



Effets de la régulation des “ Toll like receptors ” dans la réponse immunitaire néonatale aux infections à Gram négatif en zone d’endémie palustre

Sem Ezinmegnon

► To cite this version:

Sem Ezinmegnon. Effets de la régulation des “ Toll like receptors ” dans la réponse immunitaire néonatale aux infections à Gram négatif en zone d’endémie palustre. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ017 . tel-03346963

HAL Id: tel-03346963

<https://theses.hal.science/tel-03346963>

Submitted on 16 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Effets de la régulation des « Toll like
receptors » dans la réponse immunitaire
néonatale aux infections à Gram négatif en
zone d'endémie palustre

*Effects of Toll-like receptor regulation in the
neonatal immune response to Gram-negative
infections in malaria-endemic areas*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569 : innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for
Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté de pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 24 mars
2021, par Sem EZINMEGNON**

Composition du Jury

Pascal BOILEAU

PU-PH, Université Paris Saclay

Président

Valérie BIRAN

PU-PH, Université Paris Descartes

Rapporteur & Examinatrice

Arnaud MARCHANT

PhD, Université Libre Bruxelles (ULB)

Rapporteur & Examineur

François MALLET

PhD, DR1 bioMérieux

Examineur

Direction de la thèse

Pierre TISSIERES

PUPH, Université Paris Saclay

Directeur de thèse

Karen BRENGEL-PESCE

PhD, bioMérieux

Co-encadrante

Nadine FIEVET

PhD, CR, IRD Paris Descartes

Co-encadrante

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je voudrais rendre grâce à Dieu.

*J'adresse ma profonde gratitude à mon directeur de thèse **Pr Pierre Tissières** et mes encadrantes **Dr Nadine Fievet** et **Dr Karen BRENGEL-PESCE** pour avoir conduit ce travail, leurs disponibilités, leurs soutiens et la confiance accordée en ma personne.*

*J'exprime ma reconnaissance au **Pr Achille Massougbodji** et aux **Dr André Garcia** et **PACHOT Alexandre** pour m'avoir accueilli au sein de leur unité et laboratoire.*

*Je remercie les membres du jury : les Professeurs **Pascal BOILEAU**, **Valérie BIRAN**, **Arnaud MARCHANT** et les Docteurs **François MALLET**, **Karen BRENGEL-PESCE** et **Nadine FIEVET**, pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.*

*Merci aux **Docteurs Laurence Vachot**, **Marine Mommert** et à **François Bartolo** pour leurs disponibilités et toute l'aide apportées à la réalisation de ce travail.*

*Je remercie les **Docteurs Javier Yugueros-Marcos** et **Luis Augusto** pour leurs appuis et leurs précieux conseils.*

*Merci aux **Docteurs Agnès Aubouy**, **Gwladys Bertin**, **Valérie Briand**, **Nicaise Ndam** pour m'avoir initié à la recherche et les nombreux mots d'encouragement.*

*Merci à **Laurence Generenaz** et **Sophie Thibault** pour leurs assistances techniques.*

*Merci au personnel de bioMéreux, et particulièrement à **Adeline Bocquet** et **Alexandra Iannello** pour leurs amitiés et accompagnement.*

*Merci à tous les membres de l'équipe Endotoxines, Structures et Réponses de l'hôte (**Stéphanie**, **Simon**, **Enrique**, **Jordi**, **Thinhinane**, **Margaux**) pour leur gentillesse.*

*A mes collègues de IRD-IRCB Cotonou, **Firmine**, **Darius**, **Aurax**, **Rodolphe**, **Urbain**, **Basile**, **Caleb**, **Anael**, **Josué**, **Djamirou**, **Dramane**, **Canisius**, **Nawal**, **Wilisto**, **Razack**, **Erasme**, **Larissa**, **Armand**, **Landry**, **Manfred**, **Florent**, **Armand**, **Amour**, **Léonidas**, **Pépin**, **Charles**, **Bertin**, **Nadia**, **Honoré**, **Severin**, **Sophie**, **Romuald** merci pour les bons moments et le travail abattu.*

*Au **Pr mahana Wahib** et aux **Dr Justin Doritchamou**, **Samad Ibitokou**, **Komi Gbedandé** et **Rafiou Adamou**, merci pour vos encouragements.*

*A **Dr Gino**, **Atika** et **Tatiana**, merci pour les bons moments et pour la sympathie.*

*A mes amis, **Meschak**, **Roméo**, **Herman**, **Rostaing**, **Yvon**, merci pour votre soutien et votre amitié.*

*Mes sincères remerciements aux enquêteurs, aux infirmiers et aux médecins des structures hospitalières et des centres de santé pour l'immense travail accompli et aux mères et enfants ayant accepté de participer aux études **RECIPAL** et **SEPSIS**.*

A toute ma famille, merci de votre soutien.

*A mère **Jeanne Koutinhoun**, merci pour tous les sacrifices consentis.*

*A mes frères et sœurs, **Arnaud, Hermine, Naomi, Caleb** et leurs familles respectives, merci pour votre confiance en moi.*

*A ma tata **Clémence**, merci pour tes prières.*

*A mon épouse **Imelda Agondanou**, merci pour ton amour et ton soutien.*

Je dédie ce travail en la mémoire :

*De mon regretté Père **Pierre Ezinmegnon**, merci d'avoir été un exemple et un père aimant.*

*De mes regrettées filles **Djlomahouton** et **Videgla**.*

RESUME

Le sepsis néonatal est une des causes majeures de mortalité chez le nouveau-né dans le monde et particulièrement en Afrique sub-saharienne. Dans cette partie du monde où les infections palustres sont fréquentes chez les femmes enceintes, les expositions *in utero* aux antigènes de *P. falciparum* sont connues pour altérer les fonctions immunes du fœtus et sont à l'origine d'une plus grande susceptibilité du nouveau-né aux infections palustres et non palustres. Nos données précédentes et celles d'autres équipes suggèrent que le paludisme gestationnel jouerait un rôle important dans la pathogenèse des infections à bactérie Gram négatif par modulation *in utero* de la signalisation médiée par les Toll Like receptors (TLR).

Notre hypothèse est que l'exposition *in utero* aux antigènes de *P. falciparum*, module la signature transcriptionnelle des transcrits primaires de l'ARNm du complexe de reconnaissance des endotoxines MD-2/TLR4 du nouveau-né, modifiant la réponse de future l'hôte aux infections bactériennes.

Dans la première partie de notre travail, nous avons évalué la performance de biomarqueurs transcriptionnels (*CX3CR1*, *CD74*) et protéiques (PCT, IL-6, IL-10, IP-10) pour le diagnostic et le pronostic du sepsis néonatal chez les nouveau-nés en zone d'endémie palustre. Nos résultats montrent que la procalcitonine dans le sang de cordon n'est pas un biomarqueur suffisamment précis pour le diagnostic et le pronostic du sepsis néonatal. Une faible expression du *CD74* est prédictive de mortalité chez les nourrissons développant un sepsis néonatal et le ratio CD74/IP-10 pourrait être plus précis pour le diagnostic du sepsis néonatal comparé à tous les biomarqueurs et combinaisons cliniques étudiés.

La deuxième partie de notre travail s'est intéressée aux conséquences de l'exposition *in utero* aux antigènes plasmodiaux sur la régulation de l'expression des isoformes des transcrits primaires TLR4 (V1, V3, et V4) et MD-2 (L-long et SH-Short) dans la mise en place des réponses immunologiques du nouveau-né. Nos résultats ne montrent pas un effet du paludisme gestationnel sur la modulation de l'expression du complexe de reconnaissance MD-2/TLR4 et sa réponse aux endotoxines, mais plutôt un effet de l'exposition prénatale à des facteurs de risques infectieux sur l'expression du complexe MD-2/TLR4 avec une sur expression de l'isoforme courte MD-2SH impliquée dans l'inhibition de la réponse aux endotoxines.

Mots clés : Sepsis néonatal, paludisme gestationnel, biomarqueurs, immunité innée, *P. falciparum*, MD-2/TLR4

ABSTRACT

Neonatal sepsis is one of the major causes of newborn mortality in the world and particularly in sub-Saharan Africa. In this part of the world where malaria infections are common among pregnant women, *in utero* exposure to *P. falciparum* antigens is known to impair the immune functions of the foetus and is responsible for a greater susceptibility of the newborn to malaria and non-malarial infections. Our previous data and those of other teams suggest that gestational malaria may play an important role in the pathogenesis of Gram-negative bacterial infections through *in utero* modulation of Toll Like receptors (TLR) signalling pathways.

Our hypothesis is that *in utero* exposure to *P. falciparum* antigens modulates the transcriptional signature of the primary mRNA transcripts of the MD-2/TLR4 endotoxin recognition complex of the newborn, modifying the host response to bacterial infections.

In the first part of our work, we evaluated the performance of transcriptional (*CX3CR1*, *CD74*) and protein (PCT, IL-6, IL-10, IP-10) biomarkers for the diagnosis and prognosis of neonatal sepsis in neonates born in malaria endemic areas. Our results show that procalcitonin in cord blood is not a sufficiently accurate biomarker for the diagnosis and prognosis of neonatal sepsis. Low *CD74* expression is predictive of mortality in infants developing neonatal sepsis and the *CD74*/IP-10 ratio may be more accurate for the diagnosis of neonatal sepsis than all biomarkers and clinical combinations studied.

The second part of our work focused on the consequences of *in utero* exposure to plasmodial antigens on the regulation of TLR4 (*V1*, *V3*, and *V4*) and MD-2 (L-long and SH-Short) primary transcript isoform expression in the development of immunological responses in the newborn. Our results do not show an effect of gestational malaria on the modulation of the expression of the MD-2/TLR4 recognition complex and its response to endotoxins, but rather an effect of prenatal exposure to infectious risk factors on the expression of the MD-2/TLR4 complex with an overexpression of the short isoform MD-2SH involved in the inhibition of the endotoxin response.

Key words: Neonatal sepsis, gestational malaria, biomarkers, innate immunity, *P. falciparum*, MD-2/TLR4.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	I
RESUME.....	III
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIERES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
TRAVAUX DE THESE.....	11
INTRODUCTION	12
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. Sepsis néonatal	16
I.1 Définition	16
I.2 Épidémiologie	17
I.3 Les facteurs de risque.....	19
I.4 Physiopathologie	19
I.5 Diagnostic.....	21
I.6 Prise en charge	35
II. Paludisme gestationnel.....	38
II.1 Épidémiologie du paludisme.....	38
II.2 Physiopathologie	42
II.3 Immunité anti-palustre	43
II.4 Diagnostic et stratégie de lutte contre le paludisme.....	48
II.5 Particularité du paludisme gestationnel.....	50
III. Infections systémiques et régulation de la réponse immunitaire innée	53
III.1 Immunité Innée	53
III.2 Régulation de la réponse innée.....	61
PARTIE II : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE	66
PARTIE III : METHODOLOGIEArticle I : Présentation du protocole de recherche	69
PARTIE IV : RESULTATS ET DISCUSSION	80
RESULTATS.....	81
Article I: Biomarkers of neonatal sepsis in Sub Saharan Africa: A prospective, multicentre study.....	82

Article II : Perinatal risk factors of sepsis and not gestational malaria modules neonatal expression of MD-2/TLR4 isoforms.	134
DISCUSSION GENERALE.....	163
PARTIE V : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	171
REFERENCES.....	175

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
ARNm	ARN messenger
AUC	Area under curve
CD	Cluster of differentiation (Complexe Membranaire)
CD74	Chaîne invariante du CMH II
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule(s) Présentatrice(s) d'Antigène(s)
CpG-ODN	CpG oligodeoxynucleotide (ODN)
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
DBL	Duffy Binding Like
DC	Cellules dendritiques (Dendritic Cells)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EOS	Early-Onset sepsis
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR
HLA-DRm	HLA-DR monocytaire
HP	Hématie parasitée
Hz	Hémozoïne
IC95%	Intervalle de confiance à 95 %
IFN- γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
IP-10	IFN-g-inducible protein-10
kDa	kilo Dalton
LOS	Late-Onset Sepsis
LPS	Lipopolysaccharide
mDC	Cellule dendritique myéloïde
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NO	Monoxyde d'azote
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
OR	Odds ratio
PCA	Principal-component analysis
PCR	Polymerase chain reaction

PCT	Procalcitonine
pLDH	Plasmodium lactate déshydrogénase
PNN	Polynucléaire neutrophile
Poly I:C	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	Pattern Recognition Receptors
ROC	Receiver operating curve
SIRS	Syndrome de réponse inflammatoire systémique
TH1/TH2	Lymphocytes T auxiliaire(s) de type 1&2 (T helper type 1&2)
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TPI-SP	Traitement Préventif Intermittent-Sulfadoxine Pyrimétamine
Treg	Lymphocyte T régulateur
VSA	Variant Surface Antigens (Antigènes variants de surface)

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Sites potentiels d'infections du nouveau-né	20
Figure 2: Modifications du développement du système immunitaire humain au cours des premières années de la vie.	21
Figure 3: Régulation et fonctions de la CRP	24
Figure 4: Fonctions de l'IL-6 dans la réponse immunitaire	27
Figure 5: Effet d'IP-10 sur les isoformes CXCR3 dans les tissus humains	28
Figure 6: Fonctions de l'IL-10	29
Figure 7: Voie de signalisation CX3CR1-CX3CL1	33
Figure 8: Rôle de CD74 dans la voie de présentation de l'antigène	35
Figure 9: Traitement antibiotique chez un nouveau-né symptomatique	37
Figure 10: Structure du sporozoïte des parasites du genre Plasmodium	38
Figure 11: Cycle de vie de Plasmodium falciparum	40
Figure 12: Pays avec des cas de paludisme en 2000 et leur situation en 2019	41
Figure 13: Modèle des interactions entre les <i>antigènes P. falciparum et hôte</i>	43
Figure 14: Reconnaissance des antigènes plasmodiaux.....	47
Figure 15 : Cytoadhérence des érythrocytes infectés dans le PAG	52
Figure 16: Activation des cellules immunitaires sentinelles	54
Figure 17: Physiopathologie de la septicémie néonatale et du choc septique.	55
Figure 18 : structure de TLR.....	58
Figure 19: La voie de signalisation des lipopolysaccharides (LPS) / TLR4.....	60
Figure 20: Différents Modèles d'épissage alternatif	63
Figure 21: Épissage alternatif du gène TLR4.....	64
Figure 22: Identification du MD-2 humain.....	65
Figure 23: Expression des isoformes des gènes de l'immunité innée dans les EOS à bactéries à Gram négatif.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Signes cliniques pouvant évoquer un sepsis chez les nouveau-nés22

Tableau 2 : Reconnaissance des motifs microbiens par les récepteurs TLRs57

TRAVAUX DE THESE

Fievet N., Ezinmegnon S, Agbota G SEPSIS study group collaborators, On behalf of the SEPSIS study group, et al .SEPSIS project: a protocol for studying biomarkers of neonatal sepsis and immune responses of infants in a malaria-endemic region *BMJ Open* 2020;10:e036905. doi: 10.1136/bmjopen-2020-036905

Ezinmegnon, S., M. Mommert, N. Fievet, P. Tissieres, SEPSIS study group collaborators, On behalf of the SEPSIS study group (2020). " Host immunity biomarkers of neonatal sepsis: A prospective, multicentre study." (submitted)

Ezinmegnon, S., Thibault, Sophie, Augusto, L., N. Fievet, P. Tissieres, SEPSIS study group collaborators, On behalf of the SEPSIS study group (2020). "Perinatal risk factors of sepsis and not gestational malaria modules neonatal expression of MD-2/TLR4 isoforms." (en préparation)

AUTRES TRAVAUX EN RELATION AVEC LA THESE

Agbota, G., N. Fievet, B. Heude, M. Accrombessi, U. Ahouayito, E. Yovo, D. Dossa, L. Dramane, A. Gartner, S. Ezinmegnon, J. Yugueros Marcos, L. Vachot, P. Tissieres, A. Massougbdji, Y. Martin-Prevel, M. Cot and V. Briand (2020). "Poor maternal anthropometric status before conception is associated with a deleterious infant growth during the first year of life: a longitudinal preconceptional cohort." *Pediatr Obes* 15(1): e12573.

Agbota, G., K. Polman, F. T. Wieringa, M. Campos-Ponce, M. Accrombessi, E. Yovo, C. Roucher, S. Ezinmegnon, J. Y. Marcos, L. Vachot, P. Tissieres, A. Massougbdji, N. Fievet, M. Cot and V. Briand (2019). "Maternal malaria but not schistosomiasis is associated with a higher risk of febrile infection in infant during the first 3 months of life: A mother-child cohort in Benin." *PLoS One* 14(9): e0222864.

INTRODUCTION



Le sepsis néonatal est une des causes majeures de décès et de handicap chez le nouveau-né. Chaque année, environ 3 millions d'enfants meurent au cours des premiers mois de vie, 98 % de ces décès surviennent dans les pays en développement. L'Afrique Sub-Saharienne (ASS) est la région du monde confrontée aux enjeux les plus élevés en matière de survie de l'enfant. En 2017, le taux de mortalité des moins de cinq ans dans les pays à faible revenu était de 68 décès pour 1000 naissances vivantes, soit près de 14 fois le taux moyen des pays à revenu élevé (5 décès pour 1000 naissances vivantes). L'ASS a connu au cours de l'année 2017 plus de 1 million de décès néonataux. La majorité de ces décès (75 %) surviennent pendant la première semaine de vie. Les naissances prématurées, les complications intrapartum, les infections et les anomalies congénitales sont à l'origine de la plupart de ces décès ^{1,2}.

Pour répondre aux pathogènes, les nouveau-nés dépendent essentiellement de leur système immunitaire inné. Les Toll-like receptors (TLRs) représentent la première ligne de défense de l'hôte et jouent un rôle important dans l'orchestration des réponses régulatrices et inflammatoires aux pathogènes ainsi que dans l'initiation des réponses spécifiques des lymphocytes T et B ^{3,4}. Chez les enfants prématurés, la réponse aux pathogènes est faible et le taux de mortalité liée aux infections néonatales est élevé. En effet, les prématurés présentent une altération importante des fonctions immunes innées et régulatrices favorisant le sepsis néonatal ⁵⁻⁷ et les infections chroniques à plus long terme ^{8,9}. Le faible poids de naissance et ou les infections maternelles pendant la gestation augmentent le risque d'infections néonatales ¹⁰⁻¹² et de troubles du développement du microbiote intestinal ¹³⁻¹⁵.

En ASS, les femmes enceintes sont susceptibles de développer de nombreuses parasitoses qui constituent des entraves à la promotion de la santé de la mère et de l'enfant. En effet, les infections pendant la grossesse, tels que le paludisme et les schistosomiasis altèrent les fonctions immunes du fœtus et sont à l'origine d'une plus grande susceptibilité du nouveau-né aux infections et d'une altération de la réponse vaccinale ^{16,17}. Le paludisme associé à la grossesse (PAG) reste un problème majeur de santé publique en ASS, avec des risques augmentés d'anémie maternelle et de petit poids de naissance (PPN) ¹⁸⁻²⁰. La relation entre PAG et PPN résulte d'une altération des fonctions du placenta et de son développement, conduisant à un retard de croissance *in utero* (SGA: small for gestational age) et/ou à la prématurité ²¹. L'exposition *in utero* à des antigènes de *Plasmodium falciparum* modifie le développement immunitaire du nouveau-né et est un facteur de risque d'infection, prédisposant au paludisme pendant la première année de vie mais aussi à d'autres infections notamment bactérienne ^{22,23}.

Dans la réponse immunitaire du fœtus contre les antigènes plasmodiaux, les TLRs jouent un rôle primordial. Des études rapportent que l'IL-10 joue un rôle majeur via 1) les lymphocytes T régulateurs qui inhibent la mise en place des réponses TH1/inflammatoires dans le sang de cordon en réponse à une stimulation par des antigènes palustres ^{24,25} et 2) lors de la stimulation des TLRs, des concentrations élevées d'IL-10 sont associées à un risque augmenté d'infection palustre pendant la première

année de vie ²⁶. Nos données suggèrent que l'immunité anti-palustre du nouveau-né peut être compromise par des dysfonctionnements de la production d'IL-10, des TLRs et des lymphocytes Treg ²⁶. Au final le PAG et la prématurité pourraient avoir un impact similaire sur le système immunitaire du nouveau-né, avec les mêmes conséquences immunologiques. Sur la base d'expériences préliminaires, nous avons observé que l'absence de réponse chez les nouveau-nés issus de PAG à différents agonistes bactériens (dont les Lipopolysaccharide, LPS), était vraisemblablement liée à une modification *in utero* importante de la signature transcriptionnelle des TLRs induite par *P. falciparum* (données non publiées).

Les efforts des programmes nationaux et des institutions d'aide au développement et à la santé contribuent à faire diminuer la mortalité néonatale mais le taux de survie des enfants africains demeure un problème majeur ²⁷. Le poids de la prématurité en Afrique reste très important. Le manque d'outils diagnostic et pronostic des infections néonatales et le coût élevé des traitements restent également un frein à la réduction de la mortalité infantile.

