

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2018

THESE 2018/TOU3/2105

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Obtenu après soutenance du
Mémoire du DIPLOME d'ETUDES SPECIALISEES de PHARMACIE
Option Biologie Médicale

CARACTERISATION LEUCOCYTAIRE EN CYTOMETRIE EN FLUX HUIT COULEURS DE NOUVEAU-NES SEPTIQUES ET NON SEPTIQUES : RESULTATS PRELIMINAIRES

Présentée et soutenue publiquement à Limoges par
Etienne Voirin-Mathieu, né le 30 août 1991 à Paris 12^{ème}
le 6 décembre 2018

Directeur de thèse : Mme le Dr Estelle GUERIN

JURY

Président : M. le Pr Jean FEUILLARD
1^{er} assesseur : M. le Pr Vincent GUIGONIS
2^{ème} assesseur : Mme le Dr Estelle GUERIN
3^{ème} assesseur : Mme le Pr Peggy GANDIA

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018

Professeurs Emérites

| | |
|------------------|----------------------|
| M. BENOIST H. | Immunologie |
| M. BERNADOU J. | Chimie Thérapeutique |
| M. CAMPISTRON G. | Physiologie |
| M. CHAVANT L. | Mycologie |
| M. MOULIS C. | Pharmacognosie |
| M. ROUGE P. | Biologie Cellulaire |
| M. SIE P. | Hématologie |

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

| | |
|------------------------|---------------------------|
| Mme AYYOUB M. | Immunologie |
| M. CHATELUT E. | Pharmacologie |
| M. FAVRE G. | Biochimie |
| Mme GANDIA P. | Pharmacologie |
| M. PARINI A. | Physiologie |
| M. PASQUIER C. (Doyen) | Bactériologie - Virologie |
| Mme ROQUES C. | Bactériologie - Virologie |
| Mme ROUSSIN A. | Pharmacologie |
| Mme SALLERIN B. | Pharmacie Clinique |
| M. VALENTIN A. | Parasitologie |

Universitaires

| | |
|---------------------------|--------------------------|
| Mme BARRE A. | Biologie |
| Mme BAZIARD G. | Chimie pharmaceutique |
| Mme BENDERBOUS S. | Mathématiques – Biostat. |
| Mme BERNARDES-GÉNISSON V. | Chimie thérapeutique |
| Mme COUDERC B. | Biochimie |
| M. CUSSAC D. (Vice-Doyen) | Physiologie |
| Mme SIXOU S. | Biochimie |
| M. FABRE N. | Pharmacognosie |
| M. GAIRIN J-E. | Pharmacologie |
| Mme GIROD-FULLANA S. | Pharmacie Galénique |
| Mme MULLER-STAU MONT C. | Toxicologie - Sémiologie |
| Mme NEPVEU F. | Chimie analytique |
| M. SALLES B. | Toxicologie |
| M. SEGUI B. | Biologie Cellulaire |
| M. SOUCHARD J-P. | Chimie analytique |
| Mme TABOULET F. | Droit Pharmaceutique |
| M. VERHAEGHE P. | Chimie Thérapeutique |

Maîtres de Conférences des Universités

| Hospitalo-Universitaires | | Universitaires | |
|--------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| M. CESTAC P. | Pharmacie Clinique | Mme ARELLANO C. (*) | Chimie Thérapeutique |
| Mme DE MAS MANSAT V. (*) | Hématologie | Mme AUTHIER H. | Parasitologie |
| Mme JULLIARD-CONDAT B. | Droit Pharmaceutique | M. BERGE M. (*) | Bactériologie - Virologie |
| M. PUISSET F. | Pharmacie Clinique | Mme BON C. | Biophysique |
| Mme ROUZAUD-LABORDE C. | Pharmacie Clinique | M. BOUJILA J. (*) | Chimie analytique |
| Mme SERONIE-VIVIEN S. | Biochimie | Mme BOUTET E. (*) | Toxicologie - Sémiologie |
| Mme THOMAS F. (*) | Pharmacologie | M. BROUILLET F. | Pharmacie Galénique |
| | | Mme CABOU C. | Physiologie |
| | | Mme CAZALBOU S. (*) | Pharmacie Galénique |
| | | Mme CHAPUY-REGAUD S. | Bactériologie - Virologie |
| | | Mme COLACIOS-VIATGE C. | Immunologie |
| | | Mme COSTE A. (*) | Parasitologie |
| | | M. DELCOURT N. | Biochimie |
| | | Mme DERAËVE C. | Chimie Thérapeutique |
| | | Mme ECHINARD-DOUIN V. | Physiologie |
| | | Mme EL GARAH F. | Chimie Pharmaceutique |
| | | Mme EL HAGE S. | Chimie Pharmaceutique |
| | | Mme FALLONE F. | Toxicologie |
| | | Mme FERNANDEZ-VIDAL A. | Toxicologie |
| | | Mme HALOVA-LAJOIE B. | Chimie Pharmaceutique |
| | | Mme JOUANJUS E. | Pharmacologie |
| | | Mme LAJOIE-MAZENC I. | Biochimie |
| | | Mme LEFEVRE L. | Physiologie |
| | | Mme LE LAMER A-C. | Pharmacognosie |
| | | M. LEMARIE A. | Biochimie |
| | | M. MARTI G. | Pharmacognosie |
| | | Mme MIREY G. (*) | Toxicologie |
| | | Mme MONFERRAN S. | Biochimie |
| | | M. Olichon A. | Biochimie |
| | | Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*) | Chimie Analytique |
| | | M. SAINTE-MARIE Y. | Physiologie |
| | | M. STIGLIANI J-L. | Chimie Pharmaceutique |
| | | M. SUDOR J. (*) | Chimie Analytique |
| | | Mme TERRISSE A-D. | Hématologie |
| | | Mme TOURRETTE-DIALO A. | Pharmacie Galénique |
| | | Mme VANSTEELANDT M. | Pharmacognosie |
| | | Mme WHITE-KONING M. (*) | Mathématiques |

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

| Assistants Hospitalo-Universitaires | |
|-------------------------------------|----------------------|
| Mme COOL C. | Physiologie |
| M. MOUMENI A. | Biochimie |
| M. METSU D. | Pharmacologie |
| Mme PALUDETTO M.N. | Chimie thérapeutique |
| M. PAGES A. | Pharmacie Clinique |
| M. PERES M. | Immunologie |
| Mme SALABERT A.S | Biophysique |

Remerciements

Aux membres du jury :

à M. le Pr Jean Feuillard, qui me faites l'honneur d'accepter d'être le président de ce jury. Pour votre accueil au sein du service et vos conseils avisés, veuillez trouver dans ce modeste travail le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect ;

à M. le Pr Vincent Guignonis, vous m'avez fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Recevez-en ici l'expression de ma reconnaissance ;

à Mme le Pr Peggy Gandia, représentante toulousaine de ce jury, que je remercie chaleureusement d'avoir accepté de juger ce travail ;

et enfin, le dernier mais non le moindre, je tiens à remercier le Dr Estelle Guérin : ce travail n'aurait pas vu le jour sans ton énergie proverbiale, ta patience, tes encouragements ainsi que ta grande disponibilité. Sache que tu m'auras beaucoup appris.

*

Je remercie la CB-HME (Collection Biologique de l'Hôpital de la Mère et de l'Enfant) du CRBioLim pour la collection des ressources biologiques et la coordination de ce travail, notamment Chahrazed El Hamel pour son grand sens de l'organisation, ainsi que les infirmières, les aides-soignantes et les sages-femmes des services de pédiatrie (urgences pédiatriques, néonatalogie, réanimation néonatale et gynécologie-obstétrique) de l'Hôpital de la Mère et de l'Enfant du CHU de Limoges. Merci aussi aux internes de pédiatrie Thomas et Philippe, ce dernier m'ayant été d'une aide précieuse dans la collecte des données cliniques.

*

Merci à tous les biologistes – qui ont contribué à leur façon à m'avoir fait aimer un peu plus cette stimulante et belle discipline qu'est la biologie médicale – et techniciens du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges, notamment Anne, Patricia et Stéphane du secteur de cytométrie en flux.

*

Enfin, une petite pensée pour tous mes co-internes d'hémato de Limoges, Virginie, Mylène, Guillaume, Rémy, Maxime, Théo, Julie, Cassandra, Camille, David, Etienne, Martial et tous les autres pour m'avoir supporté (!) durant cette année, pour leur soutien, leur bonne humeur et les moments plaisants que nous avons passés ensemble.

Je n'en oublie pas pour autant mes co-internes toulousains préférés : Noémie, Mehdi, Nicolas, Céline, Julian... vous garderez toujours une place dans mon cœur.

*à ma famille,
Maman, Papa,
Nicolas, Geoffrey, Amaury*

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES TABLEAUX | 10 |
| TABLE DES FIGURES | 11 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 12 |
| INTRODUCTION | 13 |
| 1. GENERALITES SUR LA CYTOMETRIE EN FLUX..... | 14 |
| 1.1. Définition et principe de la CMF..... | 14 |
| 1.1.1. Système fluidique : focalisation hydrodynamique..... | 15 |
| 1.1.2. Système optique | 15 |
| 1.1.3. Système électronique et informatique | 17 |
| 1.2. Définition des CDs | 19 |
| 1.3. Applications de la CMF | 20 |
| 1.4. Place au laboratoire d'hématologie | 20 |
| 2. SEPSIS..... | 21 |
| 2.1. Chez l'adulte – état des lieux..... | 21 |
| 2.2. Chez le nouveau-né | 22 |
| 2.2.1. Définitions – EOS – LOS..... | 22 |
| 2.2.2. Prématurité..... | 23 |
| 2.2.2.1. Définitions | 23 |
| 2.2.2.2. Epidémiologie..... | 23 |
| 2.2.2.3. Causes..... | 24 |
| 2.2.3. Mode de contamination et germes incriminés..... | 25 |
| 2.2.4. Prise en charge..... | 25 |
| 2.2.5. Diagnostics différentiels..... | 28 |
| 2.2.6. Rôle de la biologie..... | 28 |
| 2.2.7. Perspectives | 28 |
| 2.2.7.1. EOS | 28 |
| 2.2.7.2. LOS..... | 29 |
| 3. MARQUEURS DU SEPSIS EN HEMATOLOGIE | 30 |
| 3.1. La myélémie – définitions – mécanisme | 30 |
| 3.2. Intérêt potentiel de la CMF dans le sepsis | 31 |
| 3.3. Place de la CMF dans le sepsis – revue de la bibliographie..... | 33 |
| 3.3.1. Etudes chez l'adulte | 33 |
| 3.3.1.1. Dysfonctionnements immunitaires dans le sepsis | 33 |
| 3.3.1.2. Intérêt de la CMF dans le sepsis | 33 |
| 3.3.1.3. Approche théorique : exemple du CD10 | 34 |
| 3.3.1.4. Exemple de deux études menées chez l'adulte | 35 |
| 3.3.2. Etudes chez le nouveau-né | 38 |
| 3.3.2.1. Introduction..... | 38 |
| 3.3.2.2. Marqueurs potentiellement utiles | 38 |
| 3.3.2.3. Variations liées à l'âge | 39 |
| 4. MATERIEL ET METHODES..... | 40 |
| 4.1. Sepsinat | 40 |
| 4.2. Protocole détaillé | 40 |
| 4.3. Stratégie de fenêtrage..... | 42 |
| 4.3.1. Fenêtrage des monocytes..... | 42 |
| 4.3.2. Fenêtrage des lymphocytes | 43 |
| 4.3.3. Fenêtrage des granuleux..... | 44 |
| 5. RESULTATS | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1. Caractérisation des nouveau-nés sains | 46 |
| 5.1.1. Méthodologie | 46 |
| 5.1.2. Résultats obtenus | 46 |
| 5.1.2.1. Etude des granuleux | 46 |
| 5.1.2.2. Etude des lymphocytes | 50 |
| 5.1.2.3. Etude des monocytes | 50 |
| 5.2. Présentation des résultats préliminaires à l'étude Sepsinat | 51 |
| 5.2.1. Méthodologie | 51 |
| 5.2.2. Résultats de l'immunophénotypage des différentes lignées | 53 |
| 5.2.2.1. Etude des granuleux | 53 |
| 5.2.2.2. Etude des lymphocytes | 58 |
| 5.2.2.3. Etude des monocytes | 59 |
| 6. DISCUSSION | 62 |
| CONCLUSION | 65 |
| ANNEXES | 69 |

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Score SOFA d'après la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF)

Tableau 2 : pathogènes habituels de l'enfant

Tableau 3 : principaux CD présents sur les granuleux potentiellement utiles dans le cadre du sepsis

Tableaux 4 à 11 : exposé des résultats

TABLE DES FIGURES

- Figure 1 : principe général de la CMF
- Figure 2 : système d'hydrofocalisation
- Figure 3 : principe des FS et SS
- Figure 4 : séparation conventionnelle des cellules circulantes en FS/SS
- Figure 5 : banc optique d'un cytomètre de flux
- Figure 6 : exemple d'un histogramme monoparamétrique
- Figure 7 : exemple d'un dot-plot en deux dimensions
- Figure 8 : exemple d'un dot plot en 3 dimensions
- Figure 9 : exemple de dot plot en 2 dimensions ayant pour but d'identifier 4 types de populations
- Figure 10 : CDs les plus couramment utilisés en hématologie : principaux marqueurs des lignées cellulaires
- Figure 11 : ancienne définition du sepsis
- Figure 12 : approche pratique pour un nouveau-né à terme, sans signes cliniques mais contexte infectieux
- Figure 13 : indication d'un traitement antibiotique chez un nouveau-né symptomatique
- Figure 14 : approche pratique pour un nouveau-né prématuré sans signes cliniques
- Figure 15 : PNN normaux comparés à des PNN de patients septiques
- Figure 16 : maturation granuleuse
- Figure 17 : Septiflux 1 : courbes de survie de Kaplan-Meier
- Figure 18 : expression du CD10 et du CD16 par groupe de patients
- Figure 19 : Septiflux 2 : courbes de survie de Kaplan-Meier
- Figure 20 : cytomètre Navios®
- Figures 21 à 31 : stratégie de fenêtrage
- Figures 32 à 50 : résultats

LISTE DES ABREVIATIONS

ATB : antibiothérapie
BGN : bacille Gram négatif
DM : digital microscope
CD : cluster de différenciation
C3G : céphalosporine de troisième génération
CMF : cytométrie en flux
CRP : protéine C-réactive
EEQ : évaluation externe de la qualité
EOS : early onset sepsis
FS : forward scatter
G/L : giga (10^9) par litre
HPN : hémoglobinurie paroxystique nocturne
IL-6 : interleukine 6
LOS : late onset sepsis
LPS : lipopolysaccharide
MGG : May-Grünwald-Giemsa
MO : moelle osseuse
NFS : numération formule sanguine
PCR : polymerase chain reaction
PCT : procalcitonine
PNB/E/N : polynucléaire basophile/éosinophile/neutrophile
PV : prélèvement vaginal
SA : semaines d'aménorrhée
SGB : streptocoque du groupe B
SN : sepsis néonatal
SOFA (score) : sequential organe failure assessment
SS : side scatter
VRS : virus respiratoire syncytial

INTRODUCTION

Le sepsis est une cause majeure de morbidité et mortalité, tant chez l'adulte que chez le nouveau-né. De diagnostic difficile, de pronostic incertain, c'est une éventualité clinique à évoquer systématiquement devant toute situation de fièvre.

Pourtant, le clinicien se retrouve souvent démuné devant le peu d'examen biologiques permettant d'affirmer ou d'infirmer la présence de cette situation clinique et d'évaluer sa gravité. Le prélèvement de séries d'hémocultures reste l'examen diagnostique de référence, cependant le délai de pousse étant particulièrement long, l'affirmation rapide du diagnostic de sepsis ne peut être déterminée par cet unique moyen. Restent la numération formule sanguine (NFS), contributive mais aspécifique, ou encore de nombreux dosages biochimiques utilisés en pratique courante comme la protéine C-réactive (CRP) ou encore la procalcitonine (PCT). L'idéal serait l'existence d'un marqueur de rendu de résultat raisonnablement rapide, suffisamment sensible et spécifique, dans l'optique de confirmer ou infirmer d'emblée l'éventualité d'un sepsis ; cela aurait notamment l'avantage d'orienter précocement le clinicien vers la prescription ou non d'une antibiothérapie, ou permettrait de raccourcir la durée de celle-ci.

En particulier, le diagnostic du sepsis néonatal demeure un défi avec peu d'outils tant sensibles que spécifiques en vue d'un diagnostic précoce. De plus en plus d'études mettent en lumière l'intérêt potentiel de la cytométrie en flux (CMF) dans ce but ; tel est le sujet de cette thèse, qui se concentrera sur le cas particulier des situations de sepsis chez les nouveau-nés et plus particulièrement les nouveau-nés prématurés.

1. GENERALITES SUR LA CYTOMETRIE EN FLUX

1.1. Définition et principe de la CMF

La CMF est une technique permettant d'étudier les paramètres physiques et biologiques des cellules individuellement présentes dans un prélèvement (sang, moelle ou autres) ; puis, en regroupant les informations issues d'un très grand nombre de cellules, d'en déduire les caractéristiques de la population étudiée (on parle d'immunophénotypage cellulaire).

Les phénomènes optiques engendrés permettent une analyse des caractéristiques physiques (taille, structure).

Pour cela, des anticorps monoclonaux, couplés à des fluorochromes ou molécules fluorescentes, sont utilisés. Ceux-ci rendent possible la détection très précise des antigènes de différenciation à la surface cellulaire : on parle de « cluster de différenciation » (abrégié en CD, voir en 1.2.).

Schématiquement, le système, particulièrement sophistiqué, se compose en trois parties (figure 1) :

- un système fluide, qui a pour objectif d'une part d'aligner les cellules les unes derrière les autres dans une veine liquide et, d'autre part, de permettre le passage d'un maximum de cellules en un minimum de temps. A la base de la CMF, ce phénomène est appelé focalisation hydrodynamique,
- un système optique (constitué de lasers comme source de lumière ainsi que de filtres optiques qui séparent la lumière émise et la dirigent vers les détecteurs) qui a pour but de transformer les caractéristiques physiques et biologiques des cellules en signaux lumineux mesurables,
- un système électronique qui convertit les différents signaux lumineux en données informatiques exploitables (1,2).

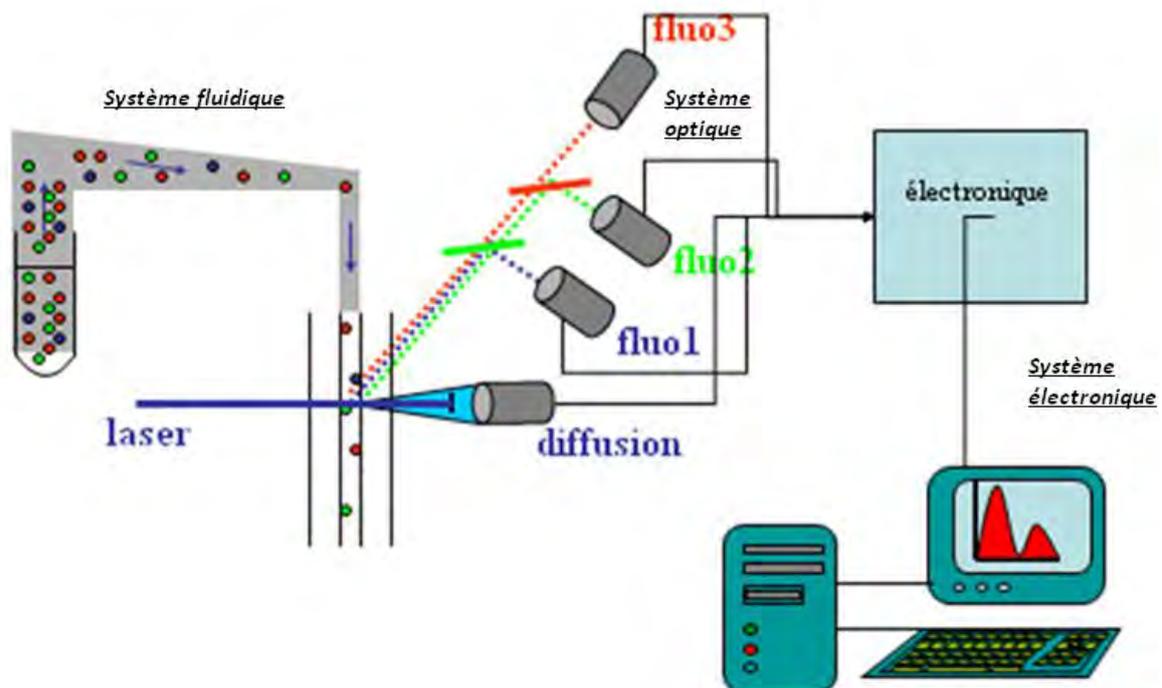


Figure 1 : principe général de la CMF

1.1.1. Système fluide : focalisation hydrodynamique

La suspension cellulaire est injectée à l'intérieur du flux du liquide de gaine dont la vitesse est constante. Il s'écoule ensuite par une buse de plus faible diamètre qui permet à débit constant une accélération de la vitesse d'écoulement. Cela entraîne un étirement de la suspension cellulaire. Ainsi, les cellules se retrouvent alignées au centre du jet et peuvent être analysées une par une à grande vitesse (figure 2).

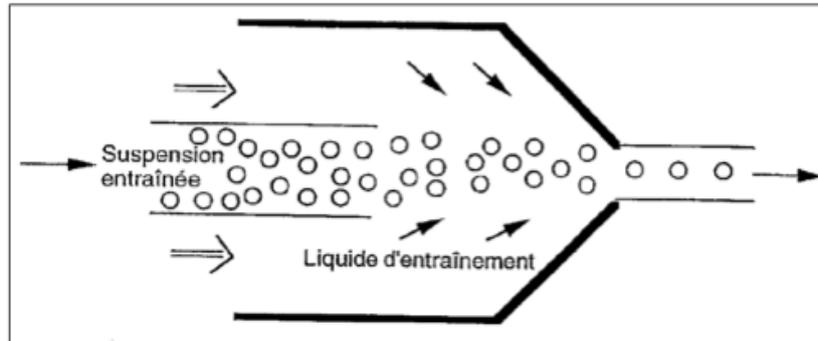


Figure 2 : système d'hydrofocalisation (1)

1.1.2. Système optique

Le passage des cellules devant le faisceau laser permet de générer trois grands types d'informations lumineuses :

- La diffusion aux petits angles (forward scatter ou FS). Elle est collectée dans l'axe du faisceau laser et correspond à la diffraction de la lumière lors du passage des cellules devant le faisceau. Elle est donc liée à la taille des cellules (figure 3).
- La diffusion aux grands angles (side scatter ou SS). Elle est collectée perpendiculairement au faisceau laser et correspond à la lumière diffusée par les éléments intracellulaires. Elle est donc liée à la granulosité du contenu cellulaire (figure 3).

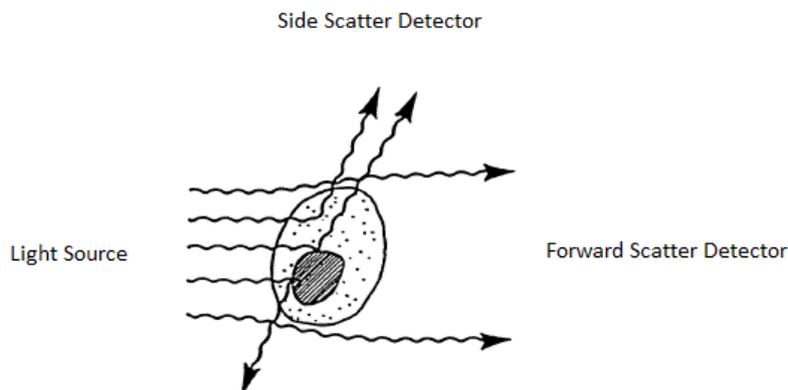


Figure 3 : principe des FS et SS (5)

Le graphique suivant (figure 4) illustre la séparation en FS/SS des cellules circulantes.

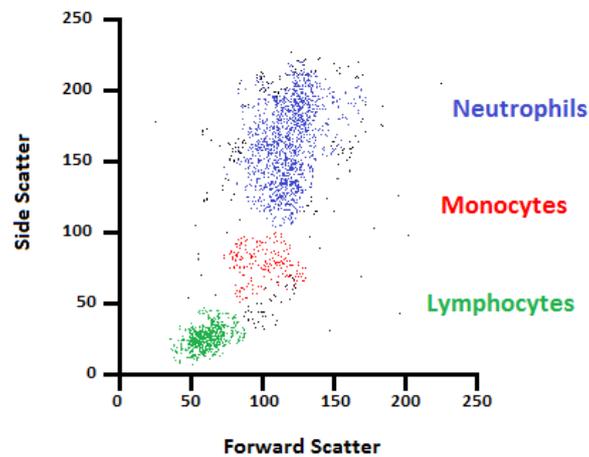


Figure 4 : séparation conventionnelle des cellules circulantes en FS/SS (5)

- L'intensité de fluorescence. Les molécules fluorescentes excitées par une source de lumière à une longueur d'onde donnée émettent un signal lumineux d'une longueur d'onde supérieure à celle absorbée. La fluorescence est émise dans toutes les directions de l'espace et est mesurée à 90° de l'axe du faisceau excitateur.

Le banc optique (figure 5) a pour objectif de séparer les différentes longueurs d'onde de fluorescence et d'acheminer chacune d'entre elles vers un détecteur dédié. Pour cela, des jeux de miroirs sélectifs (dichroïques) et des filtres interférentiels sont répartis au niveau du banc optique (6,7).

