalogie, la morbi-mortalité liée au sepsis néonatal reste élevée.⁵ Dans la population d'enfants nés prématurés le risque de survenue d'épisode septique est inversement proportionnel à l'AG. L'incidence des infections précoces est d'autant plus élevée que l'AG est bas. Elle passe ainsi de 0,7 % au-dessus d'un terme de naissance de 29 SA à 2% pour les très grands prématurés.⁶ De plus, ces nouveau-nés d'AG bas sont confrontés à un long parcours d'hospitalisation et sont exposés à de multiples risques infectieux. Un temps prolongé de port de cathéter central est particulièrement vecteur de sepsis chez le grand prématuré.⁷ L'incidence de ces épisodes de sepsis tardifs va de 3% chez les plus de 29 SA à 36% chez les très grands prématurés.⁸

I.2. Le sepsis néonatal

Malgré l'abondante littérature scientifique disponible, il n'émerge pas de consensus autour de la définition du sepsis néonatal et encore moins du sepsis chez le prématuré. Pourtant, des définitions claires sont indispensables afin de mener des enquêtes épidémiologiques reproductibles, comparables ainsi que des essais cliniques.⁹ Certains auteurs le définissent comme une infection systémique bactérienne, virale ou fongique associée à des modifications hémodynamiques ou autres manifestations cliniques résultant en une morbi-mortalité substantielle.¹⁰

Cette absence de consensus rend inhomogène les critères d'inclusions des études qui s'attachent parfois à comparer uniquement les sepsis prouvés microbiologiquement à des groupes contrôles.¹¹ Ces critères occultent le cas plus délicat des épisodes de sepsis non prouvés sur le plan microbiologique mais probables au vu d'arguments cliniques ou paracliniques. Or, avec une sensibilité décrite par certains auteurs inférieure à 40 à 50 % dans une population néonatale, il n'est pas raisonnable de se fier à la seule microbiologie pour

définir le sepsis même s'il s'agit du « gold standard ». ^{12,13} Pour exemple, une étude incluant 92 nouveau-nés d'AG \geq à 34 SA avec une méningite bactérienne prouvée dans le liquide céphalo-rachidien retrouvait une rentabilité des hémocultures de 62% seulement. ¹⁴ Par ailleurs, la spécificité n'est pas satisfaisante pour autant avec un taux de faux positifs décrit supérieur à 17%. ¹⁵

Heureusement, la plupart des études définissent le sepsis néonatal comme non limité aux seuls épisodes ayant une confirmation microbiologique. Une revue de la littérature a répertorié les critères retenus pour la définition du sepsis dans les études cliniques et leur fréquence d'utilisation. ⁹ Ainsi, 29% d'entre elles retenaient un ou plusieurs paramètres biologiques tels que la CRP, la formule leucocytaire, l'acidose métabolique et le rapport d'IGs sur le compte total de PNN. Toutefois pour un même paramètre, les valeurs seuil étaient loin d'être consensuelles. Dans 62 % des études, des critères cliniques aspécifiques étaient retenus avec au-devant de la scène des signes cardiorespiratoires, la dysrégulation thermique et des signes neurologiques. Ces définitions correspondent en effet plus à une pratique clinique car la prise en charge des sepsis documentés et des sepsis probables non documentés est identique. Dans d'autres études, la définition de sepsis retenue est indexée à une durée de traitement (au moins supérieure à 5 jours).

D'après ces données, nous avons constitué 3 groupes pour l'analyse des patients de notre étude. Le premier groupe était constitué des épisodes de sepsis prouvés sur le plan microbiologique associant des critères cliniques de dégradation respiratoire (majoration du support ventilatoire, augmentation de la fraction inspirée d'oxygène, répétition d'apnées, apparition de signes de lutte respiratoire) et/ou hémodynamiques (accès de bradycardie/tachycardie, hypotension, signes d'hypoperfusion). Un deuxième groupe de sepsis probable a été défini comme les patients n'ayant pas de confirmation microbiologique du sepsis mais pour lesquels un décalage de la CRP dans les 48 premières heures du diagnostic \geq 5 mg/L était objectivé, en association aux critères cliniques précédents. Le dernier groupe était constitué des cas de sepsis infirmés en l'absence d'élévation de la CRP au-delà de 5 mg/L avec une amélioration clinique permettant un arrêt de l'antibiothérapie dans les 48h.

I.3. Le sepsis précoce et le sepsis tardif

En l'absence d'étiologie évidente, la prématurité spontanée est d'emblée suspectée d'origine infectieuse. ¹⁶ Dans 25% des cas de prématurité, une infection intra-amniotique est incriminée car les mécanismes inflammatoires mis en œuvre en réponse à l'agent infectieux vont déclencher la mise en travail. ¹⁷ Ces épisodes de sepsis survenant en la période néonatale

immédiate correspondent aux sepsis liés aux infections néonatales bactériennes précoces (INBP). Dans la littérature de référence anglo-saxonne, ces épisodes sont appelés « early onset sepsis ». ^{17,18} Ils correspondent aux infections survenant dans les 72 premières heures de vie. ¹⁷ Le sepsis tardif ou « late onset sepsis » est défini au-delà de ce délai. ¹⁹

La physiopathologie de ces deux entités est différente. Les INBP répondent à une problématique de transmission materno-fœtale d'un agent infectieux au cours d'une contamination in utero. Celle-ci peut se faire par voie transplacentaire ou plus fréquemment par voie ascendante depuis la flore vaginale lors de la rupture des membranes ou du passage dans la filière génitale à la naissance. ^{10,17} En cas de prématurité non expliquée, l'étiologie principale retenue est l'infection fœto-maternelle avec comme agent infectieux les plus fréquents *Escherichia coli* et le *Streptococcus agalactiae* (streptocoque du groupe B). La mortalité liée à ces agents infectieux reste élevée. Elle peut atteindre un taux global de 16%, allant jusqu'à 30% pour les 25-28 SA et 54% pour les 22-24 SA. ¹⁰ Les cliniciens sont donc amenés à prescrire une antibiothérapie probabiliste précoce et large, parfois prolongée, y compris chez des nouveaux nés prématurés asymptomatiques ou pauci-symptomatiques. ²⁰ Or, une large étude nord-américaine conduite chez des extrêmes prématurés a montré qu'une antibiothérapie précoce et prolongée (> 5 jours) faisait le lit de complications secondaires avec au premier plan l'entérocolite ulcéro-nécrosante. ²¹

Quant aux épisodes de sepsis tardifs, ils font écho aux infections liées aux soins et à l'environnement de soins : ils correspondent aux infections nosocomiales. ¹⁹ Ces épisodes sont plus fréquemment associés aux nouveau-nés porteurs de cathéters centraux. Leur incidence et donc d'autant plus importante chez les grands prématurés dont le temps d'exposition au cathéter central est prolongé dans l'attente de leur autonomie alimentaire. Les agents alors impliqués sont des *Cocci* gram positifs et plus précisément, les *Staphylococcus coagulase négative* et les *Streptococcus*. ¹⁰ L'implication de *Candida albicans* est aussi largement soulignée. ¹⁹ Le mode de transmission de germes le plus incriminé reste le manuportage. Dans un contexte de sepsis tardif ou sepsis nosocomial, la mortalité peut atteindre 32 à 52 % des cas avec une mortalité plus élevée si le germe impliqué est un bacille gram négatif. ^{19,19}

I.4. Expression clinique du sepsis néonatal

La problématique du diagnostic de l'infection néonatale repose sur l'absence de signes cliniques spécifiques de sepsis. Ils peuvent être aussi nombreux qu'aspécifiques. La sensibilité des différents signes cliniques issus des définitions consensuelles de sepsis chez le grand enfant, est très peu rentable lorsqu'on l'applique en néonatalogie. ⁹ Hofer et al. ont montré

que la sensibilité des signes cliniques selon ces définitions était de 20% pour l'hypothermie, 33% pour les signes cardiovasculaires, 43 % pour les anomalies de la numération, et 87% pour les signes respiratoires mais avec une faible spécificité.²²

Si l'on s'attache au consensus national récemment défini pour les nouveau-nés d'AG \geq à 34 SA, le sepsis néonatal peut se révéler par des signes généraux tels qu'une fièvre (température $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$) ou une hypothermie (température $< 36,0^{\circ}\text{C}$). Les signes respiratoires caractérisés par une détresse respiratoire initiale et/ou la survenue d'apnées, sont également décrits comme étant des signes cliniques devant faire suspecter une INBP.¹⁸ Les signes hémodynamiques sont souvent plus tardifs et témoignent d'une atteinte plus sévère : tachycardie (FC > 160 bpm) ou bradycardie (FC < 80 bpm), signes d'hypoperfusion périphérique (augmentation du temps de recoloration cutanée, pâleur, hypotension artérielle, oligurie). Les signes neurologiques, sont eux aussi d'autant plus difficiles à apprécier que l'AG est bas. En effet, la somnolence et/ou l'irritabilité sont des signes à rendement diagnostique faible contrairement aux signes comme l'hypotonie et/ou les convulsions.²³

L'incidence élevée de ces signes cliniques à l'état non septique chez les nouveau-nés prématurés, rend impossible l'application d'une stratégie de stratification du risque comme celle décrite pour les nouveau-nés de plus de 34 SA. Cela justifie également le recours à une antibiothérapie probabiliste débutée la plupart du temps d'emblée sur des seuls arguments cliniques peu discriminants. En effet, plus l'AG est bas, plus les signes respiratoires et le recours à un support respiratoire vont devenir la norme au sein de cette population.²⁴ Entre 24 et 28 SA, l'incidence de la détresse respiratoire néonatale est comprise entre 86 à 80 %.^{6,25} Les recommandations de pratiques pour ce type de tableau sont de recourir à une antibiothérapie probabiliste dans l'attente d'arguments pour exclure une infection associée.²⁶ Passé la période de détresse respiratoire immédiate, la survenue d'apnées est fréquente chez les prématurés allant jusqu'à une incidence de 100% en dessous de 28 SA.²⁷ On comprend donc la difficulté de l'application des critères cliniques d'infections décrits en population de nouveau-nés à terme et chez les nouveau-nés prématurés.

L'absence de signes cliniques suffisamment sensibles et spécifiques pour l'aide au diagnostic du sepsis fait ainsi le lit d'une littérature médicale abondante à la recherche du marqueur idéal qui permettrait d'améliorer la prise en charge. En ce qui concerne le sepsis précoce, le clinicien devrait disposer d'un marqueur avec une bonne valeur prédictive négative, de façon précoce sans avoir à répéter les prélèvements. Cela lui permettrait de pouvoir exclure définitivement le diagnostic de sepsis et d'arrêter, voire de ne pas débuter une antibiothérapie probabiliste.

Cette épargne d'exposition aux antibiotiques est l'un des enjeux pour ces sepsis précoces. Pour les sepsis tardifs, le clinicien a besoin d'un outil diagnostique suffisamment sensible pour ne pas méconnaître un état infectieux infra clinique dont le retard de traitement pourrait être lourdement préjudiciable.