Ces travaux de thèse qui s'inscrivent dans le projet SEPSIS réalisé en Afrique Sub-Saharienne et financé par bioMérieux et l'Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT) ont pour objectif de 1) mieux comprendre l'implication de *l'exposition in utero* aux antigènes plasmodiaux dans la survenue des sepsis néonataux et d'expliquer les mécanismes de contrôle des infections néonatales par le complexe de reconnaissance MD-2/TLR4 et 2) à proposer l'utilisation de biomarqueurs transcriptionnels (*CX3CR1*, *CD74*) et protéiques (IL-6, IL-10, IP-10, PCT) au diagnostic et au pronostic du sepsis néonatal. Les résultats de cette thèse pourront servir à valider ou à proposer de nouvelles stratégies ou des études interventionnelles chez les nouveau-nés prématurés pour restaurer les processus de maturation des réponses immunologiques innées afin de prévenir les infections futures.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



I. Sepsis néonatal

I.1 Définition

Le sepsis néonatal est une infection invasive d'origine bactérienne, virale ou fongique, qui se déclare au cours des quatre premières semaines de vie extra-utérine et qui peut entraîner une morbidité et une mortalité importantes. L'origine de l'agent pathogène peut être attribuée à une infection *in utero*, à une infection par la flore vaginale maternelle ou encore à une infection postnatale acquise à l'hôpital. La définition du sepsis néonatal ne fait pas consensus au sein des praticiens, mais elle inclut l'identification d'un pathogène dans les fluides biologiques (sang, LCR, urine) ^{28,29}.

Suivant le délai d'apparition des manifestations cliniques, le sepsis néonatal est classé en sepsis néonatal précoce et sepsis néonatal tardif. Cette classification aide à orienter le traitement car elle implique des différences dans le mode de transmission et les pathogènes responsables.

Sepsis néonatal précoce ou Early-Onset Sepsis (EOS)

L'EOS définit une infection bactérienne survenant dans les 72 heures après l'accouchement. Il est essentiellement dû aux micro-organismes, transmis verticalement de la mère au nouveau-né avant ou pendant l'accouchement ^{30,31}. Le nouveau-né peut également être infecté quand il inhale le liquide amniotique infecté ou quand il subit des lésions épidermiques causées par des instruments utilisés lors d'un accouchement assisté ³². Les streptocoques du groupe B (SGB) et *Escherichia coli* sont les micro-organismes les plus fréquemment associés aux EOS. SGB est plus fréquent chez les nourrissons à terme, et *E. coli* est plus important chez les prématurés ³³⁻³⁵. Ils représentent environ 70 % des résultats positifs des cultures de prélèvements vaginaux des femmes à l'accouchement ³⁴.

Sepsis néonatal tardif ou Late-Onset Sepsis (LOS)

Le LOS désigne les infections néonatales survenant après 72 heures selon la définition ou après les 7 premiers jours de vie et attribuées aux pathogènes habituellement contractés en hospitalisation, et dans la communauté ³⁶ mais peut également résulter de la manifestation tardive d'une infection transmise verticalement. L'incidence des LOS est inversement liée à l'âge gestationnel et au poids de naissance et peut entraîner à long terme des altérations neurodéveloppementales (paralysie cérébrale, retard psychomoteur, altérations cognitives) et visuelles (rétinopathie du prématuré) chez les nouveau-nés de faible poids de naissance et les grands prématurés ^{37,38}. Les bactéries fréquemment associées aux LOS sont les espèces de staphylocoques à coagulase négative et en particulier *Staphylococcus epidermidis*.

1.2 Épidémiologie

1.2.1 Incidence et Mortalité

Le sepsis néonatal est la première cause de morbidité périnatale dans le monde touchant plus de 3 millions de nouveau-nés chaque année ³⁹. En Afrique subsaharienne, le sepsis néonatal représente environ 16 % des causes de consultations et plus de la moitié des décès infantiles ^{2,39}. L'incidence du sepsis néonatal est d'environ 40 fois plus élevée et les taux de mortalité 2 fois plus élevés dans les pays à revenus moyens que dans les pays à revenus élevés ⁴⁰. Des études menées en Afrique ont montré une incidence de sepsis pour mille naissances vivantes de 39,3 en Afrique du Sud en 2019 et 18,2 au Nigéria en 2018 ^{41,42}.

Au niveau mondial, l'incidence des EOS est d'environ 1 à 2 pour 1000 nouveau-nés vivants et la mortalité liée aux EOS est plus élevée chez les nouveau-nés de très faible poids de naissance et les prématurés. Les taux de mortalité sont d'environ 3 % chez les nouveau-nés à terme, et 16 % chez les nourrissons de faible poids de naissance ⁴³⁻⁴⁵.

Contrairement aux EOS, les infections tardives contractées à l'hôpital sont courantes et touchent 25 à 30 % de nouveau-nés de très faible poids de naissance et l'incidence est de 6 à 10 % chez les nouveau-nés prématurés de 34 à 37 semaines de gestation. Le taux de mortalité est très élevé et atteint 36 % chez les nouveau-nés de très faibles poids de naissance entre 8 et 14 jours de vie ^{36,46}.

1.2.2 Epidémiologie microbienne.

Un grand nombre d'agents pathogènes ont été associés au sepsis au cours de la période néonatale. Cependant, la cause prédominante est bactérienne, même si certaines infections virales sont associées à une évolution fulgurante et à une mortalité significative ^{47,48}. Des études en Europe montrent que les bactéries à Gram-positifs représentent environ 34 % des agents pathogènes responsables des EOS et 61 % de ceux responsables des LOS. Inversement, les bactéries à Gram-négatifs représentent 58 % des cas des EOS et 26 % des cas des LOS ⁴⁷.

Les germes les plus couramment associés aux EOS sont le *Streptococcus agalactiae* et *Escherichia coli*. Une étude aux États-Unis a montré 43 % d'infections dues aux *Streptococcus agalactiae* (0-41 pour 1000 naissances vivantes) et 29 % à *E. coli* (0-28 pour 1000 naissances vivantes) chez les nourrissons qui développent un EOS. La plupart des nourrissons atteints d'une infection à SGB étaient à terme (73 %) et 81 % des nourrissons atteints d'une infection à *E. coli* étaient prématurés ⁴⁹. Plusieurs études ont décrit *E. coli* comme étant le principal agent pathogène associé aux EOS et à la mortalité chez les prématurés et les nourrissons de très petits poids de naissance ^{36,49,50}.

D'autres micro-organismes ont été également isolés et associés aux EOS avec de faibles proportions. Il s'agit des bacilles entériques Gram négatifs (*Klebsiella spp*, *H. Influenzae type b*, *Neisseria meningitidis*) et certains micro-organismes Gram positifs, (*Listeria*

onocytogènes), entérocoques (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*), streptocoques du groupe D (*Streptococcus bovis*), streptocoques alpha-hémolytiques et des staphylocoques (*S. pneumoniae*),^{33,35,51}. Les infections virales maternelles telles que : le virus de l'herpès simplex (VHS), les entérovirus, sont également impliquées dans les EOS. Environ 5 % des cas de VHS néonatal sont acquis *in utero*, 95% sont acquis peripartum, et postnatale^{52,53}.

La plupart des infections LOS sont acquises dans l'environnement après la naissance. Selon le National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), environ 70 % des infections LOS sont causés par des bactéries à Gram-positifs. Les données montrent majoritairement les Staphylocoques à coagulase négative (68 % des infections à Gram positif et 48% de toutes les infections), suivis par *S. aureus* (8 %), les espèces d'*Enterococcus* (3%), et GBS (2%)^{33,54,55}.

Contrairement à l'Europe où les bactéries à Gram positif sont prédominantes dans les infections néonatales, des études réalisées en Afrique montrent une prédominance des bactéries à Gram négatif qui représentaient 75,9 % des infections contre 24,1 % pour les bactéries à Gram positif⁵⁶. Les germes fréquemment retrouvés sont *E. coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* dans des proportions variables⁵⁶. Ces prédominances de germes observés dans les études africaines seraient la résultante des conditions précaires d'asepsie et la proportion élevée des infections bactériennes précoces. *Klebsiella Spp* et *Staphylococcus Spp* bien que retrouvés dans les infections materno-fœtales, sont des germes opportunistes^{57,58}.

1.2.3 Coût

La prise en charge des nourrissons atteints de sepsis nécessite plusieurs jours d'hospitalisation, un grand nombre de produits pharmaceutiques, des analyses biologiques et une surveillance continue du personnel de santé (infirmières et médecins). Cette mobilisation de ressources nécessite un coût financier important pour les familles surtout dans les pays à faibles revenus. La méta-analyse de Salman Omar regroupant 20 études de différents systèmes de santé (13 études en Amérique du Nord, 4 études en Asie de l'Est, 1 étude en Asie du Sud, 1 étude en Afrique du Nord et 1 étude en Europe) relève les coûts élevés que peut occasionner la prise en charge du sepsis néonatal. Les données rapportent des coûts qui varient de 222 à 33 635 dollars pour la prise en charge du sepsis y compris la méningite⁵⁹. Nous manquons de données pour estimer avec précision le poids économique de la prise en charge des infections néonatales en Afrique subsaharienne. Il est donc important de mener davantage d'études qui mesurent les coûts économiques de la maladie supportés par les familles et la société en général dans les pays à faibles revenus.

I.3 Les facteurs de risque

Les facteurs de risque du sepsis néonatal sont à la fois infantiles et maternels. Les facteurs de risque infantiles les plus importants sont la prématurité, le faible poids de naissance, les anomalies congénitales et les faibles scores APGAR (score de ≤ 6 à 5 min) ^{10,34}.

Les nouveau-nés prématurés de faible poids de naissance ont une incidence d'infection plus élevée que les nouveau-nés de poids normal nés à terme ^{28,60}. L'immaturité du système immunitaire, notamment chez les prématurés, les faibles taux d'immunoglobulines liés à la diminution du transfert transplacentaire des IgG maternelles, sont également des facteurs qui augmentent le risque des infections néonatales ^{61,62}. Dans la mesure où 20 % des nouveau-nés de faible poids de naissance nécessitent souvent des procédures médicales invasives et plusieurs jours d'hospitalisation, l'utilisation prolongée de cathéters intravasculaires, l'exposition aux antibiotiques et l'utilisation d'équipements contaminés sont d'autres facteurs qui augmentent les risques de LOS ^{10,28,63}.

S'agissant des facteurs de risque maternels, les plus essentiels sont une rupture prématurée des membranes > 18 heures et une chorioamniotite (infection intra-amniotique). La chorioamniotite, ou l'infection intra-amniotique, est le facteur majeur associé au risque des EOS et à la mortalité qui en résulte ^{64,65}. L'infection intra-amniotique est cliniquement caractérisée par une fièvre maternelle (≥ 38 °C ou $\geq 100,4$ °F) et au moins deux des éléments suivants : leucocytose maternelle ($> 15\,000$ cellules/mm³), tachycardie maternelle (> 100 bpm), tachycardie fœtale (> 160 bpm), l'utérus de bois et odeur malodorante du liquide amniotique ⁶⁵. Une analyse de 9391 données couples mère-enfant aux Etats-Unis a montré une association entre l'infection intra-amniotique et EOS suspectés [OR 4.01 (3.16-5.08)] et EOS confirmés [OR 4.93 (1.65-14.74)] ³²

Outre les facteurs de risque infantiles et maternels, des soins prénataux médiocres ou tardifs, un statut socio-économique bas, une mauvaise nutrition maternelle, une toxicomanie maternelle, le sexe masculin est un des facteurs sociaux supplémentaires associés au sepsis néonatal ^{34,66}

I.4 Physiopathologie

Le sepsis néonatal est dû à une rupture de l'intégrité de la barrière de l'hôte, soit physique soit immunologique, et à la pénétration de l'agent pathogène dans le sang. Les différents sites potentiels d'infections du nouveau-né sont indiqués dans la figure 1.

Quatre voies de contamination sont habituellement distinguées :

- le mode ascendant, par migration de l'agent infectieux de la flore vaginale à la cavité utérine où elle peut se développer et infecter à la fois le fœtus et la mère (*Streptococcus agalactiae*).
- le mode hématogène par transmission du germe de la mère à l'enfant par la voie sanguine via le placenta (*Listeria*, SARS-CoV-2) ⁶⁷.
- le mode de contamination par passage dans la filière génitale, lorsque le germe présent dans le canal vaginal est transmis au nouveau-né lors de l'accouchement (*Streptococcus agalactiae*, entérobactéries)
- la transmission lors de gestes médicaux qui concernent les infections nosocomiales (*Streptococcus epidermidis*).

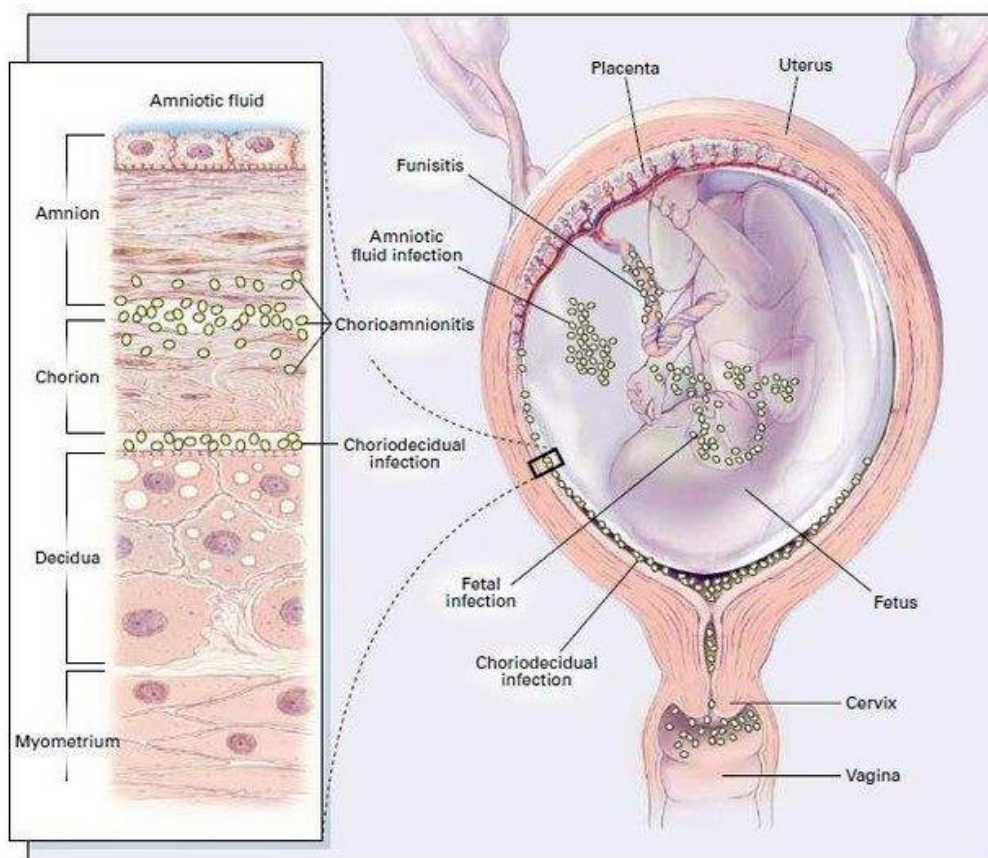


Figure 1: Sites potentiels d'infections du nouveau-né. ⁶⁸

La littérature indique que l'âge gestationnel et l'âge postnatal sont des facteurs importants qui influent sur les réponses immunitaires de l'hôte lors de l'infection ^{69,70}. L'immaturation du système immunitaire inné néonatal (activité phagocytaire et d'opsonisation réduite, faibles niveaux de complément, et immunité humorale et à médiation cellulaire immature) rend les nouveau-nés et particulièrement les prématurés plus vulnérables aux infections. En effet, les mécanismes de

développement de l'immunité débutent *in utero* mais n'achèvent leur maturation qu'après la naissance. Ce développement se fait à travers plusieurs processus :

La mise en place de réponses immunitaires innée et adaptative, les échanges cellulaires entre la mère et le fœtus et le transfert d'immunoglobulines maternelles au fœtus. La figure 2 illustre les événements de maturation qui se produisent dans les principales fonctions immunitaires adaptatives et innées du fœtus à l'adulte.

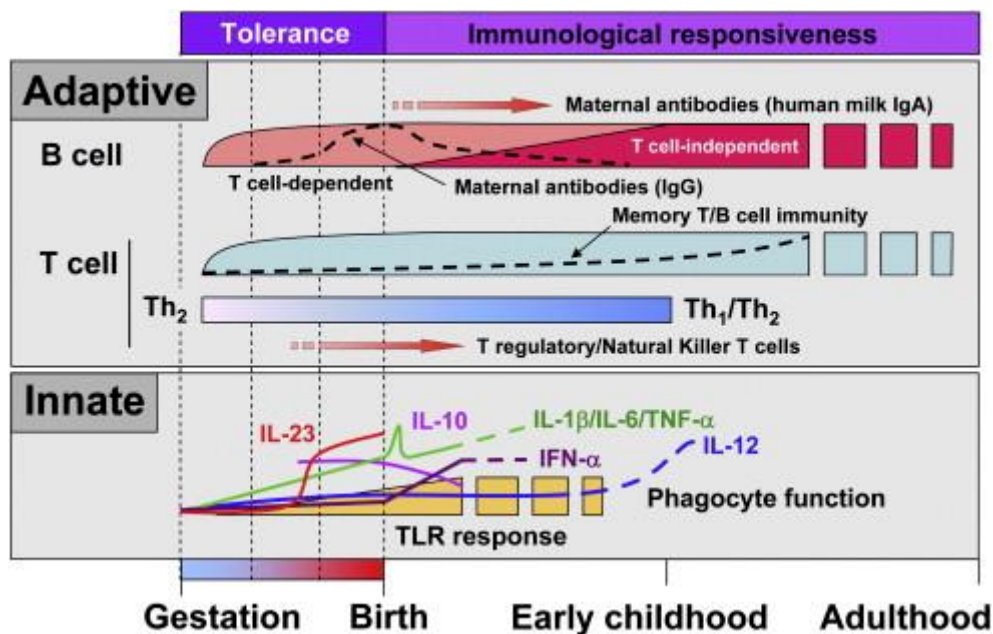


Figure 2: Modifications du développement du système immunitaire humain au cours des premières années de la vie.

(Partie supérieure) Transfert d'anticorps maternels transplacentaires (IgG) principalement en fin de gestation, suivi d'une protection des anticorps maternels (IgA) acquis à travers le lait maternel après la naissance. Les anticorps du nourrisson atteignent leur pleine maturité plus tard, au cours de la petite enfance. Les cellules T néonatales sont largement biaisées en faveur des réponses de type II.

(Partie inférieure) Les réponses des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23) et anti-virales (IFN- α) sont largement atténuées chez les prématurés, alors que la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est relativement élevée en fin de gestation et à la naissance.⁹

I.5 Diagnostic

I.5.1 Diagnostic clinique

Les signes et symptômes du sepsis néonatal sont non spécifiques et très souvent le diagnostic ne peut être établi avec certitude que sur la base des résultats de laboratoire, notamment ceux de la culture microbiologique. Malheureusement, les résultats de ce test ne sont disponibles que plusieurs heures (48 heures en moyenne) après le prélèvement. A défaut des résultats, les pédiatres ont pour habitude de considérer que «tout nouveau-né qui va mal, surtout sans raison apparente, est a priori suspect

d'infection» ⁷¹. Ils se fient donc à l'examen clinique pour orienter le diagnostic et engager un traitement. En plus de l'anamnèse, les pédiatres tiennent compte des facteurs de risque qui sont susceptibles d'augmenter le risque de sepsis chez le nourrisson. Malheureusement, certaines manifestations cliniques ne sont pas fiables et de nombreux signes précoces peuvent être simplement dus à la prématurité ou à la transition du nouveau-né vers la vie extra-utérine ^{49,72}. Cette difficulté diagnostique est à la base du nombre élevé de nourrissons soignés à tort pour le sepsis ainsi que les prescriptions d'antibiothérapie à large spectre qui participent à l'émergence de bactéries résistantes ⁷³. Les signes cliniques d'infection chez le nouveau-né apparaissent dans les 24 à 48 premières heures de vie, mais ils sont en réalité présents dès la naissance.

Le tableau 1 résume les signes cliniques généralement évocateurs du sepsis néonatal.