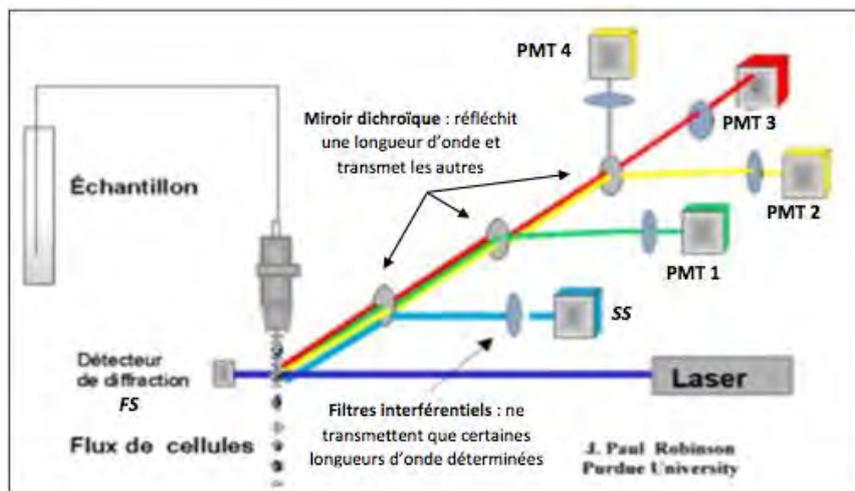


Figure 5 : banc optique d'un cytomètre de flux (4)

1.1.3. Système électronique et informatique

Les différents types de signaux lumineux sont séparés par des filtres optiques, collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. La conversion du signal lumineux en courant électrique est assurée par les PMT. Les signaux électriques vont être analysés par un convertisseur analogique-digital. Ces fichiers peuvent par la suite être modifiés et retraités grâce à des logiciels informatiques spécifiques.

L'ordinateur calcule les données statistiques associées à la distribution des paramètres mesurés et les représente sous deux formes classiques :

- les nuages de points (ou dot-plots) qui montrent l'expression de deux paramètres l'un par rapport à l'autre (les axes représentant alors les intensités de fluorescence),
- les histogrammes mono-paramétriques qui exposent le nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence

Les figures 6 à 9 illustrent les divers types de graphiques exploitables qu'il est possible d'obtenir en CMF.

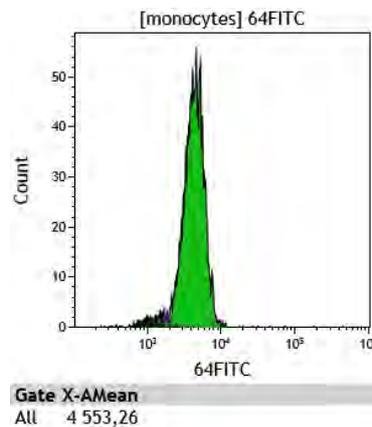


Figure 6 : exemple d'un histogramme monoparamétrique

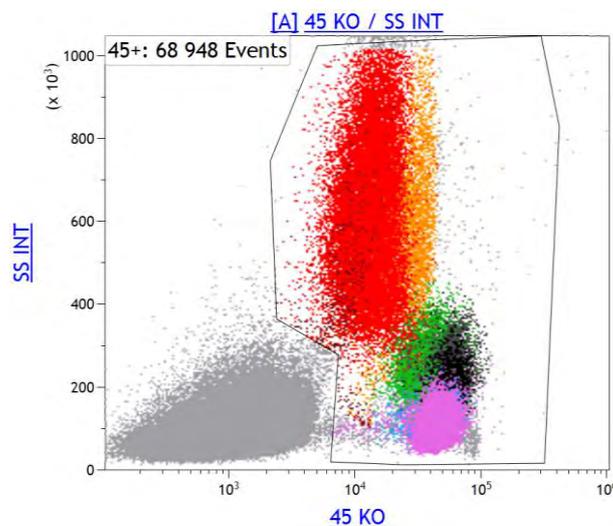


Figure 7 : exemple d'un dot-plot en deux dimensions : en ordonnée l'intensité de fluorescence SS en fonction de l'intensité de fluorescence en CD45 (marqueur pan-hématopoïétique)

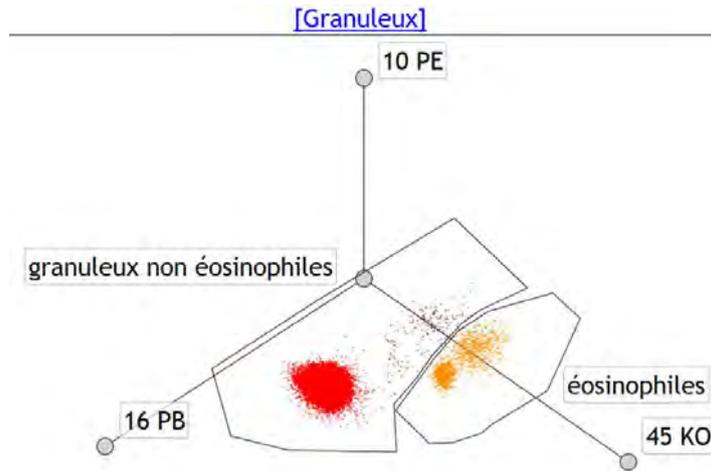


Figure 8 : exemple d'un dot plot en 3 dimensions (ici permettant de les séparer plus précisément les granuleux en prenant en compte 3 intensités de fluorescence : CD45, CD10 et CD16)

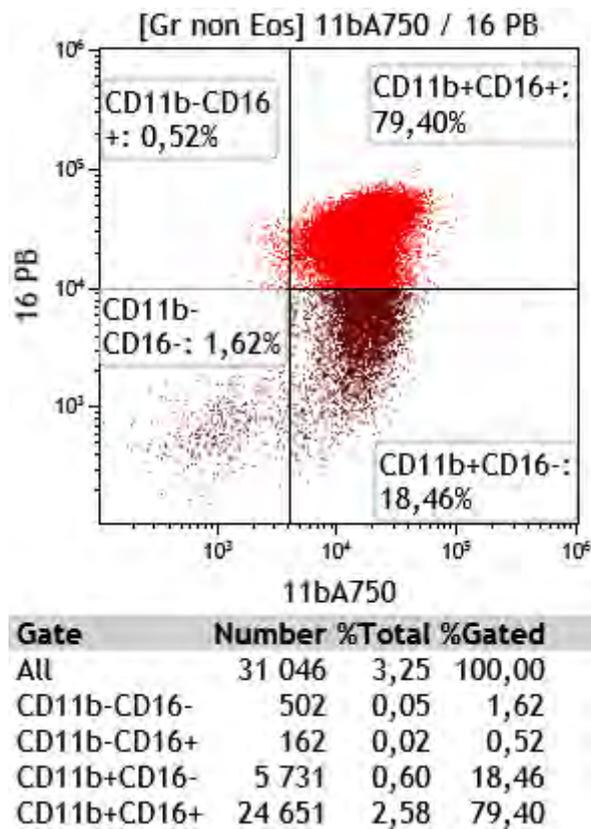


Figure 9 : exemple de dot plot en 2 dimensions ayant pour but d'identifier 4 types de populations ; ici CD11b+CD16+, CD11b+CD16-, CD11b-CD16+ et CD11b-CD16-

1.2. Définition des CD

Le développement de la CMF a abouti à l'utilisation en pratique courante d'une vaste nomenclature s'efforçant de classer les marqueurs cellulaires utilisés en les désignant par le vocable de clusters de différenciation (CD) suivi par nombre attribué pour des raisons le plus souvent historiques. La nomenclature de ces CD, glycoprotéines membranaires exprimées ou non en fonction de la cellule, de la pathologie, etc., a pour but de faciliter leur utilisation pour l'identification et l'immunophénotypage de cellules. Plus de 360 CD différents ont été identifiés chez l'être humain (11).

| | |
|---|--|
| <p>Marqueur panleucocytaire CD45 (toutes les cellules hématopoïétiques)</p> <p>Cellules immatures CD34 (précurseurs hématopoïétiques) CD117 (c-kit) (cellules leucémiques myéloïdes) HLA-DR (précurseurs myéloïdes, monocytes, cellules B, cellules T activées) TdT (thymocytes, lymphoblastes, certains myéloblastes)</p> <p>Cellules myélo/monocytaires CD4 (monocytes) CD11b (lignée granulocytaire et monocytaire, lymphocytes B,T, et NK) CD13 (lignée granulocytaire et monocytaire) CD14 (lignée monocytaire) CD15 (lignée granulocytaire et monocytaire) CD33 (lignée granulocytaire et monocytaire) CD65 (lignée granulocytaire et monocytaire)</p> <p>Lignée plaquettaire CD41 (gp IIb/IIIa) (mégacaryocytes, plaquettes) CD42b (gp Iba) (mégacaryocytes, plaquettes) CD61 (gp IIIa) (mégacaryocytes, plaquettes)</p> <p>Lignée érythrocytaire Glycophorine A (précurseurs érythroïdes, globules rouges)</p> | <p>Lymphocytes B CD10 (lymphocytes pré-B, précurseurs B) CD19 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD20 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD22 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs) CD23 (lymphocytes B, monocytes) CD24 (tous les précurseurs B et lymphocytes B mûrs)</p> <p>Plasmocytes CD138 (plasmocytes) CD38 (plasmocytes, lymphocytes T activés)</p> <p>Lymphocytes T CD1a (thymocytes corticaux) CD2 (thymocytes, lymphocytes T mûrs et NK) CD3 (thymocytes, lymphocytes T mûrs) CD4 (thymocytes, lymphocytes T-helper mûrs) CD5 (thymocytes, lymphocytes T mûrs) CD7 (tous les précurseurs et lymphocytes T mûrs, NK) CD8 (thymocytes, lymphocytes T-cytotoxiques)</p> <p>Lymphocytes NK CD11b (lymphocytes B,T, et NK, lignée granulocytaire et monocytaire) CD16 (lymphocytes NK, granulocytes) CD57 (lymphocytes T-LGL, certains lymphocytes NK, monocytes) CD56 (lymphocytes T et NK)</p> |
|---|--|

Tableau 2. Principaux antigènes utilisés dans le diagnostic hématologique.
CD: cluster de différenciation; TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase; NK: natural killer; T-LGL: T-large granular lymphocytes; gp: glycoprotéine.

Figure 10 : CD les plus couramment utilisés en hématologie : principaux marqueurs des lignées cellulaires (8)

On parle alors des molécules CD quand il s'agit de trier des cellules par CMF. On symbolise alors par un « + » ou un « - » la présence ou l'absence d'un marqueur sur une population, par exemple « CD3+CD4- » signifiera que celle-ci exprime le CD3, CD commun à tous les lymphocytes T mais pas le CD4. On parle de même de cellules présentant une expression augmentée (forte) ou diminuée (faible) du marqueur étudié.

1.3. Applications de la CMF

La CMF est le complément indispensable de la morphologie pour le diagnostic et le suivi d'un certain nombre d'hémopathies. On la considère ainsi comme la méthode de référence pour compter les éléments cellulaires circulants ainsi que pour caractériser l'immunophénotypage d'un leucocyte. Celui-ci est un élément clé du diagnostic de la plupart des hémopathies malignes, en particulier pour les syndromes lymphoprolifératifs et les leucémies aiguës. Il s'articule dans une démarche pluridisciplinaire avec la cytologie, la cytogénétique, la biologie moléculaire et l'anatomo-pathologie.

En hématologie, la CMF est aussi utilisée dans l'évaluation de la MRD (maladie résiduelle) en réponse au traitement dans certaines hémopathies, la numération des cellules souches hématopoïétiques (CSH), le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), de certaines thrombopathies (1)...

De plus, les possibilités de tri cellulaire offertes par cette technique débouchent sur des applications de recherche fondamentale et ce même bien au-delà du champ médical.

1.4. Place au laboratoire d'hématologie

Des progrès considérables ont été réalisés dans l'harmonisation de la CMF (9,10). En journée, cette méthode peut rendre des résultats fiables rapidement, la CMF en routine étant utilisée pour identifier et quantifier des cellules hématopoïétiques, car plus précise, plus rapide et plus reproductible que la cytologie classique. Toutefois la technique nécessite le plus souvent la présence sur place d'un technicien et d'un biologiste spécialisés ou tout au moins qualifiés pour traiter les échantillons et en interpréter les résultats.

La CMF ne peut ainsi que difficilement être mise en œuvre en routine d'urgence H24, ou alors de façon exceptionnelle.

*

On vient de voir les applications de la CMF en pratique courante, devenue maintenant incontournable dans le diagnostic et le suivi de très nombreuses hémopathies. Moins connue et encore peu développée, de nombreuses études ont montré le potentiel intéressant de la CMF face aux situations de sepsis, tant chez l'adulte que chez le nouveau-né, ce dernier cas de figure faisant l'objet du sujet de cette thèse.

2. SEPSIS

2.1. Chez l'adulte – état des lieux

Un sepsis (du grec ancien σηψις « putréfaction »), anciennement désigné par le terme « septicémie » est un syndrome d'infection générale et grave de l'organisme par des agents pathogènes, le plus souvent bactériens.

Historiquement, depuis sa première définition par Bone et al. en 1991 (12), le sepsis est divisé en stades : SIRS (syndrome de réponse inflammatoire systémique) – ce dernier ne sous-entendant pas nécessairement à la base une étiologie infectieuse, sepsis simple, sepsis sévère lorsqu'une dysfonction organique est présente, choc septique lorsque celui-ci est réfractaire au remplissage vasculaire ; cette classification, en pratique pas utilisée en néonatalogie, est par ailleurs aujourd'hui obsolète.

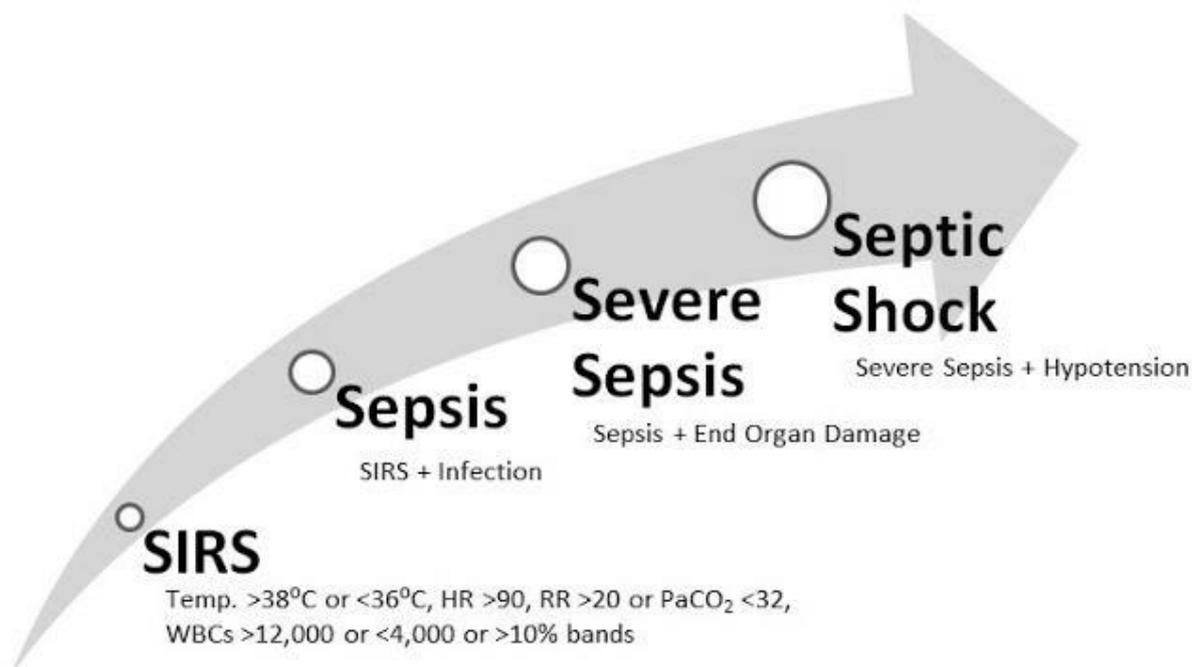


Figure 11 : ancienne définition du sepsis (12)

En effet, depuis 2016, le sepsis a été largement redéfini (13), sa définition impliquant un dysfonctionnement d'organe secondaire à une réponse inappropriée de l'hôte envers l'infection. Le sepsis est maintenant défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse dérégulée inappropriée de l'hôte à une infection (14,15).

Il n'y a plus de notion de SIRS ou de distinction sepsis/sepsis grave. La présence de 2 points minimum ou une augmentation de 2 points si dysfonction présente avant infection dans le score SOFA pour Sequential Organ Failure Assessment (tableau 1) définit le sepsis chez un patient avec infection, ce

seuil étant associé à une mortalité à l'hôpital de 10% (13). C'est ce score, reflet des défaillances organiques, qui permet désormais en pratique l'opérationnalisation clinique.

| Calcul du score SOFA | 0 point | 1 point | 2 points | 3 points | 4 points |
|--|----------------|--------------------|--|--|--|
| PaO ₂ /FiO ₂ | >400 | 301-400 | 201-300 | 101-200 et VA | ≤ 100 et VA |
| Plaquettes x10 ³ /mm ³ | >150 | 101-150 | 51-100 | 21-50 | ≤20 |
| Bilirubine, mg/L (mmol/L) | <12 (<20) | 12-19 (20-32) | 20-59 (33-101) | 60-119 (102-204) | >120 (>204) |
| Hypotension | PAM ≥70mmHG | PAM < 70mmHG | Dopamine ≤ 5 ou dobutamine (toute dose) | Dopa > 5 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradré ≤ 0,1 | Dopamine > 15 ou adr > 0,1 ou noradré > 0,1 |
| Score de Glasgow | 15 | 13-14 | 10-12 | 6-9 | <6 |
| Créatinine, mg/L (μmol/L) ou diurèse | <12 (<110) | 12-19 (110-170) | 20-34 (171-299) | 35-49 (300-440) ou <500mL/j | >50 (>440) ou <200mL/j |

VA : ventilation assistée. PAM : pression artérielle moyenne [estimée par (PAS + 2 x PAD) / 3]. Amines : dose en γ/kg/mn

Tableau 1 : score SOFA d'après la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF)

La fréquence du choc septique, exprimée pour 100 admissions en réanimation, est en augmentation croissante au cours des 20 dernières années en France (8,2 en 1993 à 15,4 en 2010). Toutefois, une diminution significative de sa mortalité en réanimation (60,1 % en 1993 à 39,5 % en 2010) et, à un moindre degré, à l'hôpital (62 % en 1997 à 48,7 % en 2011) est à souligner (16).

Cette amélioration nette de la survie, liée sans doute à l'optimisation de la prise en charge des patients adultes, ne doit pas faire oublier le pronostic sombre du tableau clinique, les chiffres de mortalité restant très élevés. Malgré une détection précoce des cas de sepsis et des soins appropriés, un des principaux enjeux reste la détection rapide de l'aggravation clinique survenant chez certains patients et l'existence de marqueurs d'une potentielle gravité de la maladie.

2.2. Chez le nouveau-né

2.2.1. Définitions – EOS – LOS

On définit le sepsis néonatal (SN) comme une infection invasive, habituellement bactérienne, survenant au cours de la période néonatale. La survenue du SN peut être précoce (avant 72 heures de vie) ou tardive (après 3 jours) (17,18).

Le terme de « nouveau-né » est employé pour les bébés de moins de 28 jours ; au-delà, le terme de « nourrisson » est préféré.

Le SN est une cause d'admission fréquente aux soins intensifs pédiatriques. Malgré les importants progrès réalisés dans la compréhension de sa physiopathologie, la mortalité du choc septique demeure aux alentours de 20%, et ce dans les pays développés ayant de hauts standards médicaux. A l'échelle mondiale, ce serait la cause de la mort d'un million de nouveau-nés par an dans le monde (source OMS 2017).

La littérature à ce sujet envisage chez les nouveau-nés deux cas de figure : l'EOS (early onset sepsis, sepsis précoce) et le LOS (late onset sepsis, sepsis tardif) (18), ces deux présentations se divisant elles-mêmes en trois possibilités, selon si le sepsis est possible, probable ou certain.

On parle d'infection certaine lorsqu'un prélèvement central, hémoculture ou ponction lombaire, est positif. Les infections certaines concernent de 1‰ à 4‰ des naissances vivantes. L'infection est dite probable lorsqu'il existe un faisceau d'arguments clinico-biologiques en faveur de l'infection (par

exemple contexte infectieux à la naissance, mauvaise adaptation à la vie extra-utérine, élévation isolée de la CRP, signes cliniques chez l'enfant, prélèvements périphériques positifs) mais sans prélèvement central positif. Cette situation concerne 3 à 8 % des naissances vivantes. L'incidence est multipliée par 20 chez le prématuré (19).

Les facteurs de risque d'infection néo-natale bactérienne précoce (EOS) sont les suivants :

- colonisation maternelle à streptocoque du groupe B (SGB) durant la grossesse actuelle (prélèvement vaginal (PV) de dépistage de SGB positif soit par culture, soit par PCR rapide en per-partum, et/ou bactériurie à SGB),
- antécédent d'infection néonatale à SGB lors d'une précédente grossesse,
- durée de rupture des membranes supérieure à 12 heures,
- prématurité spontanée et inexpliquée < 37 SA,
- fièvre maternelle > 38,0° C en per-partum (ou dans les 2 heures qui suivent l'accouchement).

Le LOS rentre quant à lui dans le cadre des infections nosocomiales ; l'incidence des sepsis néonataux à apparition tardive est inversement proportionnelle au degré de maturité et varie géographiquement de 0,61% à 14,2% chez les nouveau-nés hospitalisés, survenant chez 15 à 25% des nouveau-nés de très faible poids de naissance et tout particulièrement les prématurés (20).

2.2.2. Prématurité

2.2.2.1. Définitions

On parle de naissance prématurée lorsque celle-ci intervient avant le terme de la grossesse qui correspond à 41 SA, soit 9 mois et demi à compter de la date des dernières menstruations. Un enfant est considéré comme prématuré s'il naît avant 37 SA, soit à 8 mois et demi de grossesse (23).

On distingue la prématurité induite, lorsque celle-ci a été provoquée médicalement en raison d'un risque pour l'enfant ou pour la mère et la prématurée dite spontanée, contexte à haute suspicion d'infection.

Trois niveaux de prématurité sont définis :

- la prématurité moyenne qui correspond à une naissance intervenant entre la 32^{ème} et la 36^{ème} SA révolue (7 mois à 8 mois de grossesse),
- la grande prématurité correspondant à une naissance intervenant entre la 28^{ème} et la 32^{ème} SA (6 mois à 7 mois de grossesse),
- et la très grande prématurité pour les naissances intervenant avant 28 SA, soit en-dessous de 6 mois de grossesse. L'extrême prématurité spontanée aurait presque toujours une origine infectieuse (24).

2.2.2.2. Epidémiologie

Aucune survie n'a été obtenue en-dessous de 23 semaines (23), soit en-dessous de cinq mois de grossesse. En France et dans de nombreux pays développés, le taux de naissances prématurées est

en hausse ces dernières années. La prématurité est passée de 5,9% des naissances en 1995 à 7,4% en 2010. Entre 50 000 et 60 000 enfants naissent prématurément chaque année. Parmi eux, 85% sont des prématurés moyens (32-37 SA), 10% sont des grands prématurés (28-32 SA) et 5% sont des très grands prématurés, nés à moins de 28 SA (chiffres INSERM).

La prématurité reste un problème de santé publique majeur. Les accouchements prématurés concernent 5 à 9% des grossesses, mais représentent 75% de la mortalité périnatale et au moins la moitié de la morbidité à long terme. De 50 à 70 % sont spontanés – dont 30% font suite à une rupture prématurée des membranes – et le mécanisme de ces accouchements reste mal élucidé.

Les études bactériologiques suggèrent que l'infection intra-utérine est responsable de 25 à 40% des accouchements prématurés, chiffre probablement sous-estimé en raison notamment des limites des techniques de culture conventionnelles. On estime que l'infection même peut être à l'origine d'une partie de la prématurité (24).

2.2.2.3. Causes

Environ 50% des naissances prématurées sont spontanées (23), dues à des contractions précoces dont la cause est rarement identifiée, ou à la rupture prématurée des membranes (ces ruptures étant parfois d'origine infectieuse).

L'autre moitié des naissances prématurées correspond à des naissances provoquées. Il s'agit alors d'une décision médicale et la naissance a le plus souvent lieu par césarienne. Une naissance prématurée peut être décidée en raison d'un risque de décès du fœtus ou de la mère en cours de la grossesse. Ce risque peut être lié à un retard de croissance grave du fœtus, une hypertension artérielle sévère chez la mère, ou une hémorragie maternelle dont l'origine n'est pas toujours expliquée.

L'hypertension maternelle sévère représente environ 20% des motifs d'accouchements avant 32 semaines de grossesse. Elle peut en effet entraîner des complications graves comme la pré-éclampsie, caractérisée par des anomalies rénales, ou l'éclampsie qui se manifeste par des convulsions chez la mère en raison d'une souffrance cérébrale. Elle peut aussi entraîner des troubles hépatiques, une destruction des globules rouges et des plaquettes.

Parmi les autres causes possibles d'accouchement prématuré, citons : les infections génito-urinaires ou généralisées, des anomalies de l'utérus et du placenta (comme le placenta prævia qui peut se compliquer d'une hémorragie), le diabète maternel ou encore l'hématome rétro-placentaire (décollement prématuré du placenta accompagné d'un hématome).

Un tiers des enfants prématurés sont issus de grossesses multiples (23).

2.2.3. Mode de contamination et germes incriminés

La contamination peut être prénatale, par voie hématogène (voie ombilicale lors d'une bactériémie maternelle, transitoire ou non) ou par voie ascendante (infection du liquide amniotique par des germes vaginaux). Elle peut être perinatale, lors du passage à travers la filière génitale. Enfin, elle peut survenir en post-natal par auto-infestation ou contamination par l'entourage ou le matériel, hospitalier ou familial.