II. Immatures granuleux et sepsis néonatal

Dans les 3 premiers mois de vie, la réponse immunitaire est essentiellement médiée par l'immunité innée faisant appel entre autre à la mobilisation des populations de neutrophiles.^{10,28,29} De longue date, lors du rendu de la numération formule sanguine, les néonatalogues ont porté une attention particulière aux IGs.³⁰ Les descriptions initiales rapportaient un « left shift » ou des « Band cells » présents chez les nouveau-nés septiques pour qualifier l'apparition d'IGs sortis de la moelle osseuse précocement vers le secteur sanguin.³¹ Dès 1988, Rodwell *et al.* avaient proposé un « hematologic scoring system » qui s'appuyait sur la présence d'IGs au décompte manuel en microscopie, comme une aide au diagnostic de sepsis en néonatalogie. Un score inférieur ou égal à 2 avait une valeur prédictive négative de sepsis de 100% avec une spécificité de 63%.³² Mais cet outil est peu utilisé en pratique du fait de l'imprécision de mesure liée à l'analyse manuelle en microscopie.³³ Nous nous sommes intéressés dans cette étude à ces populations de neutrophiles et plus particulièrement à leur contingent d'IGs dont la présence sanguine est le témoin d'une stimulation de la granulopoïèse par divers médiateurs de l'inflammation au cours du sepsis.³⁴

II.1. Granulopoïèse normale (Figure 1)

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les cellules de l'immunité innée les plus abondantes et jouent un rôle prépondérant dans l'immunité des nouveau-nés.²⁹ Elles proviennent de la maturation de cellules hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse, et pour une moindre participation dans la rate et les poumons. Ces cellules souches produisent des progéniteurs capables d'orienter leur maturation soit vers une lignée lymphoïde, soit vers une lignée myéloïde. Les progéniteurs myéloïdes donnent naissance aux progéniteurs myélomonocytaires. C'est à l'étape suivante de maturation de ces progéniteurs que la lignée granuleuse va se constituer à partir des progéniteurs neutrophiles promyélocytes. Les 3 étapes maturatives suivantes vont donner naissance aux IGs appelés également précurseurs neutrophiles. Il s'agit des cellules d'intérêt pour notre étude : les myélocytes, métamyélocytes et les « band cells » ou PNN juvéniles.³⁵ L'expression d'antigènes CD16 à leur surface progresse au fur et à mesure de leur maturation. Elles ont toutes une expression de CD10 diminuée (nCD10^{low}) qui se positive uniquement au stade de polynucléaires matures.³⁶

II.2. Modifications physiologiques de la granulopoïèse en cas de sepsis

En cas de stimulus infectieux, il existe une fabrication accrue de polynucléaires via une « granulopoïèse d'urgence » qui fait appel à une production médullaire, et extra-médullaire,

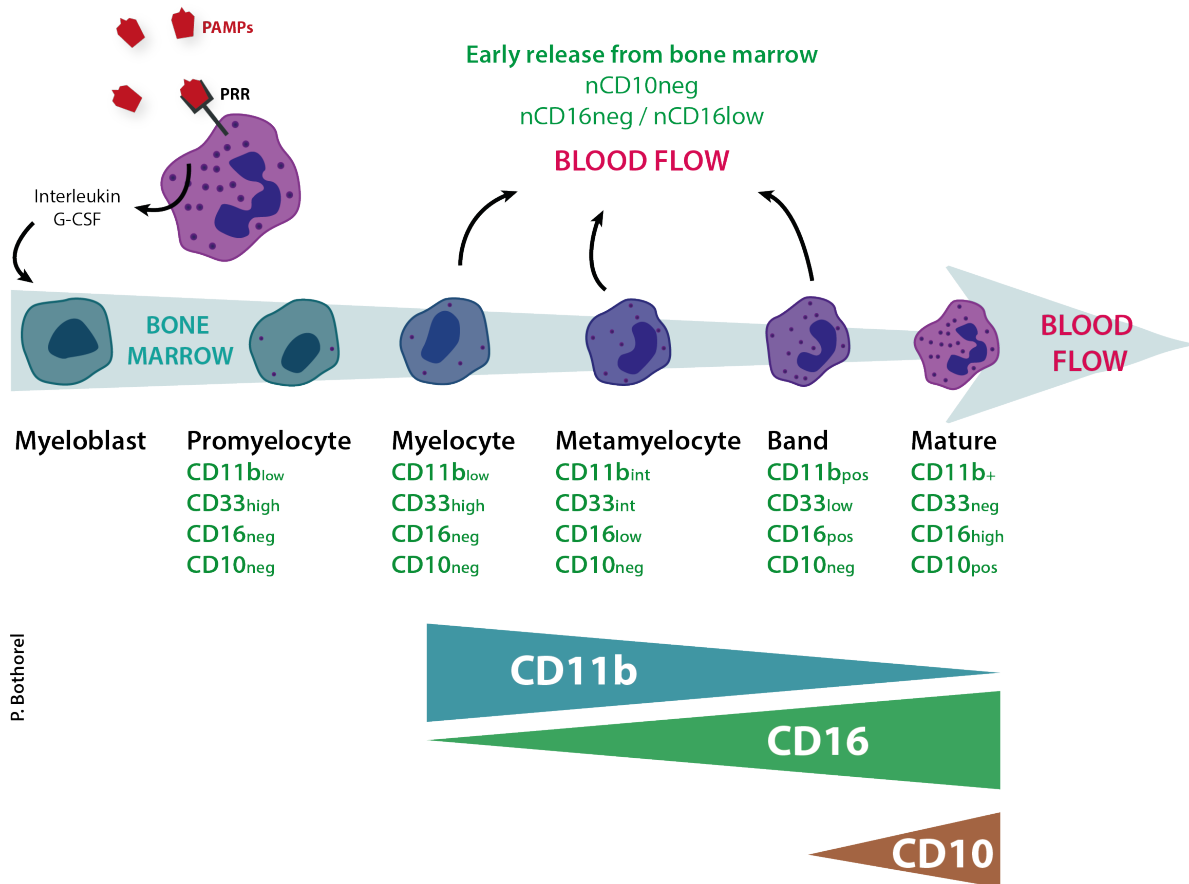
splénique et hépatique. La rencontre de l'agent infectieux avec les récepteurs des motifs moléculaires, associés aux pathogènes (Pattern recognition receptor (PRRs)) situés sur les cellules du système immunitaire inné va déclencher une production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL3, IL-6, IL8) et du facteur de croissance hématopoïétique des granuleux (G-CSF). Ces derniers vont stimuler la libération et la production de polynucléaires matures et immatures.³⁷ Ce « protocole » d'urgence va libérer dans le sang des granuleux encore immatures alors qu'en situation de synthèse physiologique, différents mécanismes de contrôle permettent de ne libérer que les polynucléaires matures.

Des études récentes se sont intéressées à ces populations d'IGs dans les épisodes de sepsis. Cimenti *et al.* ont montré à l'aide d'un analyseur automatisé d'hématologie que les IGs étaient significativement augmentés chez les prématurés en cas d'INBP microbiologiquement prouvée.³⁸ Cependant la technique d'analyse des IGs n'était pas basée sur l'analyse des CD10 et CD16. Par ailleurs, cette étude comparait uniquement un groupe de sepsis prouvé microbiologiquement à un groupe contrôle, ce qui en limite fortement l'intérêt. De plus, les performances diagnostiques évoquées faisaient part d'une faible valeur prédictive négative.

Guérin *et al.* puis Daix *et al.* ont démontré l'intérêt de l'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires pour la quantification des IGs circulants d'expression diminuée en CD10 et CD16. Ils se sont avérés être un marqueur prédictif précoce de décès dans le sepsis de l'adulte^{1,2} Nous avons repris une bonne partie de la méthodologie analytique employée dans ces deux dernières études pour répondre à la problématique diagnostique qui nous intéresse, c'est-à-dire l'analyse des populations d'IGs eu cours du sepsis chez le prématuré.

Figure 1 | Différents phénotypes de surface exprimés au cours de la granulopoïèse neutrophile.³⁵⁻³⁷

G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor, *PAMPs*: Pathogen Associated Molecular Pattern, *PRR*: Pattern recognition receptor



P. Bothorel

III. La cytométrie de flux

III.1. Justification du choix de la technique analytique

L'analyse manuelle en microscopie optique limite grandement l'utilisation des IGs comme marqueur de sepsis. Cette technique présente en effet plusieurs inconvénients : (i) une variabilité interindividuelle significative pour le décompte de ces cellules, (ii) une discrimination entre les différents stades d'IGs difficile, (iii) un nombre limité de cellules analysées.³³ De ce fait, l'utilisation de cet outil a rapidement été controversée, mais les méthodes automatisées permettent actuellement de répondre à l'ensemble de ces problématiques.³⁹ La CMF est une méthode de choix ultra-performante permettant d'accéder à une finesse d'analyse des modifications d'expression des lignées lymphocytaires sous certaines contraintes de stress (e.g. infection, inflammation).^{40,41} Elle permet par ailleurs l'utilisation de très faibles volumes de prélèvements de l'ordre de 50 à 100 µL, ce qui reste un critère primordial dans nos populations d'extrêmes prématurés.

Cette technique analytique a déjà été proposée pour l'étude de l'expression augmentée du CD64 à la surface des polynucléaires (nCD64^{high}) en tant que marqueur de sepsis néonatal dans de nombreuses publications récentes.⁴²⁻⁴⁴ Toutefois, en 2016 une méta-analyse regroupant 17 études au sujet du nCD64^{high} mettait en garde contre l'utilisation isolée de ce paramètre. En effet, dans les groupes de nouveau-nés prématurés et les groupes de sepsis non prouvés microbiologiquement la sensibilité et la spécificité étaient plus faibles.⁴⁵ L'expression du CD11b sur les neutrophiles (nCD11b) a elle aussi fait l'objet d'une attention particulière au cours du sepsis néonatal. Une méta-analyse de 2019 le présente comme un marqueur prometteur.⁴⁶ Une étude parue en septembre 2019, vient de décrire plusieurs sous-types de populations lymphocytaires circulantes dont les marqueurs de surface sont modifiés en cas de sepsis chez onze prématurés. Les performances diagnostiques évoquées sont également prometteuses pour des sous-catégories de monocytes et de lymphocytes T.⁴⁷

La CMF est donc la technique de choix, performante, reproductible et permettant une analyse étendue des sous-populations lymphocytaires avec de faibles volumes sanguins tout à fait adaptée à notre population d'étude. Cette technique est amenée à devenir de plus en plus automatisée, ce qui permettra à l'avenir une utilisation en routine grâce à sa reproductibilité, sa rapidité d'analyse et sa disponibilité.⁴¹

III.2. Description de la technique analytique

La CMF est une technique analytique déjà plébiscitée dès les années 70. Elle s'est développée lentement dans l'attente de nouvelles avancées technologiques qui l'ont rendue plus performante au début des années 2000. Elle est depuis, largement utilisée quotidiennement en hématologie et en immunologie car elle explore précisément les lignées hématologiques en identifiant les sous-populations par immunophénotypage.⁴⁸

Le cytomètre de flux est un trieur de cellules capable d'analyser et de catégoriser en quelques secondes des dizaines de milliers de cellules selon des caractéristiques intrinsèques. Le principe repose sur la mesure d'une population cellulaire qui se déplace dans une gaine de liquide. Les cellules préalablement marquées par des fluorochromes vont se présenter une à une à travers un faisceau laser. Un détecteur va ensuite mesurer la capacité de la cellule à diffracter la lumière selon 2 axes et sa capacité à émettre une fluorescence en fonction des fluorochromes qu'elle a conservé à sa surface lors de l'immunophénotypage. Les données sont ensuite compilées par analyse logicielle sous forme de graphiques en nuages (dot plots, figure 2) en représentation biparamétrique (ex : FSC et SSC ou CD10 et CD16) voire triparamétrique (dot plot J, figure 2). La représentation peut se faire également sous forme d'histogrammes. Cela permet d'identifier des groupes distincts de cellules selon leurs caractéristiques de diffraction et de fluorescence.⁴⁹

Pour catégoriser les cellules, deux grands types de propriétés sont utilisées avec en premier lieu les caractéristiques physiques de la cellule. On peut en effet estimer leur taille en fonction de l'intensité de diffraction de la lumière dans l'axe : forward light scatter (FSC) ; et estimer le contenu cytoplasmique en mesurant l'intensité de diffraction de la lumière à 90° : side scatter (SSC).⁴⁹ Par exemple si l'on s'attache à décrire le dot plot A de la figure 2, il s'agit d'une représentation biparamétrique en FSC et SSC où les lymphocytes sont représentés par la couleur rose. Ce sont des cellules relativement petites avec un cytoplasme sans granulations et un noyau régulier. Elles se situent donc en bas du graphique et à gauche car leurs paramètres de FCS et de SSC sont faibles. En revanche, les granulocytes représentés en rouge, sont de grandes cellules avec beaucoup de granulations et présentent donc des paramètres FCS et SSC plus élevés.

Dans un deuxième temps ces cellules vont être catégorisées selon la nature des anticorps présents à leur surface après l'étape d'immunophénotypage. Les anticorps utilisés sont couplés à des fluorochromes qui vont émettre une lumière à une longueur d'onde précise lors du passage au travers du laser. Il sera donc possible de différencier les cellules en fonction de

l'intensité du signal recueilli pour chaque longueur d'onde d'intérêt. Pour notre étude, nous avons utilisé 8 anticorps différents couplés à différents fluorochromes (tableau 6). L'utilisation de plusieurs anticorps permet ainsi d'adopter par la suite une stratégie de « gating », c'est-à-dire de sélection étape par étape des différentes sous-populations en fonction de l'intensité du signal émise par les différents fluorochromes (Dot plots A à J, Figure 2).

Dans notre étude, les granuleux ont été séparés des autres populations en fin de « gating » selon la procédure en 10 étapes décrite en Figure 2. Ensuite, l'analyse des IGs s'est faite en dot plot biparamétrique CD10/CD16 sur une population de granuleux isolés. Nous avons préalablement défini des seuils d'expression normaux de CD10 et CD16 au moyen de 10 contrôles adultes sains. Ces seuils ont été définis afin que plus de 95% des polynucléaires de ces contrôles soit situés au-dessus des seuils (Dot plot A, Figure 7). Les immatures granuleux étaient définis comme ayant une expression diminuée en CD10 et CD16 tel que l'on peut le constater sur les dot plots C et D de la figure 6. Ces graphiques représentant la répartition des granulocytes de deux prématurés ayant un sepsis prouvé. Ils expriment une proportion fortement augmentée d'IGs parmi les granuleux totaux.