	Signes cliniques
Signes généraux	Fièvre, instabilité de la température, "ne va pas bien", mauvaise alimentation, œdème
Système gastro-intestinal	Distension abdominale, vomissement, hépatomégalie
Système respiratoire	Apnée, dyspnée, tachypnée, grognement ou cyanose
Système rénal	Oligurie
Système cardiovasculaire	Pâleur, peau froide et moite, tachycardie, hypotension, ou bradycardie
Système nerveux central	Irritabilité, léthargie, tremblements, convulsions, hypotonie, réflexe de Moro anormal, respiration irrégulière, fontanelle pleine, ou cris aigus
Hématologie	Jaunisse, splénomégalie, pâleur, pétéchies, purpura, ou saignement

Tableau 1 : Signes cliniques pouvant évoquer un sepsis chez les nouveau-nés
50,74,75

1.5.2 Diagnostic biologique

Tests biologiques conventionnels

a. Culture microbiologique et Numération de la formule sanguine (NFS)

La culture et l'identification de l'agent pathogène dans les fluides biologiques (sang, LCR, urine, liquide pleural, liquide articulaire et les fluides péritonéaux) restent les tests de référence pour le diagnostic du sepsis néonatal. La majorité des bactéries en cause

étant détectées en moins de 48 heures, il est recommandé d'attendre 48 heures d'incubation pour que la négativité des hémocultures permette d'exclure le diagnostic d'infection chez un nouveau-né asymptomatique. L'étude menée par l'Agence européenne des médicaments (EMA) en 2019 pour évaluer ses critères de diagnostic de sepsis néonatal, a montré que la culture microbiologique ne détectait que 11,4 % des patients septiques ⁷⁶. Dans trois études menées en Afrique sub-saharienne et en Tanzanie, le taux de positivité des hémocultures chez des nouveau-nés à risque d'infections est compris entre 25 et 54 % ⁷⁷⁻⁷⁹. La culture microbiologique est donc un test présentant de faibles valeurs de sensibilité et de spécificité pour le diagnostic des infections néonatales. La difficulté de prélèvement sanguin chez les nouveau-nés ainsi que les faibles quantités de sang prélevé pour la culture diminuent d'avantage l'efficacité du test ⁸⁰.

Un autre test biologique habituellement utilisé comme aide au diagnostic et à la démarche thérapeutique est l'hémogramme et en particulier la numération des leucocytes totaux (T), la numération absolue et immature des neutrophiles (I), et le rapport I/T. Une étude multicentrique des numérations globulaires chez 293 nouveau-nés admis dans des unités de soins intensifs néonataux aux États-Unis a montré qu'un faible nombre de leucocytes, un faible nombre de neutrophiles absolu et un ratio élevé de I/T sont associés à une augmentation des risques d'infection (odds ratios: 5,38, 6,84 et 7,97, respectivement). La spécificité était comprise entre 73,7 et 99,9 % et les valeurs prédictives négatives étaient supérieures à 99,8 %. Cependant, les sensibilités étaient faibles (0,3-54,5 %) pour tous les indices de numération globulaire complète analysés ⁸¹. Les valeurs de l'hémogramme ne sont pas spécifiques pour un diagnostic précoce du sepsis néonatal ^{82,83}, mais une interprétation correcte basée sur certains facteurs (l'âge gestationnel, facteurs de risque) et en combinaison avec d'autres marqueurs peut augmenter la sensibilité du diagnostic.

b. La protéine C-réactive (CRP)

La CRP est le marqueur biologique le plus largement utilisé pour le diagnostic des infections bactériennes. Elle est synthétisée par le foie, en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine 6 (IL-6) et l'IL-1 β sécrétées suite à une infection bactérienne ou virale ^{84,85}. Les ARNm de la CRP sont également retrouvés dans les cellules extra-hépatiques, tels que les macrophages, les cellules pulmonaires, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales des tubules corticaux rénaux, les lymphocytes et les tissus adipeux ^{84,86}. Après synthèse et libération dans la circulation, le taux sérique de CRP augmente rapidement dans les 6 heures après le début de l'infection et atteint son pic entre 24 et 48 heures. Cette valeur baisse rapidement dès que l'inflammation est résolue. La CRP joue plusieurs rôles importants dans le processus inflammatoire ^{87,88} (figure 3).

Les niveaux sériques de la CRP peuvent être mesurés au laboratoire en 1 heure en utilisant 20 μ L de sérum. En absence d'infection les taux sériques sont généralement

très faibles (de 5 mg/L à 10 mg/L), mais s'élèvent à des concentrations détectables à la suite d'un stimulus infectieux ou inflammatoire sur une période de 12 à 24 heures. Chez les nouveau-nés exposés aux infections néonatales, les taux sériques de CRP peuvent être multipliés par plus de 100 et diminuer avec une demi-vie d'environ 18 à 24 heures lorsque le stimulus cesse ⁸⁹. Dans une étude incluant 147 nouveau-nés, l'équipe de Effat Hisamuddin a montré que pour le diagnostic du sepsis néonatal, la CRP avait une sensibilité à 76,96%, une spécificité à 53,49 % avec un AUC à 70 %. Les valeurs prédictives positive et négative étaient à 80 % et 48,94 % respectivement ⁹⁰. A la manifestation des premiers signes cliniques, le dosage de la CRP montre une sensibilité de 40 % et on note une augmentation de la sensibilité jusqu'à 90 % si le test est effectué 24 heures plus tard ⁹¹. L'utilisation de la CRP montre cependant des limites. Des résultats faussement positifs et faussement négatifs ont été rapportés et révèlent que la CRP était positive dans 46,5 % de cas de sepsis négatifs en culture, alors qu'elle était négative dans 23,7 % des cas de sepsis avéré en culture. Dans 3 cas de sepsis prouvés en culture, la CRP était positive à 0 heure et son niveau a augmenté après 72 heures, malgré un traitement antibiotique empirique ^{90,92}. Au final, la CRP ne peut être considérée comme un bon test de dépistage précoce du sepsis néonatal que si elle est intégrée dans un système de notation impliquant d'autres tests biologiques et symptômes cliniques associées.

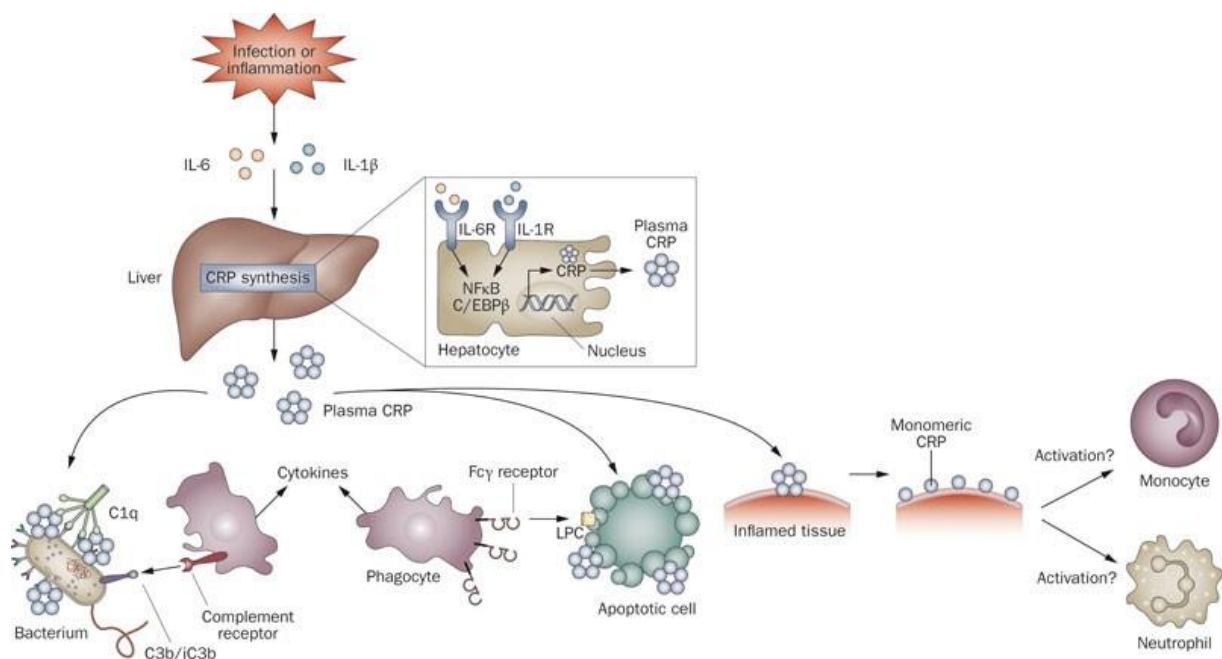


Figure 3: Régulation et fonctions de la CRP

Après sa synthèse dans le foie, la CRP circulante opsonise les bactéries et les cellules mourantes, et facilite leur élimination par phagocytose à médiation par le complément. La PCR circulante facilite également la dissociation de la PCR pentamérique en sous-unités monomériques, ce qui favorise les interactions monocyteendothéliales et un état pro-inflammatoire ⁹³.

c. La Procalcitonine (PCT)

La PCT est un peptide précurseur de la calcitonine composé de 116 acides aminés et d'une glycoprotéine 14,5 KDa. Il est normalement synthétisé à faibles concentrations ($<0,1\mu\text{g/l}$) dans les cellules C de la glande thyroïde, mais ses niveaux peuvent augmenter en cas de septicémie, de méningite, de pneumonie et d'infection des voies urinaires. En cas d'infection bactérienne, elle est produite par les macrophages, les monocytes, ainsi que les cellules C de la thyroïde et certains organes tels que les poumons et les intestins ⁹⁴⁻⁹⁶. Les taux sériques sont détectés dans les 3 à 4 heures après l'infection, atteignent leurs pics entre 6 et 12 heures et reviennent à des niveaux normaux après 24 heures une fois l'infection contrôlée. Les niveaux de PCT dans les syndromes infectieux doivent être interprétés en prenant en compte les facteurs de risques, l'examen clinique et, si possible, les tests microbiologiques des patients ^{29,97}.

En néonatalogie, la PCT est considérée comme un biomarqueur hautement sensible dans le diagnostic des infections bactériennes avec une valeur prédictive négative très élevée (87-100 %) ^{94,97,98}. Une méta-analyse, comprenant 16 études sur 1959 nouveau-nés, a démontré que la PCT peut différencier efficacement le sepsis et le SIRS d'origine non infectieuse avec une sensibilité de 81 % (74-87 %), une spécificité et 79 % (69-87 %) et une AUC de 0,85 ⁹⁹. Cependant les performances de la PCT dans le cas du sepsis néonatal précoce est encore un sujet de controverse. Les niveaux de PCT augmentent faussement dans des conditions non infectieuses comme l'asphyxie à la naissance, l'hypoxémie néonatale et l'hémorragie intracrânienne ¹⁰⁰. La PCT est tout de même très utilisée comme guide dans la gestion des infections en temps réel par les laboratoires cliniques. L'équipe de Martin Stocker a mené une étude sur 2440 nouveau-nés à risque accru des EOS qui montre que la prise de décision guidée par la PCT s'est avérée meilleure aux soins standards pour réduire l'antibiothérapie chez les nouveau-nés dont on soupçonne un EOS ²⁹.

1.5.3 Les nouveaux tests émergents

L'avènement des techniques de biologie moléculaire et cellulaire a permis d'accroître la découverte de nouveaux marqueurs pour le triage des patients pédiatriques suspectés d'infections. Bien que ces biomarqueurs ne soient pas encore utilisés dans la pratique hospitalière, ils constituent des pistes sérieuses pour améliorer la stratification et la prise en charge des patients.

Les Cytokines

En absence de stimuli, les niveaux sanguins des cytokines sont généralement très faibles (indétectables aux limites inférieures de sensibilité de l'analyse standard de laboratoire, généralement de 5 mg/L à 10 mg/L), mais s'élèvent à des concentrations détectables à la suite d'un stimulus infectieux ou inflammatoire sur une période de 12

à 24 heures. Dans le cadre des sepsis néonataux certaines cytokines sont produites rapidement, avant même les protéines de la phase aiguë citées plus haut (CRP, PCT). Ces cytokines sont produites de façon abondante et précoce et sont détectables dans le sang des nourrissons avant l'apparition des signes de l'infection ¹⁰¹. Certaines de ces cytokines pourraient être utilisées dans la pratique clinique pour diagnostiquer EOS et LOS ^{83,102}.

Dans ce document, nous parlerons des cytokines IL-6, IL-10, IP10 qui ont fait l'objet de notre étude.

a. Interleukine 6 (IL-6)

L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle produite par différentes cellules immunes (monocytes, fibroblastes, ostéoblastes, cellules lymphocytaires, etc). Elle joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire, inflammatoire, et dans l'hématopoïèse (figure 4). Durant la phase aiguë d'une infection, des quantités relativement importantes d'IL-6 sont produites et elle stimule la sécrétion des protéines de la phase aiguë. L'IL-6 participe également avec d'autres cytokines (l'interleukine-1, facteur de nécrose tumorale) à stimuler les cellules T, accroître le nombre de cellules B productrices d'anticorps et stimuler la sécrétion d'hormones. Son taux plasmatique augmente au cours d'infections bactériennes, virales ou parasitaires, de maladies auto-immunes et dans certaines tumeurs.

Le dosage sérique de L'IL-6 dans les 12 premières heures de vie apparaît intéressant pour le diagnostic précoce de l'infection chez le nouveau-né. Son élévation rapide et franche est plus performante pour différencier les nouveau-nés sains, des nouveau-nés qui développeront l'infection dans les 48 heures suivantes ^{71,103,104}. Deux méta-analyses effectuées sur 46 publications, constituées de 4179 nouveau-nés révèlent les performances de l'IL-6 à diagnostiquer et à pronostiquer le sepsis néonatal ^{103,105}. Les résultats montrent une sensibilité de 79 %, une spécificité de 84 % et une AUC à de 0,89.

D'autres études sur différentes cohortes ont montré également un taux élevé de la valeur d'IL-6 dans le sang de cordon des nouveau-nés atteints de sepsis néonatal. Ces études ont rapporté des sensibilités de 87 à 100 %, avec des valeurs prédictives négatives de 93 à 100 % ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. La précision du diagnostic peut être améliorée en combinant l'IL-6 et la PCT dans les 48 premières heures d'un sepsis clinique présumé ¹⁰⁹.

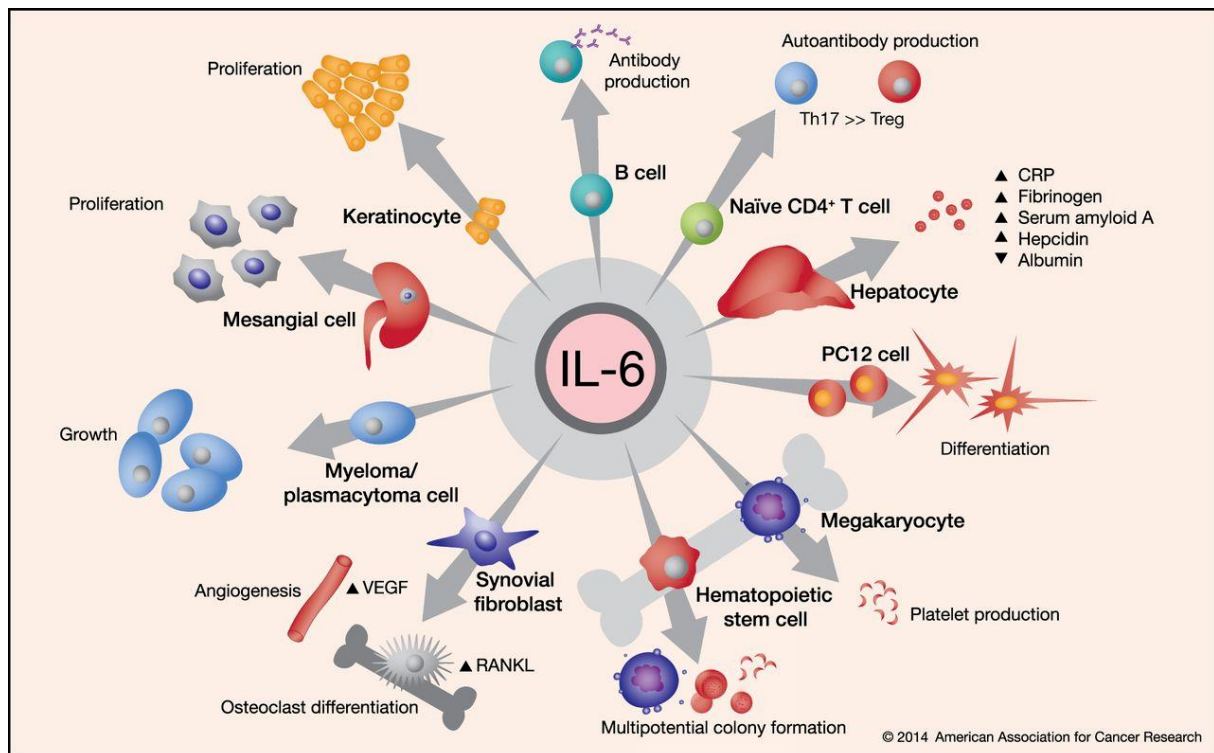


Figure 4: Fonctions de l'IL-6 dans la réponse immunitaire. ¹¹⁰

L'IL-6 induit la production de protéines de phase aiguë telles que la protéine C-réactive (CRP), le fibrinogène, l'amyloïde A sérique (SAA) et l'hépcidine, qui peuvent réduire la synthèse d'albumine dans les hépatocytes. Des niveaux élevés de sérum amyloïde A et d'hépcidine provoquent respectivement une amylose amyloïde et une anémie inflammatoire. Dans la moelle osseuse, l'IL-6 induit la maturation des mégacaryocytes en plaquettes et favorise l'activation des cellules souches hématopoïétiques. En outre, l'IL-6 favorise la différenciation des ostéoclastes et l'angiogenèse, la prolifération des kératinocytes et des cellules mésangiales, ainsi que la croissance des cellules de myélome et de plasmocytome.

b. Interféron gamma induite par la protéine 10 (IP-10)

La chimiokine CXC chemokine motif 10 (CXCL10) également appelée IP-10 est produite lors des infections et inflammations en réponse aux interférons de type I et de type II (IFN) tels que IFN α / β et IFN γ ¹¹¹. IP-10 active le récepteur CXCR3, un récepteur de chimiokine qui est fortement exprimé sur les cellules T effectrices et joue un rôle important dans le transfert et la fonction des cellules T vers les sites d'inflammation. Le CXCR3 est rapidement induit sur les cellules naïves après activation et reste fortement exprimé sur les cellules T CD4⁺ de type Th1 et les cellules T CD8⁺ effectrices ^{112,113}. La figure 3 montre l'effet d'IP-10 sur les isoformes CXCR3 dans les tissus humains (figure 5).

Des études cliniques ont montré de fortes concentrations plasmatiques d'IP-10 chez les patients septiques et une corrélation de ces fortes concentrations avec la gravité du sepsis chez les patients adultes ^{114,115}. Une étude réalisée sur des nouveau-nés à risque accru d'infection bactérienne a révélé que les taux plasmatiques d'IP-10 étaient plus élevés dans le groupe des nourrissons qui ont fait l'infection par rapport au

groupe de nourrissons sains. Les niveaux d'IP-10 observés dans le plasma avaient une meilleure précision diagnostique que la PCT pour indiquer la présence d'une infection bactérienne. Pour un niveau plasmatique supérieur à 48,2 pg ml/1, l'IP-10 présentait une sensibilité à 81 %, une spécificité à 94,9% avec une AUC à 0,87 pour le diagnostic de l'infection bactérienne ¹¹⁶

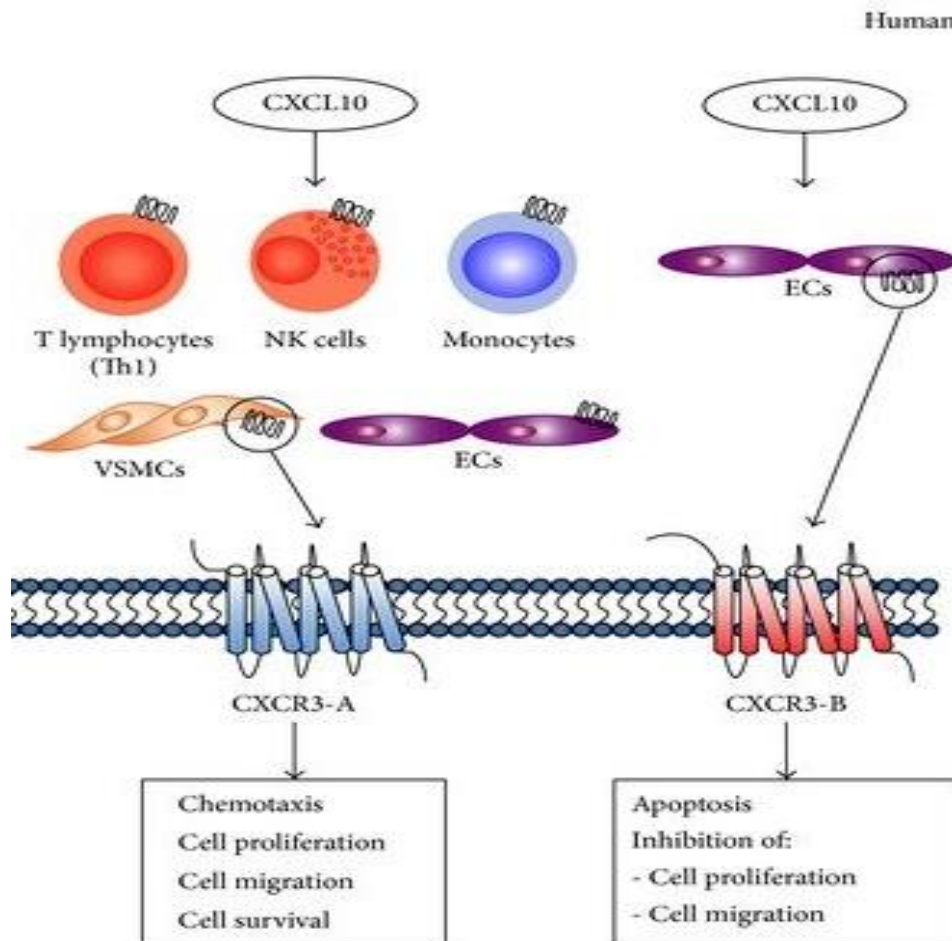


Figure 5: Effet d'IP-10 sur les isoformes CXCR3 dans les tissus humains

Le CXCR3 est exprimé par les lymphocytes T (Th1), les monocytes, les cellules NK, les VSMC (cellules musculaires lisses vasculaires) et les cellules endothéliales (ECs). Après s'être lié à IP-10, le récepteur CXCR3-A assure la médiation des fonctions cellulaires, telles que la chimiotaxie, la prolifération cellulaire, la migration et la survie. Un deuxième isoforme, connue sous le nom de CXCR3-B, est identifiée dans la liaison à IP-10. CXCR3-B est principalement exprimée par les cellules endothéliales et est connue pour favoriser l'apoptose cellulaire et inhiber la prolifération et la migration des cellules

¹¹⁷

c. Interleukine 10 (IL-10)

L'IL-10 est la cytokine clé du système immunitaire qui régule et supprime l'expression des cytokines pro-inflammatoires pendant les phases de récupération des infections

réduisant ainsi les dommages causés par les cytokines inflammatoires. Elle est produite par les leucocytes, y compris les cellules T et B, les cellules dendritiques, les cellules T $\gamma\delta$, les cellules NK, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les kératinocytes en réponse à un stimulus. Par son effet inhibiteur sur les macrophages et les cellules dendritiques, l'IL-10 restreint les réponses immunitaires contre les agents pathogènes et la flore microbienne. IL-10 est impliquée dans la production des protéines anti-inflammatoires (IL-1 et TNF) ¹¹⁸ et l'augmentation du potentiel phagocytaire des monocytes ¹¹⁹. Lors d'une infection aiguë, une expression altérée de l'IL-10 peut améliorer l'élimination des agents infectieux, mais également exagérer la réponse inflammatoire et entraîner une immunopathologie et des lésions tissulaires ^{120,121} (figure 6). A l'inverse, une production exacerbée de l'IL-10 peut entraîner une immunosuppression favorisant une infection persistance ^{122,123}.