Certains éléments en pré-partum doivent attirer l'attention quant au risque de survenue d'une infection materno-fœtale : l'absence d'une antibioprofylaxie bien menée en cas de portage du streptocoque B chez la mère, un antécédent d'infection materno-fœtale, la présence d'une chorioamniotite, une fièvre maternelle, une rupture de la poche des eaux prématurée, c'est-à-dire avant 37 semaines d'aménorrhées SA), ou prolongée, supérieure à 18 heures. Au moment de la naissance, des anomalies du rythme cardiaque fœtal, un liquide amniotique teinté ou méconial sans raison évidente doivent faire suspecter une infection.

Le streptocoque B représente à lui seul 40 à 50 % des infections materno-fœtales. *Escherichia coli* est quant à elle responsable de 20 à 30 % des infections mais serait la principale cause de mortalité (21), 7 à 8 % sont dues au streptocoque D, *Listeria* ayant quasiment disparu actuellement (22). Ces chiffres concernent uniquement le nouveau-né et ne sont pas ceux rencontrés chez les plus grands enfants (tableau 2).

| | Germes fréquents |
|--------------|--|
| Nouveau-né | Streptocoque groupe B E. coli |
| Petit enfant | Haemophilus influenzae Pneumocoque Staphylocoque doré Streptocoque groupe B |
| Enfant | Pneumocoque Méningocoque Haemophilus influenzae |

Tableau 2 : pathogènes habituels de l'enfant d'après (19)

2.2.4. Prise en charge

Les signes cliniques d'une infection chez le nouveau-né sont non spécifiques et souvent discrets, surtout chez le prématuré. Or, il existe un risque de décompensation rapide. On considère donc tout nouveau-né symptomatique comme suspect d'infection jusqu'à preuve du contraire. La pauvreté du tableau clinique au même titre que son caractère aspécifique doit, en raison de la gravité potentielle du sepsis chez le nouveau-né, faire systématiquement suspecter son éventualité, en particulier devant tout signe de décompensation principalement hémodynamique, pulmonaire ou digestive devant alerter et faire mettre en place une prise en charge adaptée (bi- voire triantibiothérapie) (19).

Les infections néonatales restent des pathologies fréquentes, difficiles à diagnostiquer avec certitude et potentiellement graves. En ce qui concerne le sepsis chez le nouveau-né, le problème est plus d'ordre diagnostique que pronostique ; en effet, la prise en charge maximale est toujours entreprise dès la moindre suspicion de sepsis (voir figures 12 à 14). Une bi-antibiothérapie voire tri-antibiothérapie (céphalosporine de troisième génération (C3G) + aminoside +/- amoxicilline) est débutée devant toute suspicion d'infection et arrêtée ou non après réévaluation clinique, biologique et bactériologique à 48 heures d'évolution (25).

Les symptômes sont multiples, non spécifiques et peuvent comprendre : diminution de l'activité spontanée, succion moins vigoureuse, apnée, bradycardie, instabilité thermique, détresse respiratoire, vomissements, diarrhée, distension abdominale, nervosité, convulsions, ictère... Le diagnostic est clinique et basé sur les résultats de la culture.

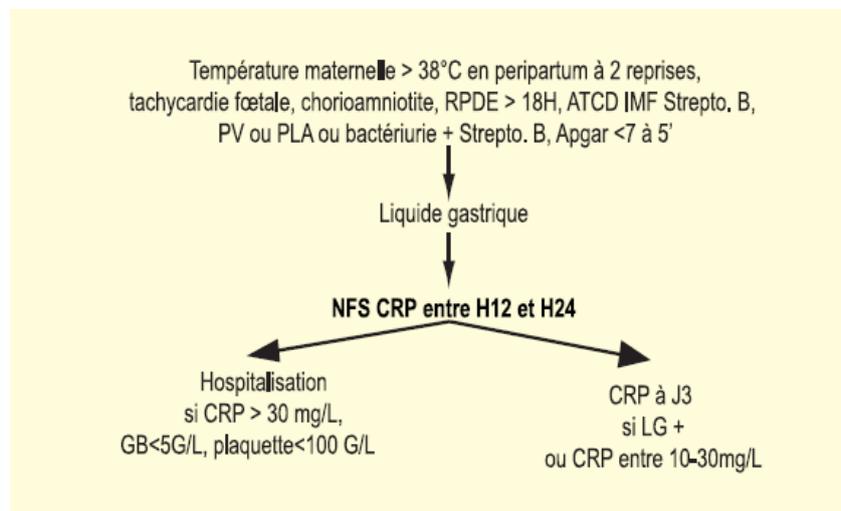


Figure 12 : approche pratique pour un nouveau-né à terme, sans signes cliniques mais contexte infectieux (19)

Indication d'un traitement antibiotique chez un nouveau-né symptomatique

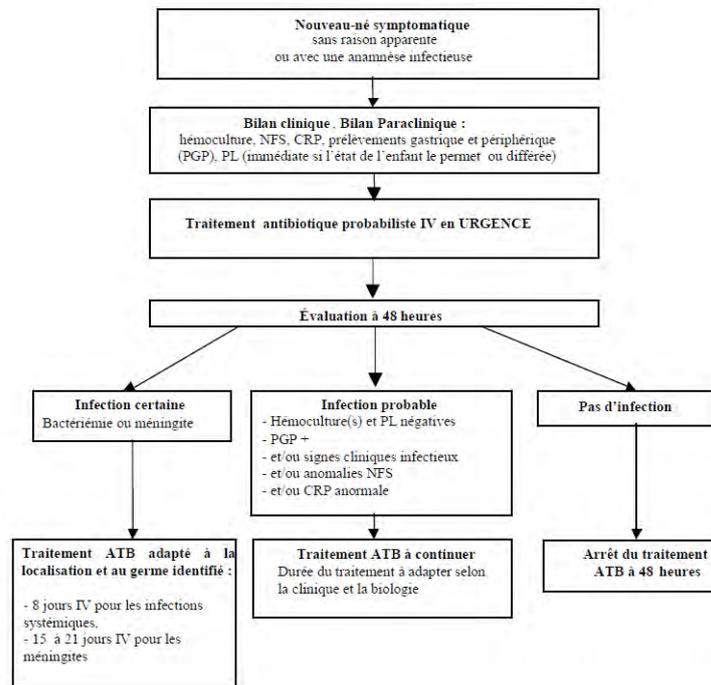


Figure 13 : indication d'un traitement antibiotique chez un nouveau-né symptomatique (25)

En ce qui concerne la prématurité, la prise en charge diffère selon si celle-ci est induite ou bien spontanée, la prématurité étant plus inquiétante si aucune explication évidente n'est retrouvée (figure 14).

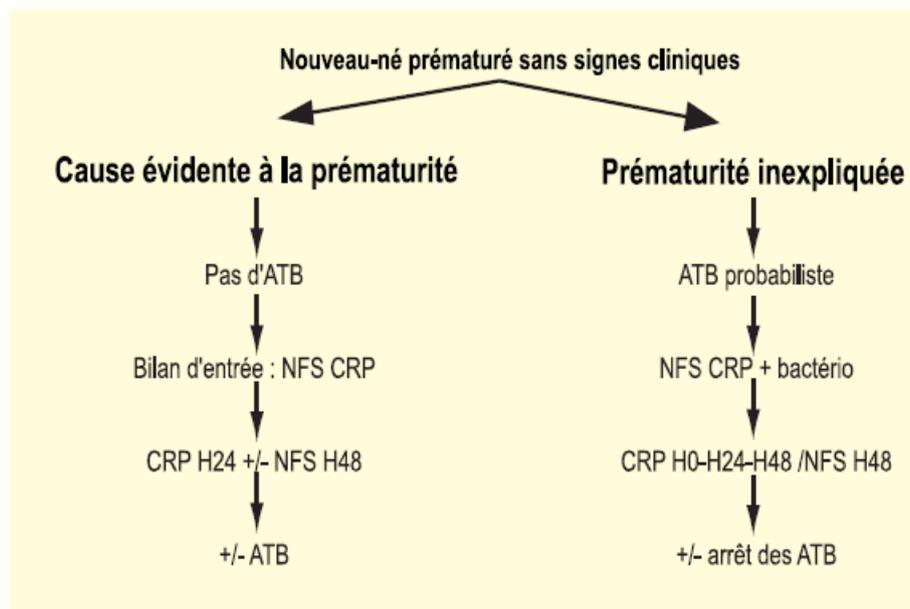


Figure 14 : approche pratique pour un nouveau-né prématuré sans signes cliniques (19)

2.2.5. Diagnostics différentiels

Certaines infections virales, notamment à herpès disséminé, entérovirus, adénovirus, paréchovirus (21) ou encore virus respiratoire syncytial (VRS), peuvent se traduire par un tableau de sepsis précoce ou tardif, bien qu'elles n'en aient dans la plupart des cas pas la potentielle gravité, d'où l'importance d'un marqueur spécifique de l'infection bactérienne.

2.2.6. Rôle de la biologie

Les délais imposés par la réalisation des analyses bactériologiques ne sont pas compatibles avec une utilisation véritablement avisée et efficace des traitements antibiotiques. Dans ce contexte, l'utilisation de marqueurs biologiques constitue un élément essentiel de la décision.

Dans le cadre de l'infection néonatale, la sensibilité est à privilégier aux dépens de la spécificité : en effet, les conséquences potentiellement dramatiques de l'abstention thérapeutique sont très largement supérieures à celles qu'impliquerait un traitement par excès d'un enfant non infecté (27). Un bilan bactériologique est réalisé, avec des prélèvements centraux (hémocultures ainsi que ponction lombaire en fonction de la clinique) et des prélèvements périphériques, ces derniers pouvant mettre en évidence une colonisation, mais ne justifiant pas à eux seuls un traitement antibiotique : liquide gastrique, oreille, pharynx, flore fécale. Un bilan biologique est systématiquement réalisé : NFS et dosage de la CRP.

Du fait de la démarginisation des leucocytes provoquée par le stress de l'accouchement, l'hyperleucocytose est physiologique à la naissance, elle est donc peu contributive au diagnostic d'infection néonatale (24).

La CRP, en raison de ses bonnes spécificité et sensibilité (24) demeure un outil indispensable, bien que d'élévation relativement tardive ; elle n'est ainsi contributive qu'à partir de 12 heures de vie (28). Elle reste cependant un bon marqueur de l'infection néo-natale.

La PCT reste d'une utilisation difficile au cours des premiers jours de vie et chez les prématurés (29). Son dosage n'est pas recommandé au cours des 48 premières heures de vie en raison de ses variations journalières (notamment pic de sécrétion à J1 chez tous les nouveau-nés sains comme infectés) et de son absence de spécificité (augmentation lors de détresse respiratoire et troubles hémodynamiques), contrairement à chez l'adulte.

D'autres marqueurs prometteurs sont encore à l'étude et non encore utilisés en pratique courante (l'IL-6 (26), dont l'élévation semble particulièrement précoce, le CD64 ou encore d'autres marqueurs analysables en CMF).

2.2.7. Perspectives

2.2.7.1. EOS (early onset sepsis)

Les efforts actuels en matière de prophylaxie antimicrobienne intrapartum par la mère ont réduit de manière significative les taux de maladie à SGB, mais ont été associés à des taux accrus d'infections à

Gram négatif, en particulier chez les nourrissons de très faible poids à la naissance. On l'a vu, certains virus doivent être pris en compte dans le diagnostic différentiel (21). Le traitement empirique doit être basé sur les profils locaux de résistance aux antimicrobiens, mais consiste généralement en l'utilisation de C3G + aminoside +/- amoxicilline, jusqu'à ce que l'agent étiologique ait été identifié. Les recherches actuelles portent principalement sur le développement de vaccins contre le SGB.

2.2.7.2. LOS (late onset sepsis)

La mortalité reste élevée, associée à une morbidité neurologique et pulmonaire significative (30). Les données épidémiologiques sur les nourrissons de très faible poids de naissance montrent que les pathogènes prédominants du LOS sont les staphylocoques à coagulase négative, suivis par les bacilles Gram négatif (BGN) et des champignons (31). En raison des difficultés liées au diagnostic rapide de la LOS et du risque élevé de mortalité associé à la LOS et aux séquelles potentielles à long terme, un traitement antibiotique empirique est initié en cas de suspicion de LOS. Cependant, le traitement empirique est souvent utilisé de manière inappropriée avec des antibiotiques à large spectre inutiles et une durée de traitement prolongée. Le nombre croissant de BGN multirésistants dans les unités néonatales de soins intensifs dans le monde est un problème grave, qui nécessite des stratégies de surveillance rigoureuses et efficaces et des schémas thérapeutiques appropriés.

3. MARQUEURS DU SEPSIS EN HEMATOLOGIE

3.1. La myélémie – définitions – mécanisme

Les situations septiques, et ce d'autant plus qu'elles sont marquées, sont liées à une augmentation du taux de polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le sang ; en effet, le sepsis a pour conséquence l'activation de la moelle osseuse (MO) par la sécrétion de G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), permettant une production en moins de 2 heures contre en moyenne 12 jours en temps normal (32), ce qui peut conduire à la libération prématurée de cellules médullaires immatures dans le sang (myélémie). Ceci a lieu sous l'influence de la stimulation de la MO par des catécholamines et des cytokines pro-inflammatoires. Les PNN peuvent aussi être recrutés à partir du pool extramédullaire marginal (PNN accolés aux parois des vaisseaux sanguins).

Aussi la myélémie, c'est-à-dire la présence dans le sang de granuleux immatures (métamyélocytes, myélocytes et promyélocytes) – du moins à l'exclusion de certaines hémopathies type syndromes myéloprolifératifs – est étroitement liée à l'incidence d'une situation réactionnelle, notamment de type infectieux. Le sepsis est un tableau où l'on rencontre fréquemment ce genre de situation, avec ses spécificités cytologiques et ses enjeux pronostiques. Dans le cadre de sepsis, les PNN peuvent aussi présenter des anomalies cytologiques à type de corps de Döhle (inclusions bleutées dans le cytoplasme) ou de vacuoles cytoplasmiques, bien que ces derniers ne soient pas absolument spécifiques d'infections systémiques.

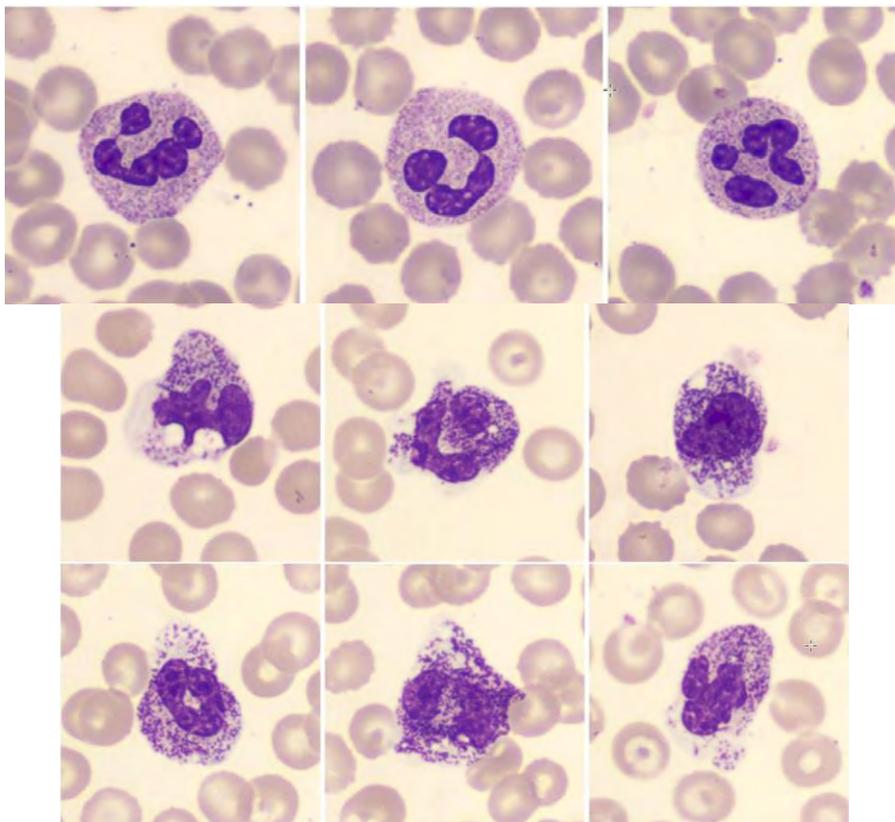


Figure 15 : PNN normaux (en haut) comparés à des PNN de patients septiques : on observe certains signes de souffrance liés au sepsis comme une hyposegmentation du noyau, une hypergranulation relative ainsi que des vacuolisations cytoplasmiques (coloration au MGG, images du laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges prises au DM)

Les automates de cytologie de routine détectent généralement assez bien cette myélémie lorsque celle-ci est présente à un taux significatif, sans toutefois permettre de quantification précise.

En microscopie optique, les granuleux immatures peuvent être identifiés et numérés cytologiquement.

Divers auteurs parlent du stade de « band cell », particulièrement présent en cas de situation septique, qui serait un stade intermédiaire entre le métamyélocyte (précurseur granuleux le moins immature) et le PNN mature se caractérisant par un accroissement de la condensation de la chromatine et la transformation de la forme du noyau en une configuration en « saucisse » ou en bande possédant un diamètre uniforme tout au long de sa longueur, le stade PNN étant caractérisé par l'existence de lobes bien individualisés reliés par de minces filaments chromatinien (33,34,35).

Le décompte ou du moins la détection de la myélémie et des band cells est chose importante, c'est la reproductibilité ainsi que la variabilité inter-opérateur qui pose problème. En pratique, la distinction avec des PNN matures est parfois floue, et varie énormément d'un opérateur à l'autre (36). Cela pose l'intérêt d'autres moyens que la cytologie pure dans le but de l'évaluer.

L'étude des granuleux immatures pour prédire l'évolution clinique de patients septiques a montré les limites actuelles de la microscopie par rapport à la méthode de référence, la CMF. Bien que la numération cytologique automatisée alliée à microscopie optique classique joue correctement son rôle de sentinelle en détectant les frottis anormaux, la quantification des granuleux immatures tant en microscopie manuelle qu'automatisée (DM) révèle des disparités majeures. De plus, des anomalies morphologiques notables sont observées dans le sepsis, d'autant plus que celui-ci est grave (figure 15).

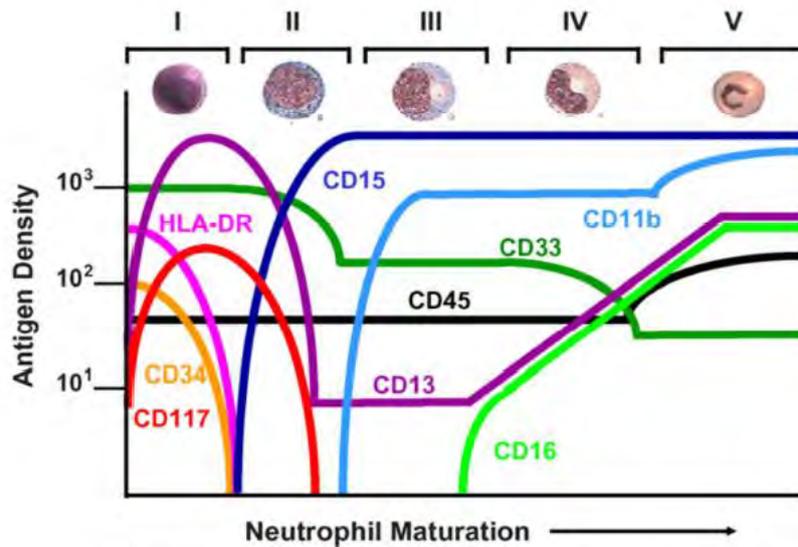
3.2. Intérêt potentiel de la CMF dans le sepsis

En hématologie, nous venons de voir que la quantification de la myélémie est chose malaisée et de reproductibilité plus qu'imparfaite. C'est pourquoi la CMF, technique permettant de caractériser précisément les phénotypes cellulaires, offre d'intéressantes perspectives de développement, pouvant grandement améliorer la reproductibilité de la quantification de la myélémie et la mise en évidence des cellules exprimant certains marqueurs pro-inflammatoires.

En CMF, ces cellules immatures constituant la myélémie présentent un défaut d'expression de certains marqueurs, dont CD10 et CD16 (figure 16), acquis plus tardivement au cours de la maturation cellulaire. Dans le cadre de situations réactionnelles, on observe de plus sur ces granuleux immatures certains marqueurs d'inflammation dont le CD64 (FcγRI, récepteur au fragment Fc des IgG).

Dans le sepsis, la présence de « band cells », de la myélémie, équivalents cytologiques des granuleux immatures CD10dim et CD16dim et l'expression du CD64 sont bien connues. Au plan cytologique, on vient de le voir, ces situations sont mal définies, mal codifiées et peu reproductibles.

La frise suivante (figure 16) illustre l'acquisition de certains marqueurs au cours de la maturation granuleuse :



Stades → I : Myeloblasts, II : Promyelocytes, III : Myelocytes, IV Metamyelocytes, V : Polynucléaires neutrophiles

Figure 16 : maturation granuleuse (Loken, 2008)

La CMF permet de discriminer avec une plus grande acuité les populations de granuleux matures et immatures par rapport à la cytologie conventionnelle. Le tableau 3 expose les marqueurs qui seront utilisés dans l'étude qui fait l'objet de ce mémoire.

| Marqueur | Noms usuels | Granuleux immatures | Granuleux matures |
|----------|--|--|--------------------|
| CD10 | Néprilysine – CALLA – endopeptidase neutre | Expression diminuée | Expression normale |
| CD16 | Récepteur au fragment Fc des IgG | Expression diminuée | Expression normale |
| CD64 | Récepteur au fragment Fc des IgG | Situations inflammatoires | |
| CD11b | Mac-1 – intégrine αM | Marqueur de sepsis (58,59) | |
| CD24 | BA-1 – HAS | Présent à partir du stade myélocyte (57) | Présent |

Tableau 3 : principaux CD présents sur les granuleux potentiellement utiles dans le cadre du sepsis

3.3. Place de la CMF dans le sepsis – revue de la bibliographie

3.3.1. Etudes chez l'adulte

3.3.1.1. Dysfonctionnements immunitaires dans le sepsis

On sait que les syndromes septiques graves altèrent profondément l'immunité innée et adaptative en entraînant des dysfonctionnements immunitaires à l'origine d'une immunosuppression.

Le sepsis, qui a ainsi pour effet de perturber certains mécanismes immunitaires, induit une énorme réponse inflammatoire systémique accompagnée d'un processus anti-inflammatoire agissant comme rétroaction négative (37). L'hyperinflammation qui initie le sepsis est essentielle pour éradiquer l'infection, mais provoque également une hypoperfusion et une insuffisance organique (38) ; de plus la réponse inhibitrice devient en deuxième lieu délétère car compromettant un grand nombre de fonctions immunitaires, celles-ci pouvant être directement responsables d'une aggravation clinique (37,39). Les lymphopénies observées en situation de sepsis pourraient être partie intégrante de ce processus, une lymphopénie persistante (60) après la survenue d'un sepsis apparaissant prédictive d'une mortalité précoce et tardive et pouvant servir de marqueur de l'immunosuppression induite par le sepsis. Récemment, il a été montré que le sepsis induisait une immunosuppression marquée et de longue durée partageant des similitudes avec l'immunosénescence ou les désordres immunitaires tels que ceux rencontrés dans les situations de cancer (61).

Bien que les PNN représentent la première ligne de défense contre l'infection, on en sait peu sur leur phénotype et leurs fonctions quelques jours après le sepsis, lorsque la phase immunosuppressive est maximale (c'est-à-dire entre 3 et 8 jours).

Il a toutefois été mis en évidence chez les patients septiques une chimiotaxie des PNN nettement altérée ainsi qu'un nombre accru de granuleux immatures circulants (CD10dim et CD16dim), bien que les capacités notamment de phagocytose soient conservées (37). Ces aspects sont associés à un risque accru de décès par choc septique. Les PNN circulants présentent des altérations phénotypiques, fonctionnelles et morphologiques quelques jours après le début du sepsis et ces dysfonctionnements peuvent participer au rôle délétère de l'immunosuppression induite par celui-ci. En effet, ce sont des granuleux en circulation – dits MDSC, pour myeloid-derived suppressor cells (39) – qui semblent présenter des propriétés immunosuppressives et être responsables de l'immunosuppression observée lors du sepsis par l'induction d'une lymphopénie T.

Les résultats actuels ouvrent de nouvelles perspectives, notamment dans les mécanismes favorisant les infections nosocomiales après un choc septique.

3.3.1.2. Intérêt de la CMF dans le sepsis

En dépit du fait que la CMF reste encore un outil utilisé de façon confidentielle et largement cantonné à la recherche en ce qui concerne le sepsis, son utilisation pourrait être utile à chaque étape de gestion des patients en situation de sepsis, tant potentielle qu'établie. En effet, la relation entre situations septiques et variations des marqueurs d'immaturation granulaire est aujourd'hui bien établie.

Parmi ceux-ci, l'expression du CD64 est augmentée dans les situations de sepsis, particulièrement chez le nouveau-né (voir plus bas) et une certaine corrélation avec la morbi-mortalité est mise en évidence. En effet, le sepsis induit une modulation de l'expression de Fc récepteurs pour les IgG (FcγR) sur les PNN, dont CD16 et CD64 (40).

De nombreuses études (voir en 3.2.1.4.) ont mis en évidence que la présence de granuleux CD64+ semble un outil sensible et spécifique pour le diagnostic de sepsis chez les adultes, les enfants et les nouveau-nés (41), l'augmentation du CD64 étant de plus spécifique à l'infection bactérienne (42).