Article

IV. Article summary

Background

Early and late onset sepsis (EOS and LOS) are both a leading cause of mortality in preterm neonates despite advances in neonatal intensive care. Early detection of sepsis in this population remains a challenge with a poor predictive performance of commonly used laboratory tests. The population of immature granulocytes (IGs) could be a marker of sepsis in preterm neonates, as suggested by the description of “band cells” on complete blood count in septic neonates.

Objective

To assess the ability of flow cytometry to predict sepsis in preterm neonates by identifying and quantifying IGs surface antigens.

Methods

We prospectively included for a one-year study period, preterm under 34 week's gestation age (GA) with suspected EOS or LOS when the clinician requested a blood culture and whole blood count to assist in diagnosis. A blood sample was obtained from blood count residues without additional sampling and tested within 12 hours during laboratory operating hours. Neutrophil CD10^{low} and CD16^{low} expression on peripheral blood were determined by flow cytometry as IGs marker (nCD10^{low} and nCD16^{low}). Clinicians were blinded to cytometry results. Preterm neonates were grouped according to blood culture results, CRP level and clinical signs in three subgroups as proven, probable, and no proven sepsis. Depending on the time between the onset of the suspected sepsis episode and the time of birth, two other categories of sepsis have been defined: early and late-onset sepsis.

Results

Fifty-one preterm neonates were included into the study, analysis was possible for 34. Among patient included, 4 had culture-proven sepsis, 11 had probable sepsis. We found a significant high percentage of nCD10^{low} and nCD16^{low} among granulocytes in probable and proven sepsis compared to no proven sepsis episodes. The most discriminating parameter between each group was the percentage of nCD10^{low} among total neutrophils count distributed as follows: 15% ± 12 (% among immature granulocytes, mean ± SEM) in the no proven sepsis group with significant difference compared to 34% ± 27 in probable sepsis group ($p = 0.008$) and 45% ± 11 in sepsis proven group ($p = 0.001$). The nCD10^{low} has the best area under the curve, in receiver operating characteristic analysis, AUC = 87 (IC95% 75-99) but without significative

difference with CRP, nCD64^{high} and other IGs parameters. With a cutoff value of 16.7%, the sensitivity of nCD10^{low} is 84% (IC95% 54-100), specificity is 78% (IC95% 61-91), negative predictive value is 90% (IC95% 77-100) and positive predictive value is 64% (IC95% 39-89). In combination with the CRP level, nCD10^{low} had the highest negative predictive value (100% IC95%: 81-100) for ruling out sepsis and (100% IC95%: 71-100) sensitivity for diagnosing sepsis with cutoff value of 6 mg/L for CRP and 16.7% for nCD10^{low}.

Conclusion

The present study indicated that extensive immunophenotypic characterization of peripheral leucocytes subsets by flow cytometry at the early of sepsis can detect elevated levels of nCD10^{low} and nCD16^{low} as markers of immature granulocytes in septic patients. Especially in association with the CRP, nCD10^{low} is a promising decision support tool for the management of neonatal sepsis with greater sensitivity and negative predictive value than CRP alone.

V. Introduction

Neonatal sepsis is still one of the leading causes of neonatal morbidity and mortality, especially among preterm population despite advances in neonatal intensive care. Two types of neonatal sepsis can be identified in this population: Early onset sepsis and late onset sepsis. Early onset sepsis (EOS) occurs within the first 72h of life. Pathogenesis of EOS remains complex and may correspond to a vertical transmission from mother to child. Several mechanisms can then be involved. Transmission can occur through amniotic fluid in context of chorioamnionitis, from maternal hematogenous transmission or from maternal genital tract colonization during labor.^{20,50} Group B *streptococcus* and *Escherichia coli* are the most common bacteria involved in EOS. Preterm neonates are more exposed to EOS with inversely incidence variation of chorioamnionitis with gestational age. A Recent large cohort study confirms that EOS are more prevalent in Extremely preterm infants (EPT) under 29 weeks' gestation compared to moderately Preterm Infants (MPT) with gestational between age 29 to 33^{6/7}. The incidence in these two groups was 2% and 0,7% respectively. Although EOS prevalence is low, the mortality rate remains high and has not really decreased in recent years.^{6,8} Under these circumstances nearly all preterm infants, especially EPT and unexplained prematurity, received antimicrobial therapy in the first few hours after birth.¹⁷

Late onset sepsis (LOS) occurs after three days of life. It is a more prevalent condition than EOS and corresponds, in case of preterm neonates, to nosocomial transmission occurring in hospital.²⁰ Several factors contribute to an increased risk of LOS such as prolonged hospital stay, central venous catheters, mechanical ventilation and invasive procedures. Coagulase-negative *Staphylococcus* is the leading cause of LOS. LOS is also diagnosed more frequently at the lowest GA with 36 % in EPT and 3 % in MPT infant.^{6,8}

For both EOS and LOS, clinical findings and symptoms are nonspecific like hypoglycemia, hypothermia, hyperglycemia, increased respiratory support and apnea.^{5,51} Diagnosis is a real challenge because the mortality rate is very high ranging from 3 to 16% in EOS and 36% to 52 % in LOS.^{19,50} To assist in diagnosis, blood culture is the gold standard test but with several limitations: it is not appropriate for early detection because it requires several days of culture to confirm sepsis, the positivity rate is low with up to 60% of false negatives and it is not uncommon to have false positives culture through contamination during a venipuncture.⁵² Currently, C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) are commonly used biomarkers to exclude or support the diagnosis.⁵³ But these markers also have several limitations. CRP levels can increase non-specifically, such as in inflammatory conditions, prolonged rupture of

membranes and antenatal steroid administration.⁵⁴ Moreover delay between the onset of sepsis and serum peak is significant: between 36 to 48 hours for CRP and 12 to 24 hours for PCT.⁵⁵ The low predictive performance of these laboratory tests in the crucial early hours of sepsis does not encourage the clinician to discontinue antibiotics once they are initiated. And yet, a recent study warns us about the risk/benefit balance of prolonged broad-spectrum antimicrobial agent therapy because of multiple subsequent poor outcomes.¹⁷

Several studies have already investigated the performance of other biomarkers and more specifically neutrophil surface antigen. Some of them such as CD64, CD14, CD11b are highlighted for diagnosing neonatal sepsis and the results show that there are reliable biomarkers for diagnosing neonatal sepsis. But none of them has a sufficiently high sensitivity and specificity and they are not widely used or described in clinical practice guidelines.⁴²

For a long time, it has been proposed that the population of immature granulocytes could be a marker of sepsis in premature infants, as suggested by the description of “band cells” on whole blood samples. The most described method of quantifying the increase in immature neutrophils in the circulation also called ‘left shift’ is immature to total (I/T) neutrophil ratio.^{30,33} Rodwell et al. described in 1988 a hematologic scoring system for neonatal sepsis with high negative predictive value if immature neutrophils and I/T neutrophils ratio are low.³² But the interpretation of hematological profiles in microscopy remains time-consuming and subjective because it requires a manual differential cell count. This may explain why these elements are not widely used in clinical practice as a highly relevant biomarker. Besides, the interpretation of cytology in microscopy is all the more difficult when other frequently encountered abnormalities such as leukopenia and neutropenia are associated. For example, it is not uncommon for premature babies from vascular-risk pregnancies to be neutropenic.⁵⁶

Guided by our recent experience in the study of IGs, we wanted to adapt these old data to current techniques such as flow cytometry, which makes it possible to quantify the different neutrophil populations and extract objective data accurately.

Indeed, we recently find the full potential of IGs in a multicentric study in the adult intensive care unit. We find that increased circulating IG assessed by early flow cytometry at the acute phase of sepsis is linked to clinical worsening.² But in the population of preterm neonates, the problem lies more in the initial diagnosis of sepsis, as described above, than in determining elements of poor prognosis.

The study aimed to evaluate the diagnosis value of IGs in flow cytometry for early diagnosis of EOS and LOS in hospitalized preterm neonates.

VI. Methods

VI.1. Patients

The project was implemented in an academic, tertiary regional referral center of NICU (Neonatal intensive care unit) with about 2500 deliveries per year at university Hospital in Limoges, France. It was a prospective, interventional study and clinicians were blinded to study results. We prospectively included for a one-year study period between July 2018 and June 2019 with, preterm under 34 SA with suspected EOS or LOS when the clinician requested a blood culture and whole blood count to assist in diagnosis. Patients were followed until discharge from neonatology. Newborns could not be included if the sample did not reach the laboratory during working hours within 12 hours after sampling (8AM to 2PM). We collected patient's demographic data, infection characteristics, EOS risk factors, and serial CRP measurements at inclusion and days after. For the study, the blood sample obtained for hematological analysis on the day of suspected sepsis was used for blood counts and residues for FCM without additional sampling.

Suspected sepsis occurring within 72 postnatal hours defined EOS and one occurring beyond the first 72 postnatal hours defined LOS.

We classified preterm neonates into 3 sepsis groups: proven sepsis (blood culture or cerebrospinal fluid or urine culture positive), probable sepsis (negative culture but CRP level above 5 mg/L in the first 48 hours with clinical symptoms including cardiovascular signs and/or respiratory signs), and no proven sepsis (negative blood cultures, negative laboratory biomarker, antibiotics only in the first 48h).

VI.2. Multicolor flow cytometry (FCM) immunophenotyping

Total blood count was performed on standard cytology analyzer (Cell Dyn[®] Sapphire or Bayer[®] Advia) with only 200 μ L of blood. For all included patients we perform flow cytometry on 8-color Navios apparatus (Beckman Coulter, Miami, FL) with no additional sampling from residual of the blood count. This protocol was close to that currently used in daily clinical practice of participating laboratory for immunophenotyping. This technique allows the use of small amounts of blood to classify a large number of leukocytes according to their size and cytoplasmic and nuclear characteristics. Antibody combinations were selected to detect and quantify leukocyte subsets presumed involved in the pathophysiology of sepsis (Table 6). This approach makes it possible to identify T- and B-cell, monocytes and macrophages, mature and immature granulocytes, dendritic and plasma cells. To this end, at least 50 μ L of blood was

required for direct immunolabellings. After 15-minute incubation in dark room with antibody, RBCs were lysed with 500 μ L of Versalyse™ enzyme reagent (Beckman Coulter, Villepinte, France) and washed. After acquiring at least 70 000 CD45 events or 300s, results were expressed as absolute counts, calculated from the total leukocyte counts, and as percentages. To identify leucocytes subsets, we used gating strategy performed with the Kaluza™ (Beckman Coulter) software described in Figure 2. It consists of 10 steps (Step A to J, Figure 2) to isolate IGs from CD45 subsets. The last step was an updated from previous gating strategy described by Daix *et al.*² to better differentiate eosinophils from granulocytes (Step J, Figure 1). Fluorescence thresholds to assess the percentages of nCD64^{pos}, nCD10^{low} and nCD16^{low} granulocytes were set-up by comparison with 10 adults controls so that more than 95% of controls exhibited less than 5% of each population of interest (Part A, Figure 7). Percentages of neutrophils and mean fluorescence intensities (MFI) of the markers under study were recorded. After this post-treatment analysis each differentiation cluster can be studied within the IGs population (Step K and L, Figure 2, Figure 7).