L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive largement proposée comme biomarqueur pour identifier les patients adultes à risque accru de mortalité après un choc septique ^{124,125}. Une étude a révélé que les taux de l'IL-10 étaient significativement élevés chez les nouveau-nés septiques par rapport au groupe de contrôle et que les valeurs prédictives du sepsis néonatal étaient 5,1 (IC à 95% : 4,5-5,6) fois plus élevées que dans le groupe contrôle ¹²⁶. Chez les nouveau-nés prématurés septiques, les concentrations élevées de l'IL-10 sont associées à la mortalité ^{127,128}.

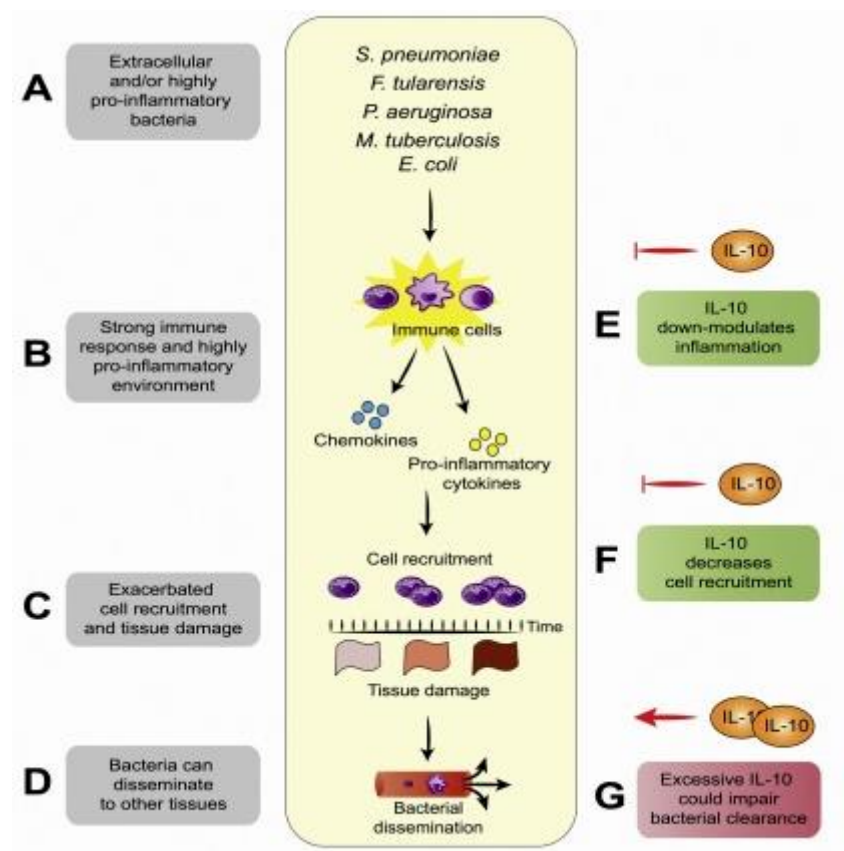


Figure 6: Fonctions de l'IL-10

L'IL-10 contribue à la survie de l'hôte lors d'infections provoquées par des bactéries extracellulaires ou hautement pro-inflammatoires. (A) Des bactéries induisent une forte réponse immunitaire. (B) La réponse immunitaire contre ces pathogènes bactériens est forte, créant un environnement hautement pro-inflammatoire caractérisé par la production de cytokines telles que $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IL-1\beta$. (C) La production de chimiokines entraîne un recrutement important de cellules dans les tissus infectés ; et l'inflammation génère des dommages tissulaires, qui augmenteront avec le temps, à moins que l'inflammation ne soit régulée à la baisse. (D) Les bactéries qui réussissent à échapper au système immunitaire peuvent se disséminer dans le sang et d'autres tissus. (E) L'IL-10 contribue à rétablir l'équilibre entre les réponses inflammatoires et suppressives. (F) La production d'IL-10 diminue le recrutement des cellules inflammatoires dans les tissus infectés. (G) Cependant, une quantité trop importante d'IL-10 pourrait produire une sur-suppression de la réponse inflammatoire et contribuer à la dissémination des bactéries, ce qui entraverait leur élimination ¹²⁹.

Les marqueurs de surface cellulaires

Grâce à la cytométrie en flux, plusieurs antigènes de surface cellulaires ont été identifiés comme de potentiels marqueurs diagnostic du sepsis néonatal. Il s'agit notamment de CD11b, CD64 et HLA-DR. Leurs expressions à la surface des cellules augmentent rapidement dans les minutes qui suivent l'exposition aux produits bactériens ¹³⁰⁻¹³³. Ces marqueurs sont facilement dosés en cytométrie avec de très faibles volumes (50-10 μ l) de sang total. CD11 β et CD64 ont montré de très bonnes performances pour le diagnostic des EOS et LOS ainsi que pour le pronostic de l'infection.

La méta-analyse de Ji Dai ¹³⁴ portant sur 7 études (2213 nouveau-nés) ainsi que les études de cohorte de Streimish ¹³⁵ et de Lynema ¹³⁶ (749 et 371 nouveau-nés respectivement) ont rapporté une expression de CD64 élevée chez les nouveau-nés présentant un sepsis comparés aux groupes contrôles. Ces études montrent des valeurs de performance élevées pour le diagnostic du sepsis néonatal (sensibilité : de 80 à 100 %, spécificité : 83 à 97 % valeurs prédictives négatives : 75 % à 100 %).

Au cours de l'infection, l'expression de CD11b augmente sur les neutrophiles et les monocytes. CD11b est impliquée entre autres dans le processus de la phagocytose, la cytotoxicité à médiation cellulaire et la chimiotaxie. CD11b est considéré comme un marqueur très efficace dans le diagnostic des infections néonatales précoces avec une expression élevée par rapport aux nouveau-nés non infectés ^{133,137}.

L'HLA-DR est un récepteur de surface cellulaire du CMH de classe II, constituant un ligand pour le récepteur des lymphocytes T (TCR). Le système HLA de classe II contient des gènes classiques (DP, DR, DQ) et des gènes apparentés (DO et DM). Les gènes classiques codent pour des protéines retrouvées principalement à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (monocytes-macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B, lymphocytes T activés et cellules activées de l'endothélium vasculaire). Parmi les molécules de classe II, le système moléculaire DR est majoritairement représenté (trois à cinq fois plus que les molécules DP ou DQ). Tous les monocytes du sang circulant expriment de façon constitutive les molécules HLA-DR à leur surface ¹³⁸.

La faible expression de HLA-DR monocyttaire (mHLA-DR) témoigne d'une altération des fonctions monocytaires. mHLA-DR est reconnu comme un marqueur fiable de l'immunoparalysie chez les adultes, permettant d'évaluer l'état d'immunocompétence du système immunitaire ^{132,139}. Chéron et al ont rapporté qu'une faible expression de mHLA-DR apparaît comme un marqueur des dysfonctionnements monocytaires et de l'immunosuppression, présents temporairement chez la majorité des patients adultes gravement malades admis aux soins intensifs (sepsis, lésions traumatiques, post-opératoires, brûlures, pancréatite et accident vasculaire cérébral) ¹³⁸.

Chez les nouveau-nés, la réduction de l'expression de HLA-DR à la surface des leucocytes pourrait être due à l'immaturité initiale des cellules du système immunitaire (en particulier chez les nouveau-nés prématurés) ¹⁴⁰. L'équipe de Genel a montré que le pourcentage de mHLA-DR était plus faible chez les nouveau-nés présentant un LOS. Les nouveau-nés septiques décédés avaient un pourcentage de mHLA-DR plus bas (16,6%) que dans celui des nouveau-nés septiques survivants (45,2%). La valeur seuil optimale de la HLA-DR pour prédire la mortalité était de 30 % avec une sensibilité de 87 % et une spécificité de 81 %. Les patients présentant une expression de mHLA-DR $\leq 30\%$ avaient un taux de survie plus faible avec un risque de mortalité 30 fois plus élevé (Odds ratio 30 ; 95% CI 3-295) ¹⁴¹.

Le HLA-DR semble être davantage un marqueur pronostique du sepsis néonatal qu'un marqueur diagnostique.

Les transcrits de gène

Les analyses du transcriptome chez l'hôte permettent de mieux comprendre la complexité de la réponse immunitaire à l'infection au niveau de la transcription des ARN messagers. La connaissance du profil génomique de chaque patient permet d'identifier ceux présentant un risque élevé de détérioration, afin de mieux adapter la prise en charge.

En utilisant le profil de l'expression à l'échelle du génome, Wong et ses collègues ont identifié douze biomarqueurs pronostiques candidats chez des patients pédiatriques septiques gravement malades ¹⁴². Combinés avec l'âge, 5 de ces biomarqueurs (CCL3, IL8, GZMB, HSPA1B, and MMP8) sont prédictifs de mortalité (PERSEVERE), très sensibles avec une valeur prédictive négative de 99 % ¹⁴². PERSEVERE a été testé dans plusieurs cohortes et permet d'estimer de manière fiable le risque de mortalité chez les enfants souffrant d'un choc septique ^{143,144}.

Chez les adultes en soins intensifs, un panel de gènes dont l'expression de l'ARNm du sang périphérique pourrait efficacement aider à stratifier les patients présentant un risque accru d'infection et/ou de décès ¹⁴⁵. Parmi ces gènes, CD74 et CX3CR1 étaient associés à la mortalité et/ou à la survenue d'infections secondaires ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Ces biomarqueurs ne sont pas encore évalués chez les nouveau-nés afin d'en établir les capacités diagnostiques et pronostiques des infections néonatales. Cette thèse nous

donne l'occasion de fournir les premières données sur l'utilité et la valeur diagnostique des transcrits de CX3CR1 et de CD74 chez les nourrissons à risque accru de sepsis.

a. CX3CR1

Lors d'une inflammation, les cellules immunitaires, y compris les monocytes circulant dans le flux sanguin ou les vaisseaux lymphatiques, sont recrutées pour soulager l'inflammation. Les cellules immunitaires peuvent se déplacer vers le site enflammé par chimiotactisme des chimiokines et de leurs récepteurs exprimés par les cellules.

Les chimiokines exercent leurs fonctions chimiotactiques en se liant aux récepteurs de chimiokines (RCK). Ces récepteurs comportent 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G (RCPG). Les RCK sont classifiés en fonction des familles de chimiokines auxquelles ils se lient : CXCR, CCR, CX3CR, XCR. Ils sont composés de 7 segments transmembranaires, d'un domaine N-terminal, de trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et d'un domaine C-terminal. Les domaines extracellulaires participent à la reconnaissance et à la liaison des ligands alors que les domaines intracellulaires sont impliqués dans la transduction du signal. Au sein d'une même sous-famille, une chimiokine peut se fixer à plusieurs récepteurs et un récepteur peut fixer différentes chimiokines ¹⁴⁹.

Le CX3CL1 (fractalkine ou neurotactine) est une chimiokine dotée d'un effet anti-apoptotique puissant sur les monocytes humains via un mécanisme impliquant la réduction du stress oxydatif ¹⁵⁰. CX3CL1 est exprimée par les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules dendritiques, les neurones et les macrophages. Sous sa forme membranaire, elle permet l'adhésion des cellules qui expriment son récepteur CX3CR1 ^{151,152}. Le CX3CR1 (chimiokine, motif CX3C, récepteur 1) est un récepteur couplé à la protéine G que l'on trouve exprimé sur plusieurs cellules immunitaires dont les monocytes, les cellules NK et les cellules dendritiques (DC) ¹⁵¹. L'interaction entre CX3CL1 et CX3CR1 engendre une multiplicité de signaux, variant selon la forme de CX3CL1 (figure 7). Sous la forme soluble, CX3CL1 se lie à CX3CR1 et induit une puissante activité chimiotactique favorisant le recrutement de cellules exprimant le récepteur CX3CR1 aux sites d'infection ^{111,153}.

Plusieurs études ont montré l'importance de CX3CR1 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, chez les patients atteints de la maladie de Crohn et dans le sepsis chez les adultes en soins intensifs ^{148,154}. Une diminution persistante de l'expression CX3CR1 chez les patients, adultes ayant subi un choc septique, tant au niveau de l'ARNm que des protéines a été rapportée ^{146,148,155}. Une faible expression de CX3CR1 a été associée à un risque élevé de mortalité chez les patients adultes admis dans les services de soins intensifs après un choc septique (AUC 0.69 avec 95 % CI 1.32–5.75) ¹⁴⁶. Les données de l'étude de Friggeri montrent également qu'une faible expression des transcrits de CX3CR1 était associée à l'immunosuppression chez les patients adultes présentant un choc septique dans l'unité de soins intensifs ¹⁴⁶.

Le rôle de CX3CR1 dans les infections bactériennes néonatales n'est pas clairement défini, mais son interaction avec la glycoprotéine G du RSV (Respiratory syncytial virus) est associée à la gravité des infections des voies respiratoires inférieures chez les nourrissons ¹⁵⁶.

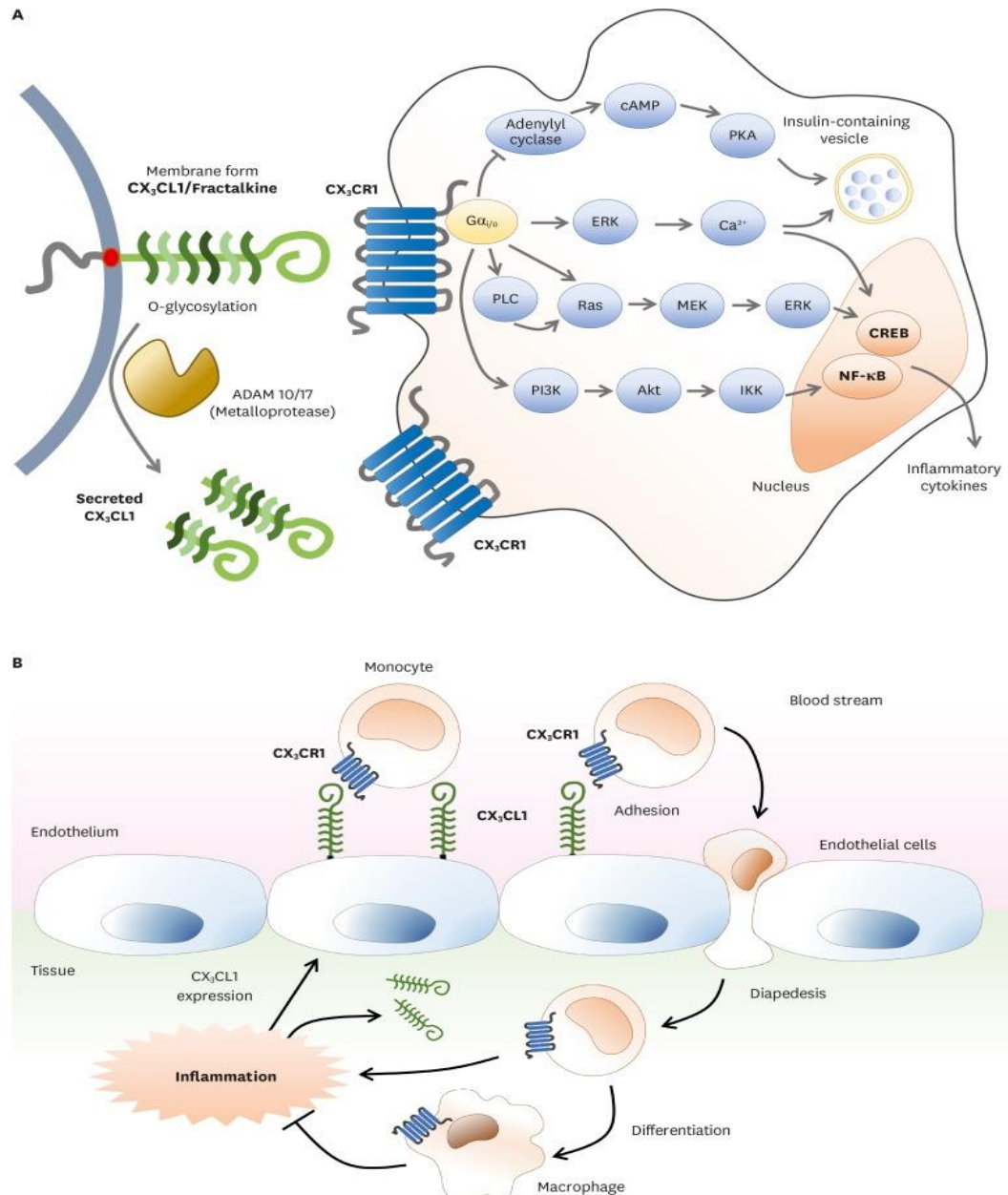


Figure 7: Voie de signalisation CX3CR1-CX3CL1

(A) Les formes solubles de CX3CL1 peuvent être fabriquées après clivage protéolytiques par ADAM 10/17. Les formes de CX3CL1 liées à la membrane et solubles peuvent se lier au CX3CR1 et activer la voie de signalisation NF-κB ou CREB favorisant la sécrétion de cytokines inflammatoires. (B) Le CX3CL1 est exprimé à la surface des cellules endothéliales à proximité des tissus enflammés. CX3CL1 induit une chimiotaxie pour favoriser le recrutement des cellules exprimant CX3CR1. Les monocytes qui circulent dans le sang rencontrent et reconnaissent CX3CL1 sur l'endothélium, près des tissus enflammés. Après formation du complexe CX3CL1-CX3CR1, les monocytes sont prêts à pénétrer dans les tissus enflammés et à entrer ensuite en diaphèse entre les jonctions des cellules endothéliales.

Dans ce processus, les monocytes vont subir une maturation et se différencient en macrophages. Les macrophages matures peuvent soulager les affections inflammatoires. cAMP, adénosine monophosphate cyclique ; PKA, protéine kinase A ; PLC, phospholipase C ; MEK, méthyléthylcétone ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; IKK, I κ B kinase ; CREB, protéine de liaison de l'élément de réponse Camp¹⁵³.

b. CD74 ou fragment li

CD74 (chaîne invariante, Ii) est une glycoprotéine transmembranaire de type II qui s'associe aux chaînes α et β du CMH de classe II et dirige le transport des complexes $\alpha\beta Ii$ (chaîne invariante) vers les endosomes et les lysosomes¹⁵⁷. Il est connu pour jouer un rôle crucial dans le processus de présentation de l'antigène aux cellules T auxiliaires autologues. CD74 est une protéine membranaire intégrale non polymorphe de type II qui fonctionne comme un chaperon du CMH de classe II. CD74 est impliqué dans la voie de signalisation fonctionnant comme un récepteur de survie¹⁵⁸.