Les patients atteints de sepsis présentent une augmentation des taux de granulocytes CD64+, de monocytes CD16+ dits pro-inflammatoires (44) et de granuleux immatures avec lymphopénie T, la gravité clinique étant associée à des pourcentages plus élevés de granuleux immatures et à une lymphopénie T plus profonde et parfois une monocytopenie (48). Le pourcentage de granuleux immatures a aussi tendance à être plus élevé chez les patients dont l'état clinique s'aggrave rapidement, en particulier lorsque celui-ci est associé à une lymphopénie T (46) ; l'augmentation des pourcentages de granuleux immatures étant également liée à la survenue de nouvelles défaillances d'organe, elle semble associée à une augmentation du risque de décès tant précoce que tardif. En résumé, la gravité clinique apparaît associée à des pourcentages plus élevés de granuleux immatures et à une lymphopénie T plus profonde.

En revanche, dans les études menées, les autres antigènes de surface des PNN ne diminuent que légèrement (CD11a) ou bien augmentent légèrement (CD11b, CD18, CD35, CD66b et CD63) (46).

Au vu de la littérature, les principales caractéristiques immunophénotypiques du sepsis sont donc la diminution des expressions du CD10 et du CD16 sur les PNN ainsi que l'augmentation du CD64.

3.2.1.3. Approche théorique – exemple du CD10

L'expression des antigènes de surface des PNN en réponse à l'inflammation a été étudiée chez l'animal et l'humain par immunohistochimie (46) : il a été observé une diminution rapide et profonde de l'expression du CD10 sur les PNN de babouins (jusqu'à 95%) en réponse à des injections de quantités différentes d'*E. Coli* qui a par la suite progressivement retrouvé les niveaux d'avant l'injection, la réduction dépendant à la fois de la dose injectée et du temps. L'expérience a été reproduite chez l'humain au moyen d'injections de LPS : les volontaires ont ainsi présenté frissons, nausées, fièvre et myalgies transitoires. Jusqu'à environ 20% de leurs PNN avaient une expression du CD10 réduite, atteignant un pic 2 à 8 heures après l'injection. Au bout de 24 heures, l'expression du CD10 des PNN était revenue aux niveaux d'avant l'injection. Ces données présentent l'observation selon laquelle l'expression de CD10 des PNN est diminuée de manière significative en réponse à une réaction inflammatoire *in vivo*.

In vitro, l'expression de CD10 mesurée sur des échantillons provenant de patients septiques, objective une capacité d'expression de CD10 significativement réduite par rapport aux témoins sains (47).

3.2.1.4. Exemple de deux études menées chez l'adulte

Deux études prospectives successives, conduites à Limoges, ont eu pour but la caractérisation cellulaire en CMF dans le cadre du sepsis, et ce chez l'adulte.

Etude Septiflux 1

Tous les patients admis aux urgences ou en réanimation pour un sepsis évoluant depuis moins de 24 heures étaient éligibles. Les critères d'exclusion étaient : grossesse en cours, âge inférieur à 18 ans, tumeurs solides, infection par le VIH, pathologie hématologique ou inflammatoire autre que le sepsis, médicaments immunosuppresseurs. Au final, 177 patients ont été inclus.

Pour chaque patient, une stratégie de fenêtrage a permis d'isoler les lignées cellulaires d'intérêt. Par exemple, la combinaison CD10/CD24/CD34/CD64/CD45 a permis de sélectionner les granulocytes qui exprimaient faiblement CD10.

Pour isoler les granuleux CD16dim, la combinaison CD14/CD45/CD16/CD11c/CD11b a été utilisée.

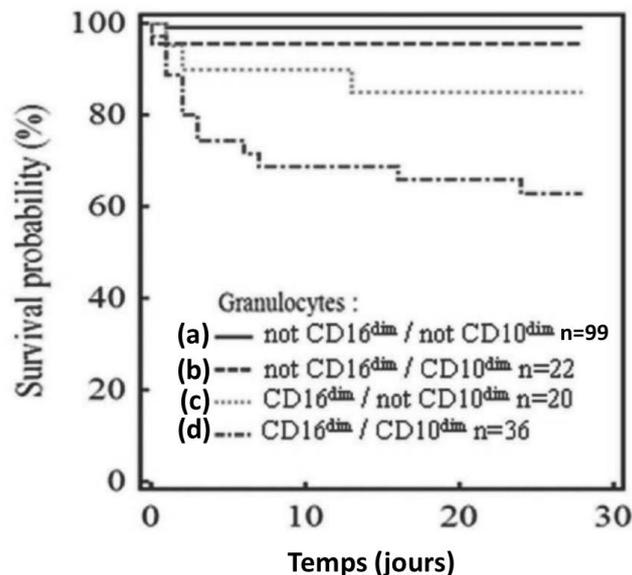


Figure 17 : Septiflux 1 : courbes de survie de Kaplan-Meier

- (a) absence d'augmentation de la proportion de granuleux immatures CD16dim et CD10dim : référence
- (b) absence d'augmentation de la proportion de granuleux immatures CD16dim/augmentation de la proportion de granuleux immatures CD10dim : pas de différence significative, avec 95,5% des patients en vie à J30
- (c) augmentation de la proportion de granuleux immatures CD16dim/absence d'augmentation de la proportion de granuleux immatures CD10dim : survie diminuée, avec 85% des patients en vie à J30
- (d) augmentation de la proportion de granuleux immatures CD16dim/augmentation de la proportion de granuleux immatures CD10dim : survie diminuée, avec 63% des patients en vie à J30

Les seuils de 90% de CD10dim et de 15% de CD16dim ont permis de prédire une aggravation du sepsis à 48h avec une sensibilité de 57% et 70%, et une spécificité de 78% et 82% respectivement. Le

taux de survie à J30 était de 99% pour les patients sans CD10dim ni CD16dim, 85% pour les patients avec seulement une augmentation de la proportion des granuleux immatures CD16dim et 63% pour les patients présentant une augmentation de la proportion de granuleux immatures CD16dim et CD10dim.

Etude Septiflux 2

L'étude Septiflux 2 était cette fois-ci multicentrique (48). Là aussi, il a été montré le rôle majeur de la quantification précise des granuleux immatures dans le but d'évaluer le risque de mortalité. De façon prospective, de novembre 2013 à juin 2015, tous les patients admis dans un service d'urgence ou une unité de réanimation pour un sepsis évoluant depuis moins de 24 heures étaient éligibles. Ils étaient regroupés selon leur état septique à l'admission : contrôles (c'est-à-dire individus non septiques), sepsis, sepsis sévère, et choc septique. Une NFS et une lame colorée au MGG étaient réalisées à l'inclusion ainsi qu'une étude par CMF en 8 couleurs (CD64, CD10, CD14, CD16, CD24, CD11b, CD3 et CD45) permettant d'isoler et quantifier : les lymphocytes CD3, les granuleux CD64+, les monocytes en distinguant la proportion de pro-inflammatoires CD16+ et les granuleux immatures (expression diminuée du CD10 et du CD16).

781 patients ont été étudiés (âge : 67 ± 48 ans, score SOFA : 5 ± 4). Ils étaient divisés en 3 groupes (sepsis, sepsis sévère et choc septique) à J0 et à J2. A J0, les patients septiques présentaient une augmentation du nombre de granulocytes CD64+, de monocytes CD16+, avec une lymphopénie CD3+. La sévérité du stade était corrélée d'une part à un pourcentage plus élevé de granuleux immatures (figure 18) et d'autre part à une lymphopénie CD3+ plus profonde. Les pourcentages de granuleux immatures avaient tendance à être plus élevés chez les patients dont l'état s'aggravait à J2 ($35,1 \pm 35,6$ contre $43,5 \pm 35,2$, $p=0,07$). Un taux élevé de granuleux immatures était aussi associé à la survenue de nouvelles défaillances d'organes à J2 et de décès (figure 19).

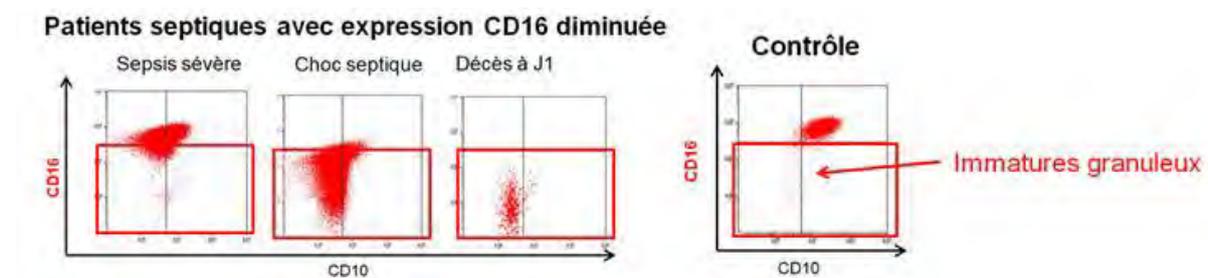


Figure 18 : expression du CD10 et du CD16 par groupe de patients

— Granulocytes CD16^{dim}>30%, CD3<0.26G/L, n= 105
 - - Granulocytes CD16^{dim}>30%, CD3>0.26G/L, n= 237
 — Granulocytes CD16^{dim}<30%, CD3<0.26G/L, n= 63
 - - Granulocytes CD16^{dim}<30%, CD3>0.26G/L, n= 363

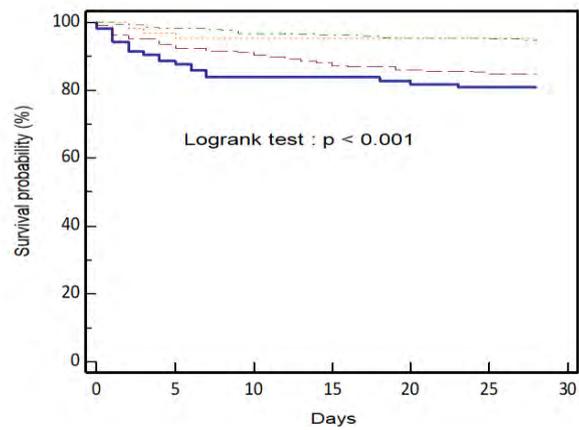


Figure 19 : Septiflux 2 : courbes de survie de Kaplan-Meier

Septiflux 2 a permis de mettre en évidence que la survie était significativement diminuée en présence de granuleux immatures CD16^{dim} et que la présence de d'une lymphopénie CD3+ profonde détériorait ce pronostic avec un taux de survie environ égal à 80% à J28.

Ces études ont donc permis de conclure sur l'augmentation des granuleux immatures dans la phase aiguë du sepsis précédant l'aggravation de l'état clinique du patient (défaillance d'organe, décès), par ailleurs souvent associée à une lymphopénie T.

3.3.2. Etudes chez le nouveau-né

3.3.2.1. Introduction

On a vu précédemment que le sepsis chez le nouveau-né, particulièrement chez le prématuré, pose de réels problèmes diagnostiques ; dans cette population, l'intérêt de développer de nouveaux outils de détection du sepsis se présente. A l'instar des études conduites chez des adultes, d'autres, moins nombreuses, ont permis d'évaluer au sein de cette population la relation entre sepsis et présence de marqueurs d'immaturation granulaire notamment. Pour le diagnostic de sepsis néonatal, particulièrement difficile, l'évaluation tant qualitative que quantitative de marqueurs sensibles et spécifiques par CMF dans ce cas de figure apparaît comme une technique prometteuse.

3.3.2.2. Marqueurs potentiellement utiles

L'association significative entre les valeurs augmentées de granuleux CD64+ et le développement d'un sepsis tardif ou précoce chez les nouveau-nés a été mise en évidence à de nombreuses reprises (49,50).

De même que chez l'adulte septique, il est relevé une expression de nCD64 (quantification du CD64) significativement plus importante, chez les nouveau-nés prématurés présentant un sepsis d'apparition précoce et tardive les résultats montrant que le nCD64 est un marqueur fiable pour le diagnostic du SN. Notamment, au même titre que chez les adultes, en association avec la PCT et/ou d'autres paramètres hématologiques de routine (51), leur utilisation combinée peut améliorer la sensibilité et la précision du diagnostic des infections bactériennes néonatales (52).

Les valeurs initiales de CRP et de CD64 semblent significativement plus élevées chez les nouveau-nés septiques (53) que chez les nouveau-nés non septiques. Dans l'étude précitée, CD64 apparaît comme un meilleur marqueur pronostique que la CRP, la valeur initiale de CD64 était significativement plus élevée chez les nouveau-nés décédés que chez les nouveau-nés survivants bien qu'aucune différence significative n'ait été observée entre les valeurs initiales de la CRP et l'issue de la maladie. La combinaison à la fois du CD64 et de la CRP semble améliorer la capacité à diagnostiquer le SN, la mesure quantitative du CD64 pouvant prédire l'issue de la maladie en SN. La CMF précoce pourrait aider les cliniciens à cibler les patients présentant un risque élevé de détérioration clinique et apparaît comme un marqueur pronostique performant.

Ainsi, au même titre que chez l'adulte, l'utilisation du CD64 semble avoir un intérêt pronostique, sa spécificité apparaissant de même intéressante. En effet, l'expression de CD64 semble significativement plus élevée chez les nouveau-nés présentant une bactériémie que chez ceux ayant une maladie non infectieuse et les nouveau-nés en bonne santé et, contrairement à d'autres biomarqueurs, aucune différence dans l'expression de CD64 n'est observée les mêmes jours entre les nouveau-nés atteints de maladies non infectieuses et les nouveau-nés en bonne santé (54). Il apparaît que l'expression du CD64 peut être un marqueur particulièrement spécifique en ce qui concerne le diagnostic d'une infection bactérienne au début de la période néonatale, car elle ne semble présenter aucune variation physiologique chez une population de nouveau-nés d'âge homogène.

Le CD11b augmenté des PNN serait aussi un marqueur diagnostique du SN (55) ; dans l'étude précitée, les auteurs suggèrent qu'en plus des protéines de phase aiguë (CRP, PCT), les antigènes de

surface cellulaire tels que CD11b et CD64 devraient être utilisés dans les investigations de routine pour le diagnostic précoce du SN, l'utilisation de cette combinaison de marqueurs en phase aiguë pouvant améliorer la précision du diagnostic.

3.3.2.3. Variations liées à l'âge

La physiologie du nourrisson et de l'enfant en général n'étant que rarement superposable à celle de modèles réduits d'adultes, on s'attend de manière intuitive à des variations physiologiques de la nature et de l'expression des marqueurs présents sur les leucocytes.

Plusieurs biomarqueurs pour le diagnostic du sepsis sont déjà élevés au début de la période néonatale en raison de variations physiologiques (54).

En ce qui concerne le CD64, une étude non publiée de 2012 (56) s'est attelée à comparer l'expression de ce marqueur en fonction de l'âge. Le CD64 est en effet normalement très faiblement exprimé par les PNN matures ; les valeurs seuils de l'expression du CD64 étant inconnues, c'est pourquoi dans l'étude citée précédemment, les taux normaux d'expression du CD64 ont été déterminés chez les nouveau-nés, nourrissons, jeunes enfants et adultes exempts de toute symptomatologie infectieuse. Pour quantifier les niveaux d'expression de CD64 des PNN, l'intensité moyenne de fluorescence sur les PNN a été mesurée par CMF sur 420 échantillons. Les sujets ont été répartis en 7 groupes selon l'âge :

- nouveau-nés (groupe A, n = 76)
- 1 à 11 mois (groupe B, n = 51)
- 1 à 5 ans (groupe C, n = 87)
- 6-10 ans (groupe D, n = 76)
- 11-15 ans (groupe E, n = 77)
- 16 - 20 ans (groupe F, n = 33)
- plus de 21 ans (groupe G, n = 20)

Il en est ressorti que le niveau d'expression de CD64 dans les groupes A, B et C était significativement plus élevé que dans le groupe G ($p < 0,01$) ; aucune différence n'a été observée entre les groupes D, E, F et G.

De la naissance à l'âge de 5 ans, l'expression du CD64 apparaît physiologiquement élevée indépendamment de toute présence de myélémie, cela avant d'atteindre des taux adultes (négligeables). Ces résultats suggèrent que les seuils normaux de CD64 doivent être déterminés en fonction de l'âge.

4. MATERIEL ET METHODES

4.1. Etude Sepsinat

Dans un premier temps, l'objectif a été de transposer l'étude Septiflux II chez les nouveau-nés et les nourrissons.

Dans la lignée de ces deux précédentes études Septiflux I et II (48), l'étude Sepsinat, qui vise à rechercher des marqueurs du sepsis néonatal sans prélèvement supplémentaire afin de repérer plus rapidement les patients à risque, a vu le jour à Limoges. Y est étudiée la répartition des granuleux immatures chez le nouveau-né prématuré ≤ 34 SA qui sont susceptibles d'être des marqueurs précoces de sepsis néonatal selon les données disponibles dans la population adulte. Tout nouveau-né ≤ 34 SA suspect de sepsis, qu'il soit précoce ou tardif, bénéficie d'un bilan comprenant NFS et hémoculture. Les premiers patients ont été inclus à partir de juin 2018. Les prélèvements ont été collectés dans le cadre de l'activité de la CB-HME (Collection Biologique de l'Hôpital de la Mère et de l'Enfant).

L'objectif principal est d'évaluer en pratique clinique l'intérêt pronostique dans le sepsis de la quantification des granuleux immatures avec expression diminuée du CD10 et/ou du CD16 par CMF multiparamétrique.

Les objectifs secondaires sont d'étudier les populations suivantes :

- les lymphocytes T CD3+,
- les granulocytes totaux,
- les granuleux CD64+,
- les granuleux avec une expression augmentée du CD24,
- les granuleux avec une expression augmentée du CD11b,
- les granuleux avec une expression diminuée du CD10 et/ou du CD16,
- les monocytes,
- les monocytes Mo1, Mo2 et Mo3 (pro-inflammatoires).

Le principal facteur limitant pour l'analyse réside dans le volume limité des prélèvements néonataux prélevés en microméthode (Microtainer BD), après consommation indispensable par l'automate de numération et ce malgré le fait que la CMF n'exige qu'un faible volume de prélèvement (50 μ L) ; en effet, l'analyse cytométrique s'effectue sur des prélèvements résiduels après numération et formule sanguine. De plus, un patient septique a une activité apoptotique plus importante qu'un patient non septique, d'où l'importance de la rapidité d'analyse.

4.2. Protocole détaillé de la CMF

Les patients ont été sélectionnés par les services cliniques.

Chaque prélèvement (témoin ou inclusion) a fait l'objet d'une NFS sur automate de cytologie standard (Cell Dyn® Sapphire ou Bayer® Advia), cette analyse nécessitant la prise et par conséquent la consommation d'un volume de 200 à 250 μ L de prélèvement. Deux lames de frottis sanguin ont été tirées, dont une colorée au MGG.

Ont été utilisés les mêmes anticorps que pour l'étude Septiflux II (élaborés par la société Beckman Coulter®).

L'analyse cytométrique a été réalisée sur Navios (figure 20) et le retraitement des graphes au moyen du logiciel Kaluza®.



Figure 20 : cytomètre Navios® (source site Beckman)

50 µL sont nécessaires à l'analyse cytométrique, dont la mise en œuvre technique est détaillée ci-dessous :

- répartition des anticorps suivants (marquage de surface)

| | | | | | | | |
|-----------|---------|------------|--------------|----------|----------------|---------|---------|
| CD64-FITC | CD10-PE | CD3-PE-Cy7 | CD14-PECy5,5 | CD24-APC | CD11B-APC A750 | CD16-PB | CD45-KO |
| 7 µL | 7 µL | 4 µL | 4 µL | 4 µL | 2.5 µL | 4 µL | 4 µL |

FITC : isothiocyanate de fluoescéine – PE : phycoérythrine – Cy : cyanine – APC : allophycocyanine – PB : Pacific Blue® – KO : Krome Orange®

- dépôt de 50µL de sang total ou dilué
- incubation pendant 15 min dans le noir à température ambiante
- lyse avec 500 µL de VersaLyse™ (lyse enzymatique)
- incubation à température ambiante 10 min à l'obscurité
- vortexer le tube 5 s
- passage au cytomètre en flux
- acquisition des données brutes après obtention d'au moins 70000 événements CD45+ ou 300 s

4.3. Stratégie de fenêtrage

Le fenêtrage débute par un ciblage des CD45 totaux en FS/SS classique (figure 21) :

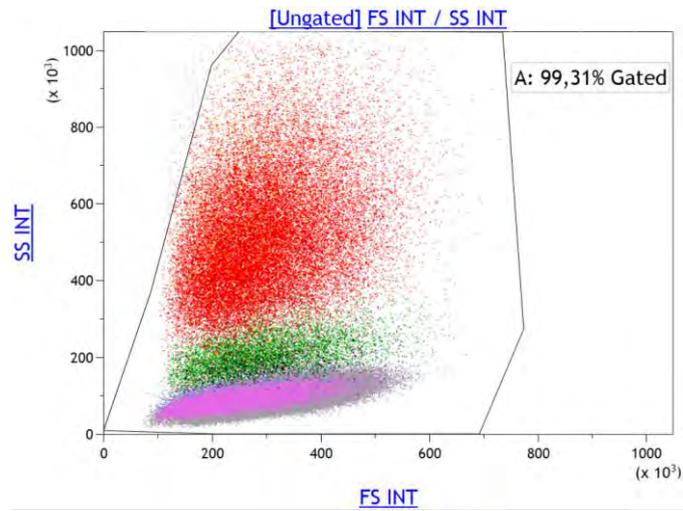


Figure 21

4.3.1. Monocytes

Les monocytes sont fenêtrés en CD45/CD14 (figure 22) ; les granuleux se mélangeant aux monocytes chez les patients septiques, ceux-ci nécessitent un reciblage en CD45/SS (figure 23).

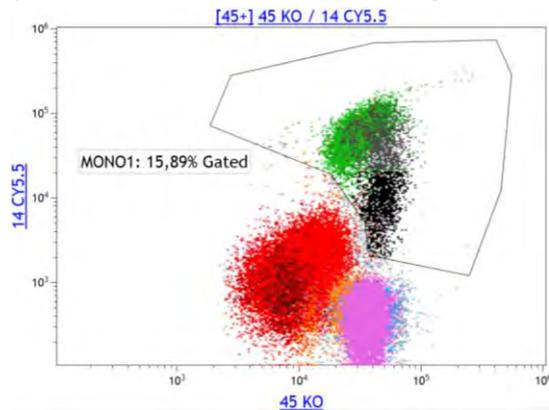


Figure 22

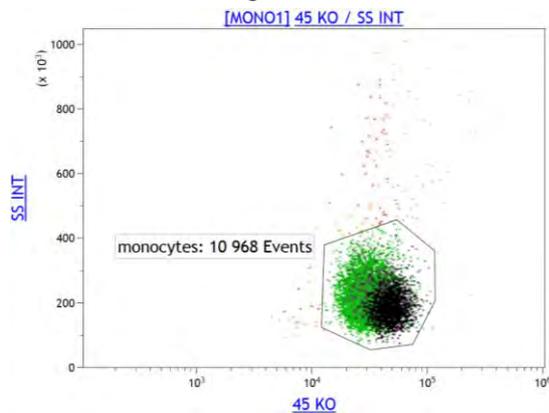


Figure 23

Le fenêtrage en CD14/CD16 (figure 24) permet ensuite de faire la distinction entre Mo1 (CD14⁺⁺/CD16⁻), Mo2 (monocytes intermédiaires CD14⁺⁺/CD16⁺) et Mo3 (monocytes non classiques CD14 faible/CD16⁺) tels que décrits dans (44) :

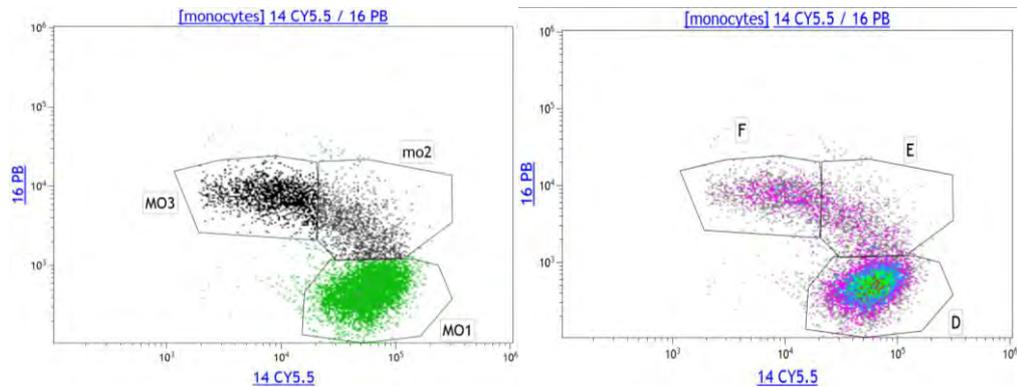


Figure 24

4.3.2. Lymphocytes

Les lymphocytes CD3⁺ sont ciblés par un fenêtrage CD3/SS simple à partir des CD45 totaux (figure 25) :

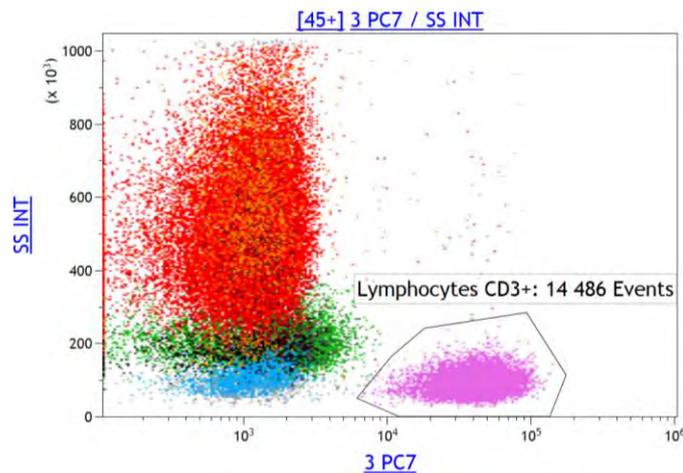


Figure 25

Les lymphocytes totaux sont quant à eux ciblés par un fenêtrage en CD45/SS ordinaire excluant les monocytes précédemment sélectionnés afin de pallier le chevauchement sur le graphe des nuages représentatifs des deux population cellulaires (figure 26) :