VI.3. Statistical analysis

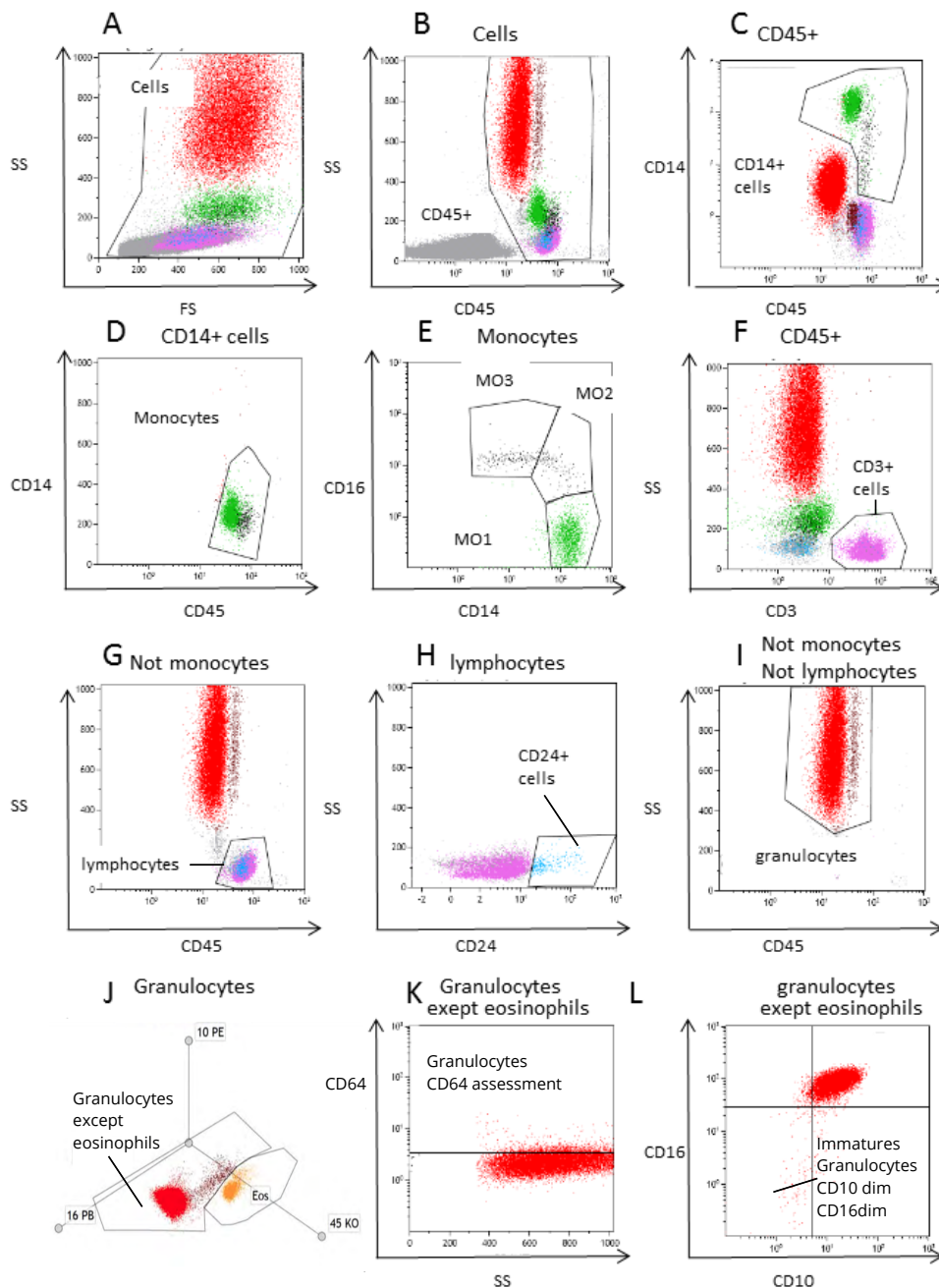
Qualitative variables were expressed as numbers and percentages and compared using the Fisher exact test. Quantitative variables were expressed as mean \pm SEM or as medians and quartiles, when not normally distributed. Intergroup comparisons were performed by Wilcoxon, or Kruskal-Wallis test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant. To define threshold values providing the best compromise between sensitivity and specificity for both the diagnosis and prediction of sepsis progression, receiver operating characteristics (ROC) curves were built. Cutoff values on ROC curves were chosen based on Youden's index by combining optimal sensitivity and specificity.⁵⁷ Statistical analyses were performed using R software version 3.5.1 (R foundation for statistical computing; <http://www.rproject.org>).

VI.4. Ethical

Signed informed consent for blood sample collection and analysis was obtained from all parents. This study was approved by the local Ethics Committee (CPP SOOM 4, Limoges, France).

Figure 2 | Gating strategy to identify leucocyte subsets and thresholds for immatures granulocytes with term neonates as control.

A: Cells were selected on morphological parameters in Forward Scatter FS versus Side Scatter SS
 B: Hematopoietic cells were defined as CD45^{pos} cells
 C, D: Monocytes were selected as CD14^{pos} cells and then refined as CD45^{pos}/SS intermediate cells
 E: Monocytes were separated into two subtypes (i) classical CD14^{pos}/CD16^{neg} (classical and MO1), (ii) CD14^{pos}/CD16^{pos} (intermediate or MO2) and CD14^{low}/CD16^{pos} (non-classical or MO3)
 F: CD3^{pos} T-lymphocytes were gated.
 G: Lymphocytes CD45^{high}/SS^{low} were separated on cells after exclusion of monocytes H: CD24^{pos} B-lymphocytes were gated.
 I: Granulocytes were gated after exclusion of monocytes and lymphocytes.
 J: Exclusion of CD45^{high}, CD16^{low}, CD10^{low} eosinophils in three dimensions parameters
 K, L: CD64, CD10 and CD16 and expression on granulocytes without eosinophils. Thresholds were determined by comparison with 30 term neonates control subjects in each center.



VII. Results

VII.1. Patients characteristics

Between July 2018 and June 2019, 160 independent episodes in 153 patients were suspected in our NICU. Only 63 episodes meet our inclusion criteria. Among these, we missed 12 episodes (19%) and 17 episodes (27%) can't be analyzed due to partial flow cytometry data, clotted blood sample or insufficient amount of blood sample. Finally, we analyzed 34 episodes (54%) of eligible suspected sepsis episodes distributed as follows: 23 cases of EOS and 11 cases of LOS. Among these episodes, there were 4 proven sepsis, 7 probable sepsis and 23 no proven sepsis (Figure 3). The demographic data of the three groups is summarized in Table 1.

Figure 3 | Chart flow of inclusions

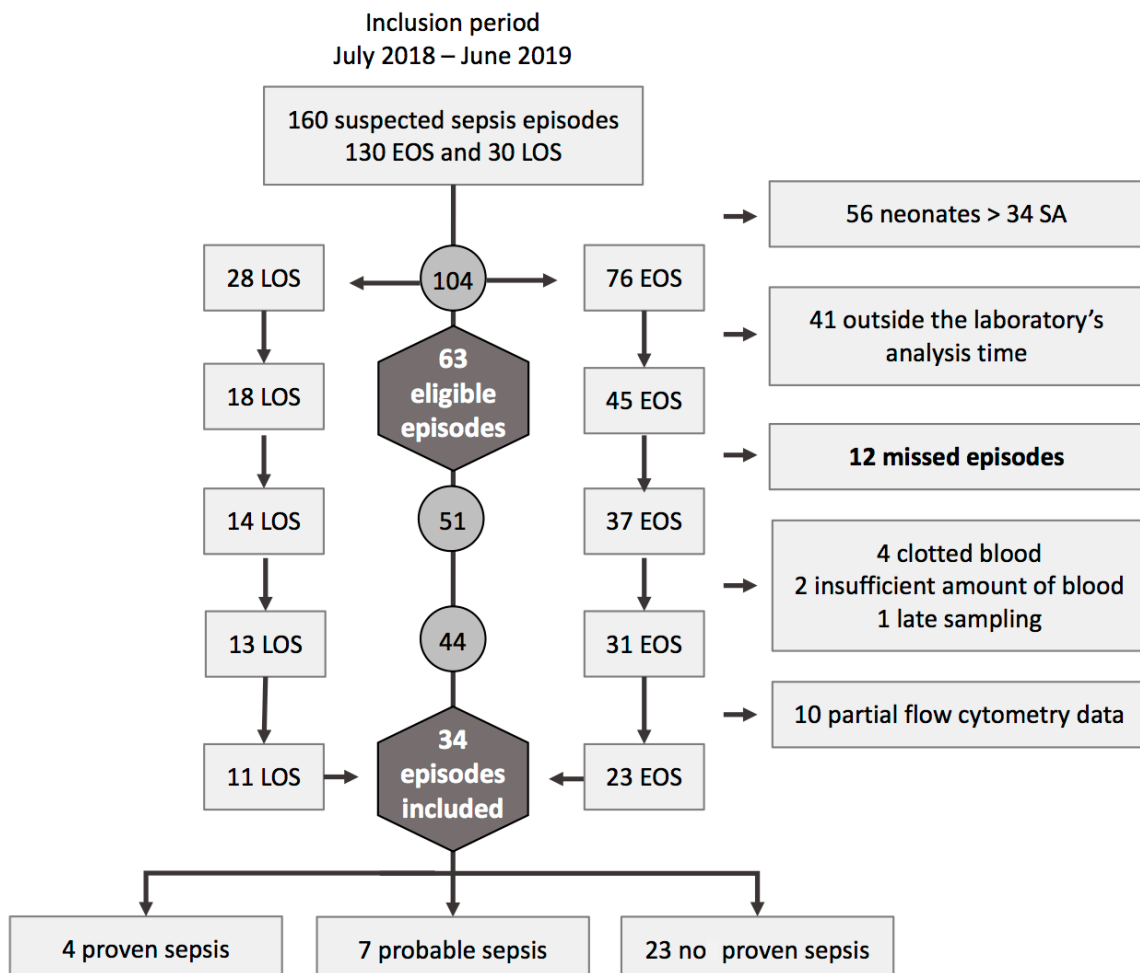


Table 1 | Clinical characteristics of study groups

| Variables | Proven sepsis (n = 4) | Probable sepsis (n = 7) | No proven sepsis (n = 23) | Total (n = 34) | P |
|--|--------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------|---------|
| Gestational age, mean ± SEM (week) | 29.3 SA ± 3.3 | 30.6 SA ± 3.2 | 30.9 SA ± 2 | 30.6 SA ± 2.4 | 0.5 |
| Birth weight, mean ± SEM (g) | 1314 ± 455 | 1459 ± 595 | 1484 ± 394 | 1 459 ± 435 | 0.7 |
| Male / Female | 2/2 | 5/2 | 12/11 | 19/15 | 0.6 |
| 1 min Apgar score, median (IQR) | 5 (3.25 - 6.5) | 5 (5 - 6) | 8 (4.5 - 10) | 7.5 (4.25 - 9) | 0.2 |
| 5 min Apgar score, median (IQR) | 9 (7.5 - 10) | 9 (8.5 - 9.5) | 8.5 (9 - 10) | 8 (9 - 10) | 0.7 |
| Risk factor for sepsis at birth, number of event | 0 | 3 | 9 | 12 | 0.3 |
| EOS/LOS, number of event | 0/4 | 4/3 | 19/4 | 23/11 | 0.005 |
| Duration of antibiotic treatment, mean ± SEM (days) | 8.8 ± 2.5 | 7.1 ± 3.7 | 1.4 ± 1 | 3.5 ± 3.7 | < 0.001 |

EOS : Early onset sepsis, IGs : immature granulocytes, IQR : interquartile range, LOS : Late onset sepsis, WBC : White Blood cells

There was no significant difference in gestational age, birth weight, sex ratio, Apgar score between preterm with sepsis episode (proven or probable) compared with those with no sepsis (Table 1). In three groups, preterm had similar risk factors for sepsis at birth, even if we are interested in subgroups of EOS ($p = 0.59$) or LOS ($p = 1$). There was more LOS episode in proven and probable sepsis group than no prove sepsis group. The duration of antibiotic treatment was significantly different between sepsis episodes with 8.8 ± 2.5 days for the proven sepsis group and 7.1 ± 3.7 days for probable sepsis group compared with those without sepsis 1.4 ± 1 days ($p = 3.10^{-6}$). However, there was no difference between proven and probable groups for treatment duration. Of 34 suspected sepsis episodes, pathogenic organisms could be isolated from 4 episodes as follows: 1 *staphylococcus aureus*, 1 *staphylococcus epidermidis*, 1 *streptococcus cristatus* and 1 *Escherichia coli*.

VII.2. FCM results

The distribution of hematologic profile for each group were described in Table 2 and by boxplot with statistical data in the supplementary material. Sepsis episodes were characterized by higher white blood cell counts only in sepsis proven group. There was no difference in neutrophil counts. Neutrophils nCD64^{high} have higher representation in sepsis proven group but no difference between probable and no proven sepsis group. As expected, sepsis episodes had greater immature neutrophil characterized in MCF as a strong expression of nCD10^{low}, nCD16^{low}, and nCD10^{low}CD16^{low} in these groups. Furthermore, the overall CD10 and CD16 mean fluorescence intensity (MFI) was lower in sepsis episodes. Based on the Wilcoxon test, the most discriminant parameter between proven sepsis and no proven sepsis

group was the CD10 MFI ($p = 0.0008$) followed by the level of nCD10^{low} and CD16 MFI ($p = 0.0014$ for each). The most discriminant parameter between each group was the percentage of nCD10^{low}. In the non-septic group nCD10^{low} was $15\% \pm 12$ (mean \pm SEM) with significant difference compared to $34\% \pm 27$ (% among immature granulocytes) in probable sepsis group ($p = 0.008$) and $45\% \pm 11$ in sepsis proven group ($p = 0.001$). Nevertheless, the most discriminating parameter between the probable and no proven sepsis groups remains the CRP with p value of 0.0003. No parameter studied can discriminate between proven and unproven sepsis groups.