Lors du mécanisme de présentation de l'antigène, CD74 possède un fragment appelé fragment CLIP qui s'associera avec la région de liaison au peptide antigénique CMH II. Dès la formation du complexe, il migrera vers l'appareil de Golgi qui formera une vésicule endocytaire caractéristique, la vésicule de classe II (CIIV). Cette vésicule sera responsable de la dégradation de la chaîne invariante par des cathepsines, mais sans dégrader le fragment CLIP qui bloquera alors la cavité. Au niveau de ces vésicules de classe II, les protéines HLA-DM vont médier le remplacement du fragment CLIP par un fragment antigénique. Une fois le peptide chargé, le complexe sera envoyé à la membrane plasmique des phagocytes, monocytes, cellules dendritiques (figure 8).

Le CD74 s'est également révélé être un récepteur de haute affinité pour le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF)^{157,159}. Le MIF est exprimé de manière ubiquitaire et contribue à l'activation du système immunitaire inné dans les macrophages et les monocytes par l'activation de la voie de signalisation de la kinase régulée par le signal extracellulaire¹⁵⁹. De nombreux rapports ont montré que MIF inhibe la fonction p53¹⁶⁰, active les composants de la protéine kinase et régule à la hausse le récepteur de TLR4¹⁶¹. De faibles expressions des transcrits CD74 sont associées à la mortalité chez les patients adultes en état de choc septique dans l'unité de soins intensifs (AUC = 0.67, 95 % (CI) = 0.55 à 0.79; P = 0.01), tandis que la forte expression des transcrits CD74 est associée à la survenue d'infections secondaires (sdHR 1,51 (95 % IC 1,11-2,06), p = 0,008)^{147,162}. Les courbes de survie ont montré qu'une diminution du niveau des ARNm de CD74 était associée à une augmentation de la mortalité après un choc septique (test Log rank, P = 0,0043, Hazard Ratio = 3,0, 95 % IC : 1,4 à 6,5).

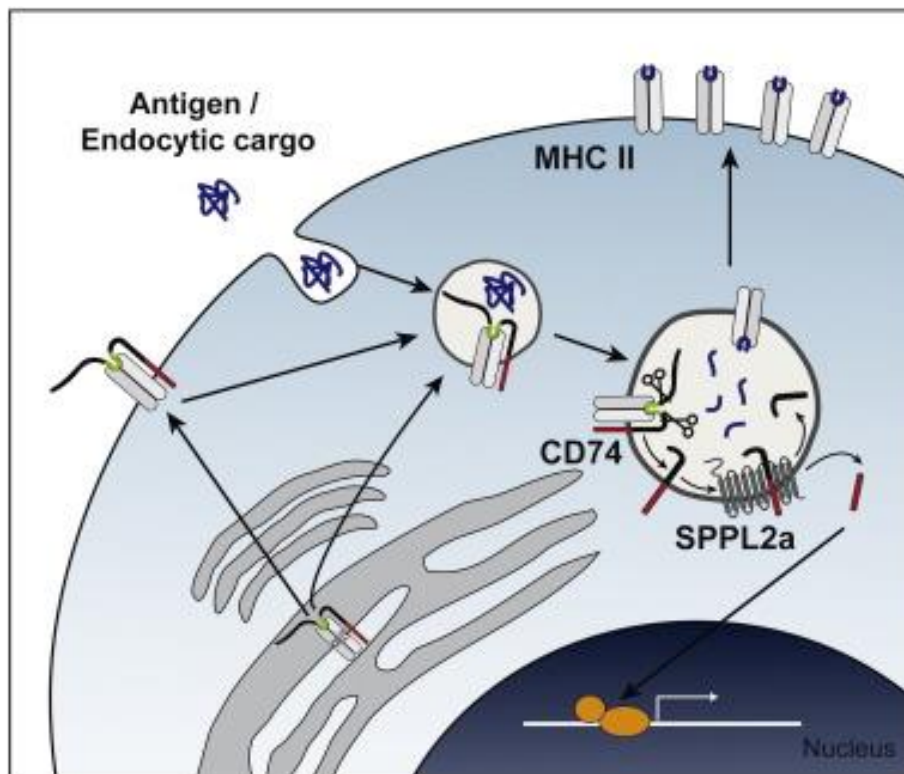


Figure 8: Rôle de CD74 dans la voie de présentation de l'antigène

CD74 s'associe aux chaînes alpha et bêta du MHCII dans l'ER, aidant ainsi les formations de pliage et de dimère. Via des domaines de trimérisation au sein de CD74, ces complexes CD74-MHCII s'assemblent en un complexe non amérique (non représenté sur la figure pour des raisons de clarté). Le segment CLIP (peptide à chaîne li associé à la classe II, vert) au sein du CD74 représente le site d'interaction majeur et empêche la liaison prématurée des peptides au MHCII pendant son transit par la voie de biosynthèse. Une fonction majeure du CD74 est de fournir le MHCII à des compartiments endosomaux spécialisés, où les antigènes exogènes endocytés sont traités et dégradés. Cela nécessite des signaux de tri basés sur la dileucine à proximité de l'extrémité CD74 N-terminale et peut utiliser des voies de trafic directes ou indirectes (via la membrane plasmique). Dans les compartiments de traitement de l'antigène, la dégradation du CD74 est également initiée à partir de son domaine luminal qui est une condition préalable à la libération du MHCII et à sa charge avec des peptides dérivés de l'antigène. Le renouvellement du CD74 est complété par la protéase intramembranaire SPPL2a qui clive le dernier fragment N-terminal lié à la membrane (NTF) libérant ainsi un domaine intracellulaire (ICD) dans le cytoplasme qui a la capacité de se déplacer vers le noyau et peut influencer la régulation transcriptionnelle¹⁶³.

1.6 Prise en charge

1.6.1 Prévention

L'objectif premier est de prévenir correctement la survenue des sepsis néonataux. Des lignes directrices récentes recommandent le dépistage universel du SGB chez toutes les femmes enceintes à 35 et 37 semaines de gestation¹⁶⁴ et précisent les antibiotiques

à utiliser avant l'accouchement. Parmi les autres stratégies prophylactiques figure l'allaitement maternel, prévention des infections liées aux soins de santé, administration de lactoferrine, d'anticorps monoclonaux antistaphylococciques, immunoglobuline, granulocyte-macrophage stimulant la colonisation facteurs, les probiotiques et le fluconazole (en cas d'infections à *Candida Spp*) ¹⁶⁵.

1.6.2 Traitement

Les critères de décision sont les critères anamnestiques et les signes cliniques. En présence de symptômes et de signes évocateurs de sepsis néonatal, un traitement empirique doit être entrepris en attendant l'identification de l'agent causal : l'ampicilline et un aminoglycoside sont recommandés comme traitement empirique pour les cas des EOS ; la vancomycine et un aminoglycoside pour les LOS ; et de la céphalosporine si l'on suspecte une méningite à Gram négatif ¹⁶⁶. Une thérapie spécifique pour l'agent pathogène responsable devrait être adoptée dès que possible sur la base de la culture cellulaire résultats. La durée du traitement varie de 7 à 21 jours, en fonction du type d'agent pathogène et du site d'infection (méningite, cérébrale, ostéomyélite). Le traitement pharmacologique est arrêté lorsqu'aucun agent pathogène n'est identifié et qu'aucun signe et symptôme d'infection ne sont observés.

En l'absence de signes cliniques (nouveau-né asymptomatique), l'indication d'un traitement ATB, est basée sur les arguments anamnestiques. Deux situations doivent entraîner une antibiothérapie chez le nouveau-né : en cas de chorioamniotite chez la mère et d'atteinte du jumeau. Dans les autres situations, en l'absence de données scientifiques et compte tenu des données concernant la réalisation et l'interprétation des examens complémentaires, les experts recommandent de tenir compte des critères anamnestiques majeurs et mineurs et des conditions locales de réalisations des examens (en urgence ou non), des techniques de laboratoires après avoir établi avec les biologistes et les microbiologistes des normes locales (notamment pour le prélèvement gastrique et périphérique, et pour la CRP) ⁷¹ celles-ci ont été modifiées en 2019 par la Société Française de Pédiatrie (SFP).

L'organigramme (Figure 9) résume l'approche clinique en cas de suspicion de sepsis néonatal.

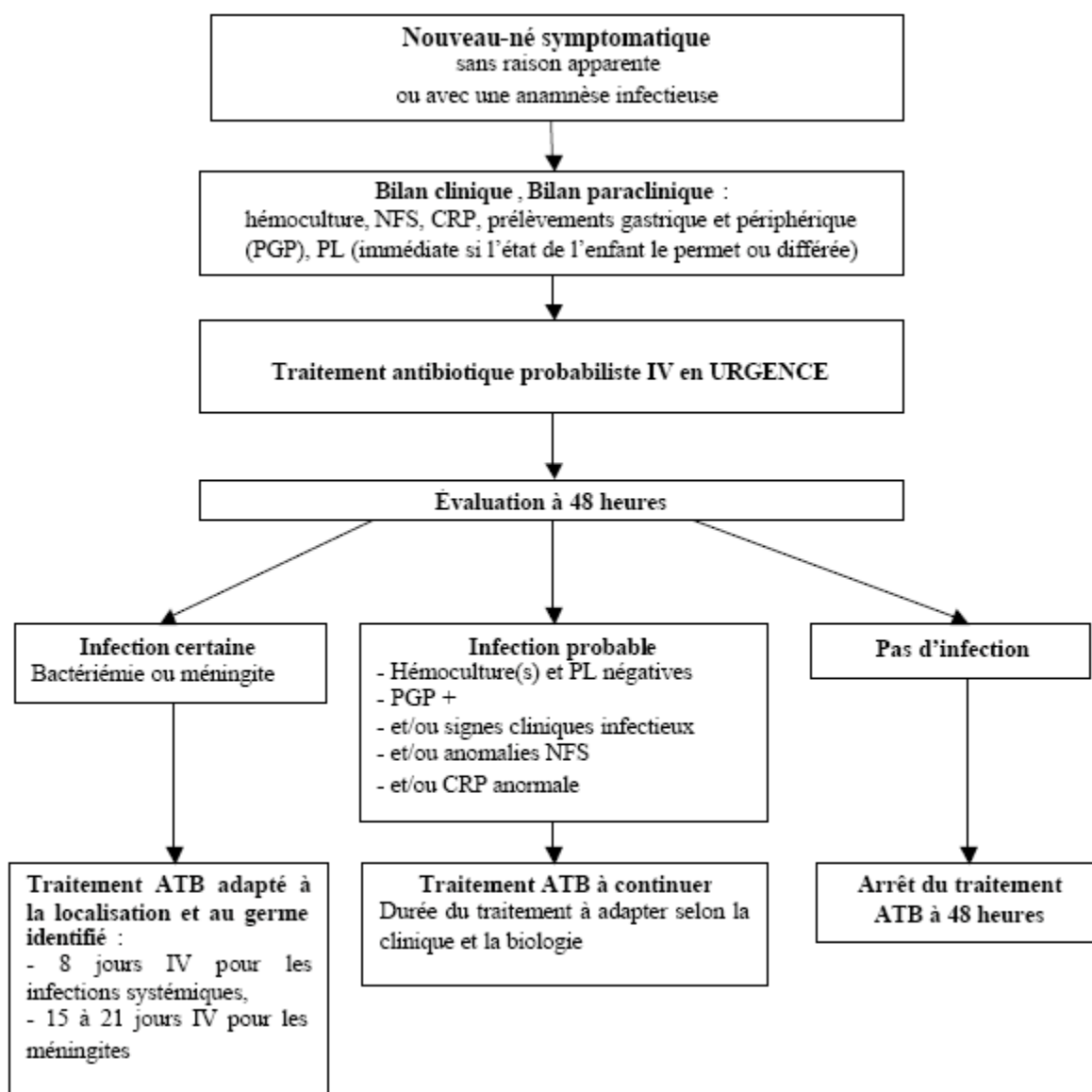


Figure 9: Indication d'un traitement antibiotique chez un nouveau-né symptomatique
⁷¹ modifiées en 2019 par la SFP.¹⁶⁷

II. Paludisme gestationnel

II.1 Épidémiologie du paludisme

II.1.1 Agents pathogènes

Le paludisme est une maladie parasitaire, transmise à l'homme par la piqure de moustiques (*anophèles*) porteurs d'un parasite du genre *Plasmodium*.

Il existe de nos jours cinq espèces du genre *Plasmodium* qui sont responsables de la maladie chez l'homme : *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum* qui est le plus mortel, responsable des formes graves et *Plasmodium knowlesi* (initialement découvert chez les macaques).

La biologie du parasite du genre *Plasmodium* est très complexe et la compréhension de son cycle de vie est indispensable pour des stratégies de lutte contre le paludisme. Les plasmodies sont des protozoaires intracellulaires appartenant au taxon des *Apicomplexa* et présentent les caractères suivants :

- La présence d'un complexe apical, qui correspond à un regroupement d'organites au niveau du pôle apical de la cellule (microtubules, vacuoles, ainsi que des organites sécréteurs spécialisés, les rhoptries, les micronèmes et les granules denses) ;
- Des centrioles, quand ils existent, constitués de neufs singlets de microtubules (l'état ancestral étant la présence de neuf triplets) ;
- Un cycle de vie incluant une forme sporozoïte, produite par sporogonie à l'intérieur de l'oocyste (figure 10).

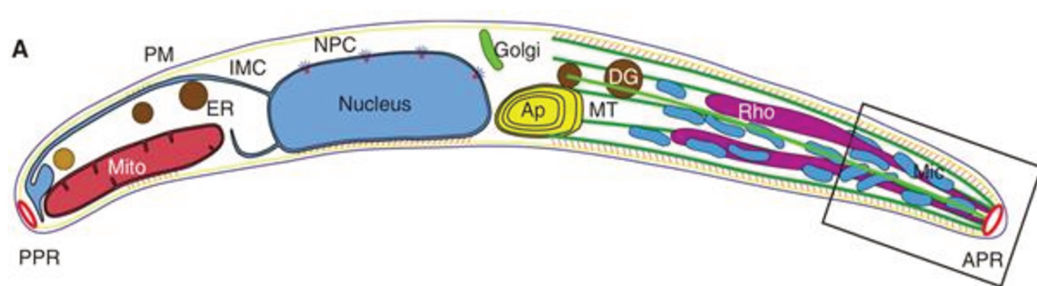


Figure 10: Structure du sporozoïte des parasites du genre *Plasmodium*

Schéma montrant la position et la taille relative des organites d'un sporozoïte de *Plasmodium*. PPR : anneau polaire proximal, Mito : mitochondrie, PM : membrane plasmique (en bleu), ER : réticulum endoplasmique, IMC : complexe membranaire interne (en jaune), NPC : complexes des pores nucléaires, Ap : apicoplaste, MT : microtubules (en vert), DG : granules denses, Rho : rhoptries, Mic : micronèmes (en bleu), APR : anneau polaire apical. ¹⁶⁸

Le cycle de développement des plasmodies est complexe et se déroule chez deux hôtes : l'anophèle (cycle sporogonique sexué) et l'Homme (cycle schizogonique asexué) (Figure 11).

a. Chez l'anophèle femelle

Le gamétocyte mâle se différencie en plusieurs gamètes mâles et le gamétocyte femelle donne un seul gamète femelle. La fusion d'un gamète femelle et d'un gamète mâle a lieu dans l'intestin moyen (ou estomac). Il en résulte un œuf mobile ou ookinète. Cet œuf mobile traverse la paroi gastrique et devient l'oocyste qui est la forme immobile dont la division aboutit à la formation d'un grand nombre de sporozoïtes mobiles. Ces derniers regagnent activement les glandes salivaires du moustique pour être inoculés à l'homme lors d'une piqûre.

b. Chez l'Homme, le cycle se caractérise par une phase tissulaire hépatique ou pré-érythrocytaire et une phase intra-érythrocytaire.

Schizogonie intra-hépatique :

Les sporozoïtes inoculés dans les capillaires de l'homme par l'anophèle au cours d'un repas sanguin pénètrent les hépatocytes. Ils croissent rapidement et leur noyau se divise pour donner les schizontes hépatocytaires ou corps bleus. L'hépatocyte éclate et libère les mérozoïtes de première génération qui passent dans la circulation sanguine. Cette phase est asymptomatique et ne nécessite pas de technique de diagnostic biologique. Le cycle hépatique est en moyenne de 7 à 9 jours chez *Plasmodium falciparum*.

Schizogonie intra-érythrocytaire :

Après leur libération par l'hépatocyte, les mérozoïtes pénètrent dans l'érythrocyte. Ils augmentent de taille et donnent naissance au trophozoïte jeune qui se nourrit de l'hémoglobine, se divise et donne le schizonte multinucléé. Le développement ultime du schizonte se termine par l'éclatement du globule et la libération des mérozoïtes de deuxième génération. Toutes les 36-48 heures, les mérozoïtes vont réinfecter de nouvelles hématies. Ce cycle intra-érythrocytaire est responsable de pathologie liée au paludisme.

Au cours de plusieurs cycles schizogoniques intra-érythrocytaires apparaissent dans le sang des éléments à potentiel sexué : les gamétocytes qui seront ingérés par l'anophèle lors d'un repas sanguin et amorceront la phase sexuée sporogonique du cycle.

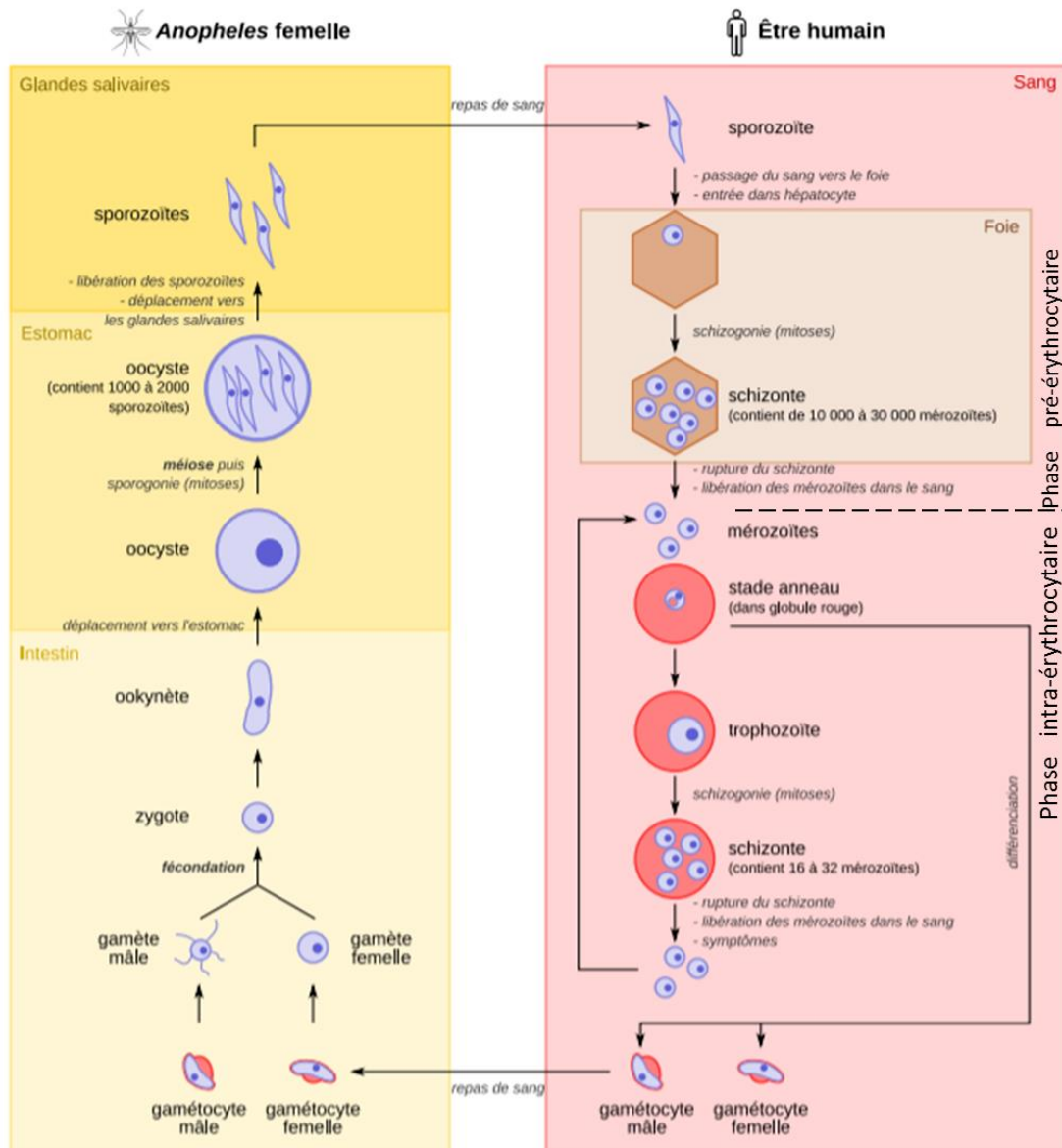


Figure 11: Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*

La transmission du parasite de l'anophèle s'effectue au cours du repas sanguin d'un moustique à l'homme. Le parasite subira un premier cycle de divisions au sein des cellules hépatiques (phase pré-érythrocytaire) puis un cycle de divisions au sein des globules rouges (phase intra-érythrocytaire). Au cours de son développement érythrocytaire, certains parasites se différencient en gamétocytes, qui évolueront en gamètes chez le moustique après un autre repas sanguin ¹⁶⁹.