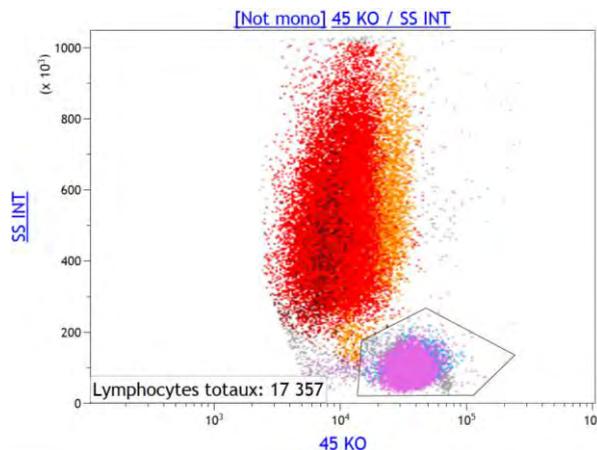


Figure 26

Après ciblage des lymphocytes totaux, ceux-ci sont discriminés entre lymphocytes B et non B, les premiers exprimant constamment le marqueur CD24 à l'inverse des seconds (figure 27) :

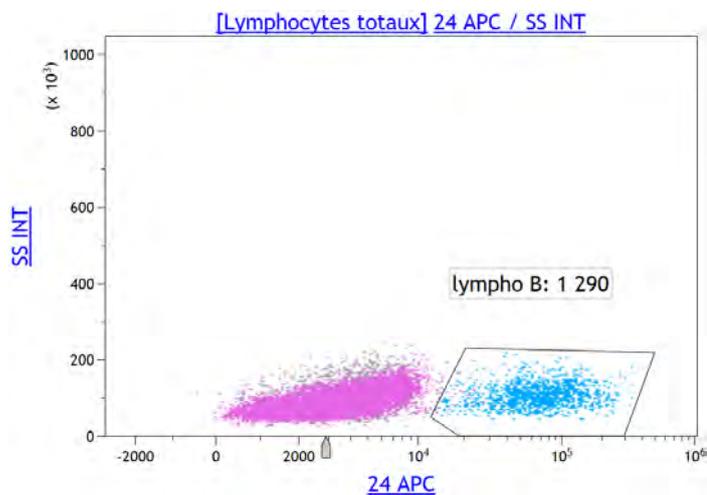


Figure 27

4.3.3. Granuleux

Les granuleux sont fenêtrés en CD45/SS après l'exclusion des lymphocytes et monocytes précédemment identifiés (figure 28). Les éosinophiles, négligeables chez les patients septiques, sont exclus par l'utilisation d'un « radar » en 3 dimensions (CD45/CD10/CD16) permettant de séparer les éosinophiles des autres granuleux avec une plus grande acuité (figure 29) :

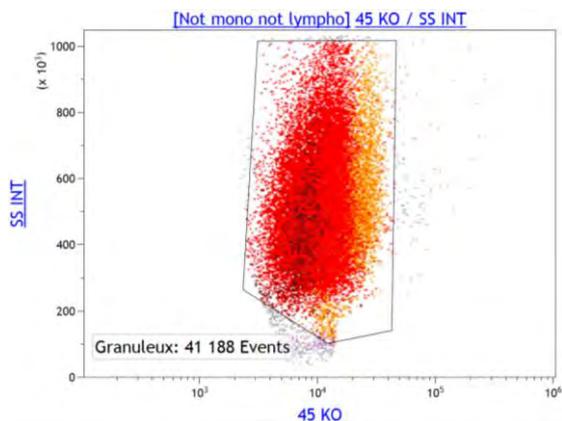


Figure 28

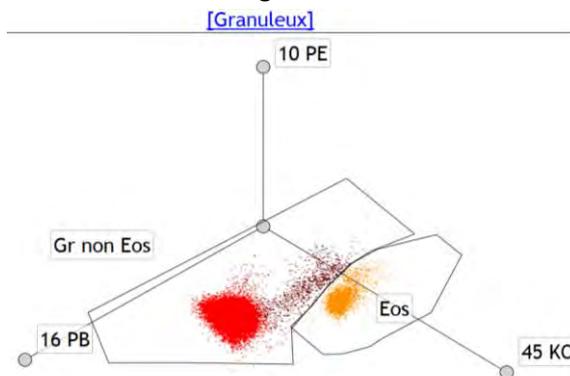


Figure 29

Après sélection des granuleux non éosinophiles, l'expression de chaque marqueur peut être étudiée individuellement (figure 30) :

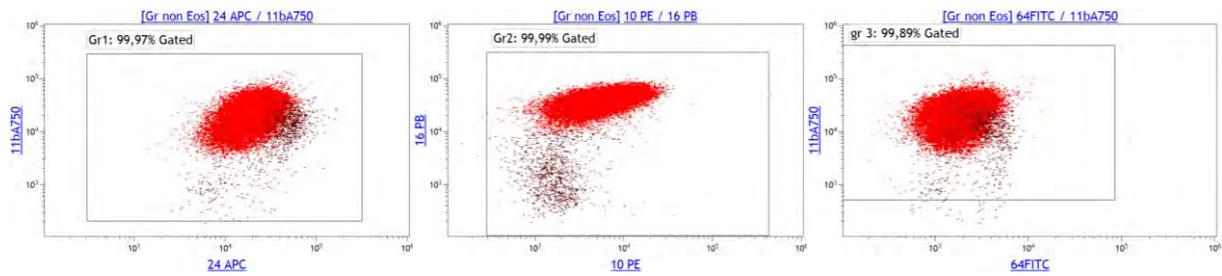


Figure 30

Les fenêtres suivantes (figure 31) permettent de relever les pourcentages de granuleux d'expression diminuée ou augmentée pour les différents marqueurs. Les seuils ont été fixés en fonction des contrôles et ne sont plus destinés à être modifiés :

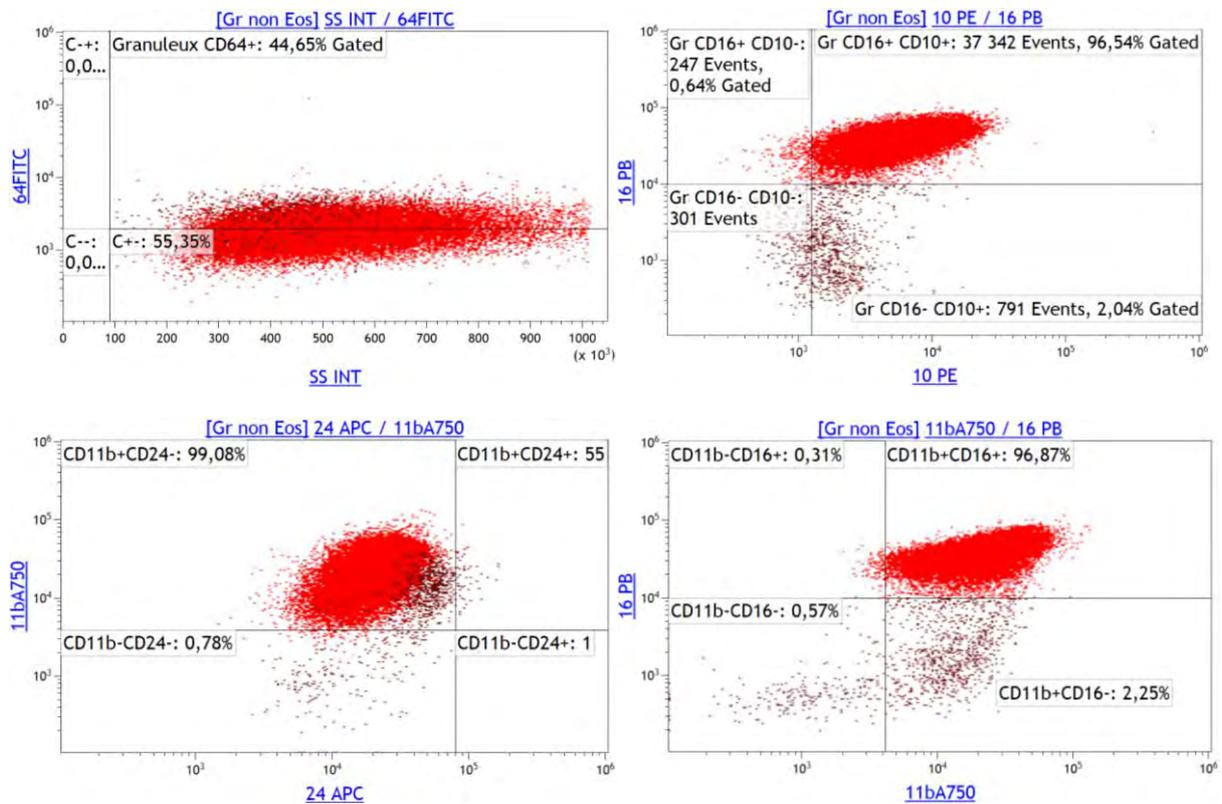


Figure 31

5. RESULTATS

La présentation des résultats est divisée en deux parties distinctes :

- Premièrement, comparaison entre nouveau-nés sains et adultes sains, achevée (5.1.) ; ces résultats ont donné lieu à la rédaction d'un poster (annexe 7).
- Dans un second temps, inclusion de nouveau-nés suspects de sepsis, en cours à l'heure d'écriture de ce mémoire (5.2.).

5.1. Caractérisation de nouveau-nés sains

5.1.1. Méthodologie

Dans un premier temps, il a été nécessaire de caractériser en CMF 8 couleurs une population de nouveau-nés sains afin d'établir les seuils, utilisables à terme en vue du diagnostic du sepsis néonatal.

Dans ce but, 30 témoins ont été analysés entre juin et août 2018 : il s'agit de nouveau-nés sains, exempts de toute pathologie – confirmé a posteriori et nés à terme – prélevés à J3 à l'occasion du prélèvement dans le cadre du dépistage néonatal à l'Hôpital Mère et Enfant du CHU de Limoges.

Ceux-ci ont été comparés à 10 jeunes adultes en bonne santé (âge = 27.9 ans \pm 3.8 ans), dont l'immunophénotypage a permis de fixer les seuils.

En vue de la comparaison des deux populations saines, la significativité a été déterminée par l'usage du test de Kruskal-Wallis.

5.1.2. Résultats obtenus

Dans un souci de lisibilité, les résultats ont été regroupés en « box plots » (voir en annexe 6 pour plus de précisions) faisant apparaître la médiane ainsi que les premier et troisième quartiles.

5.1.2.1. Etude des granuleux

1) CD10dim et CD16dim

La proportion de granuleux immatures CD10dim et CD16dim est retrouvée significativement plus élevée chez les nouveau-nés par rapport aux contrôles (respectivement 3% \pm 2.86 contre 0.17% \pm 0.15, $p < 0.0001$ et 4.05% \pm 3.46 contre 0.5% \pm 0.09, $p < 0.0001$), voir figures 34 et 35.

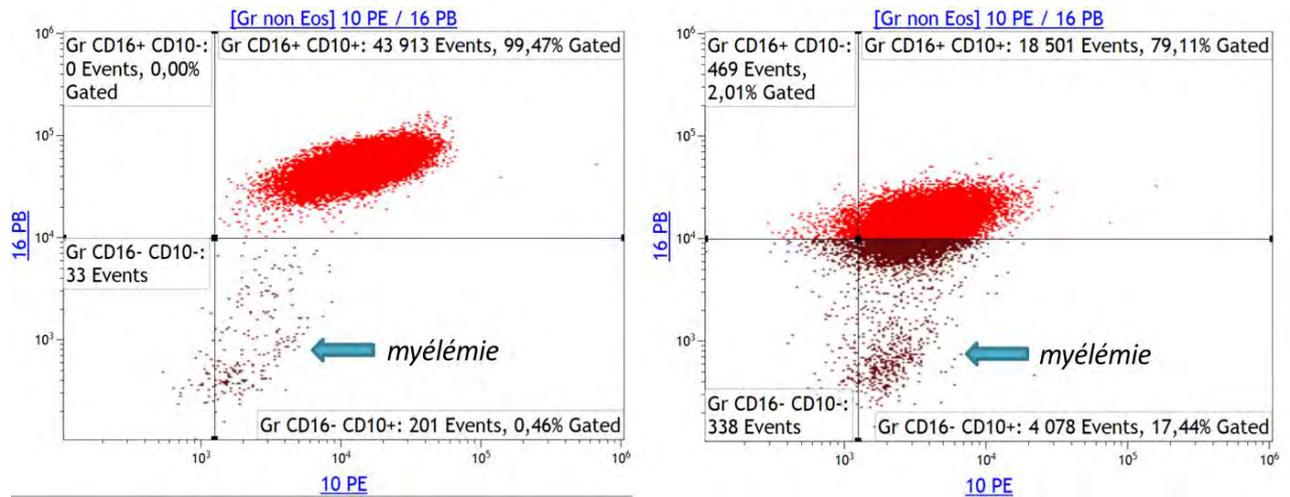


Figure 34 : contrôle adulte en CD10/CD16 (à gauche) comparé à un nouveau-né témoin (à droite) : les seuils étant les mêmes sur les deux graphiques, on observe le décalage vers CD10- et CD16- de la population granuleuse des NN, et ce indépendamment de la présence de myélémie (minime sur les deux prélèvements, figurée par les nuages diffus très faibles en CD16).

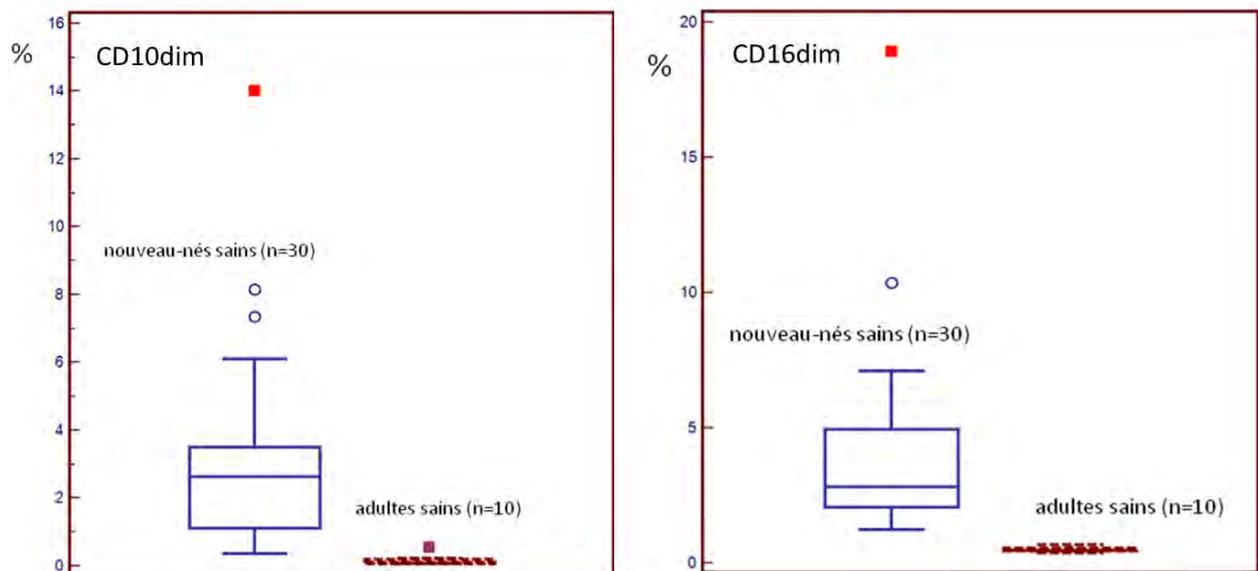


Figure 35 : proportion de granuleux CD16- et de CD10- exprimés en pourcentage chez les NN témoins et les contrôles adultes parmi les granuleux totaux

2) CD64+

De même, il a été observé une expression du CD64 chez les nouveau-nés parmi les granuleux alors qu'elle est absente chez les contrôles (81.84% ± 18.99 contre 0.41% ± 0.36, $p < 0.0001$) (figures 36 et 37).

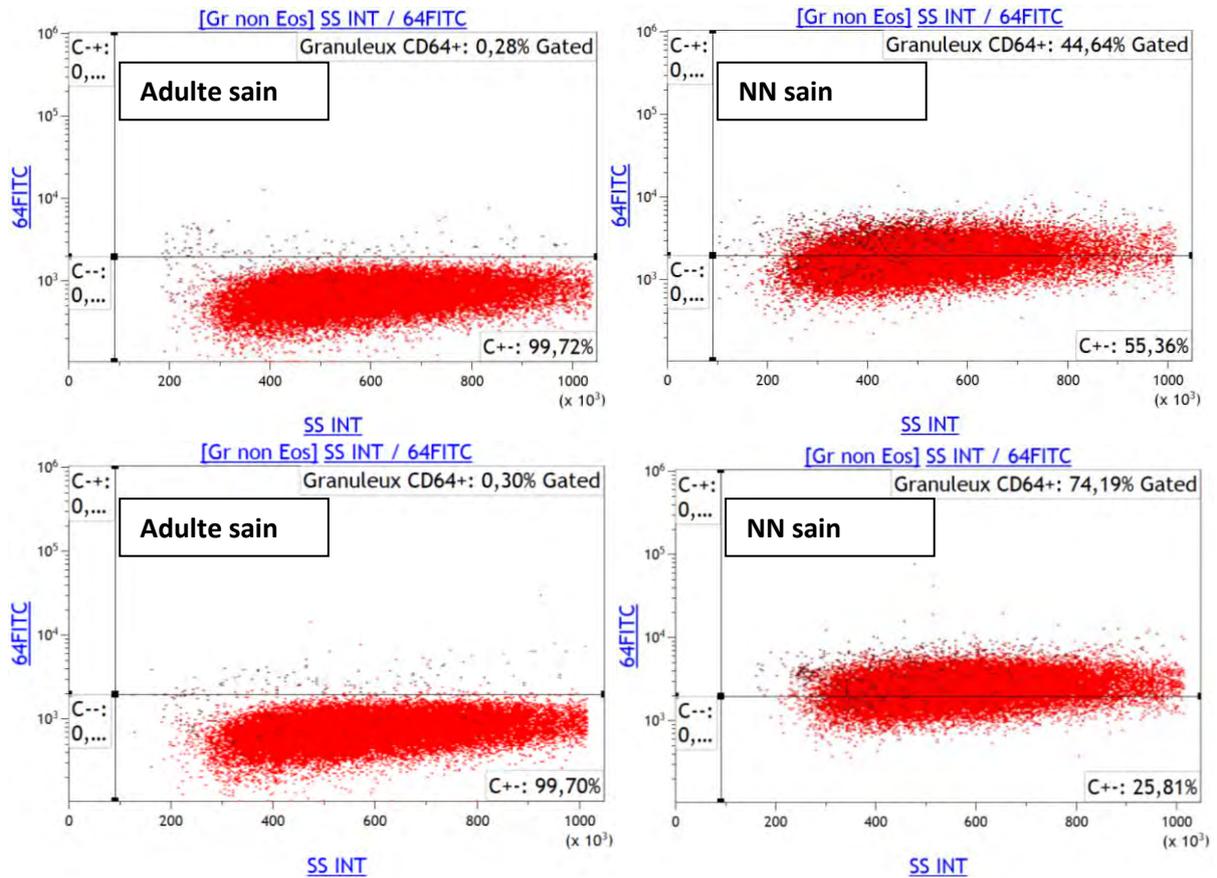


Figure 36 : profils d'expression du CD64 sur les granuleux comparés d'adultes sains (à gauche) et de NN sains (à droite)

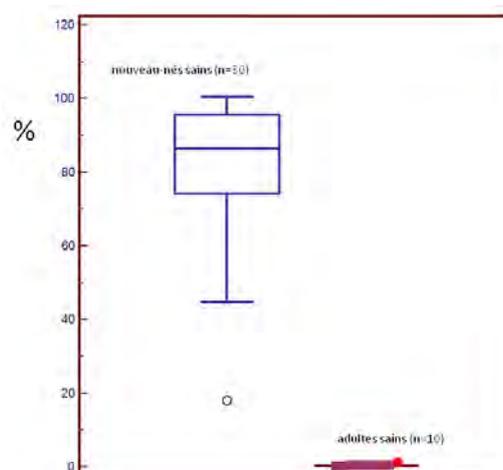


Figure 37: proportion de granuleux CD64+ exprimés en pourcentage chez les nouveau-nés témoins et les contrôles adultes parmi les granuleux totaux

En ce qui concerne les intensités de fluorescence, il a été retrouvé une moyenne de fluorescence significativement augmentée pour le CD64 chez les nouveau-nés sains par rapport aux adultes sains (3562 ± 1146 contre 772 ± 57 , $p < 0.0001$), ainsi que significativement diminuée pour le CD10 (5175 ± 1878 contre 10830 ± 3146 , $p < 0.0001$), aucune variation n'étant cependant retrouvée pour le CD16 (50243 ± 19011 contre 48234 ± 7891 , $p = 0.89$).

3) CD11b et CD24

En ce qui concerne la moyenne de fluorescence des granuleux pour le CD11b, aucune différence n'est mise en évidence pour les 2 populations (23695 ± 6320 contre 25431 ± 7685 , $p = 0.5485$), à l'inverse du CD24 qui semble, par rapport aux nouveau-nés sains, davantage exprimé par les contrôles adultes (21071 ± 4269 contre 32091 ± 9540 , $p = 0.0010$), comme le montrent les figures 38 et 39 :

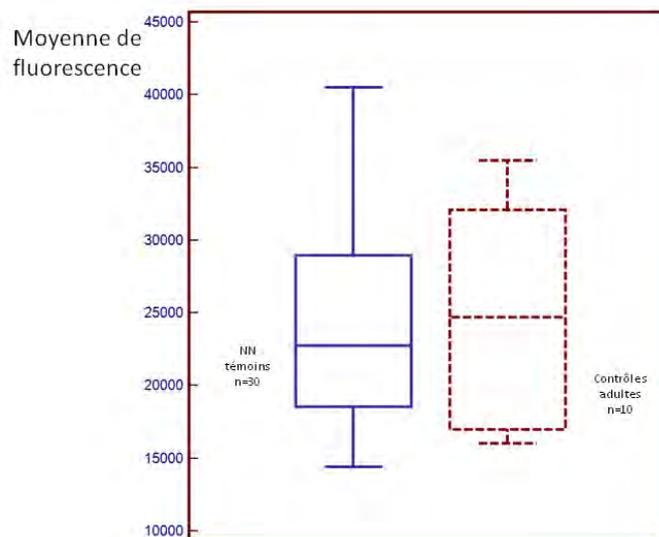


Figure 38 : moyenne d'expression de CD11b

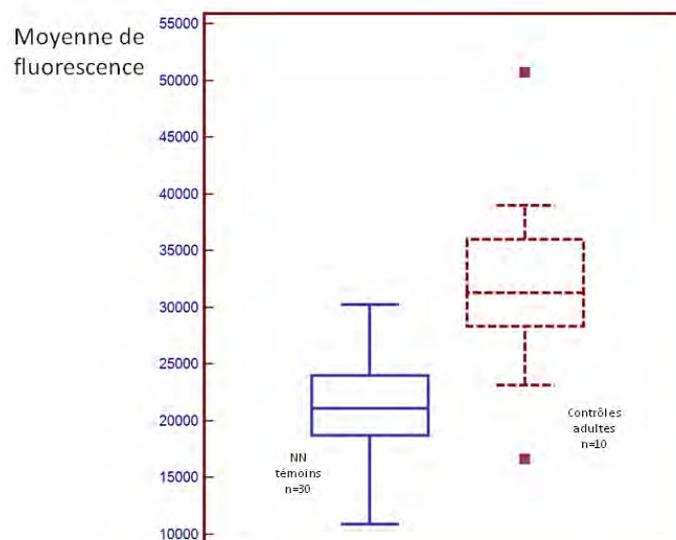


Figure 39 : moyenne d'expression de CD24

5.1.2.2. Etude des lymphocytes

La lymphocytose CD3+ a été retrouvée augmentée chez les nouveau-nés par rapport aux contrôles adultes ($2.65\text{G/L} \pm 0.7$ contre $1.71\text{G/L} \pm 0.23$, $p=0.0008$), parallèlement à la lymphocytose totale ($3.29\text{G/L} \pm 0.84$ contre $2.48\text{G/L} \pm 0.44$, $p=0.0150$), comme le montre la figure 32 :

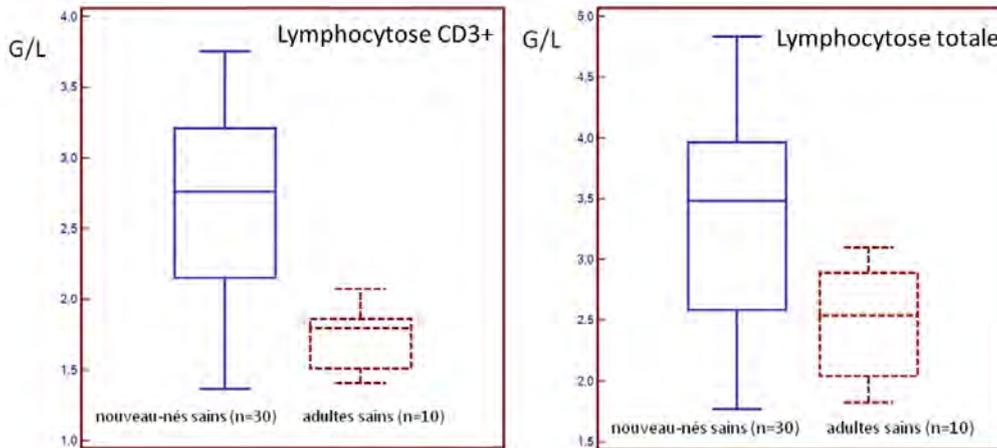


Figure 32 : lymphocytose CD3+ chez les nouveau-nés témoins et les contrôles adultes

5.1.2.3. Monocytes

Il en va de même pour la monocytose ($1.30\text{G/L} \pm 0.42$ contre $0.63\text{G/L} \pm 0.13$, $p<0.0001$), celle-ci étant davantage composée de monocytes pro-inflammatoires Mo2 et Mo3 (44) (respectivement $17.76\% \pm 6.18$ contre $2.66\% \pm 0.98$, $p<0.0001$ et $8.98\% \pm 3.97$ contre $6.43\% \pm 1.66$, $p=0.0492$) (figure 33) :

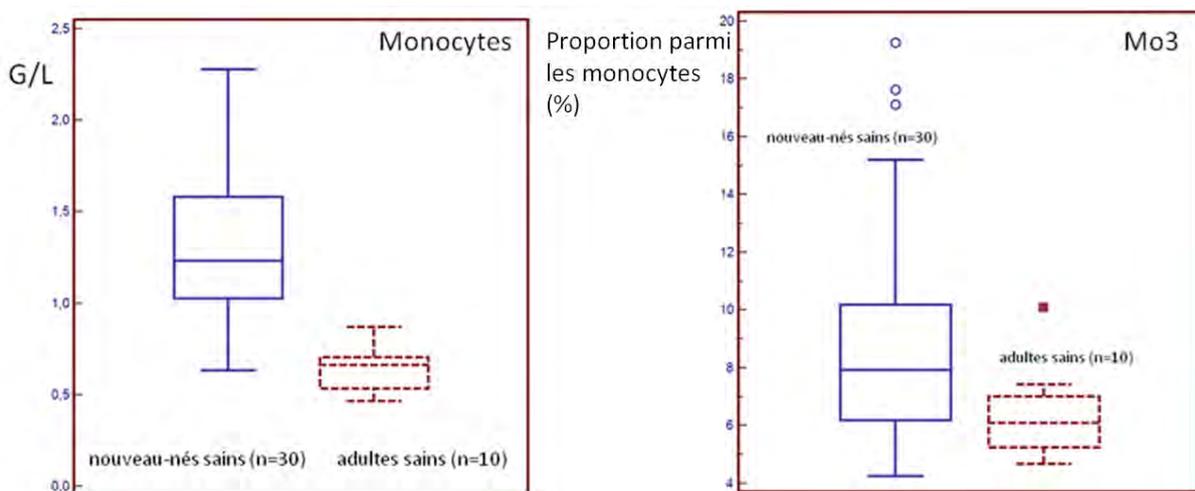


Figure 33 : monocytose totale et pourcentage de Mo3 chez les nouveau-nés témoins et les contrôles adultes

5.2. Présentation des résultats préliminaires à l'étude Sepsinat

5.2.1. Méthodologie

Tout d'abord, il convient de préciser que les résultats présentés ci-après, s'ils permettent de dégager certaines tendances, notamment après prise en compte de la littérature existant à sujet, n'ont rien d'encore significatif. Les inclusions n'ayant débuté qu'au mois de juillet 2018, ce mémoire expose les premiers résultats d'une étude amenée à se prolonger plusieurs mois voire années.