Table 2 | Level of hematological and biochemical markers and neutrophil cell surface antigens at onset of the sepsis in various groups

| Blood parameters (mean \pm SEM) | Proven sepsis n = 4 | Probable sepsis n = 7 | No proven sepsis n = 23 | <i>P</i> |
|--|------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|
| Wool Blood Count | | | | |
| White blood cell count, G/L | 20 \pm 5 * | 14 \pm 9 | 11 \pm 7 | 0.03 |
| Neutrophil without eosinophils, G/L | 9.7 \pm 8.7 | 6.7 \pm 6 | 4.8 \pm 3.3 | 0.59 |
| Multicolor flow cytometry | | | | |
| nCD64 ^{high} , % among neutrophils | 81 \pm 26 ** | 51 \pm 33 | 29 \pm 25 | 0.009 |
| nCD10 ^{low} , % among neutrophils | 45 \pm 11 ** | 34 \pm 27 ** | 15 \pm 12 | 0.002 |
| nCD16 ^{low} , % among neutrophils | 59 \pm 35 * | 54 \pm 31 * | 24 \pm 20 | 0.003 |
| nCD10 ^{low} CD16 ^{low} , % among neutrophils | 27 \pm 11 ** | 27 \pm 22 * | 8 \pm 7 | 0.004 |
| CD10, MFI | 1.5 \pm 0.8 *** | 2.2 \pm 1.4 * | 3.8 \pm 1.7 | 0.001 |
| CD16, MFI | 14 \pm 6 ** | 24 \pm 14 * | 38 \pm 14 | 0.005 |
| Hematogone, % (10^{-3}) | 15 \pm 7 ** | 23 \pm 14 | 31 \pm 10 | 0.02 |
| Biochemistry | | | | |
| First CRP ¹ , mg/L | 43 \pm 52 ** | 12 \pm 9 *** | 1.4 \pm 0.9 | 0.0004 |
| Second CRP, mg/L | 69 \pm 49 * | 24 \pm 41 *** | 1.4 \pm 0.7 | 0.001 |

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (proven sepsis vs no proven sepsis and probable sepsis vs no proven sepsis). No significant difference between proven sepsis and probable sepsis for any parameters. MFI: Mean fluorescence intensity. ¹CRP was sampling in the same time than NFS.

For diagnosis performance analysis we focused our interest on two groups: sepsis episode (proven sepsis or probable sepsis) and no proven sepsis that have more clinical consistency in terms of medical management. Moreover, we did not find any significant difference between these two groups on the hematological parameters studied anyway. For all sepsis episodes, the nCD10^{low} has the greater area under the curve, in receiver operating characteristic analysis, AUC = 87 (IC_{95%} 75-99) but without significant difference with CRP, nCD64^{high} and other IGs parameters. With a cutoff value of 16.7% the sensitivity of nCD10^{low} is 84% (IC_{95%}

54-100), specificity is 78% (IC_{95%} 61-91), negative predictive value is 90% (IC_{95%} 77-100) and positive predictive value is 64% (IC_{95%} 39-89). Table 3 shows for each hematologic parameters the sensitivity, specificity, negative predictive value, positive predictive value and AUC of receiver operating curves (ROC). Pairwise comparisons of diagnosis performance parameters sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) and AUC were performed for each hematological parameter and show no significant difference compared to CRP except for a lower positive predictive value for nCD10^{low}.⁵⁸⁻⁶⁰

Table 3 | Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of markers using optimal cutoff values.

| Blood parameters | Cut-off value | Sensitivity % (95% CI) | Specificity % (95% CI) | NPV % (95% CI) | PPV % (95% CI) | AUC (95% CI) |
|--|---------------|------------------------|------------------------|----------------|----------------|--------------|
| Biochemistry | | | | | | |
| CRP mg/L | 6 | 73 (39-94) | 100 (85-100) | 88 (70-98) | 100 (63-100) | 88 (74-100) |
| Multicolor flow cytometry | | | | | | |
| nCD64 ^{high} % among neutrophils | 42.9 | 73 (45-100) | 86 (73-100) | 87 (73-100) | 73 (46-99) | 79 (65-94) |
| nCD10 ^{low} % among neutrophils | 16.7 | 81 (54-100) | 78 (61-91) | 90 (77-100) | 64 (39-89) * | 87 (75-99) |
| nCD16 ^{low} % among neutrophils | 52.1 | 64 (35-92) | 95 (87-100) | 85 (70-98) | 88 (65-100) | 79 (59-98) |
| nCD10 ^{low} CD16 ^{low} % among neutrophils | 12.4 | 82 (54-100) | 86.9 (73-100) | 91 (79-100) | 75 (50-99) | 85 (69-100) |
| CD10 MFI | 2.16 | 82 (54-100) | 95 (86-100) | 92 (81-100) | 90 (71-100) | 88 (73-100) |
| CD16 MFI | 24.05 | 72 (45-100) | 83 (67-98) | 86 (72-100) | 66 (40-93) | 83 (67-98) |

* $p < 0.05$ (Pairwise comparison was tested for each parameter versus CRP as gold standard.
MFI: Mean fluorescence intensity, PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value

Due to a lack of sensibility, 3 of 11 patients in the septic group have CRP below the cutoff value; but in these cases, the percentage of nCD10^{low} was well above thresholds and allows these missed patients to be classified in the right group. Therefore, we tested the diagnostic performance of the combination of CRP level, nCD10^{dim}. Combined together with parallel multiple testing approaches, these two parameters had the highest sensitivity of 100% (IC_{95%}: 71-100) for diagnosing sepsis and the highest NPV of 100% (IC_{95%}: 81-100) for ruling out sepsis (Table 4). A trend towards significance seems to be emerging with a p-value of 0.08 when we compared nCD10^{low} NPV with CRP NPV.

Table 4 | Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of markers using optimal cutoff values for two combined diagnosis tests: CRP and nCD10^{low}

| Blood parameters | Cut-off value | Sensitivity % (95% CI) | Specificity % (95% CI) | NPV % (95% CI) | PPV % (95% CI) |
|--|---------------|------------------------|------------------------|---------------------|----------------|
| CRP, mg/L | 6 | 73 (39-94) | 100 (85-100) | 88 (70-98) | 100 (63-100) |
| nCD10 ^{low} , % among neutrophils | 16.7 | 81 (54-100) | 78 (61-91) | 90 (77-100) | 64 (39-89) |
| CRP, mg/L + nCD10 ^{low} , % among neutrophils | 6 16.7 | 100 (71-100) | 78 (61-95) | 100 (81-100) | 69 (61-95) |

Figure 4 compares the ROC curves of IGs and CRP and Figure 5 compares the ROC curves of MFI and CRP. There is no significant difference when testing IGs and MFI AUC compared to CRP AUC.

Figure 4 | ROC curve of immature granulocytes compared with CRP

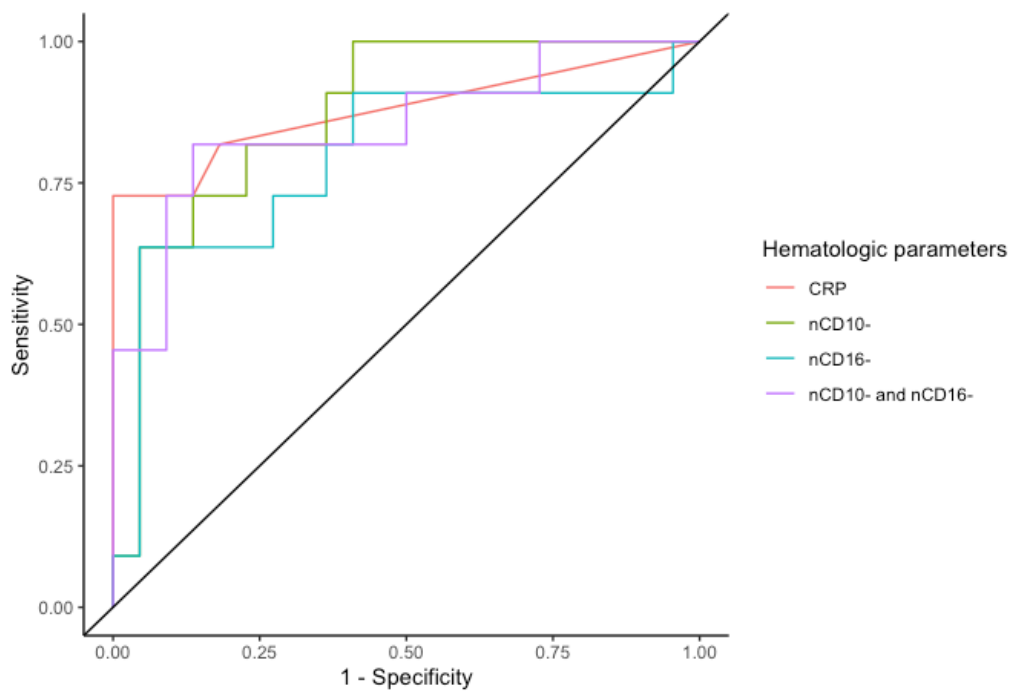
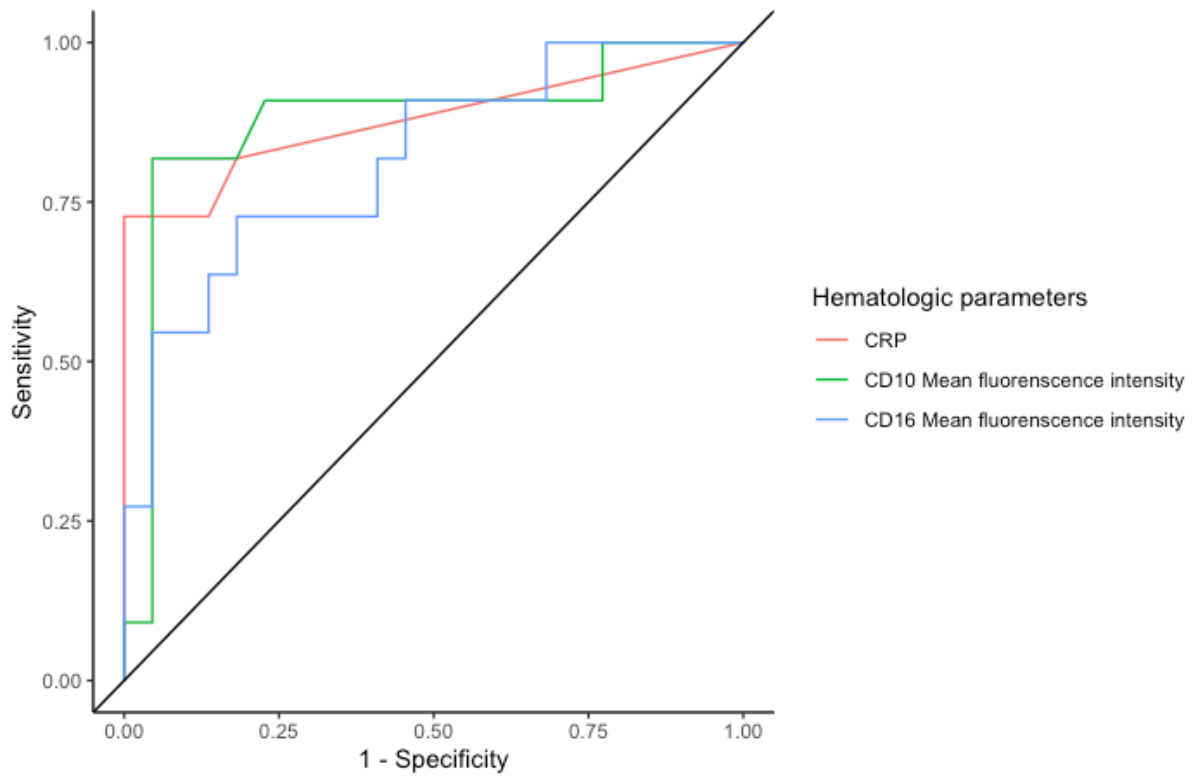


Figure 5 | ROC curves of mean fluorescence intensity of whole blood immature cells



VIII. Discussion

As described above, it's always difficult in clinical practice to differentiate sepsis and the absence of septic patients only on clinical features. The diagnosis of proven sepsis episode requires a microbiological-clinical correlation. Because of the long-time taken to obtain culture results and its low sensitivity and low negative predictive value, clinicians can't rely only on blood culture to rule out sepsis. And yet, probable sepsis without microbiological confirmation in preterm neonates, still constitutes a difficult diagnosis group that can't be ignored because of many fatal outcomes.¹³ In NICU practice, the CRP is the most common biomarker for screening neonatal sepsis, and it is as important as the assessment of clinical signs and microbiological examination.⁶¹ But the peak level of CRP is delayed from the early stage of sepsis episode, which is why it lacks sensitivity. Meen et al reviewed 70 studies about use of CRP in neonatal sepsis and show that the sensitivity widely varied among the studies between 41 to 91% due to the variability of cutoff values used to define positivity.⁶¹ In our study in preterm neonates and with a common cutoff value of 6 mg/L, we found a similar sensitivity of 73 % (IC95% 39-94), it provides a good external validity to our work.