II.1.2 Distribution géographique

Le paludisme est endémique ou sporadique dans la plupart des pays tropicaux où subtropicaux. Selon le World Malaria Report de 2020, le nombre de cas de paludisme dans 87 pays où le paludisme est endémique est estimé à 238 millions en 2019 (figure 12). Sur les 87 pays, 29 pays africains représentaient 95% des cas de paludisme. Le Nigeria (27%), la République démocratique du Congo (12%), l'Ouganda (5%), le

Mozambique (4%) et le Niger (3 %) représentait environ 51 % de l'ensemble des cas à l'échelle mondiale ¹⁷⁰.

L'espèce plasmodiale la plus répandue en Afrique est *P. falciparum*. Il à l'origine de 99,7 % des cas de paludisme en 2018. *P. vivax* prédomine dans la région Amériques de l'OMS, et représentant 75 % des cas de paludisme ¹⁷⁰. Environ 384 000 personnes sont mortes du paludisme dans le monde en 2019, dont 95 % en Afrique et, pour la plupart, des enfants de moins de 5 ans. La figure 12 présente l'incidence du paludisme en 2019 dans le monde.

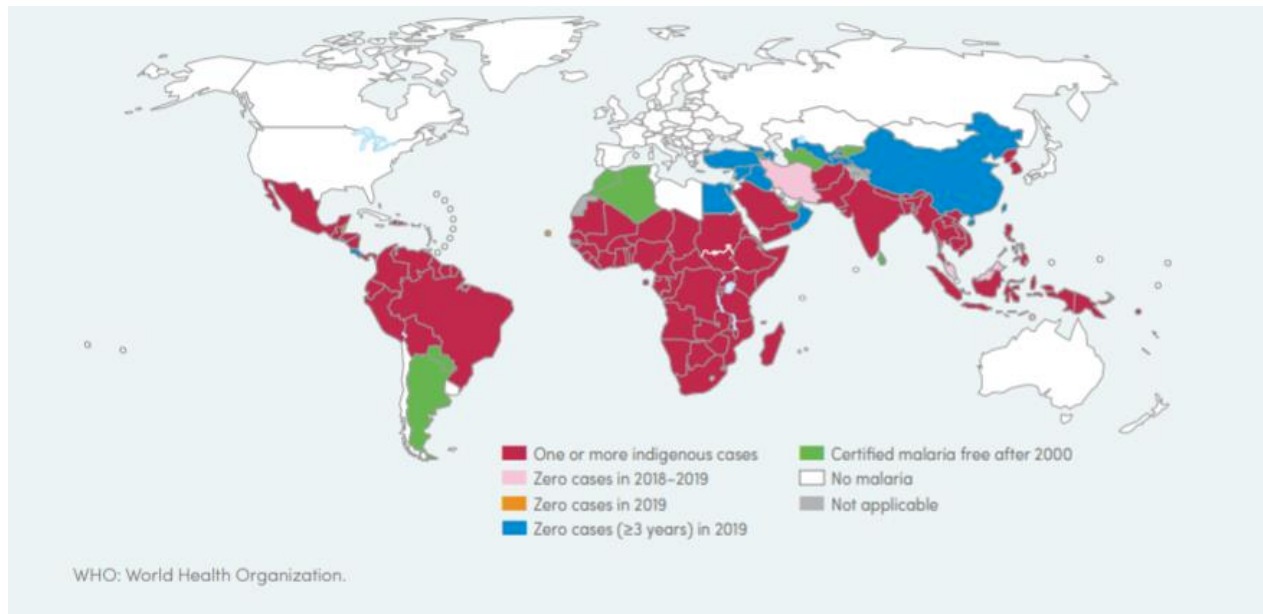


Figure 12: Carte des pays avec des cas de paludisme en 2000 et leur situation en 2019¹⁷⁰

II.1.3 Incidences socio-économiques

Le paludisme a des conséquences socio-économiques importantes en Afrique Subsaharienne. L'endémicité du paludisme est surtout liée à la faiblesse des potentialités économiques et sociales des ménages à faire face à la maladie. Le paludisme reste une maladie intimement liée à la pauvreté et touche principalement des populations démunies qui vivent dans des zones rurales où les services de soins de santé sont peu présents. D'autres facteurs de risque tels que : l'environnement, la mauvaise gestion des eaux usées, le choix inapproprié des thérapies et la faiblesse relative de revenus sont autant d'éléments aggravant l'insécurité des ménages vis-à-vis du paludisme ^{171,172}. Le paludisme affecte le revenu des ménages, par son impact sur la participation au marché, la productivité au travail, les dépenses de consommation. Une infection palustre des membres actifs (10-55 ans) affecte négativement l'accumulation des richesses dans les ménages et coûte en moyenne 12 à 14% du revenu des ménages et 4 à 7 jours de travail manqués par ces membres actifs

des ménages ¹⁷³. Les ménages pauvres consacrent près de 34% de leurs revenus mensuels pour le traitement du paludisme contre 1% pour les ménages riches ¹⁷³. Le renforcement des programmes d'éducation de population et la lutte contre les inégalités sociales devrait être implémenté dans les stratégies de lutte contre le paludisme.

II.2 Physiopathologie

Les manifestations cliniques du paludisme se produisent pendant le cycle érythrocytaire quand la parasitémie est au-delà d'un certain seuil (environ 100 parasites par μL)¹⁷⁴. La durée du cycle érythrocytaire varie en fonction de l'espèce de *Plasmodium* (10–14 jours pour *P. falciparum* et *P. knowlesi*, 2–3 semaines pour *P. vivax* and *P. ovale*, et 18 jours ou plus pour *P. malariae*). Au cours de la phase asexuée du cycle, l'éclatement des rosaces contenues dans les hématies s'accompagne des accès périodiques de fièvres et de frissons chez l'hôte humain. En se multipliant, les mérozoïtes font éclater les globules rouges et produisent une hémolyse. Suite à l'éclatement des schizontes, plusieurs substances y compris les produits de la membrane des cellules rouges, les pigments d'hémiozoïne et d'autres facteurs toxiques tels que le glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont libérés dans le sang. Les produits libérés, en particulier le GPI, activent les macrophages et les cellules endothéliales pour une sécrétion des cytokines et des médiateurs inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF), interféron- γ (IFN- γ), interleukine (IL)-1, IL-6, IL-8, Le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), et la lymphotoxine, le superoxyde et l'oxyde nitrique (NO). Les manifestations cliniques du paludisme telles que maux de tête, fièvre, nausées, vomissements, diarrhée, anorexie, fatigue, douleurs articulaires et musculaires, thrombocytopenie, immunosuppression, coagulopathie ont été largement attribuées aux diverses cytokines libérées en réponse aux parasites et aux produits des membranes des hématies éclatées ¹⁷⁵.

La virulence du paludisme dépend de la capacité des parasites à adhérer aux récepteurs endothéliaux de l'hôte. Lors de l'infection, le parasite va entraîner des modifications de la membrane globulaire, avec l'adressage à la membrane érythrocytaire de protéines d'origine parasitaire (RESA, KAH-RP, MESA) qui interagissent avec des structures membranaires de l'érythrocyte (actine, spectrine) pour former des protubérances à la surface du globule rouge appelées « knobs » ¹⁷⁶. Ces modifications sont à l'origine d'un processus décrit sous le terme de cytoadhérence ¹⁷⁷. Dans le cas spécifique des infections à *P. falciparum*, la cytoadhérence est médiée par la protéine 1 de la membrane érythrocytaire de *P. falciparum* (PfEMP1). Comme le montre la figure 13, *PfEMP1* est composée de domaines extracellulaires variables qui permettent son adhésion aux différents récepteurs de l'hôte tels que CD36, ICAM1, VCAM1, et CSA ^{20,178}. La cytoadhérence permet au globule rouge infecté d'éviter l'élimination dans la

rate et est associée aux formes graves de paludisme dans certaines populations (enfants < 5 ans, femme enceinte et voyageurs) ¹⁷⁴.

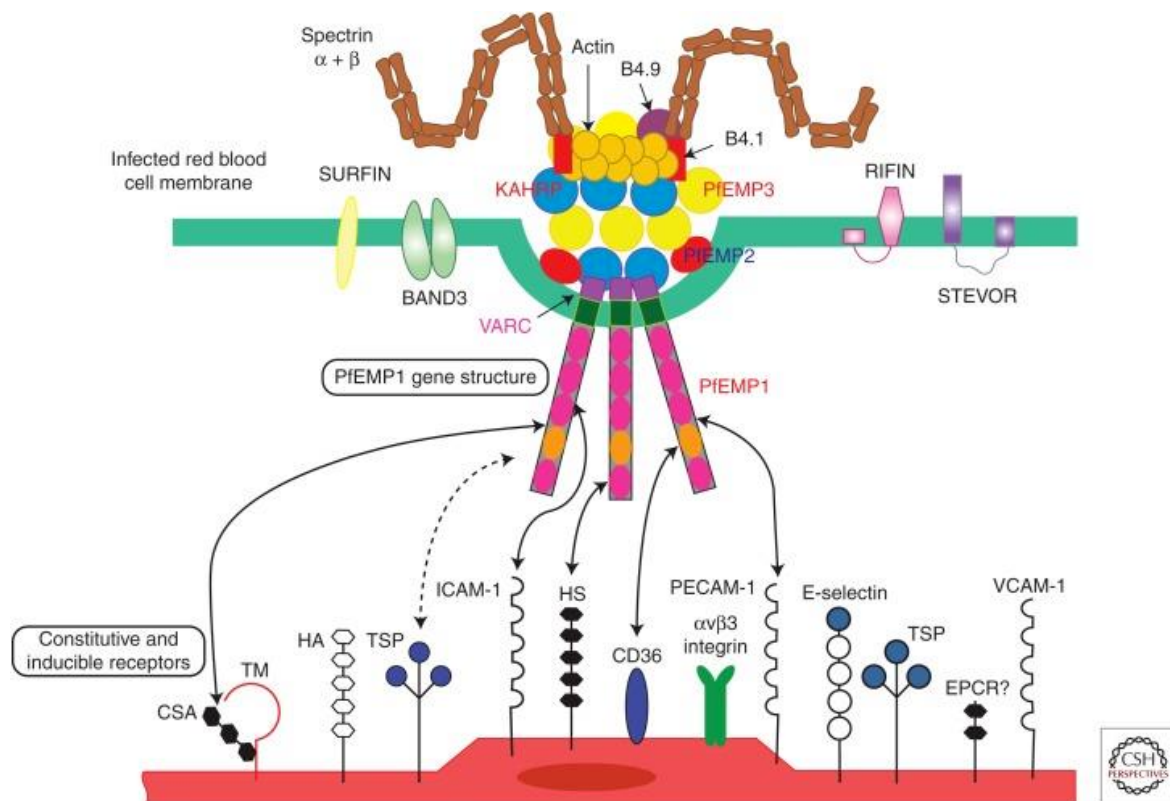


Figure 13: Modèle des interactions entre les *antigènes P. falciparum* (en haut) et hôte (en bas).

PfEMP1 est surexprimée, à la surface des hématies parasitées. Les protéines parasites telles que les surfines, rifines et stevors sont également situées dans la membrane des globules rouges. Du côté humain, une série de molécules, selon le tissu, est impliquée dans les interactions parasites et hôte infecté. La protéine impliquée dans le cas du paludisme gestationnel est la chondroïtine sulfate A (CSA) du placenta ¹⁷⁹.

II.3 Immunité anti-palustre

II.3.1 Facteurs génétiques de résistance

Les mécanismes naturels de défense contre le paludisme sont plus apparents dans les populations exposées sans cesse à des parasites. La sensibilité aux infections palustres dépend du rôle des récepteurs de globules rouges face à l'invasion des mérozoïtes. Il a été constaté que des modifications de la structure de l'hémoglobine ou de certaines enzymes confèrent une protection contre l'infection ou ses manifestations graves. En effet, les érythrocytes humains présentant un déficit de l'antigène Duffy (groupe sanguin Duffy-négatif) ou qui ont eu ces antigènes enlevés par un traitement à la

chymotrypsine, sont résistants à l'invasion par les mérozoïtes de *P. knowlesi* ou à *P. vivax*¹⁸⁰. Il faut noter également que le déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase et l'hémoglobine drépanocytaire confèrent une protection contre le paludisme grave et la mortalité qui y est associée^{181,182}.

II.3.2 Immunité naturelle acquise

En zone de forte transmission de paludisme, la population est exposée quasiment en permanence aux piqûres infectantes du moustique. Dans ces conditions, la répétition des infections plasmodiales permet, pendant l'enfance, le développement progressif d'une protection contre la maladie, puis contre les parasites. L'acquisition de cette immunité est d'autant plus rapide que le niveau de transmission palustre est élevé dans la région. On parle de prémunition. La prémunition contre le paludisme est fluctuante, pouvant disparaître en cas de régression de l'agression anophélienne et elle s'atténue en cas de fatigue, de maladie intercurrente ou de conditions climatiques différentes ; elle est spécifique d'espèces, voire de souche. En cas de départ d'une zone endémique pendant plusieurs mois, l'individu natif perd progressivement son immunité naturelle.

Les réponses immunitaires contre le paludisme, font appel à une réponse immunitaire humorale et à une réponse immunitaire cellulaire qui mobilise les lymphocytes T et les lymphocytes B mémoires. L'immunité humorale quant à elle, repose sur la synthèse de cytokines et d'anticorps dirigés contre des antigènes variables de surface (VSA).

Dans le paludisme, comme dans la plupart des infections, le système immunitaire inné intervient en première ligne de défense en contrôlant l'évolution du parasite et initie la réponse immunitaire adaptative¹⁸³. Les antigènes plasmodiaux sont reconnus *via* des récepteurs de reconnaissance cellulaire notamment les récepteurs Toll-like (TLR). Les TLRs se lient aux différentes molécules des parasites et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires nécessaires au contrôle de l'infection et leurs capacités à induire une réponse adaptative^{184,185}. Les principales molécules dérivées du parasite de plasmodium qui se lient aux TLRs sont le glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui se lie à TLR2 et TLR4, la peroxirédoxine à TLR4, l'hémozoïne à TLR4 et TLR9 et l'ADN du parasite qui se lie à TLR9¹⁸⁵ (figure 14).

Les antigènes plasmodiaux et la réponse immunitaire

a. Le glycosylphosphatidylinositol (GPI)

Le GPI est le premier facteur qui a été identifié comme PAMP du parasite du paludisme. Les GPI servent d'ancrage membranaire pour certaines protéines de surface cellulaire telles que la protéine circumsporozoïte et la protéine de surface mérozoïte. En l'absence d'ancrage du GPI, ces protéines ne sont pas exprimées à la surface et les mérozoïtes ne peuvent donc pas envahir les érythrocytes. Les parasites du paludisme synthétisent le GPI en excès par rapport aux quantités réelles nécessaires pour ancrer les protéines à la surface des mérozoïtes et ainsi, des quantités importantes de GPI

restent non liées aux protéines. Les molécules de GPI qui ne sont pas liées aux protéines sont exposées à la surface des cellules et sont donc probablement ciblées par le système immunitaire inné et induisent la production de cytokines pro-inflammatoires^{186,187}. La lyse des globules rouges pendant la phase érythrocytaire du cycle de vie du *Plasmodium* entraîne la libération de GPI, qui est reconnue par les hétérodimères TLR2-TLR6 ou TLR1-TLR2 et dans une moindre mesure, par les homodimères TLR4^{188,189}. Les ancras GPI induisent une synthèse de cytokines pro-inflammatoires médiée par les TLRs, telles que TNF α et IL-1 β ¹⁹⁰, ainsi que de l'oxyde nitrique¹⁹¹ par les macrophages hôtes. Le GPI du parasite de la malaria est une toxine candidate qui augmente l'expression de la molécule d'adhésion cellulaire par l'activation des TLRs, ce qui entraîne une augmentation marquée de la cytoadhérence du parasite et des leucocytes aux cellules endothéliales¹⁹².

b. L'hémozoïne

L'hémozoïne est un polymère hydrophobe, cristallin et insoluble de l'hème formé lors de la digestion de l'hémoglobine par des parasites. Elle est libérée dans la circulation sanguine lorsque les mérozoïtes sont évacués des schizontes matures. L'hémozoïne est en soi un matériau inerte et ne semble pas avoir de récepteur spécifique pour la reconnaissance, mais elle influence de plusieurs façons les réponses immunitaires innées aux parasites du paludisme.

Avec une parasitémie de 1 à 10 % et 0,2 à 2 g d'hémozoïne peuvent être produits par *Plasmodium falciparum* au cours de chaque cycle¹⁹³. Après la rupture du schizonte, l'hémozoïne brute libérée et composée de l'hème agrégé et de divers composants attachés d'origine parasitaire et hôte (lipides, dérivés lipidiques et protéines) est avidement absorbée par les phagocytes, à la fois *in vivo* et *in vitro*. La libération d'hémozoïne libre, par les parasites, coïncide avec l'induction de cytokines pro-inflammatoires, dont IL-1 β et TNF α et les fièvres périodiques caractéristiques du paludisme. Une fois libérée dans la circulation sanguine, l'hémozoïne est phagocytosée par les cellules immunitaires de la rate, du foie et du cerveau.

L'hémozoïne naturelle et synthétique se lie directement à TLR9 d'une manière dépendante à des motifs particuliers et de séquences d'acides aminés. Cette liaison induit des changements conformationnels dans le récepteur¹⁹⁴. Il a été découvert par la suite que la capacité de stimulation de TLR9 de l'hémozoïne dépend de la présence d'ADN de *Plasmodium*, qui est complexé à l'hémozoïne et non à l'hémozoïne elle-même. L'hémozoïne agit comme un transporteur pour transporter l'ADN plasmodial dans les phagolysosomes où il peut être détecté par le TLR9^{195,196}. L'hémozoïne qui est phagocytée par les macrophages est initialement localisée dans le compartiment phagolysosomal. Par la suite, elle est retrouvée dans le cytosol. Ce mouvement de l'hémozoïne du compartiment phagolysosomal vers le cytosol met en évidence un mécanisme par lequel l'hémozoïne peut faciliter le mouvement de l'ADN plasmodial dans le cytosol où elle est reconnue par des capteurs d'acide nucléique autres que les TLRs¹⁹⁵.

c. L'ADN plasmodial

Il a été démontré que les motifs CpG dans l'ADN plasmodial activent TLR9 dans les endosomes et peuvent stimuler l'activation de l'inflammasome AIM2 lorsqu'ils sont présents dans le cytosol ¹⁹⁵. La phagocytose et la digestion des hématies infectées libèrent également l'ADN du parasite dans les phagolysosomes et ensuite dans le cytosol, ce qui entraîne l'activation des récepteurs immunitaires innée. L'ADN du parasite du paludisme pénètre dans les endosomes des cellules immunitaires innées, tels que les macrophages et les CD (Cellules Dendritiques), par l'absorption phagocytaire des IRBC, des mérozoïtes, du matériel nucléaire des parasites, du complexe ADN-protéine-hémozoïne et des complexes immuns contenant de l'ADN ¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Les endosomes sont ensuite fusionnés aux lysosomes pour former des phagolysosomes. Dans l'environnement acide des phagolysosomes, l'ADN est libéré et reconnu par TLR9, ce qui entraîne l'activation des voies de signalisation MAPK et NF- κ B et des réponses des cytokines et des chimiokines (figure 6). En plus du TLR9, l'ADN du parasite est reconnu par les capteurs d'ADN cytosolique lors de la libération du contenu phagolysosomal dans le cytosol. Dans le cytosol, plusieurs capteurs cytosoliques distincts peuvent potentiellement reconnaître l'ADN. Jusqu'à présent, il a été démontré que deux récepteurs de l'immunité innée (Pattern of recognition receptor, PRR) cytosoliques détectent l'ADN du parasite : (i) cGAS détectant l'ADNdb et induisant l'activation de la signalisation STING-TBK1-IRF3 et la production en aval d'IFN de type I ^{185,199}, et (ii) AIM2 reconnaissant l'ADNdb, entraînant l'activation de l'inflammasome et de la caspase 1. La caspase 1 activée convertit les pro-formes d'IL-1 et d'IL-18 en IL-1 et IL-18 actives. La production robuste d'IL-1 et d'IL-18 en réponse à une infection palustre nécessite, en plus de la signalisation de l'inflammasome, la production de pro-IL-1 et de pro-IL-18 par l'intermédiaire de TLRs (principalement TLR9 et TLR7). L'ADN génomique de *P. falciparum* contient plus de 80 % de nucléotides AT. Les motifs riches en AT de l'ADN du parasite forment des structures en boucle, dont on a montré qu'elles induisaient une réponse IFN de type I par la signalisation STING-TBK1-IRF3 ¹⁹⁹.

d. L'ARN plasmodial

Le système immunitaire inné détecte l'ARN des parasites du foie et du stade sanguin. Au stade du foie, l'ARN est reconnu exclusivement dans le cytosol par MDA5 ^{185,200}. En revanche, au stade sanguin, l'ARN du parasite de souris est reconnu par TLR7 dans les phagolysosomes des cellules dendritiques, ce qui conduit à la production d'IFN de type I. L'ARN des parasites pénètre dans les endosomes des macrophages et des cellules dendritiques lors de l'absorption des composants des parasites, induisant la réponse de l'IFN de type I par la signalisation TLR7 ^{199,201}. Les IFN de type I ainsi produits contribuent de manière importante à la régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires, telles que IFN- γ et IL-12, au cours des premiers stades de l'infection ²⁰¹. Chez l'humain, la capacité de l'ARN des parasites à induire une réponse à l'IFN de type I n'est pas encore clairement définie. En effet, bien qu'il ait été signalé que l'ARN du parasite humain du paludisme *P. falciparum* induit des réponses cytokines par la reconnaissance de TLR7, l'activité signalée semble très faible ²⁰¹.