A l'heure de l'écriture de ce travail, outre les 30 nouveau-nés sains analysés à des fins de témoins et les 10 contrôles adultes, 24 prélèvements de nouveau-nés et nourrissons ont été inclus :

- 19 prélèvements de nouveau-nés de réanimation néonatale dont :
 - 4 de très grands prématurés (< 28 SA)
 - 8 de grands prématurés (de 28 à 32 SA)
 - 7 de prématurés modérés (> 32 SA)
- 5 prélèvements de nourrissons des urgences pédiatriques, tous nés à terme et âgés de 45 ± 30 jours

Parmi les 19 prélèvements de nouveau-nés prématurés : 14 proviennent de bébés ayant été classés non septiques, 3 en sepsis probable et 2 en sepsis prouvé à la culture conformément à la classification définie en 2.2.1. (tableau 4).

Parmi les 5 nourrissons des urgences, 2 présentaient une infection bactérienne systémique, les 3 autres ne présentaient pas d'infection bactérienne (deux avec une infection virale et un sans infection retrouvée).

| | < 28 SA | 28-32 SA | > 32 SA |
|-----------------|---------|----------|---------|
| non septique | 1 | 7 | 6 |
| sepsis probable | 2 | 1 | 0 |
| sepsis prouvé | 1 | 0 | 1 |

Tableau 4 : répartition des prélèvements de nouveau-nés prématurés en fonction du degré de prématurité et de la classification non septique/sepsis probable/sepsis prouvé

Il a donc été procédé à la division en 8 groupes distincts :

- groupe 1 : prématuré < 28 SA non septique (n=1)
- groupe 2 : prématurés > 28 SA non septiques (n=13)
- groupe 3 : prématurés sepsis probable (n=3)
- groupe 4 : prématurés sepsis prouvé (n=2)
- groupe 5 : témoins nouveau-nés (n=30)
- groupe 6 : nourrissons non infectés (n=3)
- groupe 7 : nourrissons infectés (n=2)
- groupe 8 : contrôles adultes (n=10)

Comme le montre le tableau 5, les pourcentages de granuleux CD64+, et de granuleux immatures CD10dim et CD16dim des nouveau-nés non septiques des groupes 28-32 SA (patients 4 à 9) et > 32 SA (patients 11 à 16) n'étant pas significativement différents (test de Mann-Whitney), ceux-ci ont été regroupés au sein d'un même ensemble. En revanche, les valeurs de CD64+, CD10dim et CD16dim de

l'unique prématuré extrême (< 28 SA) retrouvé non septique (patient 1) se détachant nettement de celles des autres, il a constitué à lui seul un groupe à part.

| patients | % CD64+ | % CD10dim | % CD16dim | terme |
|----------|---------|-----------|-----------|----------|
| 1 | 78.7 | 15.8 | 62.1 | < 28 SA |
| 2 | 70.7 | 8.0 | 16.2 | |
| 3 | 82.3 | 15.9 | 4.3 | |
| | 91.1 | 14.6 | 46.6 | |
| 4 | 22.6 | 3.5 | 7.2 | 28-32 SA |
| 5 | 22.6 | 2.7 | 12.6 | |
| | 37.7 | 1.5 | 5.3 | |
| 6 | 44.7 | 4.7 | 20.3 | |
| 7 | 13.7 | 6.8 | 12.8 | |
| 8 | 47.1 | 10.3 | 3.9 | |
| 9 | 14.8 | 2.7 | 9.6 | |
| 10 | 33.3 | 2.2 | 13.7 | |
| 11 | 37.5 | 7.2 | 15.9 | |
| 12 | 44.8 | 8.3 | 20.0 | |
| 13 | 37.6 | 5.9 | 7.2 | > 32 SA |
| 14 | 20.7 | 4.7 | 12.0 | |
| 15 | 24.0 | 5.1 | 11.1 | |
| 16 | 29.7 | 4.4 | 6.9 | |
| 17 | 97.9 | 11.8 | 54.2 | |

| | |
|---|-----------------|
|  | sepsis prouvé |
|  | sepsis probable |
|  | non septique |

Tableau 5 : répartition des nouveau-nés prématurés

On parle bien ici de « prélèvements » et non de nouveau-nés/nourrissons : en effet, deux bébés ont été prélevés à deux reprises dans le cadre de deux épisodes successifs distincts et peuvent par conséquent figurer dans deux groupes différents : dans les résultats présentés, un nouveau-né prématuré figure à deux reprises dans le groupe 2 rassemblant les nouveau-nés prématurés non septiques (patient 5) et un autre (patient 3) une fois dans le groupe 3 (sepsis probable) et une autre dans le groupe 4 (sepsis prouvé).

5.2.2. Résultats de l'immunophénotypage des différentes lignées

Pour chaque paramètre, un tableau consigne les valeurs obtenues ; dans un souci de lisibilité, elles ont été regroupées en « box plots » faisant apparaître la médiane ainsi que les premier et troisième quartiles.

5.2.2.1. Etude des granuleux

1) CD16 et CD10

Le tableau et les figures suivantes illustrent les valeurs obtenues pour les deux marqueurs d'immaturation granulaire CD16 et CD10 :

| Groupe | CD16dim (%) | CD10dim (%) |
|---|--------------|--------------|
| prématuré < 28 SA non septique (n=1) | 62.08 | 15.83 |
| prématurés > 28 SA non septiques (n=13) | 11.14 ± 5.22 | 5.21 ± 2.46 |
| prématurés sepsis probable (n=3) | 11.40 ± 6.31 | 8.69 ± 6.86 |
| prématurés sepsis prouvé (n=2) | 50.39 ± 5.33 | 13.21 ± 2.00 |
| témoins nouveau-nés (n=30) | 4.05 ± 3.46 | 3.00 ± 2.86 |
| nourrissons non infectés (n=3) | 9.02 ± 11.17 | 4.84 ± 6.20 |
| nourrissons infectés (n=2) | 3.39 ± 2.59 | 10.21 ± 1.09 |
| contrôles adultes (n=10) | 0.50 ± 0.09 | 0.17 ± 0.15 |

Tableau 6 : pourcentage de CD10dim et CD16dim parmi les granuleux moins éosinophiles

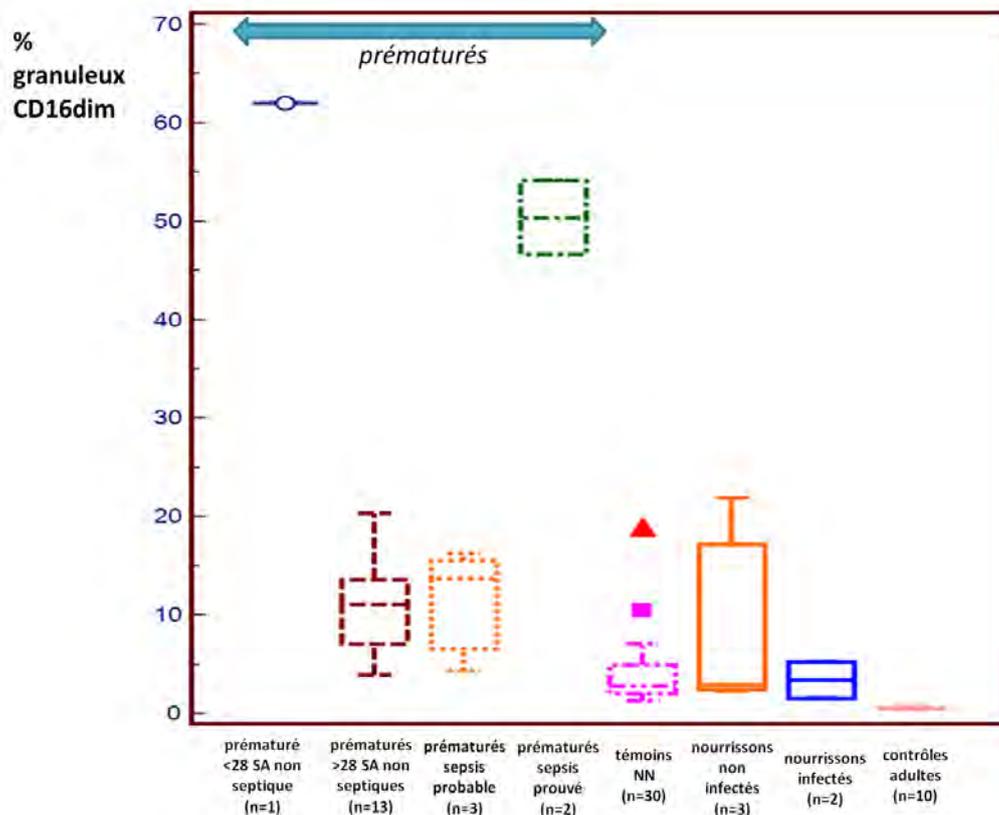


Figure 40 : pourcentages de granuleux CD16dim parmi les granuleux totaux

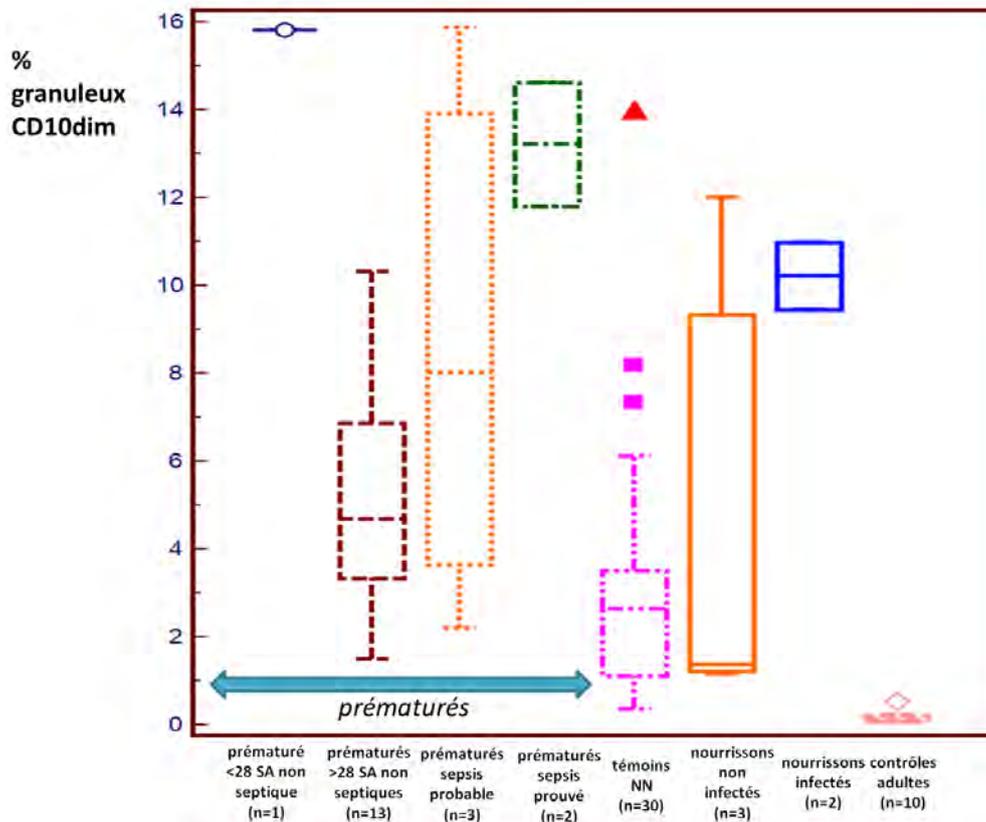


Figure 41 : pourcentages de granuleux CD10dim parmi les granuleux totaux

2) CD64

Le tableau et les figures suivantes illustrent les valeurs obtenues pour le CD64 :

| Groupe | % CD64+ | moyenne de fluorescence |
|---|---------------|-------------------------|
| prématuré < 28 SA non septique (n=1) | 78.71 | 3475 |
| prématurés > 28 SA non septiques (n=13) | 30.58 ± 11.65 | 1776 ± 202 |
| prématurés sepsis probable (n=3) | 62.11 ± 25.59 | 2616 ± 692 |
| prématurés sepsis prouvé (n=2) | 94.48 ± 4.82 | 5705 ± 1579 |
| témoins nouveau-nés (n=30) | 81.84 ± 18.99 | 3561 ± 1145 |
| nourrissons non infectés (n=3) | 59.39 ± 16.98 | 2494 ± 573 |
| nourrissons infectés (n=2) | 67.43 ± 40.54 | 3477 ± 2242 |
| contrôles adultes (n=10) | 0.41 ± 0.36 | 772 ± 57 |

Tableau 7 : pourcentage de granuleux CD64+ parmi les granuleux et moyenne de fluorescence

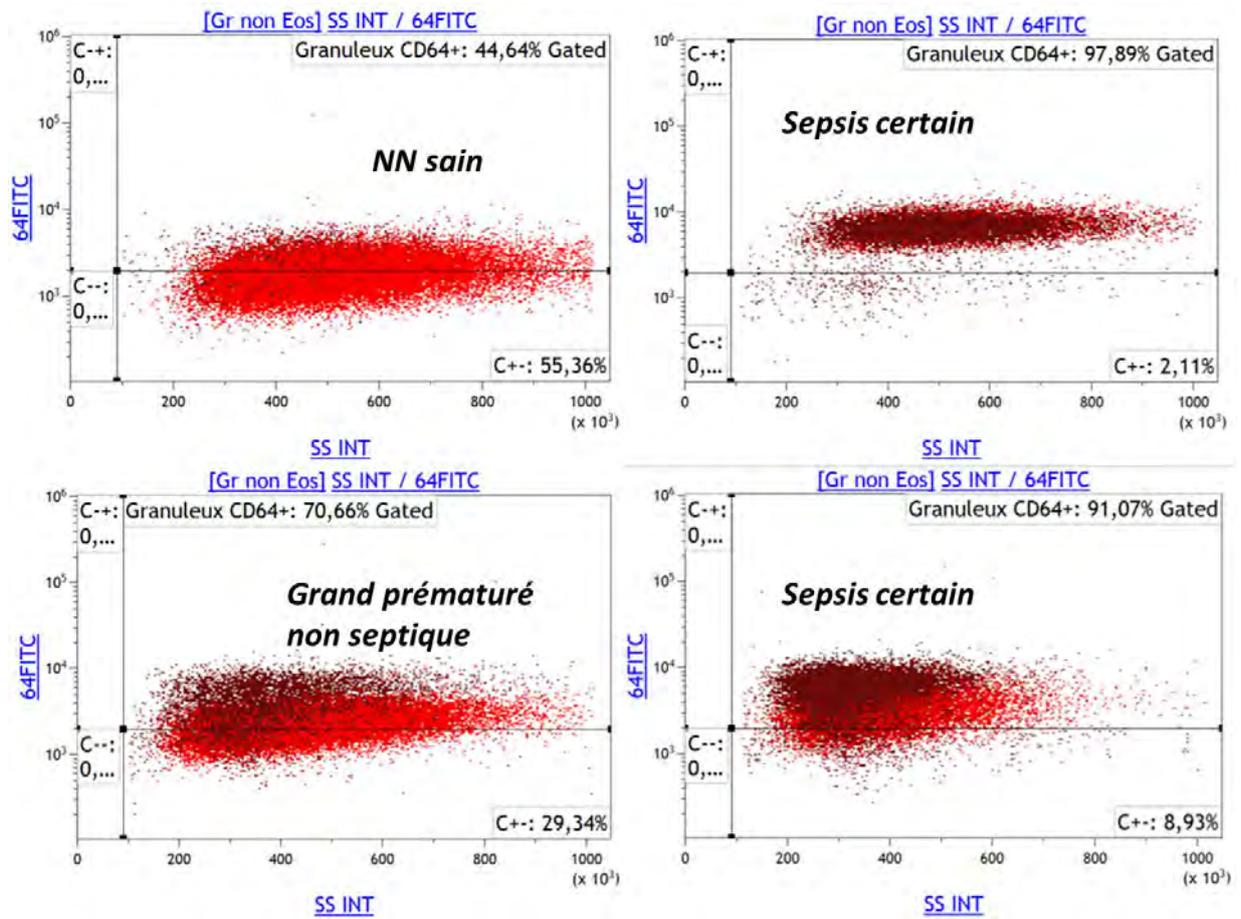


Figure 42 : variétés d'expression du CD64 sur les granuleux : à droite, profil des 2 patients septiques de l'étude ; en haut à gauche, NN sain né à terme ; en bas à droite, grand prématuré non septique ; on observe la plus forte expression de CD64 chez les deux patients septiques ; la myélémie apparaît en marron.

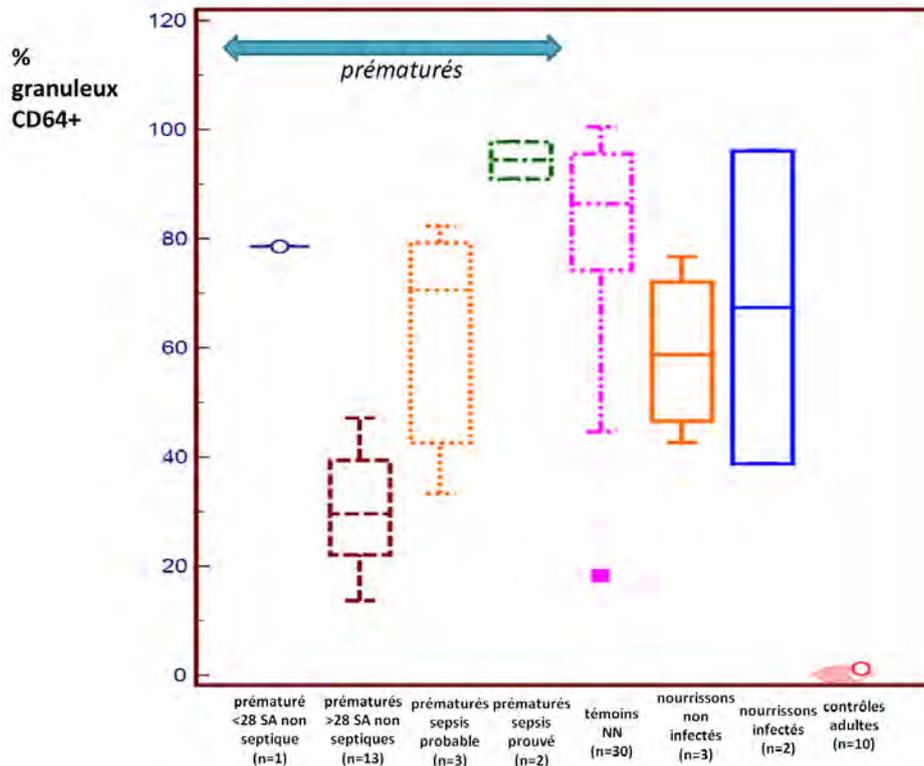


Figure 43 : pourcentages de granulocytes CD64+ parmi les granulocytes totaux

Si l'on compare les pourcentages d'expression de CD64 sur les granulocytes entre le groupe de prématurés non septiques (n=13) – si tant est que celui-ci puisse servir de « témoin » pour les nouveau-nés prématurés – avec ceux du groupe de nouveau-nés témoins (n=30), on observe une moindre expression de CD64 significative chez les premiers par rapport aux nouveau-nés nés à terme (30.58 % ± 11.65 contre 81.84 % ± 18.99, p<0.0001).