In an attempt to solve this diagnosis problem, research has been conducted to identify markers of neonatal sepsis with high sensitivity and specificity. This study focused on markers associated with the inflammatory response such as cytokines. Currently, a lot of attention is being paid to the cell antigen surface of granulocytes involved in the immune response (CD64, CD11b). Among those, several studies have already shown that nCD64^{high} is the most reliable biomarker for diagnosing neonatal sepsis. Upregulation of CD64 on neutrophils is a very early stage of the host's innate immune response to a bacterial infection with circulating cell levels increasing about one hour after the invasion.⁴³ A recent review by Dai et al of 7 studies in 2017 found a pooled sensitivity and specificity for nCD64^{high} were 80% and 83%.⁴² This data were very similar compared to our study for nCD64^{high} with sensitivity of 73% (IC95% 45-100) and specificity of 86% (IC95% 73-100). But in our study, the mean percentage of nCD64^{high} between no proven sepsis group and probable sepsis group was not significant.

For many years, there has been a lot of data on the interest of IGs as markers of sepsis. One method of quantifying the immature neutrophils in the circulation, particularly popular in neonatal hematology, is the immature to total (I/T) neutrophil ratio on the blood count. But identified using non-automated techniques, reproducibility remains low and variability between observers due to manual differential cell count is high.^{30,33,34} Moreover, there is a low correlation between the I/T ratio and the percentage of IGs because these measurements

evaluate distinct stages of development of neutrophils: the I/T ratio compares mature neutrophils and mainly the proportion of bands to segmented neutrophils, while the IGs focuses on less mature neutrophils, such as promyelocytes, myelocytes, and metamyelocytes.³³ FCM is a growing technique in routine laboratories due to its simplicity, rapidity, and reproducibility that allows us today to better determine the ratio of IGs among granulocytes.⁴¹ In 2012, Cimenti et al already conducted a study with a multiparameter automated hematological analyzer which can detect IGs based on morphological characteristics but not on neutrophils cell surface antigen. They describe a significantly elevated number of immature granulocytes and the immature myeloid in neonates with early-onset sepsis.³⁸ But no study has previously described a FCM method to exactly quantify IGs as increased expression of CD10^{low} and CD16^{low} on neutrophils surfaces as sepsis biomarkers. In our study, we compared the diagnostic performance of IGs to the well-described CRP test as gold standard and nCD64^{high}. Our results about IGs showed that it was a very promising marker for decision support in neonatal sepsis but without being able to identify any significant difference with CRP or nCD64^{high} in our small population study.

Based on recent fundamental research, it seems that IGs (myelocytes, metamyelocytes, band cells) characterized by CD10^{low} expression increases within a few minutes after exposure to bacteria. During sepsis, bacterial product and pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor and interleukin, up-regulate the level of G-CSF which quickly promotes the generation of immature neutrophils.⁶² This is why this marker can be interesting in combination with the CRP in cases where the sampling is really early and CRP has not yet exceeded the cutoff value before sampling. We found that the use of a composite criterion of two markers involving immature granulocytes and CRP together increases sensitivity by up to 100% [IC_{95%} 71-100]. and NPV in the diagnosis of sepsis by up to 100% [IC_{95%} 81-100]. In clinical practice, a useful NPV biomarker could allow the clinician to not initiate antibiotic therapy and achieve the objective of preserving newborns from undeserved prolonged antibiotic therapy that promotes the emergence of bacterial resistance. These results are more promising than those found in previous studies. For example, Yang et al, compared the diagnosis accuracy of combined CRP or PCT with nCD64^{high}.¹¹ The best result of this study was a sensitivity of 90% [IC_{95%} 77-97] and NVP of 89%. Besides, this study compares only MPT sepsis proven group to healthy term neonates, overlooking all probable sepsis group.

To date, it's the first study that provide diagnostic accuracy of IGs characterized by nCD10^{low} assessment in FCM. In this study, we demonstrated the feasibility of leukocyte

immunophenotyping by FCM in septic neonates with minimal blood volume sampling (50µL) that can be obtained on the total blood count without additional sampling. Despite the low number of patients, we have shown the equivalence of diagnostic performance compared to CRP and nCD64^{low} and a trend towards better performance with a combination test of CRP and nCD10^{low}. This finding alone justifies the additional evaluation of nCD10^{low} in neonatal sepsis with further large and well-designed prospective trials to confirm our findings of immatures granulocytes detected by FCM.

Our study has several limitations. The number of patients is limited because FCM technique for this study was not available all day long and that we could not keep the samples longer than 12 hours. Furthermore, a total of 46% of patients could not be enrolled. We missed a few patients at the initiation phase of the study and besides, a good number of patients who could be included in the analysis could not be exploited because of a loss of partial FCM data or clotted blood. For this last point, it should be recalled that we did not have a dedicated sample for analysis and we couldn't perform new sampling. We have focused our attention on the search for possible confounding factors concerning IGs populations in premature newborns in the literature. In preterm neonates, early neutropenia is more common, and we would be prompted to think that this would modify the ratio of immature to total neutrophils. But, Christensen et al in 2015 showed that in case of reduced neutrophil production, these are conserved.⁶³ Faulhaber et al. have reported an increase in the expression of CD10 and CD16 among term neonates after 24 h of phototherapy treatment, which may be related to an anti-inflammatory effect of phototherapy.⁶⁴ This potentially confounding parameter has not been considered in our study.

IX. Conclusion

The present study indicated that extensive immunophenotypic characterization of peripheral leucocytes subsets by flow cytometry at the early of sepsis can detect elevated levels of nCD10^{low} and nCD16^{low} as markers of immature granulocytes in septic patients. Especially in association with the CRP, nCD10^{low} is a promising decision support tool for the management of neonatal sepsis with greater sensitivity and negative predictive value than CRP alone.

X. Acknowledgments

Source of funding: we received support from our local preterm association (non-profit organization) for this work. We thank the staffs of the Neonatal Intensive Care Unit and Hematology Department for their cooperation and assistance.

Bibliographie

1. Guérin E, Orabona M, Raquil M-A, et al. Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration*. *Crit Care Med* 2014;42(9):2007–18.
2. Daix T, Guerin E, Tavernier E, et al. Multicentric Standardized Flow Cytometry Routine Assessment of Patients With Sepsis to Predict Clinical Worsening. *Chest* 2018;154(3):617–27.
3. World Health Organization. Preterm birth [Internet]. 2018 [cited 2019 Aug 3]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
4. Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (DRESS). La santé des mères et des nouveau-nés : Premiers résultats de l'enquête nationale périnatale 2016 - Ministère des Solidarités et de la Santé [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 8]; Available from: <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/etudes-et-statistiques/publications/communiqués-de-presse/article/la-sante-des-meres-et-des-nouveau-nes-premiers-resultats-de-l-enquete-nationale>
5. Santos RP, Tristram D. A Practical Guide to the Diagnosis, Treatment, and Prevention of Neonatal Infections. *Pediatr Clin North Am* 2015;62(2):491–508.
6. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Neonatal Outcomes of Extremely Preterm Infants From the NICHD Neonatal Research Network. *PEDIATRICS* 2010;126(3):443–56.
7. Zipursky AR, Yoon EW, Emberley J, et al. Central Line-Associated Blood Stream Infections and Non-Central Line-Associated Blood Stream Infections Surveillance in Canadian Tertiary Care Neonatal Intensive Care Units. *J Pediatr* 2019;208:176–182.e6.
8. Walsh MC, Bell EF, Kandefor S, et al. Neonatal outcomes of moderately preterm infants compared to extremely preterm infants. *Pediatr Res* 2017;82(2):297–304.
9. Wynn JL, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med J Soc Crit Care Med World Fed Pediatr Intensive Crit Care Soc* 2014;15(6):523–8.
10. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *The Lancet* 2017;390(10104):1770–80.
11. Yang A-P, Liu J, Yue L-H, Wang H-Q, Yang W-J, Yang G-H. Neutrophil CD64 combined with PCT, CRP and WBC improves the sensitivity for the early diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Chem Lab Med CCLM* [Internet] 2016 [cited 2019 Oct 7];54(2). Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2016.54.issue-2/cclm-2015-0277/cclm-2015-0277.xml>
12. INIS Collaborative Group, Brocklehurst P, Farrell B, et al. Treatment of neonatal sepsis with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2011;365(13):1201–11.
13. Squire E, Favara B, Todd J. Diagnosis of neonatal bacterial infection: hematologic and pathologic findings in fatal and nonfatal cases. *Pediatrics* 1979;64(1):60–4.
14. Garges HP, Moody MA, Cotten CM, et al. Neonatal meningitis: what is the correlation among cerebrospinal fluid cultures, blood cultures, and cerebrospinal fluid parameters? *Pediatrics* 2006;117(4):1094–100.
15. Norberg A, Christopher NC, Ramundo ML, Bower JR, Berman SA. Contamination Rates of Blood Cultures Obtained by Dedicated Phlebotomy vs Intravenous Catheter. *JAMA* 2003;289(6):726–9.
16. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine Infection and Preterm Delivery. *N Engl J Med* 2000;342(20):1500–7.
17. Puopolo KM, Benitz WE, Zaoutis TE, COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Management of Neonates Born at $\leq 34\ 6/7$ Weeks' Gestation With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis. *Pediatrics* 2018;142(6).

18. Société française de Néonatalogie. Prise en charge du nouveau-né à risque d'infection néonatale bactérienne précoce (≥ 34 SA) - Recommandation de bonne pratique. 2017.
19. Pammi M, Weisman LE. Late-onset sepsis in preterm infants: update on strategies for therapy and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015;1–18.
20. Polin RA, Newborn the COFA. Management of Neonates With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis. *Pediatrics* 2012;129(5):1006–15.
21. Cotten CM, Taylor S, Stoll B, et al. Prolonged Duration of Initial Empirical Antibiotic Treatment Is Associated With Increased Rates of Necrotizing Enterocolitis and Death for Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 2009;123(1):58–66.
22. Hofer N, Zacharias E, Müller W, Resch B. Performance of the definitions of the systemic inflammatory response syndrome and sepsis in neonates. *J Perinat Med [Internet]* 2012 [cited 2019 Oct 9];40(5). Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/jpme.2012.40.issue-5/jpm-2011-0308/jpm-2011-0308.xml>
23. Haute Autorité de Santé. Prise en charge du nouveau-né à risque d'infection néonatale bactérienne précoce ≥ 34 SA. HAS; 2017.
24. Martherus T, Oberthuer A, Dekker J, et al. Supporting breathing of preterm infants at birth: a narrative review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2019;104(1):F102–7.
25. Condò V, Cipriani S, Colnaghi M, et al. Neonatal respiratory distress syndrome: are risk factors the same in preterm and term infants? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017;30(11):1267–72.
26. Sakonidou S, Dhaliwal J. The management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants (European Consensus Guidelines—2013 update). *Arch Dis Child - Educ Pract Ed* 2015;100(5):257–9.
27. Eichenwald EC, Newborn C on FA. Apnea of Prematurity. *Pediatrics* 2016;137(1):e20153757.
28. Smith CL, Dickinson P, Forster T, et al. Identification of a human neonatal immune-metabolic network associated with bacterial infection. *Nat Commun* 2014;5:4649.
29. Sterkers G. 3 - Immunité innée et acquise en période néonatale: Innate and acquired immunity in neonates [Internet]. In: Aujard Y, editor. *Infections néonatales*. Paris: Elsevier Masson; 2015 [cited 2019 Oct 12]. p. 19–26. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294741357000036>
30. Akenzua GI, Hui YT, Milner R, Zipursky A. Neutrophil and Band Counts in the Diagnosis of Neonatal Infections. *Pediatrics* 1974;54(1):38–42.
31. Manroe BL, Rosenfeld CR, Weinberg AG, Browne R. The differential leukocyte count in the assessment and outcome of early-onset neonatal group B streptococcal disease. *J Pediatr* 1977;91(4):632–7.
32. Rodwell RL, Leslie AL, Tudehope DI. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. *J Pediatr* 1988;112(5):761–7.
33. MacQueen BC, Christensen RD, Yoder BA, et al. Comparing automated vs manual leukocyte differential counts for quantifying the “left shift” in the blood of neonates. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc* 2016;36(10):843–8.
34. Engle WD, Rosenfeld CR, Mouzinho A, Risser RC, Zeray F, Sanchez PJ. Circulating neutrophils in septic preterm neonates: comparison of two reference ranges. *Pediatrics* 1997;99(3):E10.
35. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2018;82(1):e00057-17, /mmlbr/82/1/e00057-17.atom.
36. Grieshaber-Bouyer R, Nigrovic PA. Neutrophil Heterogeneity as Therapeutic Opportunity in Immune-Mediated Disease. *Front Immunol [Internet]* 2019 [cited 2019 Oct 7];10. Available