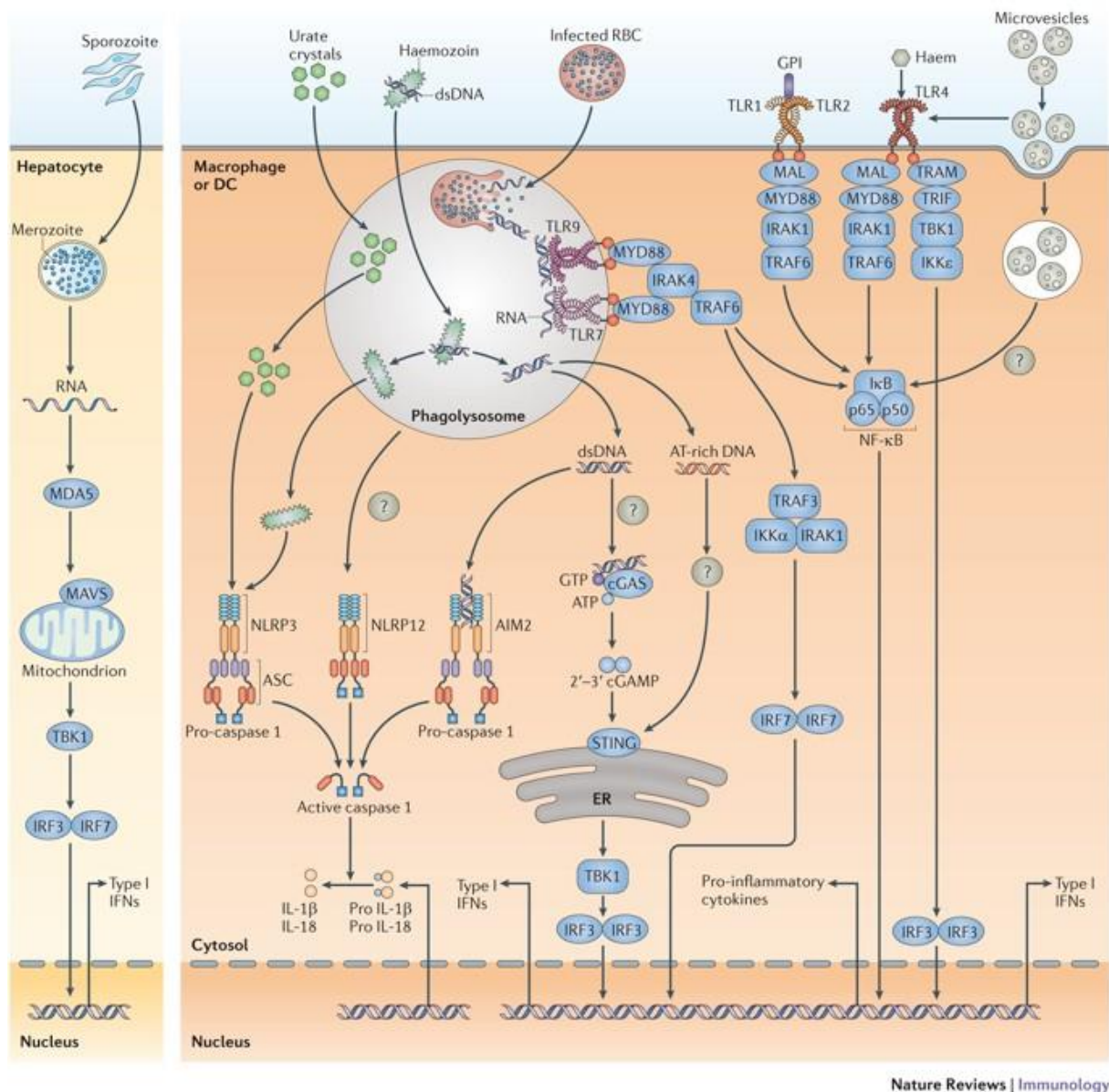


Figure 14: Reconnaissance des antigènes plasmodiaux

L'ARN dérivé des mérozoïtes se transloque de la vacuole parasitophore dans le cytoplasme des hépatocytes (panneau de gauche) et active la protéine 5 associée à la différenciation du mélanome (MDA5), qui signale par l'intermédiaire de la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) d'induire la production d'interférons de type I (IFN). L'hémozoïne fait circuler les acides nucléiques du *Plasmodium* dans les phagolysosomes (panneau de droite). Les TLRs (TLR7) et TLR9 sont activés par l'ARN et l'ADNdb du parasite, respectivement, tandis que les ancres du glycosylphosphatidylinositol (GPI) du parasite activent les hétérodimères TLR1-TLR2. Les microvésicules dérivées de l'hème et des cellules hôtes activent TLR4. Les TLR émettent un signal par le biais de la protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MYD88), qui conduit finalement au facteur nucléaire d'activation- κ B (NF- κ B) et à l'induction de cytokines pro-inflammatoires. Les cristaux d'hémozoïne déstabilisent les phagolysosomes, ce qui entraîne la libération de leur contenu dans le cytoplasme de la cellule hôte et l'activation des domaines NOD-, LRR- et pyrine contenant 3 (NLRP3) et NLRP12 qui s'assemblent en inflammasomes. La protéine inducible par l'IFN absente dans le mélanome 2 (AIM2), qui est activée par l'ADNdb du parasite, forme également des inflammasomes. Les inflammasomes recrutent la pro-caspase 1 soit directement (NLRP12), soit indirectement (NLRP3 et AIM2) via la molécule d'adaptation ASC. Cela conduit à l'activation de la caspase 1, et au clivage et à la sécrétion d'interleukine-1 β (IL-1 β) qui en

résultent. La GMP-AMP synthase cyclique (cGAS) génère le second messenger GMP-AMP cyclique (cGAMP), qui se lie et active le stimulateur de la protéine des gènes IFN (STING) qui à son tour active la sérine/thréonine-protéine kinase TBK1. La phosphorylation du facteur 3 de régulation de l'IFN (IRF3) médiée par TBK1 conduit à l'expression de l'IFN β . De plus, les motifs riches en Plasmodium AT activent un récepteur inconnu qui converge également sur la voie STING-TBK1-IRF3. Les points d'interrogation indiquent que certaines composantes de ces voies restent à caractériser. DC, cellule dendritique ; ER, réticulum endoplasmique ; $\text{I}\kappa\text{B}$, inhibiteur de NF- κB ; IKK, $\text{I}\kappa\text{B}$ kinase ; IRAK, kinase associée au récepteur IL-1 ; MAL, protéine MYD88 de type adaptateur ; TRAF, facteur associé au récepteur TNF ; TRAM, molécule d'adaptateur associée au TRIF ; TRIF, protéine d'adaptateur contenant un domaine TIR induisant IFN β ¹⁹⁹.

II.4 Diagnostic et stratégie de lutte contre le paludisme

La confirmation de la présence du parasite dans les cas de paludisme permet un traitement antipaludique spécifique à l'espèce et évite l'utilisation de médicaments antipaludéens les cas de tests négatifs. Les outils de diagnostic du paludisme reposent sur la mise en évidence directe ou indirecte de la présence de Plasmodium dans le sang.

Diagnostic directe

Le diagnostic direct repose sur les techniques de microscopie : frottis mince et goutte épaisse. Le frottis mince correspond à un étalement monocouche coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG). Sur le frottis mince les structures des éléments figurés du sang et des parasites sont conservées et permettent de faire le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales. La goutte épaisse correspond, elle, à une technique de concentration aboutissant à un frottis « épais » coloré au MGG après hémolyse, ne permettant plus de visualiser les structures cellulaires, les parois cellulaires ayant été lysées : ce dernier est donc d'interprétation souvent plus délicate, si l'œil n'est pas entraîné, mais a l'intérêt de détecter des parasitémies faibles non identifiées sur le frottis. La goutte épaisse reste le test référence et sa sensibilité est 20 à 30 fois plus élevée que celle du frottis mince.

Diagnostic indirecte

Le diagnostic indirect consiste en la mise en évidence de la présence du parasite par des techniques qui ne reposent pas sur l'observation directe du parasite. Ces techniques permettent indirectement d'identifier une infection palustre passée. Les différents outils utilisés sont :

Les tests de diagnostic rapide du paludisme (TDR) qui révèlent en 5 à 15 mn la présence ou l'absence d'un antigène de *Plasmodium* dans le sang du patient.

Les TDR sont de plus en plus utilisés en première ligne de diagnostic. La plupart des TDR sont basés sur la recherche l'antigène de la protéine 2 riche en histidine (*PfHRP2*) spécifique de *P. falciparum* et le lactate Déshydrogénase de Plasmodium (pLDH)

commune aux 4 espèces de *Plasmodium*. Sa précision pour le diagnostic d'une infection à *P. falciparum* non compliquée est égale ou supérieure à celle de la microscopie de routine²⁰². L'une des limitations des TDR est sa faible performance à diagnostiquer les infections palustres à parasitémie faible (>20 parasites/µl de sang).

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) qui permet la détection d'infections à bas bruits avec des parasitémies très faibles, la surveillance des gènes de résistance et le génotypage des espèces. Cette technique plus performante, nécessite des équipements plus lourds et très coûteux.

Recherche d'immunoglobulines spécifiques de *Plasmodium* par L'IFI (L'immunofluorescence indirecte) ou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Son intérêt réside dans le diagnostic rétrospectif éventuel, en particulier dans les formes très peu parasitémiques, dans le dépistage chez les donneurs de sang et dans les études épidémiologiques.

L'OMS a adopté en 2015 'la stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030' qui consiste à donner aux pays et aux structures de lutte, des orientations techniques en vue de réduire la charge du paludisme de 90% à l'horizon 2030.

La lutte contre le paludisme de nos jours comprend la lutte anti-vectorielle, menée sur la base de données épidémiologique et anthropologique et qui consiste à l'utilisation des moustiquaires imprégnées de longue durée d'action, assainissement de l'environnement domestique. La Chimio prévention qui est l'ensemble des stratégies de traitement préventif (combinaison thérapeutique à base d'artémisinine) qui vise à réduire la morbidité du paludisme. A cet effet L'OMS recommande le traitement préventif intermittent chez la femme enceinte (TPI) et la chimioprévention du paludisme saisonnier chez les enfants de moins de 5 ans (CPS)²⁰³. Les tests diagnostic, les traitements médicamenteux (combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine) et les vaccins antipaludiques.

Il n'existe actuellement aucun vaccin homologué contre le paludisme. L'Agence européenne des médicaments (EMA) a recommandé en 2014 l'homologation d'un vaccin antipaludique pré-érythrocytaire nommé RTS,S/AS01. Ce vaccin induit des réponses immunitaires humorales et cellulaires contre une protéine de stade hépatique (protéine circumsporozoïte) des sporozoïtes et des schizonts²⁰⁴. Le RTS,S est le seul vaccin ayant montré une certaine protection contre le paludisme chez les enfants (5 à 17 mois) dans le cadre d'un essai de phase 3²⁰⁵.

Avec plus de 5 300 protéines obtenues à partir séquençage du génome du *Plasmodium falciparum*, il existe plusieurs protéines cibles pour le développement de vaccins antipaludiques. Trois stades du cycle évolutif parasitaire sont à cibler pour un candidat vaccin contre le paludisme :

Les vaccins de stade pré-érythrocytaire : ils visent à inhiber le cycle hépatocytaire du parasite limitant ainsi l'invasion des globules rouges sains (GRS).

Les vaccins de stade sanguin asexué (anti-mérozoïtes) du parasite qui visent à empêcher l'invasion des GRS par les mérozoïtes en ciblant les protéines de surface du parasite.

Les vaccins de stade sexué qui sont conçus pour empêcher la transmission entre le vecteur et l'homme en induisant des anticorps contre des protéines des stades sexués du parasite chez le moustique.

II.5 Particularité du paludisme gestationnel

En zone d'endémie, le paludisme chez la femme enceinte est un problème majeur de santé publique. Il est caractérisé par la séquestration des hématies parasitées dans le placenta, phénomène encore appelé "paludisme placentaire". La séquestration des parasites dans les espaces intervillositaires du placenta perturbe les échanges gazeux et nutritionnels fœto-maternels à travers le placenta, provoquant ainsi des avortements spontanés, des accouchements prématurés ou des nouveau-nés de faible poids de naissance ^{19,206}. La sévérité des infections au cours de la grossesse détermine la prématurité et le retard de la croissance *in-utero*; ce qui représente un des facteurs de risque de la mortalité néonatale et infantile ²⁰⁷. Des études épidémiologiques et parasitologiques ont montré que le paludisme gestationnel ou placentaire est associé à un risque accru d'infections palustres et non palustres chez les nouveau-nés pendant les premières années de la vie ^{22,208,209}.

La séquestration placentaire

Les souches de *P. falciparum* impliquées dans le paludisme placentaire expriment à la surface des hématies, la protéine PfEMP1 codée par le gène VAR2CSA qui va favoriser le tropisme et la séquestration des ²¹⁰ hématies parasitées dans le placenta par adhérence à la chondroïtine sulfate A (CSA) exprimée à la surface des syncytiotrophoblastes comme le montre la figure 5 ¹⁷⁸.

Plusieurs études ont montré la forte expression des gènes *var* dans les isolats placentaires de *P. falciparum* ^{211,212} ou une forte association entre les niveaux plasmatiques d'IgG anti-VAR2CSA et le paludisme gestationnel ²¹³, ou encore l'altération du phénomène d'adhésion associée au paludisme placentaire en absence des gènes Var2CSA ²¹⁴. Var2CSA est un gène d'environ 350 kDa, composé de 6 domaines de type Duffy-Binding Like (DBL) une région inter-domaine riche en cystéines (CIDR) et plusieurs régions inter-domaines. Les domaines DBL sont de type α et ϵ (DBL1 α , DBL2 α , DBL3 α , et DBL4 ϵ , DBL5 ϵ , DBL6 ϵ) et ceux de type α sont intercalés par des Inter-Domaines (ID) riches en cystéine de taille variable qu'on retrouve uniquement chez var2CSA ²¹⁵. Plusieurs équipes s'intéressent au mécanisme de cytoadhérence des HP dans le placenta en vue d'identifier des domaines qui pourraient intervenir dans la conception d'un vaccin contre le PAG (figure 15).

Dans les zones à forte transmission du paludisme, les femmes enceintes développent une résistance au PAG qui se met progressivement en place lors des grossesses successives. L'acquisition d'une immunité contre le PAG est associée au développement d'une large réponse anticorps protectrice contre les hématies parasitées placentaires ^{216,217}. Ces anticorps naturellement acquis ciblent la séquence NTS-DBL2X du VAR2CSA et inhibent l'adhérence des parasites placentaires à la CSA ²¹⁷⁻²¹⁹.

Deux candidats vaccins à base de VAR2CSA (PRIMVAC et PAMVAC) sont actuellement en cours de développement clinique ²²⁰. Les antigènes sélectionnés englobent différentes régions et séquences VAR2CSA avec des propriétés antigéniques potentiellement distinctes qui pourraient se compléter en termes de pouvoir immunogène et d'efficacité protectrice. PRIMVAC est basé sur un multidomaine DBL1x-2x de VAR2CSA se liant à la CSA de la souche 3D7 de *P. falciparum* (DBL1x-2x (3D7) et PAMVAC se concentrent sur ID1-DBL2X-ID2a, un dérivé de 73 kDa de VAR2CSA de la souche *P. falciparum* FCR3 ^{220,221}.

Conséquences chez la femme

Chez la femme enceinte la réponse humorale est favorisée aux dépens de la réponse cellulaire par un déséquilibre Th1/Th2 en faveur de la réponse de type Th2. Ce changement immunologique nécessaire à l'implantation du placenta et au maintien de la grossesse serait la conséquence de la susceptibilité des femmes enceintes aux infections parasitaires telle que le paludisme ²²²⁻²²⁴.

L'infection à *P. falciparum* chez la femme enceinte entraîne l'infiltration de monocytes et de macrophages dans le tissu placentaire pour l'opsonisation et la phagocytose des hématies parasitées. *P. falciparum* induit principalement une activité des cytokines de type Th1 avec l'augmentation relative des TNF- α et une diminution des réponses IL-10 ^{225,226}. Cette dynamique des profils de cytokines au cours de la réponse contre *P. falciparum*, joue un rôle clé dans la polarisation de la réponse adaptative vers Th1 ou Th2 et peut être nocive à la mère et fœtus ²²⁵.

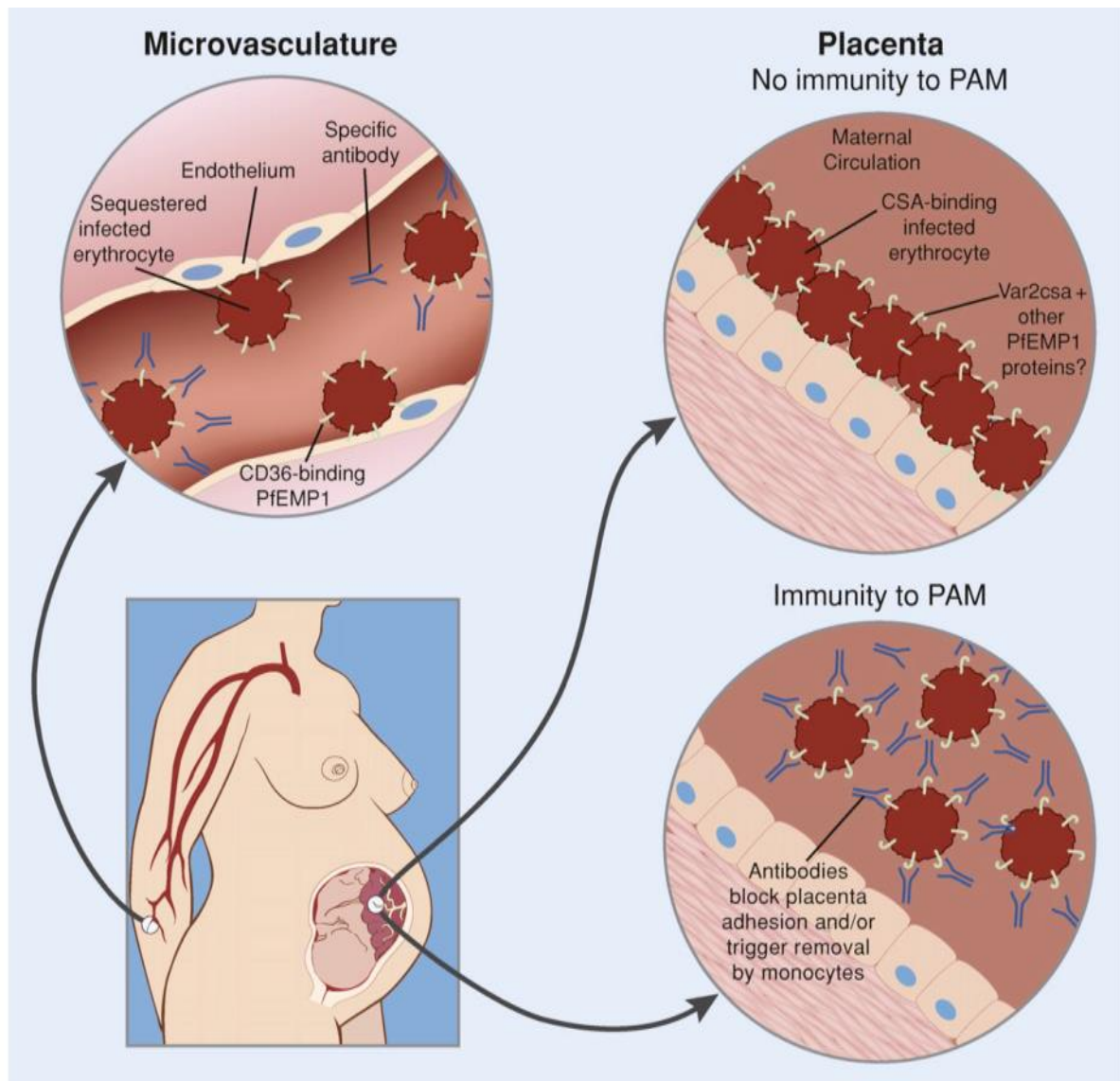


Figure 15 : Cytoadhérence des érythrocytes infectés dans le paludisme gestationnel²²⁷

Le mécanisme par lequel les antigènes du plasmodiaux accèdent à la circulation sanguine du fœtus après avoir traversé le placenta n'est pas encore tout à fait clair. Certains antigènes du paludisme semblent être transportés à travers le placenta comme des complexes immuns transportés à travers la couche de cellules syncytiotrophoblastes par le récepteur Fc néonatal ²²⁸. En plus du transport médié par les récepteurs Fc, les antigènes plasmodiaux peuvent accéder plus directement à la circulation sanguine fœtale, à la suite du dénudement focal et la nécrose de la couche syncytiotrophoblastique par les protéines inflammatoires impliquées dans le paludisme gestationnel ²¹⁰. La détérioration de la barrière placentaire un contact du noyau stromal des villosités directement avec le sang maternel. Cela peut permettre à de grosses molécules ou même à des cellules d'entrer dans la circulation fœtale ^{229,230}.