3) CD24

Le tableau et la figure suivantes illustrent les valeurs obtenues pour le CD24, marqueur pour lequel il ne se dégage pas de tendances évidentes :

| Groupe | Moyenne de fluorescence CD24 |
|---|------------------------------|
| prématuré < 28 SA non septique (n=1) | 39074 |
| prématurés > 28 SA non septiques (n=13) | 41399 ± 20582 |
| prématurés sepsis probable (n=3) | 24782 ± 1923 |
| prématurés sepsis prouvé (n=2) | 32763 ± 124 |
| témoins nouveau-nés (n=30) | 21071 ± 4269 |
| nourrissons non infectés (n=3) | 51318 ± 14202 |
| nourrissons infectés (n=2) | 51412 ± 36200 |
| contrôles adultes (n=10) | 32091 ± 9540 |

Tableau 8 : moyenne de fluorescence de CD24 parmi les granulocytes moins éosinophiles

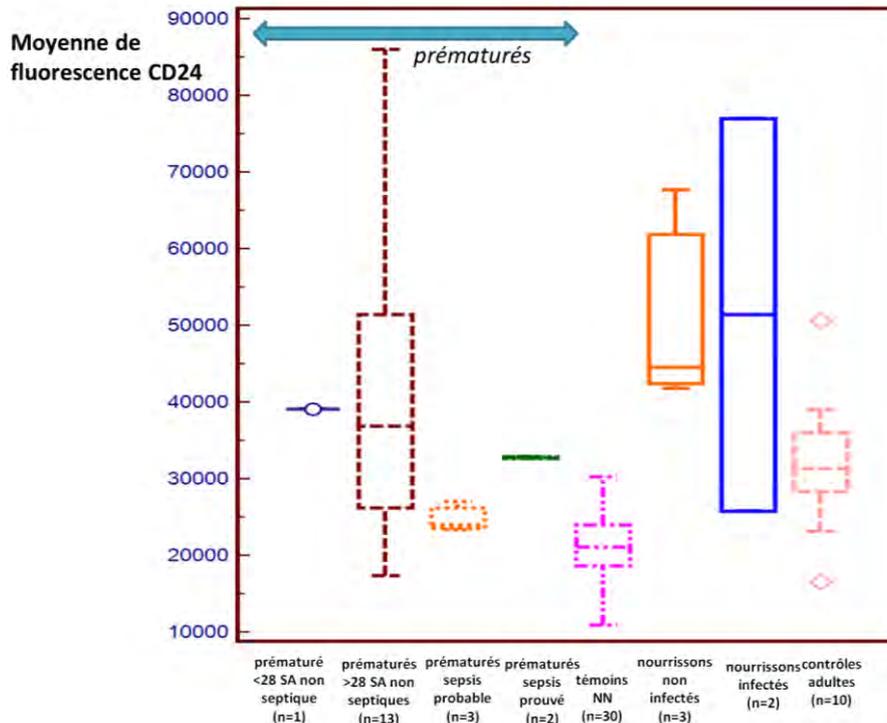


Figure 44 : moyennes de fluorescence du CD24 par groupe

4) CD11b

Le tableau et la figure suivantes illustrent les valeurs obtenues pour le CD11b, marqueur pour lequel il ne se dégage pas de tendances évidentes :

| Groupe | Moyenne de fluorescence CD11b |
|---|-------------------------------|
| prématuré < 28 SA non septique (n=1) | 17349 |
| prématurés > 28 SA non septiques (n=13) | 23459 ± 6326 |
| prématurés sepsis probable (n=3) | 13933 ± 5971 |
| prématurés sepsis prouvé (n=2) | 13276 ± 5573 |
| témoins nouveau-nés (n=30) | 23695 ± 6320 |
| nourrissons non infectés (n=3) | 41751 ± 19611 |
| nourrissons infectés (n=2) | 33826 ± 5823 |
| contrôles adultes (n=10) | 25431 ± 7685 |

Tableau 9 : moyenne de fluorescence de CD11b parmi les granuleux moins éosinophiles

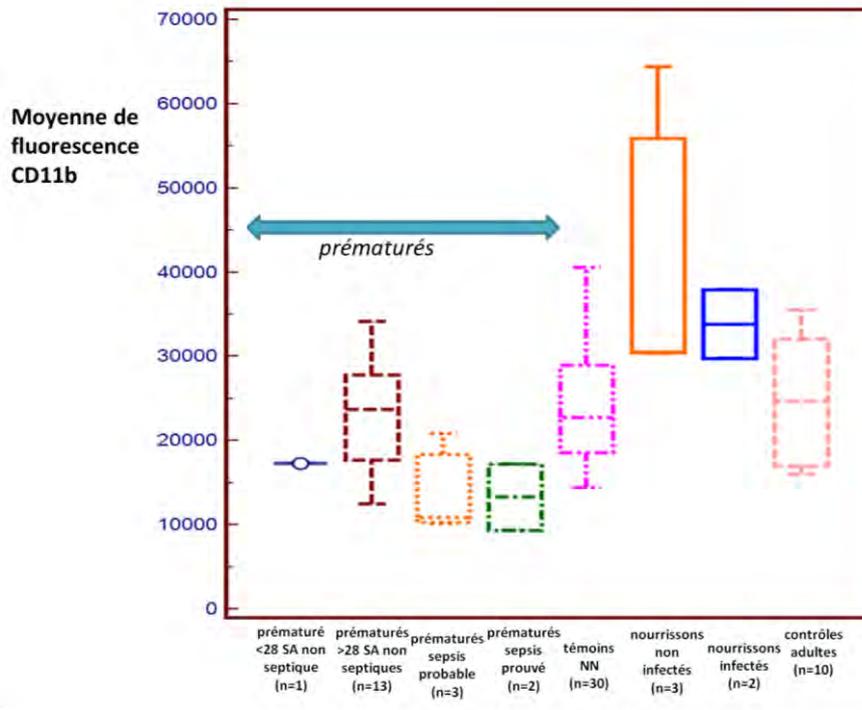


Figure 45 : Moyennes de fluorescence du CD11b par groupe

5.2.2.2. Etude des lymphocytes

Les tableaux et les figures suivantes illustrent les valeurs obtenues concernant l'immunophénotypage des lymphocytes :

| Groupe | Lymphocytose (G/L) | lymphocytose CD3+ (G/L) |
|---|--------------------|-------------------------|
| prématuré < 28 SA non septique (n=1) | 4.72 | 3.12 |
| prématurés > 28 SA non septiques (n=13) | 3.87 ± 1.03 | 2.71 ± 0.70 |
| prématurés sepsis probable (n=3) | 4.17 ± 2.27 | 2.29 ± 0.76 |
| prématurés sepsis prouvé (n=2) | 3.49 ± 3.00 | 2.77 ± 2.42 |
| témoins nouveau-nés (n=30) | 3.30 ± 0.84 | 2.65 ± 0.70 |
| nourrissons non infectés (n=3) | 3.38 ± 1.69 | 2.12 ± 1.11 |
| nourrissons infectés (n=2) | 2.74 ± 2.50 | 1.86 ± 1.90 |
| contrôles adultes (n=10) | 2.49 ± 0.45 | 1.71 ± 0.23 |

Tableau 10 : lymphocytose totale et CD3+

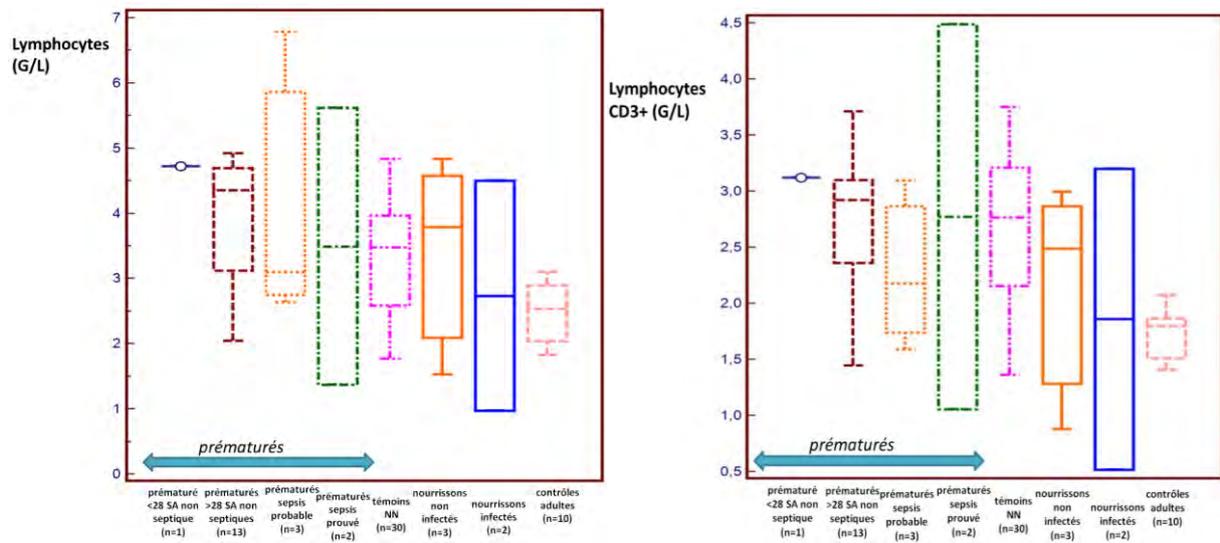


Figure 46 : lymphocytose totale (à gauche) et CD3+ (à droite)

On remarque une importante hétérogénéité des valeurs ainsi qu’une absence de tendance concernant la lymphocytose des différents groupes.

5.2.2.3. Etude des monocytes

Les tableaux et les figures suivantes illustrent les valeurs obtenues concernant l’immunophénotypage des monocytes :

| Groupe | Monocytes (G/L) | % Mo1 | % Mo2 | % Mo3 |
|---|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| prématuré < 28 SA non septique (n=1) | 4.64 | 74.30 | 22.88 | 0.77 |
| prématurés > 28 SA non septiques (n=13) | 1.37 ± 0.80 | 82.14 ± 5.29 | 13.14 ± 4.62 | 1.59 ± 1.46 |
| prématurés sepsis probable (n=3) | 2.53 ± 2.26 | 73.82 ± 7.70 | 22.00 ± 7.43 | 1.76 ± 1.10 |
| prématurés sepsis prouvé (n=2) | 2.22 ± 1.09 | 69.17 ± 10.33 | 26.06 ± 12.52 | 3.42 ± 1.20 |
| témoins nouveau-nés (n=30) | 1.30 ± 0.42 | 70.67 ± 7.77 | 17.76 ± 6.18 | 8.98 ± 3.97 |
| nourrissons non infectés (n=3) | 1.49 ± 0.95 | 63.74 ± 11.05 | 22.86 ± 9.56 | 10.64 ± 5.81 |
| nourrissons infectés (n=2) | 0.81 ± 0.49 | 74.07 ± 16.67 | 17.20 ± 11.93 | 3.28 ± 0.23 |
| contrôles adultes (n=10) | 0.63 ± 0.13 | 88.79 ± 2.29 | 2.66 ± 0.98 | 6.43 ± 1.66 |

Tableau 11 : monocytose et pourcentage de Mo1, Mo2 et Mo3 parmi les monocytes totaux

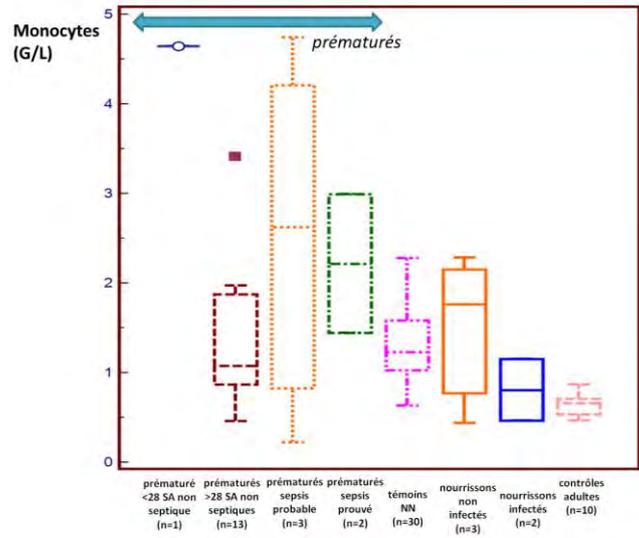


Figure 47 : monocytose totale

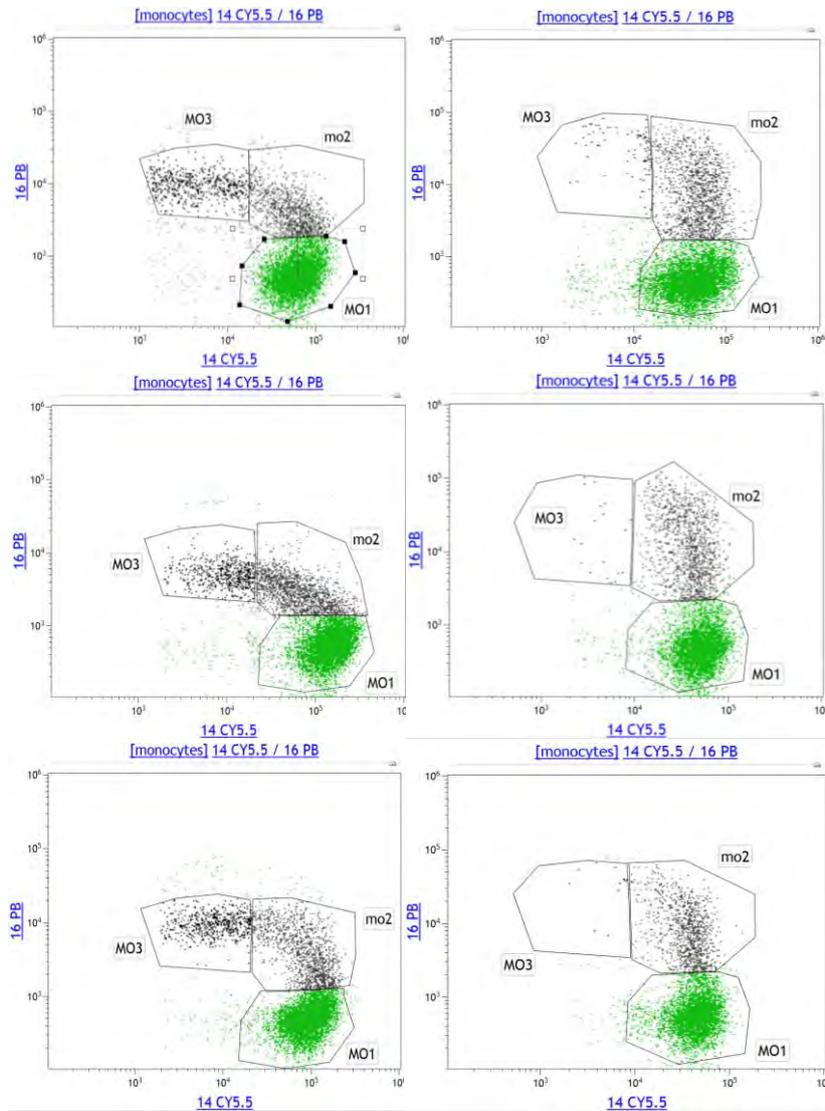


Figure 48 : profil CD14/CD16 des monocytes chez 3 NN sains (à gauche) et 3 NN grands prématurés (à droite)

Le profil de répartition habituel avec décalage vers la gauche dû à la présence de monocytes CD14- (Mo3) est remplacé chez les NN prématurés par un profil en flamme de bougie en raison parfois de la quasi absence de monocytes CD14- (Mo3) (voir figure 49).

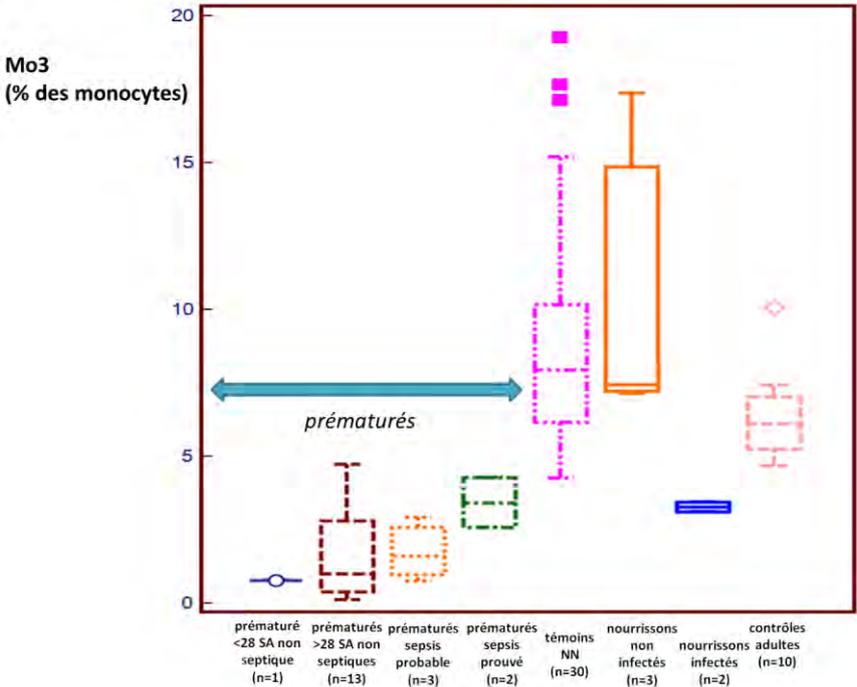


Figure 49 : proportion de Mo3 parmi les monocytes totaux par groupe

Fait intéressant, chez 3 patients de l'étude – un très grand prématuré (< 28 SA) classé sepsis probable et deux grands prématurés (28-32 SA) classés non septiques – ont été détectés des promonocytes à un taux significatif (figure 50)

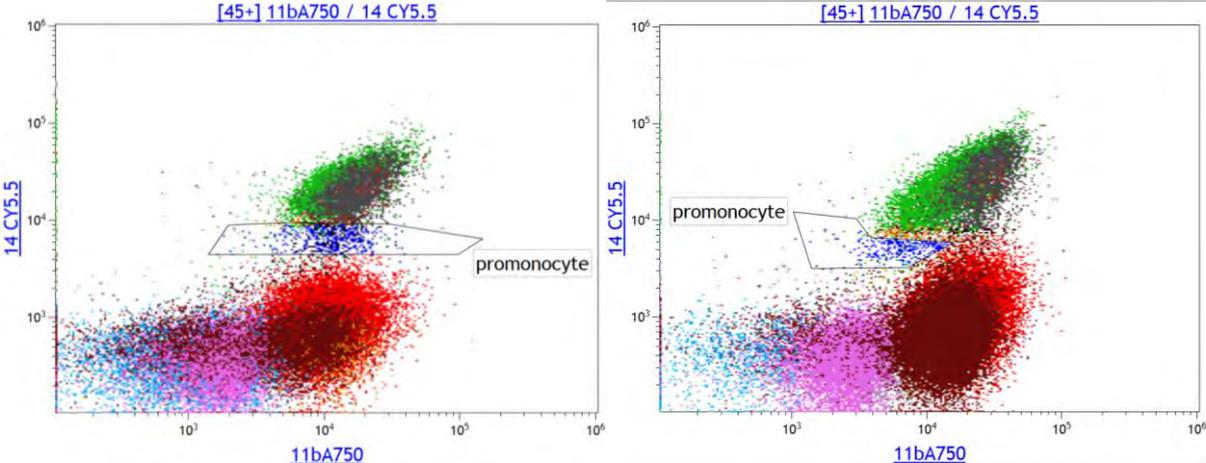


Figure 50 : fenêtrage en CD11b/CD14 faisant figurer la présence de promonocytes (graphes de deux patients de l'étude)

6. DISCUSSION

La comparaison entre nouveau-nés sains et adultes sains met en évidence l'existence de différences significatives :

- de par l'augmentation de la population de lymphocytes, notamment CD3+, ce point n'étant pas une surprise (formule dite « inversée » chez l'enfant) ;
- de par une plus grande proportion de monocytes notamment pro-inflammatoires chez le nouveau-né – la description de cette entité chez l'adulte (44) étant déjà récente (2015), aucune étude à ce sujet n'a été menée chez les nouveau-nés ;
- ainsi que de par la modification de l'expression de marqueurs caractéristiques de l'immaturité granulaire (CD10dim et CD16dim) et de l'inflammation (CD64+).

Sur ce dernier point, aucun des nouveau-nés sains n'avait de myélémie détectable en cytologie ; toutefois, une proportion significative de leurs granuleux présente une expression diminuée de CD10 et CD16.

De plus, la diminution significative de l'expression du CD24 sur les granuleux des contrôles adultes par rapport aux nouveau-nés témoins peut évoquer un retard d'acquisition de ce marqueur, ou tout au moins un passage dans le sang de cellules ne l'exprimant pas encore. Aucune tendance n'a été notée au sujet de l'expression du CD11b.

On peut intuitivement émettre l'hypothèse d'une présence dans le sang circulant de nouveau-nés sains de cellules non parfaitement matures, cette immaturité partielle, non détectable en cytologie à l'inverse de la CMF, ne présentant aucun retentissement clinique.

L'absence de certains marqueurs d'immaturité granulaire chez les nouveau-nés sains, et ce indépendamment de la présence de myélémie, évoque une immaturité médullaire qu'il serait intéressant de caractériser plus précisément.

*

En ce qui concerne les résultats préliminaires de l'immunophénotypage des nouveau-nés prématurés inclus, le groupe de patients classés « sepsis certain » semble – sous réserve du très faible nombre de patients inclus – présenter des profils de granuleux immatures CD10dim, CD16dim et pro-inflammatoires CD64+ plus fortement exprimés, conformément à la bibliographie disponible à ce sujet chez l'adulte.

En effet, le groupe des patients classés « sepsis certain » se détache nettement des autres groupes, à l'exception de l'unique patient prématuré < 28 SA ayant été retrouvé non septique, présentant un profil à part.

La diminution du CD16 apparaît d'exploitation plus intéressante que celle du CD10 – comme montré chez l'adulte, l'étude Septiflux 1 ne retrouvant pas de relation clinique significative entre la diminution de l'expression du CD10 seul et une expression normale de CD10 associée à une expression normale du CD16.

Pour CD16, chez tous les nouveau-nés prématurés hors sepsis certain, la proportion de granuleux CD16dim reste inférieure à 20%, tandis que les deux nouveau-nés dont le sepsis a été confirmé affichent une proportion de granuleux CD16dim avoisinant les 50% (figure 40). Ces valeurs semblent

à interpréter en fonction du degré de prématurité, l'unique nouveau-né prématuré < 28 SA classé non septique présentant lui aussi une importante proportion de CD16dim : ceci est à mettre en relation avec le fait que les prématurés extrêmes ont une myélocytémie circulante majeure, les granuleux immatures sous-exprimant de manière constante CD16. Ces seuils seraient donc à considérer en fonction du degré de prématurité, étant peut-être inutilisables chez les prématurés extrêmes avec une myélocytémie importante impliquant une forte proportion de granuleux immatures circulants. En revanche, aucune différence ne semble pour le moment être mise en évidence entre les populations « non septiques » (groupe 2) et « sepsis probable » (groupe 3). On rappelle que les seuils de gravité pour le sepsis chez l'adulte ont été fixés pour le CD16 à 16% (Septiflux 1) et 30% (Septiflux 2). Ces résultats encouragent à poursuivre l'étude en vue de l'obtention de résultats réellement significatifs.

La présence régulière d'une forte proportion de CD64+, marqueur inflammatoire, sur les granuleux de nouveau-nés exempts de toute pathologie, à mettre en relation avec notamment l'augmentation des monocytes Mo3, pose la question d'un possible état pro-inflammatoire présent au sein de cette population – pouvant être causé par le récent « traumatisme » de l'accouchement ?

Ceci est néanmoins à relativiser au vu de la très mince littérature disponible à ce sujet (une seule étude non publiée retrouvée (56), qui s'attache à comparer l'expression du CD64 sur les granuleux en fonction de l'âge), objectivant sur ce point une surexpression granulaire de ce marqueur tout au long de la petite enfance, bien que les chiffres ne soient pas disponibles.

Plus surprenante est la significative moindre expression du CD64 chez les prématurés ici classés « non septiques » par rapport aux nouveau-nés sains (5.2.2.1.), que l'on pourrait interpréter comme le fait que le CD64 pourrait être acquis progressivement jusqu'à atteindre des taux « normaux » de nouveau-nés.

L'usage de seuils pour le CD64 dans le sepsis s'impose chez le nouveau-né en raison d'une importante expression basale de ce marqueur dans la population néo-natale saine : concernant le CD64, il semble important de ne pas raisonner en positif/négatif dans les études à venir.

Il est à préciser que dans le protocole mis en œuvre dans l'étude faisant l'objet de cette thèse, il a été utilisé pour la mesure de l'expression du CD64 des réactifs « maison » sans étalon interne, à l'inverse des études citées tout au long de ce mémoire qui, elles, utilisaient un kit industriel avec étalon interne (dont Leuko64®).

Chez les nouveau-nés septiques inclus, on ne retrouve pas la lymphopénie qui accompagne généralement les sepsis sévères chez l'adulte, toutefois le faible nombre de patients ne permet de tirer aucune conclusion à ce sujet.

Les résultats de l'immunophénotypage des nourrissons admis aux urgences ne mettent en évidence *a priori* aucune tendance, d'une part en raison du très faible nombre de patients inclus, d'autre part du fait des très importantes disparités relevées au sein de la population et du caractère non sévère des situations septiques.

Plus anecdotique, l'immunophénotypage semble montrer certaines caractéristiques originales chez les nouveau-nés prématurés, notamment la quasi absence de monocytes CD14⁻ (Mo3), retrouvée constante chez les grands et très grands prématurés et la présence ponctuelle de promonocytes, mais à taux significatif.

CONCLUSION

Les résultats exposés dans ce mémoire ne sont que la présentation de la mise en place d'un travail amené à se poursuivre. Bien qu'encore insuffisants et non significatifs, les résultats préliminaires obtenus présentent déjà le mérite de dégager des tendances telles que relevées dans la littérature existante à ce sujet.

Dans le sepsis, l'objectif à terme de cette étude et des autres qui suivront demeure comme chez l'adulte de trouver un marqueur intéressant suffisamment sensible et spécifique – CD64 et CD16 semblant pour le moment les mieux placés en ce sens au vu de la bibliographie, possiblement associés à CD10 ou encore CD11b.

De plus, devant le développement de la CMF d'un point de vue technologique et notamment l'essor de la CMF « rapide » réalisée sur appareils miniatures, il sera probablement possible, dans un avenir proche, de quantifier les granuleux immatures par CMF 24/7 en utilisant un nombre réduit de marqueurs, d'où l'intérêt d'en sélectionner la meilleure combinaison et d'établir des seuils propres aux nouveau-nés prématurés ainsi qu'aux nourrissons.

*

Les prélèvements sanguins de nouveau-nés sont un matériel biologique d'étude tout à fait unique et original ; leur étude systématique et approfondie – hors cadre sepsis –, notamment en CMF, pourrait à terme permettre de mieux décrire l'immaturité médullaire chez les nouveau-nés et nourrissons, prématurés ou nés à terme, ou encore les jeunes enfants, et ainsi de caractériser précisément les mécanismes d'acquisition d'une hématopoïèse mature.