- from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00346/full>
37. Yvan-Charvet L, Ng LG. Granulopoiesis and Neutrophil Homeostasis: A Metabolic, Daily Balancing Act. *Trends Immunol* 2019;40(7):598–612.
 38. Cimenti C, Erwa W, Herkner KR, Kasper DC, Müller W, Resch B. The predictive value of immature granulocyte count and immature myeloid information in the diagnosis of neonatal sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2012;50(8):1429–32.
 39. Nigro KG, O’Riordan M, Molloy EJ, Walsh MC, Sandhaus LM. Performance of an automated immature granulocyte count as a predictor of neonatal sepsis. *Am J Clin Pathol* 2005;123(4):618–24.
 40. Marimuthu R, Francis H, Dervish S, Li SCH, Medbury H, Williams H. Characterization of Human Monocyte Subsets by Whole Blood Flow Cytometry Analysis. *J Vis Exp JoVE* [Internet] 2018 [cited 2019 Oct 12];(140). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6235554/>
 41. Spijkerman R, Hesselink L, Hellebrekers P, et al. Automated flow cytometry enables high performance point-of-care analysis of leukocyte phenotypes. *J Immunol Methods* 2019;112646.
 42. Dai J, Jiang W, Min Z, et al. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ* 2017;26(2):327–32.
 43. Du J, Li L, Dou Y, Li P, Chen R, Liu H. Diagnostic Utility of Neutrophil CD64 as a Marker for Early-Onset Sepsis in Preterm Neonates. *PLoS ONE* [Internet] 2014 [cited 2018 Jan 10];9(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102545/>
 44. Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics* 2008;121(1):129–34.
 45. Shi J, Tang J, Chen D. Meta-analysis of diagnostic accuracy of neutrophil CD64 for neonatal sepsis. *Ital J Pediatr* [Internet] 2016 [cited 2018 Jan 10];42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4897921/>
 46. Qiu X, Li J, Yang X, et al. Is neutrophil CD11b a special marker for the early diagnosis of sepsis in neonates? A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2019;9(4):e025222.
 47. Vázquez Rodríguez S, Arriaga Pizano LA, Laresgoiti Servitje E, et al. Multiparameter flow cytometry analysis of leukocyte markers for diagnosis in preterm neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2019;1–11.
 48. Robinson JP. Overview of Flow Cytometry and Microbiology: Overview of Flow Cytometry and Microbiology. *Curr Protoc Cytom* 2018;84(1):e37.
 49. Dean PN, Hoffman RA. Overview of Flow Cytometry Instrumentation. *Curr Protoc Cytom* 2007;Supplement 39:1–8.
 50. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, et al. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatr Neonatol* 2016;57(4):265–73.
 51. Bekhof J, Reitsma JB, Kok JH, Van Straaten IHLM. Clinical signs to identify late-onset sepsis in preterm infants. *Eur J Pediatr* 2013;172(4):501–8.
 52. Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr* 1996;129(2):275–8.
 53. Eschborn S, Weitkamp J-H. Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc* 2019;
 54. Chiesa C, Pellegrini G, Panero A, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications, and infection. *Clin Chem* 2003;49(1):60–8.

55. Weitkamp J-H, Aschner JL. Diagnostic Use of C-Reactive Protein (CRP) in Assessment of Neonatal Sepsis. *NeoReviews* 2005;6(11):e508–15.
56. Brazy JE, Grimm JK, Little VA. Neonatal manifestations of severe maternal hypertension occurring before the thirty-sixth week of pregnancy. *J Pediatr* 1982;100(2):265–71.
57. Schisterman EF, Perkins N. Confidence Intervals for the Youden Index and Corresponding Optimal Cut-Point. *Commun Stat - Simul Comput* 2007;36(3):549–63.
58. Florkowski CM. Sensitivity, Specificity, Receiver-Operating Characteristic (ROC) Curves and Likelihood Ratios: Communicating the Performance of Diagnostic Tests. *Clin Biochem Rev* 2008;29(Suppl 1):S83–7.
59. Kosinski AS. A weighted generalized score statistic for comparison of predictive values of diagnostic tests. *Stat Med* 2013;32(6):964–77.
60. Trajman A, Luiz RR. McNemar chi2 test revisited: comparing sensitivity and specificity of diagnostic examinations. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68(1):77–80.
61. Meem M, Modak JK, Mortuza R, Morshed M, Islam MS, Saha SK. Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: A systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics. *J Glob Health* 2011;1(2):201–9.
62. Shen X, Cao K, Jiang J, Guan W, Du J. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J Cell Mol Med* 2017;21(9):1687–97.
63. Christensen RD, Yoder BA, Baer VL, Snow GL, Butler A. Early-Onset Neutropenia in Small-for-Gestational-Age Infants. *Pediatrics* 2015;136(5):e1259-1267.
64. Faulhaber FRS, Faulhaber GAM, Marcondes NA, Procianoy RS, Silveira RC. Expression of neutrophil surface markers in icteric neonates before and after phototherapy. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94(6):895–900.

Supplementary material

Table 5 | Deduced cell types from the gating characteristics of each cell studied

| Leukocytes subsets | Gating characteristics |
|--------------------------|--|
| Monocytes, G/L | SSC ^{int} , CD45 ^{high} , CD14+ |
| Classical | SSC ^{int} , CD45 ^{high} , CD14 ^{high} , CD16 |
| Intermediate | SSC ^{int} , CD45 ^{high} , CD14 ^{high} , CD16 ^{high} |
| No classical | SSC ^{int} , CD45 ^{high} , CD14 ^{low} , CD16 ^{high} |
| Lymphocytes G/L | SSC ^{low} , CD45 ^{high} |
| T-lymphocytes, CD3+ G/L | SSC ^{low} , CD45 ^{high} , CD3+ |
| B-lymphocytes, CD24+ G/L | SSC ^{low} , CD45 ^{high} , CD24+ |
| Eosinophils G/L | SSC ^{high} , CD45 ^{high} , CD14-, CD3-, CD24-, CD16 ^{low} , CD10 ^{pos} |
| Granulocytes G/L : | SSC ^{high} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24- |
| CD64high, %* | SSC ^{high} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, CD64+ |
| CD10dim, % * | SSC ^{high} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, CD10 ^{low} , |
| CD16dim, % * | SSC ^{high} CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, |
| CD10dim and CD16dim % * | SSC ^{high} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, CD10 ^{low} , CD16 ^{low} |

* The threshold has been established from a control group of 10 healthy adults

Table 6 | Antibodies used for multicolor flow cytometry

| Antibodies | Manufacturer |
|---|---------------------------------------|
| Fluoresceine Iso Thio Cyanate (FITC) conjugated CD64 mAb (CD64-FITC, clone 22) | Immunotech (Marseille, France). |
| phycoerythrin (PE) conjugated CD10 mAb (CD10-PE, clone ALB1) | |
| PE-cyanine 5,5 (PC5,5) conjugated CD14 mAb (CD14-PC5,5, clone RMO52) | |
| PE-cyanine 7 (PC7) conjugated CD3 mAb (CD3-PC7, clone UCHT1) | |
| Allophycocyanin (APC) conjugated CD24 mAb (CD24-APC, clone ALB9) | |
| APC Alexia Fluor 750 (APC-A750) conjugated CD11b mAb (CD11b-APC-A750, clone Bear 1) | |
| Pacific blue (PB) conjugated CD16 mAb (CD16-PB, clone 3G8) | |
| Krome Orange (KO) conjugated CD45 mAb (CD45-KO, clone J.33) | |

Figure 6.1 | Boxplot diagram showing distribution of CRP, CD64^{high} and IGs among different sepsis groups.

Difference between the three group was calculated by Kruskal-Wallis test and pairwise comparison between two group were calculated by Wilcoxon test. CD64^{high} and IGs were expressed in percentage among granulocytes except eosinophils.

The top and the bottom of the box represent the 25th and 75th percentile; the line in the box indicates the median. The Whiskers display the largest data less than or equal to the 75th percentile plus 1.5 times interquartile range and the lowest data greater than or equal to the 25th percentile minus 1.5 times interquartile range.

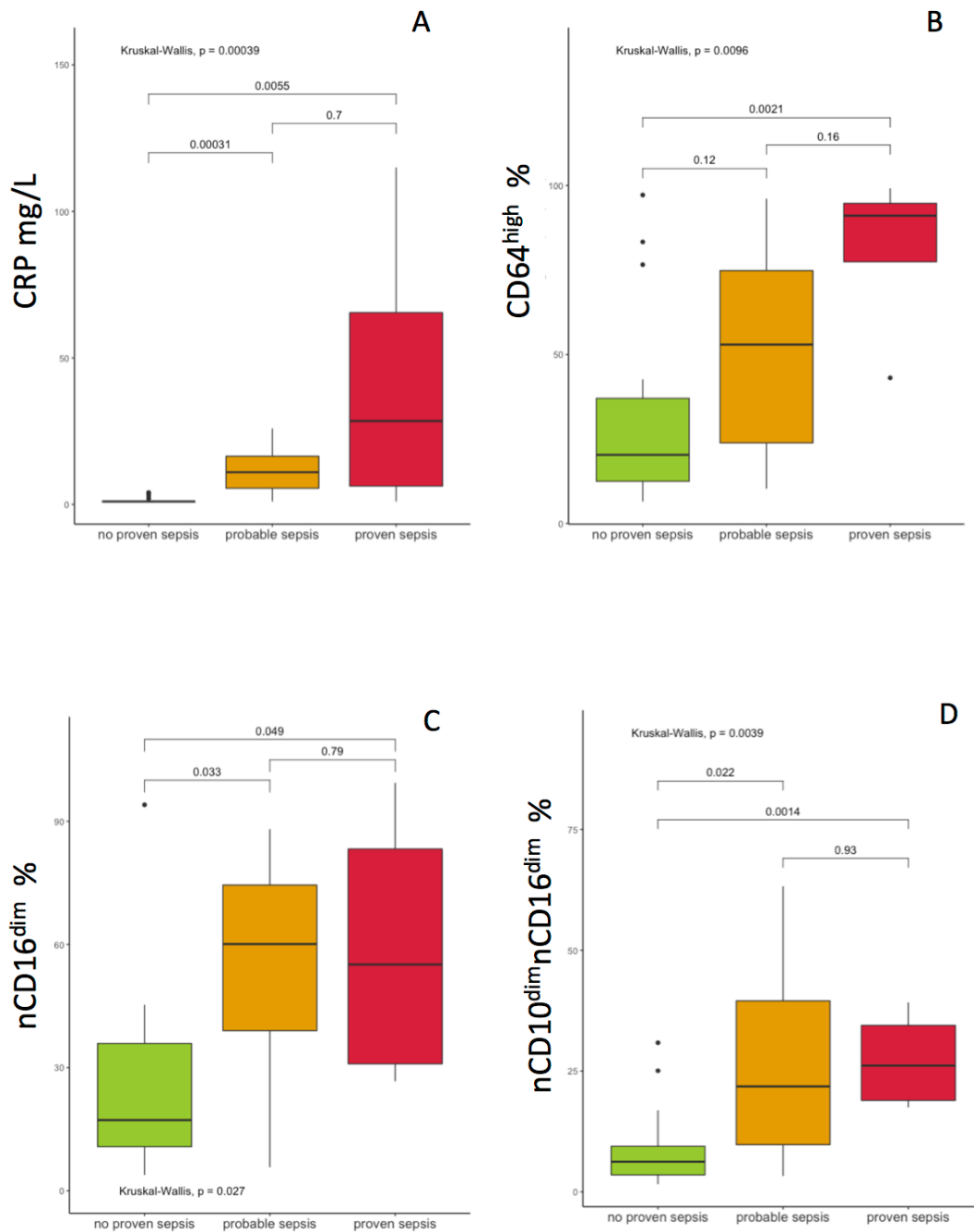


Figure 6.2 | Boxplot diagram showing distribution of CRP, CD64^{high} and IGs among different sepsis groups.

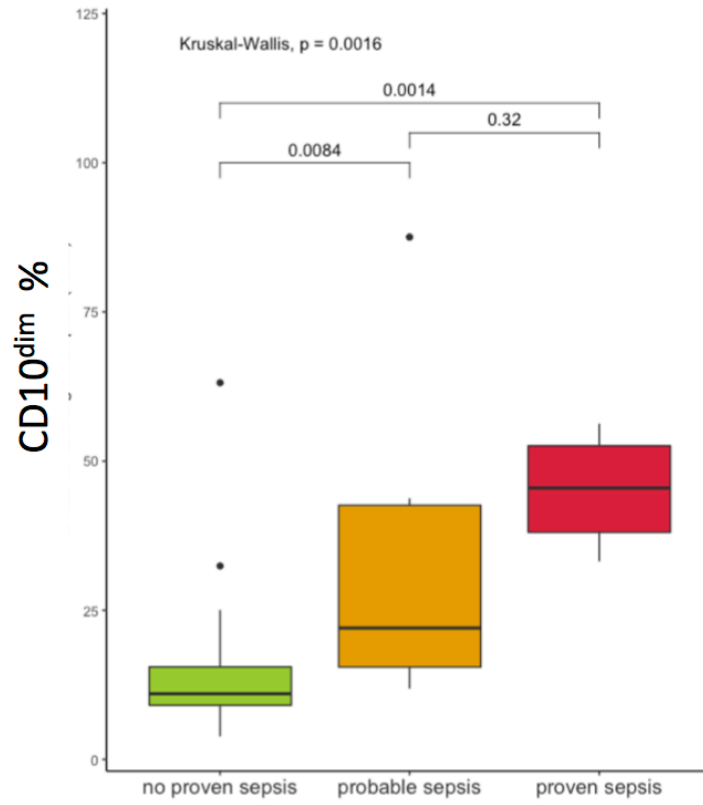
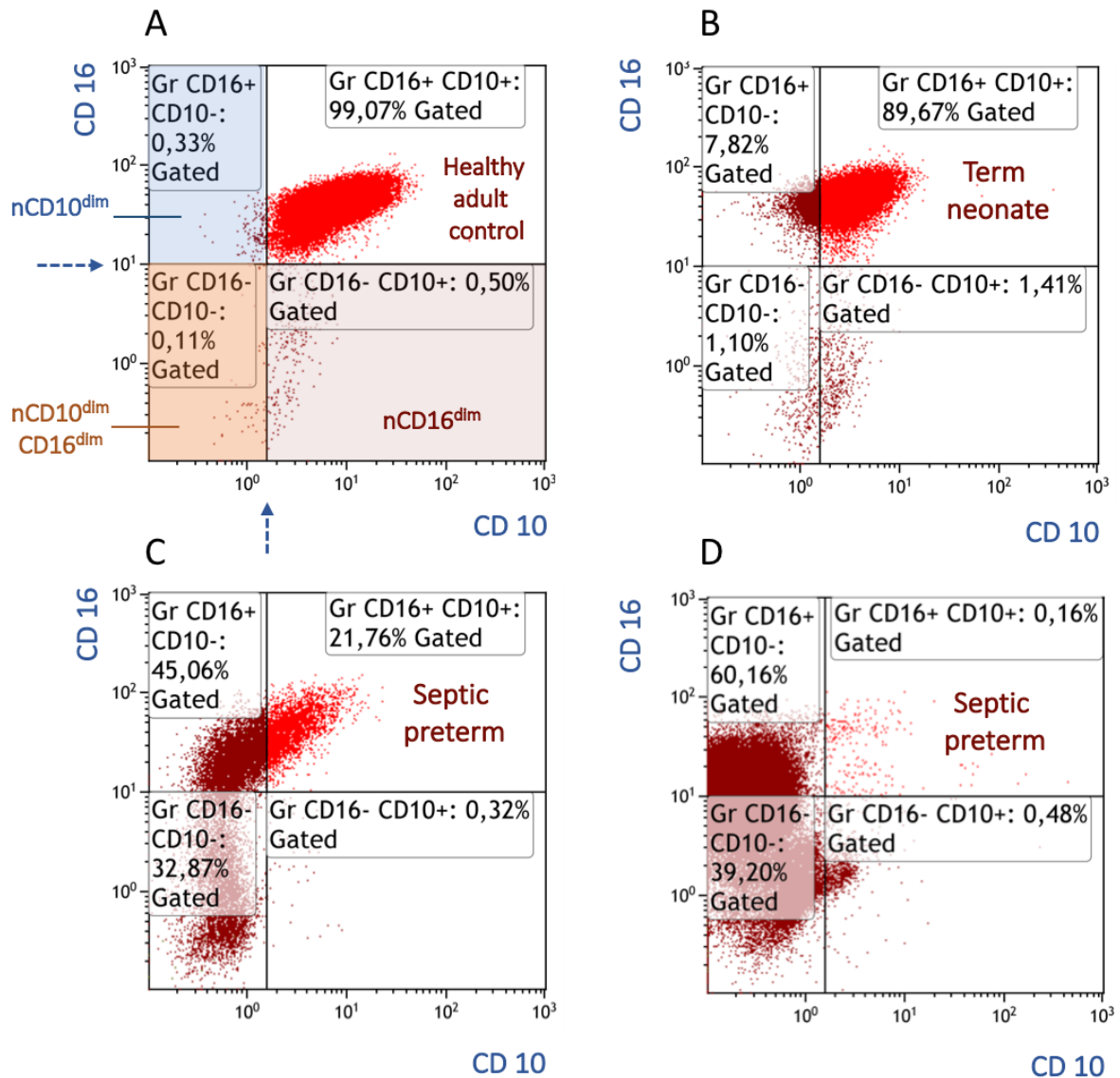


Figure 7 | Gating strategy of CD10 and CD16 granulocytes among CD45 without eosinophils. Comparison between expression of CD10 and CD16 in no septic patient and septic patient

Part A represent gating window of no septic patient. The color box corresponds to the gate in which population of granulocytes with low CD10 and/or CD16 expression were counted. Thresholds are indicated by dashed arrows and have been previously determined by 10 young healthy adults.

Part B represent a term with increased granulocytes with high CD16 expression compared to healthy adult control: $nCD16^{lowup}$ to 7.8%.

Part C and D represents septic preterm with high level of immature granulocytes.



Conclusion

Notre étude démontre la faisabilité de l'utilisation de la CMF au stade précoce du sepsis afin de détecter une augmentation des populations nCD10^{low} et/ou nCD16^{low}. Nous avons clairement pu mettre en évidence une augmentation significative de ces populations d'IGs au cours des épisodes de sepsis prouvés ou probables. Il s'agit de marqueurs biologiques du sepsis décrits de longue date. Ces derniers restaient jusqu'alors peu utilisés en l'absence de techniques fiables et automatisées pour les quantifier.

Grâce aux techniques d'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires périphériques déjà utilisées en routine, il est probable que ce nouveau marqueur puisse venir renforcer l'aide à la décision diagnostique dans le sepsis du nouveau-né prématuré.

Il existe une vraie tendance à la supériorité de l'utilisation combinée de la CRP et du nCD10^{low}, mais celle-ci n'a pas pu être prouvée du fait du petit nombre de patients inclus.

Il s'agit d'une étude pilote qui permettra à l'avenir, de définir le nombre de sujets nécessaires à la réalisation d'une étude multicentrique afin d'évaluer à plus grande échelle ce marqueur prometteur.

Serment d'Hippocrate

Révisé et amendé par la 68^{ème} assemblée générale de l'association médicale mondiale réunie à Chicago en octobre 2017.

EN QUALITÉ DE MEMBRE DE LA PROFESSION MÉDICALE

JE PRENDS L'ENGAGEMENT SOLENNEL de consacrer ma vie au service de l'humanité ;

JE CONSIDÉRERAI la santé et le bien-être de mon patient comme ma priorité ;

JE RESPECTERAI l'autonomie et la dignité de mon patient ;

JE VEILLERAI au respect absolu de la vie humaine ;

JE NE PERMETTRAI PAS que des considérations d'âge, de maladie ou d'infirmité, de croyance, d'origine ethnique, de genre, de nationalité, d'affiliation politique, de race, d'orientation sexuelle, de statut social ou tout autre facteur s'interposent entre mon devoir et mon patient ;

JE RESPECTERAI les secrets qui me seront confiés, même après la mort de mon patient ;

J'EXERCERAI ma profession avec conscience et dignité, dans le respect des bonnes pratiques médicales ;

JE PERPÉTUERAI l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale ;

JE TÉMOIGNERAI à mes professeurs, à mes collègues et à mes étudiants le respect et la reconnaissance qui leur sont dus ;

JE PARTAGERAI mes connaissances médicales au bénéfice du patient et pour les progrès des soins de santé ;

JE VEILLERAI à ma propre santé, à mon bien-être et au maintien de ma formation afin de prodiguer des soins irréprochables ;

JE N'UTILISERAI PAS mes connaissances médicales pour enfreindre les droits humains et les libertés civiques, même sous la contrainte ;

JE FAIS CES PROMESSES sur mon honneur, solennellement, librement.

Quantification des immatures granuleux en cytométrie de flux comme marqueur de sepsis chez les nouveau-nés prématurés.

Dans une population d'enfants nés prématurés, les épisodes de sepsis précoces et tardifs restent responsables d'une forte morbi-mortalité en dépit des avancées médicales en néonatalogie.

Objectif : Nous avons souhaité évaluer la capacité de la cytométrie en flux (CMF) à identifier des populations d'immatures granuleux (IGs) et mesurer les performances de ces IGs comme marqueur de sepsis chez les prématurés.

Méthodes : Nous avons inclus de façon consécutive sur une période d'un an, tous les nouveau-nés prématurés d'âge gestationnel inférieur à 34 SA suspects de sepsis précoce ou tardif. Les échantillons sanguins ont été obtenus sur les résidus de NFS sans prélèvement supplémentaire. Le pourcentage de neutrophiles immatures à expression diminuée en CD10 et/ou en CD16 a été déterminé par CMF (nCD10^{low}, nCD16^{low}).

Résultats : Sur 51 prématurés inclus, 34 ont pu être analysés. Au cours des épisodes de sepsis probables ou prouvés, l'expression des nCD10^{low}, nCD16^{low} était significativement plus importante comparée aux sepsis non prouvés. En utilisant le nCD10^{low} en tant que marqueur de sepsis, l'aire sous la courbe était de 87 (IC_{95%} 75-99). Avec une valeur seuil choisie de 16.7% la sensibilité de ce test était de 84% (IC_{95%} 54-100), la spécificité de 78% (IC_{95%} 61-91), la valeur prédictive négative de 90% (IC_{95%} 77-100) et la valeur prédictive positive 64% (IC_{95%} 39-89). En utilisation combinée à la CRP le nCD10^{low} procurait une sensibilité de 100% (IC_{95%}: 71-100) et une valeur prédictive négative de 100% (IC_{95%}: 81-100) avec des valeurs seuil respectives de 6 mg/L pour la CRP et 16.7% pour le nCD10^{low}.

Conclusion : Notre étude démontre que l'utilisation de la CMF au stade précoce du sepsis permet la détection d'une augmentation des populations nCD10^{low} et/ou nCD16^{low} utilisables comme marqueur de sepsis chez le prématuré.

Mots-clés : Immatures granuleux, nouveau-nés prématurés, infection néonatale bactérienne précoce, infection nosocomiale, cytométrie de flux, CD10, CD16

Immature granulocytes quantification by flow cytometry as a diagnostic marker for sepsis in preterm neonates.

Background: Early and late onset sepsis (EOS and LOS) are both a leading cause of mortality in preterm neonates despite advances in neonatal intensive care.

Objective: To assess the ability of flow cytometry (FCM) to predict sepsis in preterm neonates by identifying and quantifying IGs surface antigens.

Methods: We prospectively included for a one-year study period, preterm under 34 week's gestation age (GA) with suspected EOS or LOS. Blood sample was obtained from blood count residues without additional sampling. Neutrophil nCD10^{low} and/or nCD16^{low} expression on peripheral blood was determined by FCM as IGs markers.

Results: 51 preterm neonates were recruited in the study, of whom 34 could be analyzed. There is a significant higher percentage of nCD10^{low} and/or nCD16^{low} among granulocytes in probable and proven sepsis compared to no proven sepsis episodes. For all sepsis episodes, the nCD10^{low} has the best area under the curve, in receiver operating characteristic analysis, of 87 (IC_{95%} 75-99). With a cutoff value of 16.7% the sensitivity of nCD10^{low} is 84% (IC_{95%} 54-100), specificity is 78% (IC_{95%} 61-91), negative predictive value is 90% (IC_{95%} 77-100) and positive predictive value is 64% (IC_{95%} 39-89). In combination with the CRP level, nCD10^{low} had the highest negative predictive value (100% IC_{95%}: 81-100) for ruling out sepsis and (100% IC_{95%}: 71-100) sensitivity for diagnosing sepsis with cutoff value of 6 mg/L for CRP and 16.7% for nCD10^{low}.

Conclusion: The present study indicated that flow cytometry at the early of sepsis can detect elevated level of nCD10^{low} and nCD16^{low} as marker of immature granulocytes in septic patients. Especially in association with the CRP, nCD10^{low} is a promising decision support tool for the management of neonatal sepsis with greater sensitivity and negative predictive value than CRP alone.

Keywords : Immature granulocytes, preterm neonates, early onset sepsis, late onset sepsis, multicolour flow cytometry, CD10, CD16.