BIBLIOGRAPHIE

1. Jouault H, Imbert M. La cytométrie en flux: intérêt et applications en hématologie. Rev Fr Lab. 1995 Apr;1995(275):29–35
2. La cytométrie en flux RONOT Xavier, GRUNWALD Didier, MAYOL Jean-François, BOUTONNAT Jean [Internet]. Librairie Lavoisier. Available from: <http://www.lavoisier.fr/livre/sciences-de-la-vie/la-cytometrie-en-flux/ronot/descriptif-9782743008987>
3. Principe de fonctionnement d'un analyseur trieur. Université Paris Diderot, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251. [Internet]. Available from: <http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?rubrique99>
4. Rowley T. Flow Cytometry - A Survey and the Basics. Mater Methods [Internet], 2012. Available from: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
5. Labome, Flow Cytometry - A Survey and the Basics <https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
6. Belloc F. Les principes de la cytométrie en flux. Rev Fr Lab. 1991;218:21-27
7. Becton Dickinson. Introduction to Flow Cytometry : A Learning Guide [Internet]. Available from: http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf
8. Les anticorps monoclonaux : outil diagnostique en hématologie, G. Canellini O. Spertini, Rev Med Suisse 2004; volume 0. 23779
9. F. Solly, L. Rigollet, L. Baseggio et al., « Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study », Cytometry A, vol.83, p. 1066-1072, 2013
10. F. Lacombe, E. Bernal, D. Bloxham et al., « Harmonemia : a universal strategy for flow cytometry immunophenotyping-A European LeukemiaNet WP10 study », Leukemia, vol. 30, p. 1769-1772, 2016
11. <http://www.sciencegateway.org/resources/prow/index.html>
12. R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, W. J. Sibbald, The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee, « Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis », American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, 1992
13. Mervyn Singer, MD, FRCP; Clifford S. Deutschman, MD, MS; Christopher Warren Seymour, MD, MSc; et al., The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)
14. E. E. Davenport, K. L. Burnham, J. Radhakrishnan, P. Humberg, P. Hutton, T. C. Mills, « Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study », Lancet Respir Med, vol. 4, 2016, p. 259-271
15. M. Emonts, F. C. Sweep, N. Grebenchtchikov et al., « Association between high levels of blood macrophage migration inhibitory factor, inappropriate adrenal response, and early death in patients with severe sepsis », Clin Infect Dis, vol. 44, p. 1321-1328, 2007
16. J. P. Quenot, A. Pavon, I. Fournel et al., « Le choc septique de l'adulte en France : vingt ans de données épidémiologiques », Réanimation, vol. 24, p. 303, 2015
17. Mary T. Caserta, Sepsis neonatal (Sepsis neonatorum), University of Rochester Medical Center
18. Neonatal Sepsis, Shermadou ES, Mavrogeorgos G, 2018
19. M. Arzac, Le nouveau-né infecté : quelle place pour quel marqueur biologique ?, SPECTRA BIOLOGIE n° 161, Septembre - Octobre 2007
20. Pammi M, Weisman LE, Late-onset sepsis in preterm infants: update on strategies for therapy and prevention, 2015
21. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD, Early-onset neonatal sepsis, Clin Microbiol Rev. 2014 Jan; 27(1): 21–47
22. STOLL BJ, HANSEN N, FANAROFF AA, WRIGHT LL, CARLO WA, EHRENKRANZ RA, Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-lowbirth-weight infants, N. Engl. J. Med., 2002, 347, 240-247
23. Prématurité, ces bébés qui arrivent trop tôt, INSERM [internet] <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/prematurite>

24. D. Subtil, E. Petit, R Dessein, G Brabant, K Faure, PRÉMATURITÉ et INFECTION : état des connaissances, Université Nord de France – Université Lille 2 Droit et Santé [internet], consulté en septembre 2018
25. Recommandations pour la pratique clinique, Diagnostic et traitement curatif de l'infection bactérienne précoce du nouveau-né, Service des recommandations et références professionnelles, ANAES sept 2002, Arch. pédiatr., 2003, 10, 5, 489-496
26. MISHRA UK, JACOBS SE, DOYLE LW, GARLAND SM, Newer approaches to the diagnosis early onset neonatal sepsis. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed., 91(3), F208-F212
27. VERBOON MACIOLEK MA, THIJSEN SF, HEMELS MA, MENSES M., VAN LOON AM, KREDIET TG, GERARDS LJ, FLEER A., VOORBIJ HA, RIJKERS GT., Inflammatory mediators for the diagnosis and treatment of sepsis in early infancy, Pediatr. Res., 2006, 59(3), 457-461
28. HENGST JM, The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis, Adv. Neonatal Care, 2003, 3(1), 3-13
29. VAZZALWAR R., PINA RODRIGUES E., PUPPALA BL, ANGST DB, SCHWEIG L., Procalcitonin as a screening test for late onset sepsis in preterm very low birth weight infants, J. Perinatol., 2005, 25(6), 397-402
30. Pammi M, Weisman LE, Late-onset sepsis in preterm infants : update on strategies for therapy and prevention, Expert Rev Anti Infect Ther. 2015 Apr;13(4):487-504. Epub 2015 Feb 8
31. Dong Y, Speer CP, Late-onset neonatal sepsis: recent developments, Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2015 May;100(3):F257-63. doi: 10.1136/archdischild-2014-306213. Epub 2014 Nov 25
32. Y. Orr, D. P. Wilson, J. Taylor, P. Bannon, C. Geczy, M. Davenport, L. Kritharides, « A kinetic model of bone marrow neutrophil production that characterizes late phenotypic maturation », American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, vol. 292, p. R1707-1716, 2006
33. P. J. Cornbleet, « Clinical utility of the band count », Clin Lab Med, vol. 22, p. 101-136, 2002
34. Maxwell M. Wintrobe, Hématologie clinique, vol. 1, p 224
35. Rodrigo Cavallazzi, Charles-Lwanga Bennin, Aryn Hirani, Christopher Gilbert, and Paul E. Marik, Is the Band Count Useful in the Diagnosis of Infection ? An accuracy Study in Critically Ill Patients, 2010
36. M. Labriffe, Validation initiale des performances du microscope automatisé DM1200 et application dans le suivi pronostique du sepsis, 2018
37. Demaret J, Venet F, Friggeri A, Cazalis MA, Plassais J, Jallades L, Malcus C, Poitevin-Later F, Textoris J, Lepape A, Monneret G, Marked alterations of neutrophil functions during sepsis-induced immunosuppression, J Leukoc Biol. 2015 Dec;98(6):1081-90. doi: 10.1189/jlb.4A0415-168RR. Epub 2015 Jul 29
38. Bae MH et al., Flow cytometric measurement of respiratory burst activity and surface expression of neutrophils for septic patient prognosis, 2016
39. Guérin E, Orabona M, Raquil MA, Giraudeau B, Bellier R, Gibot S, Béné MC, Lacombe F, Droin N, Solary E, Vignon P, Feuillard J, François B, Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration, 2014
40. KUO-HSUAN HSU et al., Comparison of Fcg receptor expression on neutrophils with procalcitonin for the diagnosis of sepsis in critically ill patients, The College of Health Care, China Medical University, Taichung, Taiwan, 2011
41. Fabienne Venet, Alain Lepape, Guillaume Monneret, Clinical review : flow cytometry perspectives in the ICU – from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions, 2011
42. Gros A, Roussel M, Sauvadet E, Gacouin A, Marqué S, Chimot L, Lavoué S, Camus C, Fest T, Le Tulzo Y, The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients, 2012
43. Bae MH et al., Société internationale de cytométrie clinique Flow cytometric measurement of respiratory burst activity and surface expression of neutrophils for septic patient prognosis, 2015
44. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O et al., Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia, Francophone Myelodysplasia Group, 2015 Jun 4

45. Ferreira da Mota NV, Brunialti MKC, Santos SS, Machado FR, Assuncao M, Azevedo LCP, Salomao R, Immunophenotyping of Monocytes During Human Sepsis Shows Impairment in Antigen Presentation : A Shift Toward Nonclassical Differentiation and Upregulation of FCγR1-Receptor, 2017
46. Kaneko T et al., Reduced neutrophil CD10 expression in nonhuman primates and humans after in vivo challenge with E. coli or lipopolysaccharide, 2003
47. Martens A, Eppink GJ, Woittiez AJ, Eidhof H, de Leij LF, Septic patients had a significantly decreased CD10 expression capacity compared with healthy controls Neutrophil function capacity to express CD10 is decreased in patients with septic shock, 1999
48. T. Daix et al., Circulating immature granulocytes and T-cell lymphopenia predict clinical worsening of septic patients, 2018
49. Halek J, Novak M, Medkova A, Furst T, Juranova J, The role of nCD64 in the diagnosis of neonatal sepsis in preterm newborns, 2018
50. Soni S1, Wadhwa N, Kumar R, Faridi MM, Sharma S, Chopra A, Singh S, Evaluation of CD64 expression on neutrophils as an early indicator of neonatal sepsis, 2013
51. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, Wang C, Renna S, Koval N, Li FY, Ehrenkranz RA, Rinder HM, Bhandari V, Neutrophil CD64 with hematologic criteria for diagnosis of neonatal sepsis, 2014
52. Qin DJ1, Tang ZS, Chen SL, Xu XM, Mao SG, Zhang SF, Value of combined determination of neutrophil CD64 and procalcitonin in early diagnosis of neonatal bacterial infection [Article in Chinese] 2017
53. El Shimi MS, Abou Shady NM, Hamed GM, Shedeed NS, Significance of neutrophilic CD64 as an early marker for detection of neonatal sepsis and prediction of disease outcome, 2017
54. Miyake F, Ishii M, Hoshina T, Ichikawa S, Araki S, Kinjo T, Shibata E, Hachisuga T, Kusuhara K, Analysis of the Physiological Variation in Neutrophil CD64 Expression during the Early Neonatal Period. 2016
55. Aydin M, Barut S, Akbulut HH, Ucar S, Orman A, Application of Flow Cytometry in the Early Diagnosis of Neonatal Sepsis, 2017
56. Shoko Matsushita, Yoshiko Asakura, Yuko Hayashi, Mikiya Endo, Yukie Nakatsuji and Shigeki Ito, Normal Values for High Affinity Fc Gamma Receptor I (CD64) From Neonate to Young Adults, Blood 2012 120:4685
57. Elghetany MT Patel J, Assessment of CD24 expression on bone marrow neutrophilic granulocytes: CD24 is a marker for the myelocytic stage of development, 2002
58. CD11b EXPRESSION ON GRANULOCYTES AS A DIAGNOSTIC MARKER FOR NEONATAL SEPSIS Erica Weirich et al., Pediatric Research volume 39, page 303 (1996)
59. Davis HM, Carpenter DC, Stahl JM, Zhang W, Hynicka WP, Griswold DE, Human granulocyte CD11b expression as a pharmacodynamic biomarker of inflammation, J Immunol Methods, 2000 Jun 23;240(1-2):125-32
60. Drewry AM et al., Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality, Shock, 2014
61. Fabienne Venet, Guillaume Monneret, Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression, Nature Reviews Nephrology volume 14, pages 121–137 (2018)

ANNEXES

Annexe 1 : valeurs normales de l'hémogramme chez l'enfant jusqu'à 12 ans (P. S. Simpkin, R. F. Hinchliffe, R. J. Arceci, « Reference Values (chapitre 37) » dans Pediatric hematology, Ed. Blackwell, 3e éd., 2006)

| Âge | PNN | Lymphocytes | Monocytes | PNE | PNB |
|---------------|----------|-------------|-----------|---------|-------|
| 0-8j | 2.7-14.4 | 2.0-7.3 | 0-1.9 | 0-0.85 | 0-0.1 |
| 8j-2 sem | 1.5-5.4 | 2.8-9.1 | 0.1-1.7 | 0-0.85 | 0-0.1 |
| 2sem-2mois | 0.7-4.8 | 3.3-10.3 | 0.4-1.2 | 0-0.9 | 0-0.1 |
| 2-6 mois | 1-6 | 3.3-11.5 | 0.2-1.3 | 0.1-1.1 | 0-0.2 |
| 6 mois – 2ans | 1-8 | 3.4-10.5 | 0.2-0.9 | 0-0.9 | 0-0.1 |
| 2-6 ans | 1.5-8.5 | 1.8-8.4 | 0.15-1.3 | 0-1.1 | 0-0.1 |
| 6-12 ans | 1.5-8 | 1.5-5.0 | 0.15-1.3 | 0-1.0 | 0-0.1 |

Annexe 2 : valeurs normales de l'hémogramme chez l'adulte (X. Troussard, S. Vol, E. Cornet et al., « Full blood count normal reference values for adults in France », J Clin Pathol, oct. 2013)

| | Homme (années) | Min-max | Femme (années) | Min-max |
|-------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| PNN | 12-15 | 1.5-6 | déc-15 | 1.5-6 |
| | 16-49 | 1.78-6.95 | 16-44 | 1.75-7.50 |
| | 50-59 | 1.91-6.63 | 45-49 | 1.81-7.15 |
| | >60 | 1.85-6.14 | 50-54 | 1.72-6.29 |
| | | | >55 | 1.69-5.84 |
| Lymphocytes | 12-15 | 1.5-4.5 | déc-15 | 1.5-4.5 |
| | 16-39 | 1.34-3.92 | 16-29 | 1.37-3.96 |
| | >40 | 1.24-3.62 | >30 | 1.24-3.56 |
| Monocytes | 12-15 | 0.15-1.3 | déc-15 | 0.15-1.3 |
| | 16-39 | 0.23-0.77 | 16-29 | 0.20-0.71 |
| | >40 | 0.23-0.72 | 30-49 | 0.20-0.66 |
| | | | >50 | 0.19-0.60 |
| PNE | 12-15 | 0.05-0.8 | déc-15 | 0.05-0.8 |
| | 16-19 | 0.05-0.63 | 16-19 | 0.04-0.58 |
| | 20-29 | 0.05-0.59 | 20-49 | 0.04-0.55 |
| | 30-59 | 0.05-0.54 | >50 | 0.04-0.47 |
| | >60 | 0.05-0.58 | | |
| PNB | >12 | 0-0.1 | >12 | 0-0.1 |

Annexe 4 : types de cellules déduits à partir des caractéristiques du fenêtrage de chaque cellule étudiée

| Variable | Caractéristiques de fenêtrage |
|--|--|
| Lymphocytes 10 ⁹ /L | SSC ^{bas} , CD45 ^{haut} |
| Lymphocytes B, CD24+ 10 ⁹ /L | SSC ^{bas} , CD45 ^{haut} , CD24+ |
| Lymphocytes T, CD3+ 10 ⁹ /L | SSC ^{bas} , CD45 ^{haut} , CD3+ |
| Granuleux 10 ⁹ /L : | SSC ^{haut} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24- |
| - CD64 ^{pos} %* | SSC ^{haut} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, CD64+ |
| - CD10 ^{dim} et non CD16 ^{dim} % * | SSC ^{haut} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, CD10 ^{dim} -, non CD16 ^{dim} |
| - non CD10 ^{dim} et CD16 ^{dim} % * | SSC ^{haut} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, non CD10 ^{dim} -, CD16 ^{dim} |
| - CD10 ^{dim} et CD16 ^{dim} % * | SSC ^{haut} , CD45 ^{int} , CD14-, CD3-, CD24-, CD10 ^{dim} |
| Monocytes, 10 ⁹ /L | SSC ^{int} , CD45 ^{haut} , CD14+ |
| - expression augmentée du CD16, %* | SSC ^{int} , CD45 ^{haut} , CD14+, CD16+ |

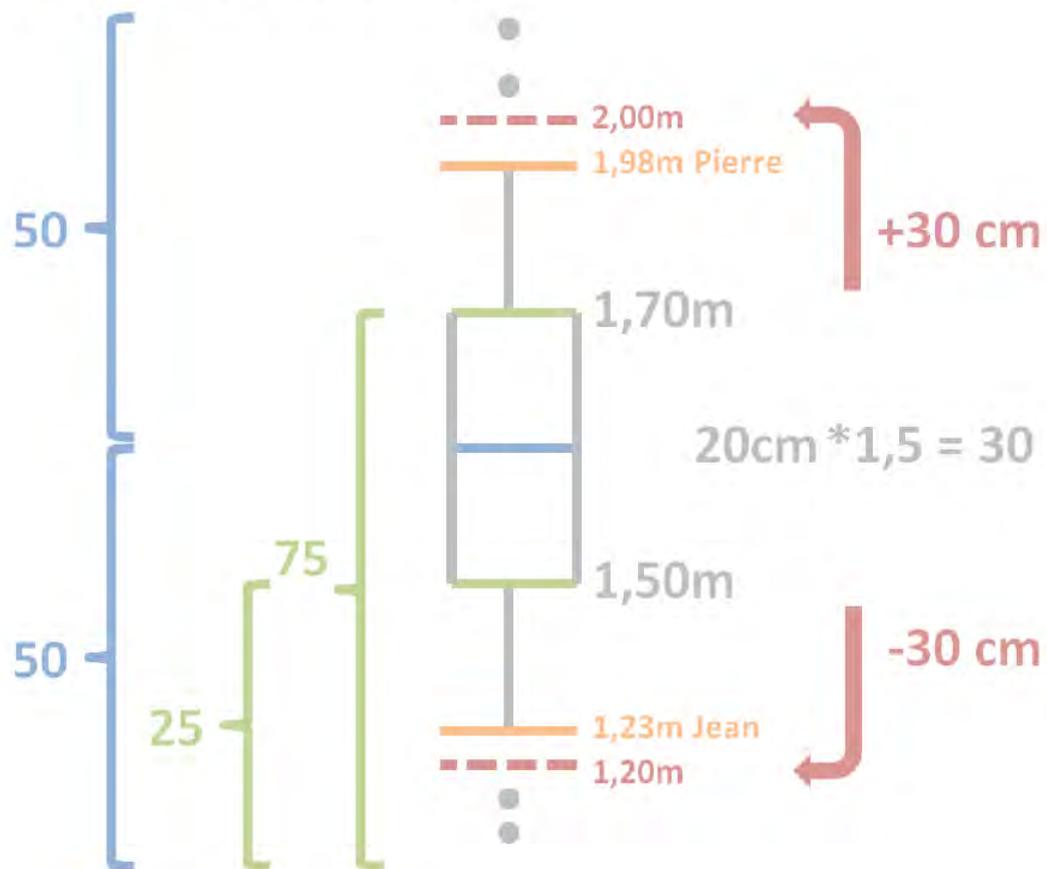
*Le seuil a été déterminé à partir d'un groupe contrôle

Annexe 5 : anticorps utilisés dans le protocole

| 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) | |

Annexe 6 : interprétation des box plots avec le logiciel MedCalc

Exemple pour les tailles de 100 personnes :



Sur les box plots tracés au moyen du logiciel MedCalc, le cadre central représente les valeurs du quartile inférieur au quartile supérieur (25^{ème} à 75^{ème} percentiles). La ligne médiane représente la médiane. La ligne horizontale s'étend du minimum au maximum, en excluant les valeurs extérieures et éloignées qui sont affichées sous forme de points séparés.

Une valeur extérieure est définie comme une valeur inférieure au quartile inférieur moins 1,5 fois l'intervalle interquartile ou supérieure au quartile supérieur plus 1,5 fois l'intervalle interquartile (clôtures intérieures).

Une valeur éloignée est définie comme une valeur inférieure au quartile inférieur moins 3 fois l'intervalle interquartile ou supérieure au quartile supérieur plus 3 fois l'intervalle interquartile (clôtures extérieures).

COMPARAISON DES VALEURS NORMALES DES POPULATIONS LEUCOCYTAIRES PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX ENTRE DES NOUVEAU-NÉS ET DES ADULTES SAINS



Inserm
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale



CHU
Limoges

E. Voirin-Mathieu¹ – P. Bothorel² – T. Larée² – L. Ponthier³ – C. El Hamel³ – J-B Woillard⁴ – C. Yardin⁵ – V. Guignonis³ – J. Feuillard⁴ – E. Guérin⁴
 1 : laboratoire d'hématologie, CHU Limoges – 2 : service de pédiatrie, CHU Limoges – 3 : CB-HME, Collection Biologique Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU Limoges et Service de pédiatrie, CHU Limoges – 4 : laboratoire de pharmacologie biologique et pharmacocinétique, CHU Limoges – 5 : CB-HME, Collection Biologique Hôpital de la Mère et de l'Enfant, CHU Limoges et Laboratoire de cytogénétique, CHU Limoges

INTRODUCTION

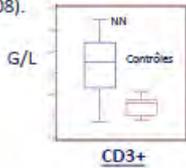
- ✓ Dans le sepsis, cause importante de mortalité néonatale, la présence de « band cells », de la myélémie, équivalents cytochimiques des granuleux immatures (GI) CD10dim et CD16dim et l'expression du CD64 sont bien connues. Au plan cytochimique, ces situations sont mal définies, mal codifiées et peu reproductibles.
- ✓ En CMF, dans une étude multicentrique (1), nous avons montré l'intérêt pronostique de la quantification des granuleux CD10dim, CD16dim et CD64+.
- ✓ Notre objectif est de transposer ces résultats chez les nouveau-nés (NN). Cette première étape a l'ambition de servir de base à l'établissement de normales pour mettre en place des seuils dans le diagnostic du sepsis chez le nouveau-né.
(1) T. Daix Chest, 2018

PATIENTS ET METHODES

- ✓ Une série de nouveau-nés sains nés à terme et des patients contrôles ont été prélevés entre juin et août 2018.
- ✓ Une NFS a été réalisée ainsi qu'une étude par cytométrie en flux en 8 couleurs (CD45, CD10, CD16, CD11b, CD3, CD14, CD24 et CD64) permettant d'isoler et de quantifier les lymphocytes CD3+, les granuleux CD64+, les granuleux immatures (expression diminuée du CD10 et du CD16) et les monocytes en évaluant la proportion de monocytes inflammatoires Mo2 (monocytes intermédiaires CD14+/CD16+) et Mo3 (monocytes non classiques CD14faible/CD16+)(2).
- ✓ La significativité a été déterminée par l'utilisation du test de Kruskal-Wallis.
(2) D. Selimoglu-Buet et al., leukemia, 2015

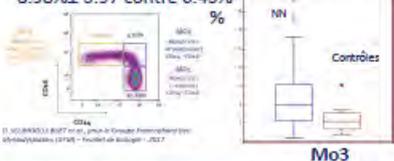
RESULTATS

- ✓ 30 nouveau-nés à J3 ont été comparés à 10 contrôles adultes (âge=27.9 ± 3.8 ans)
- ✓ La lymphocytose CD3+ est augmentée chez les nouveau-nés par rapport au contrôle (2.65G/L±0.7 contre 1.71G/L±0.23, p=0.0008).



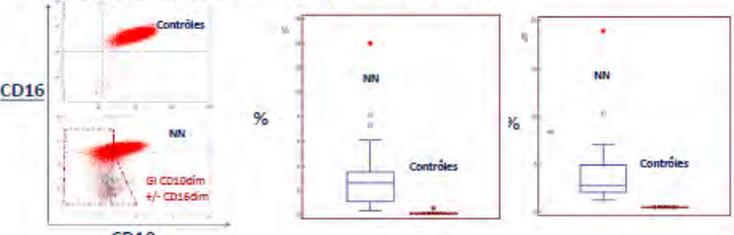
CD3+

- ✓ La monocytose est augmentée chez les nouveau-nés (1.30G/L±0.42 contre 0.63G/L±0.13, p<0.0001), celle-ci étant davantage composée de monocytes pro-inflammatoires Mo2 et Mo3 (respectivement 17.76%±6.18 contre 2.66%±0.98, p<0.0001 et 8.98%±3.97 contre 6.43%.



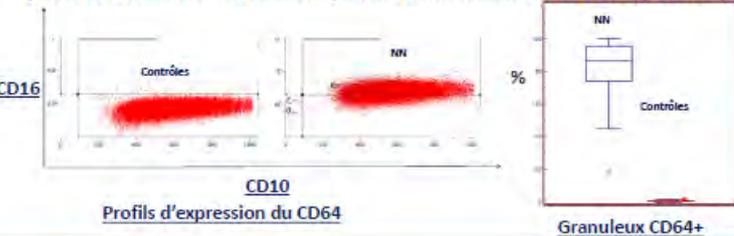
Mo3

- ✓ La proportion de granuleux immatures (GI) CD10dim et CD16dim est significativement plus élevée chez les NN par rapport aux contrôles (respectivement 3%±2.86 contre 0.17%±0.15, p<0.0001 et 4.05% ± 3.46 contre 0.5% ± 0.09)



Profils d'expression des GI chez un adulte sain et NN

- ✓ Il a été observé une expression du CD64 chez les nouveau-nés parmi les granuleux alors qu'elle est absente chez les contrôles (81.84% ± 18.99 contre 0.41% ± 0.36, p<0.0001).



Profils d'expression du CD64

CONCLUSION

- ✓ Il existe des différences significatives entre le profil cytométrique de nouveau-nés sains et d'adultes sains, mettant en évidence, au vu de l'augmentation de la population de lymphocytes CD3+, de monocytes notamment pro-inflammatoires ainsi que de la modification de l'expression de marqueurs de l'immaturité granulaire (CD10dim, CD16dim) et de l'inflammation (CD64+), un état pro-inflammatoire basal chez le nouveau-né sain.
- ✓ Cette étude, dont l'intérêt réside dans la comparaison entre une population néonatale saine et adulte saine, a pour objectif de servir de base à la mise en place de seuils dans le sepsis.

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

RESUME :

Le sepsis, reconnu priorité mondiale en matière de santé par l'OMS depuis 2017, est une cause majeure de morbidité et de mortalité, tant chez l'adulte que chez le nouveau-né.

De par son diagnostic difficile et son pronostic incertain, la prise en charge du sepsis néonatal demeure un défi avec peu d'outils tant sensibles que spécifiques en vue d'un diagnostic précoce et d'un pronostic fiable. De plus en plus d'études, principalement conduites chez l'adulte, mettent en lumière l'intérêt potentiel de la cytométrie en flux (CMF) dans ce but.

Cette thèse expose les premiers résultats de l'immunophénotypage leucocytaire en huit couleurs (CD3, CD10, CD11b, CD14, CD16, CD24, CD45, CD64) de nouveau-nés suspects de sepsis et de nouveau-nés non infectés. A l'instar des études menées chez l'adulte et bien que le nombre de patients inclus dans l'étude soit encore insuffisant, il en ressort notamment l'intérêt potentiel de l'utilisation des marqueurs CD64 et CD16, ainsi que la nécessité de déterminer préalablement des seuils différents de ceux appliqués chez l'adulte.

Devant le développement de la CMF d'un point de vue technologique et notamment l'essor de la CMF « rapide » réalisée sur appareils miniatures, il sera probablement possible, dans un avenir proche, de quantifier les granuleux immatures par CMF 24/7 en utilisant un nombre réduit de marqueurs, d'où l'intérêt d'en sélectionner la meilleure combinaison et d'établir des seuils propres aux nouveau-nés prématurés ainsi qu'aux nourrissons.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : pharmacie – biologie médicale

MOTS-CLES : cytométrie en flux – sepsis – infection – nouveau-né – prématurité – nourrisson – seuil – CD64 – CD16 – CD10 – immaturité médullaire – Navios®

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR ET DU LABORATOIRE :

Université Paul Sabatier – Toulouse III
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 chemin des Maraîchers
31062 TOULOUSE Cedex 9

Hématologie biologique
Centre de Biologie et de Recherche en Santé (CBRS)
2 avenue Martin-Luther-King
87042 Limoges Cedex

Directeur de thèse : Mme le Dr Estelle Guérin