III. Infections systémiques et régulation de la réponse immunitaire innée

III.1 Immunité Innée

Les infections néonatales sont en général contractées *in utero* (voir figure 2). De multiples éléments immunitaires sont présents pour empêcher l'entrée et la propagation des agents pathogènes tout en permettant la présence d'organismes commensaux nécessaires à l'homéostasie. Les barrières physiques y compris la peau et les muqueuses sont les premiers points de contact entre les pathogènes et l'hôte²³¹⁻²³³. Lorsque la barrière locale compromise, le point de départ de l'état septique est la colonisation d'un organe ou fluide de l'organisme par un microorganisme pathogène ou potentiellement pathogène, induisant d'abord une réaction inflammatoire locale. Les macrophages résidents et les cellules dendritiques constituent la première ligne de défense contre les micro-organismes. La reconnaissance et la réponse immunitaire aux agents pathogènes sont déclenchées par la liaison des molécules microbiennes appelées "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) à une variété de récepteurs exprimés sur les cellules immunitaires innées, y compris les neutrophiles, les cellules Naturel Killer (NK), lymphocytes T, monocytes, macrophages et cellules dendritiques (DC)^{183,234}. Ces récepteurs, connus sous le nom de "Pattern Recognition Receptors" (PRR), comprennent les récepteurs de types Toll (TLR), RIG-I (retinoid acid-inducible gene I), NOD (NLR), AIM2 (ALR), les récepteurs de lectine de type C (CLR) et des capteurs d'ADN intracellulaires^{234,235}. La figure 16 montre l'activation des cellules effectrices du système immunitaire inné par les PAMPs déclenchent en aval les voies de signalisation qui conduisent à la transcription ultérieure des médiateurs inflammatoires.

La réponse pro-inflammation

La stimulation de PRRs entraîne une transcription rapide du médiateur inflammatoire et une traduction axée sur l'activation et l'élimination des organismes pathogènes (voir figure 16). Chez l'adulte, au cours du sepsis et du choc septique, de multiples cytokines pro-inflammatoires ont été identifiées, notamment IL-1 β , IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-12, IL-18, IFN- γ , et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α ²³⁶. Par rapport aux adultes septiques, les nouveau-nés développant un sepsis produisent moins d'IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , et IL-12^{237,238}.

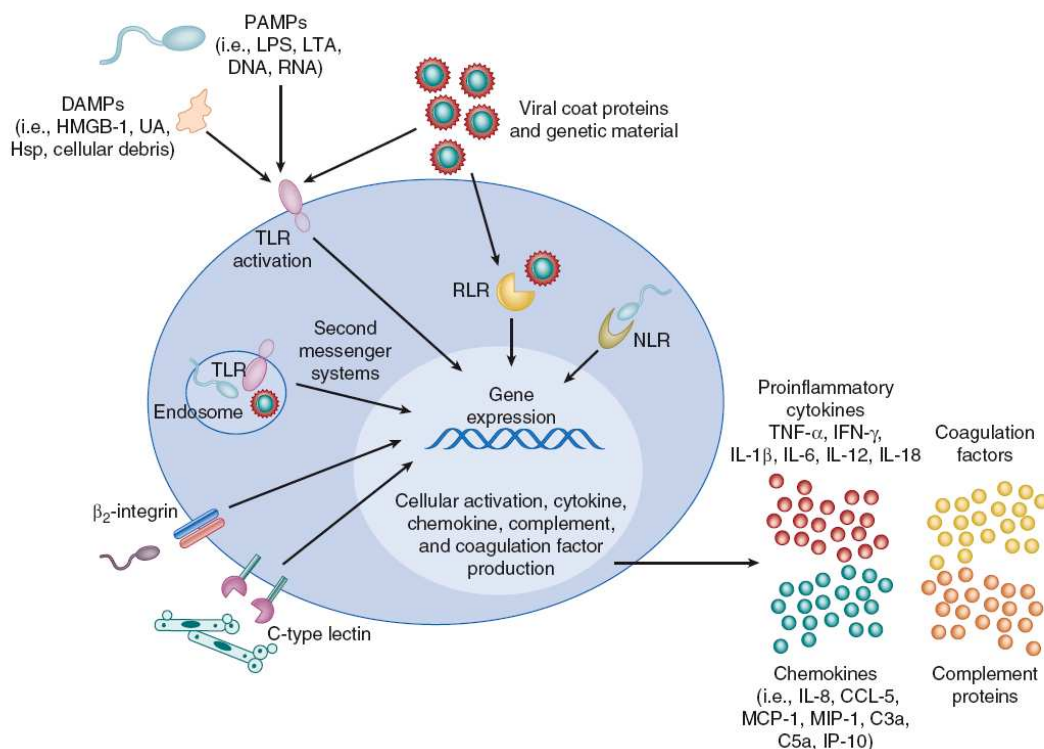


Figure 16: Activation des cellules immunitaires sentinelles

La signalisation des PRR par les PAMPs se fait par une série de seconds messagers et entraîne la transcription et la traduction de cytokines et de chimiokines qui amplifient la réponse immunitaire. IFN, Interféron, IL, interleukine, MCP, protéine chemoattractante des monocytes, MIP, protéine inflammatoire des macrophages, NLR, récepteurs de type NOD, RLR, rétinolique protéine inducible par les acides, récepteur I like, TNF, facteur de nécrose tumorale, TLR, récepteur Toll-like²³⁹.

La diminution de la production de cytokines est due en partie à la diminution de la production d'importants médiateurs intracellulaires de la signalisation TLR, y compris le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88), Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5), et p38, qui présentent des diminutions spécifiques à l'âge gestationnel²⁴⁰.

La réponse anti-inflammatoire

Si l'agent pathogène n'est pas contenu localement et l'homéostasie inflammatoire rétablie, les conséquences peuvent inclure un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) associé à une défaillance de plusieurs organes et à la mort (figure 17). L'interaction entre les stimuli anti et pro-inflammatoires sert à fournir la réponse immunitaire pour permettre le confinement local des pathogènes mais aussi à empêcher l'activation systémique conduisant à des dommages inflammatoires excessifs par le SIRS²⁴¹. À cette fin, la production de cytokines anti-inflammatoires pendant l'infection (le TGF-β, l'IL-4, l'IL-10, l'IL-11 et l'IL-13) est quasi simultanée contrant les actions des cytokines pro-inflammatoires. Ces médiateurs atténuent l'activation des cellules phagocytaires, bloquent la fièvre, modifient l'expression du

facteur de coagulation et diminuent la production de ROI/RNI, NO et autres médiateurs vasoactifs²³⁹. Des inhibiteurs de cytokines pro-inflammatoires ont été rapportés dans les sepsis néonataux^{239,242}. Le rôle de ces inhibiteurs régulateurs de cytokines dans la réponse immunitaire à la septicémie néonatale est encore mal étudié.

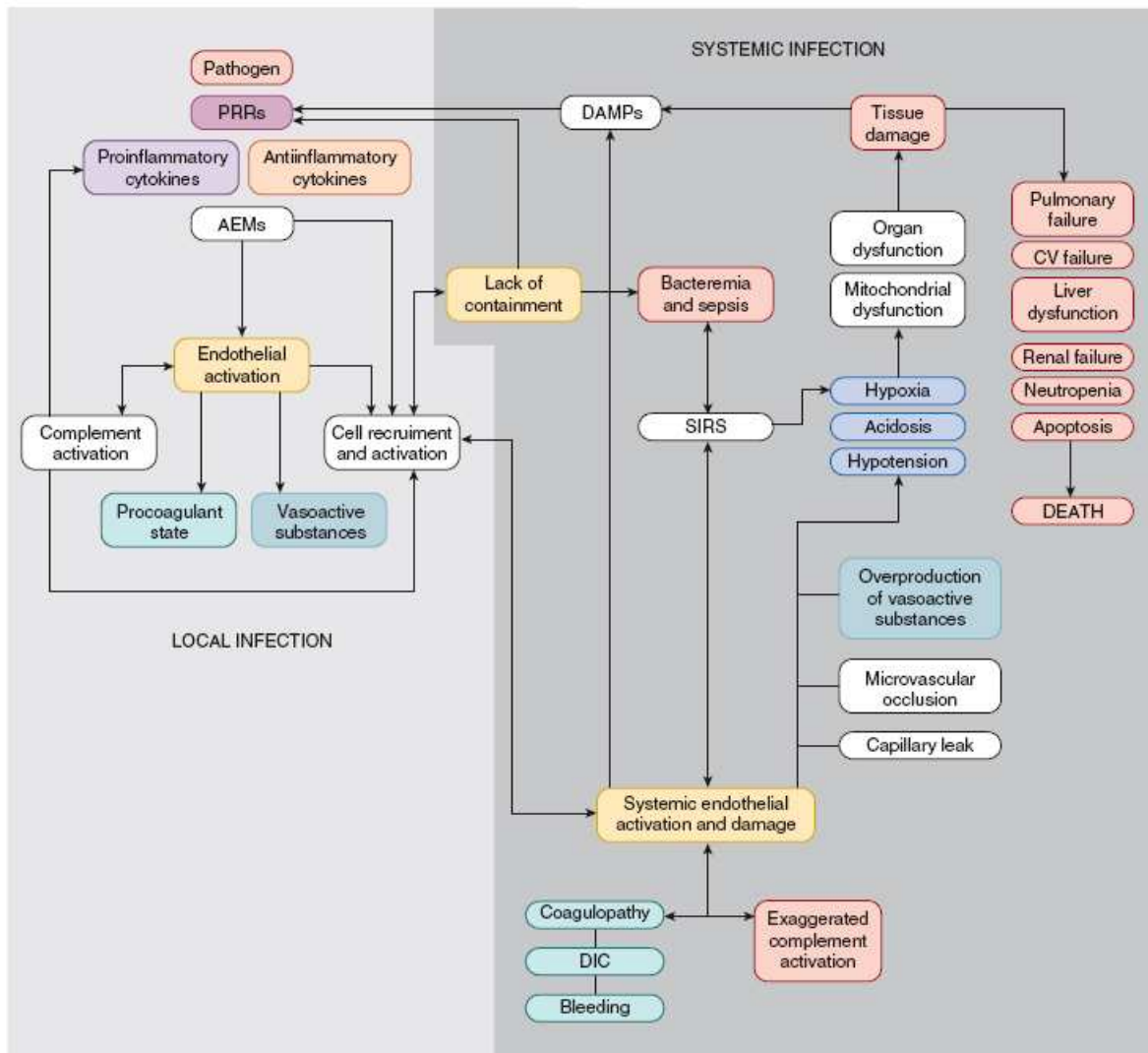


Figure 17: Physiopathologie de la septicémie néonatale et du choc septique.

AEMs, Mécanismes anti-microbiens effecteurs ; CV, cardiovasculaire ; DAMPs, schémas moléculaires associés aux dommages ; CVID, coagulation intravasculaire disséminée ; PRR, récepteurs de reconnaissance de schémas ; SIRS, syndrome de réponse inflammatoire systémique²³⁹.

III.1.1 Les récepteurs de type Toll

Lors de la reconnaissance initiale des pathogènes, les récepteurs TLR jouent un rôle central dans l'activation du système immunitaire inné et l'initiation de la réponse appropriée à l'infection. Chez l'homme, il a été identifié 10 TLRs dont certains sont à la surface cellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR10) et d'autres dans des

compartiments intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) ^{184,243}. Des analyses cristallographiques des ectodomaines des TLRs ont permis de comprendre de manière structurale les interactions entre les TLRs et les PAMPs. Ces derniers peuvent être des lipides, des lipoprotéines, des protéines ou des acides nucléiques provenant aussi bien de bactéries, virus, champignons ou parasites. Ainsi TLR1, 2 et 6 reconnaissent les lipopeptides bactériens, le TLR3 reconnaît les ARN double brin des virus, le TLR4 reconnaît le LPS des bactéries Gram négatives, le TLR5 reconnaît la flagelline des bactéries et le TLR9 reconnaît le motif CpG non méthylé des certaines coiffes d'ARN de virus. De plus les TLR7 et TLR8 sont activés par des molécules de la famille des imidazoquinolines. Les TLR1/TLR2, ainsi que les TLR2/TLR6, peuvent fonctionner comme homodimère, mais aussi s'associer en hétérodimère pour permettre d'élargir le spectre des molécules reconnues. Pour les TLR3, 4, 5 ou 9 ils fonctionnent en homodimères mais ont besoin de s'associer à d'autres molécules accessoires pour permettre une reconnaissance optimale du signal. La reconnaissance des PAMP par les TLRs peut se faire dans différents compartiments cellulaires, dont la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes ²⁴⁴. Le tableau 1 présente les récepteurs TLRs et leurs différents ligands associés. Les TLRs sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires, y compris les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes B, certaines classes de lymphocytes T et les plaquettes. Ils peuvent être également exprimés par des cellules ne participant pas à la réponse immune telles que les cellules fibroblastes ou les cellules épithéliales ²³⁴.

Récepteurs	Motif moléculaire	Pathogènes
TLR1	Triacyl des lipoprotéines	Bactéries, mycobactéries
TLR2	Lipoprotéines	Bactéries
	Acides lipotéichoïques	Bactéries à Gam positif
	Lipoarabinomannane	Mycobactéries
	Glycoprotéines virales	Herpès simplex virus
	Zymozan	Levures
TLR3	ARN double brin d'origine virale ou parasitaire	Virus
TLR4	Lipopolysaccharide des bactéries à Gram négatif	Bactéries à Gam négatif
	Glycoprotéines virales	
TLR5	Flagelline	Bactéries flagellées
TLR6	Diacyl des lipoprotéines	Bactéries Gam positif
	Diacyl des lipopoptides	Bactéries flagellées
TLR7	ARN simple brin	Virus

TLR8	ARN simple brin	Virus
TLR9	ADN CPG non-méthylés	Bactéries, Virus, Mycobacterium tuberculosis
TLR10	Inconnu	Inconnu

Tableau 2 : Reconnaissance des motifs microbiens par les récepteurs TLRs

III.1.2 Structure et signalisation des TLRs

Les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I (partie N-terminale du coté extracellulaire) et se composent d'une région extérieure, d'un domaine de recouvrement membranaire et d'un domaine intracytoplasmique contenant une région appelée *Toll-IL-1R homology (TIR) domain*. Le domaine intracytoplasmique des TLRs présente une grande similarité avec la famille des récepteurs de l'interleukine-1 (IL-1)²⁴⁵. Le domaine extérieur contient de nombreuses répétitions riches en leucine (LRR) qui servent de site de liaison au ligand. Le domaine TIR interagit avec le TIR et les autres membres de la voie de transduction du signal TLR. Il existe 3 séquences conservées d'acides aminés appelées Box 1, 2, 3 qui sont essentielles pour cette interaction et sont la caractéristique du domaine TIR (figure 18). En absence de stimulation, les TLRs se trouvent sous forme monomérique (TLR de surface), homodimérique ou hétérodimérique préformés (endolysosomaux). La dimérisation des TLRs est essentielle à leur activation. La liaison du ligand à l'ectodomaine du TLR induit une modification de sa conformation, ce qui permet l'interaction entre les domaines TIR des dimères TLRs. La voie de signalisation des TLRs se compose de deux voies différentes, la voie dépendante de MyD88 qui est commune à tous les TLRs sauf le TLR3 et la voie indépendante de MyD88 qui est propre au TLR3^{245,246}.

L'activation du TLR contribue à l'initiation des réactions inflammatoires. L'activation de NF-κB permet pour la transcription de gènes immunomodulateurs, notamment les gènes de diverses cytokines et chimiokines. Le site la production de cytokines et de chimiokines déclenche à son tour l'inflammation par le recrutement de cellules immunitaires de l'hôte et l'activation des défenses antimicrobiennes. L'inflammation déclenchée par la signalisation TLR permet l'élimination du pathogène, mais peut également nuire à l'hôte en endommageant les tissus de l'hôte ou en provoquant un choc septique²⁴⁷.

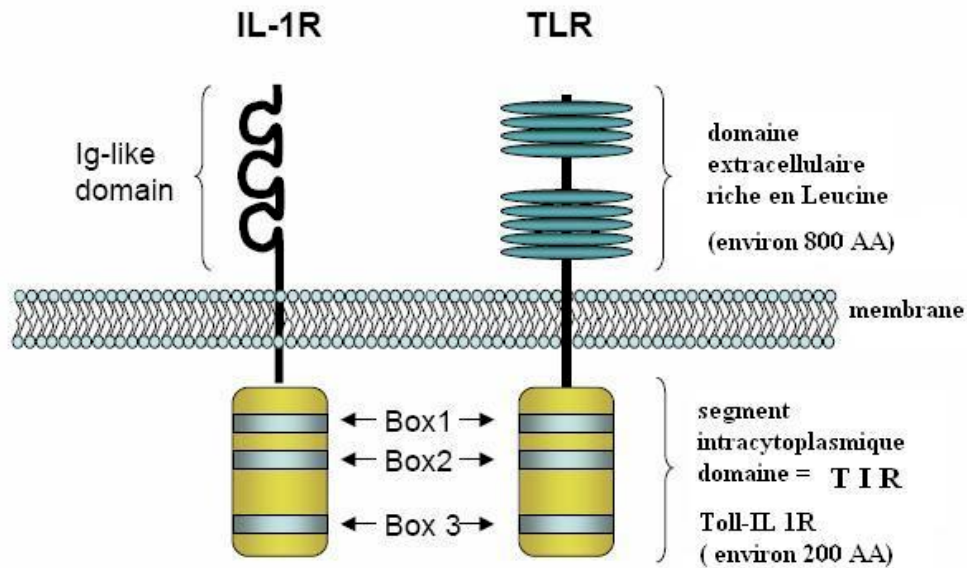


Figure 18 : structure de TLR ²⁴⁵

III.1.3 Le complexe de reconnaissance MD-2/TLR4

Le récepteur Toll like 4

Le premier TLR à avoir été identifié chez l'homme fut TLR4 par le groupe de Janeway ²⁴⁸. Comme les autres TLR, le TLR4 a une structure modulaire composée d'un domaine constitué de répétitions riches en leucine (LRR) dans la partie extracellulaire, connectée à un domaine TIR intracellulaire responsable de la transmission du signal. Il est principalement exprimé sur les cellules du système immunitaire y compris les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. TLR4 est impliquée dans la reconnaissance du LPS (endotoxine contenue dans la paroi des bacilles à Gram-négatif). La reconnaissance moléculaire de quantités infimes de LPS circulantes par le système récepteur TLR4, suivie d'une dimérisation du récepteur sur la membrane cellulaire, déclenche une cascade d'interactions protéine-protéine conduisant à la production de cytokines et d'interférons pro-inflammatoires, déclenchant ainsi des réponses immunitaires comme l'inflammation (figure 19).

Le TLR4 ne se lie pas directement au LPS. La liaison au LPS et la signalisation du TLR4 nécessitent la présence de plusieurs protéines qui sont le LPS-binding protein (LBP), CD14 (protéine membranaire ancrée au glycosylphosphatidylinositol) et la protéine adaptatrice MD-2 (Myeloid differentiation factor-2). L'étape initiale de la liaison implique la protéine de liaison au LPS (LPS Binding Protein, LBP) qui extrait le LPS des membranes bactériennes et des vésicules contenant du LPS pour le transférer vers le CD14. Ce dernier décompose les agrégats de LPS et transfère le LPS monomère dans la poche hydrophobe de MD-2 qui forme un complexe avec le TLR4 permettant

l'hétérodimérisation de deux complexes LPS_MD-2_TLR4 et l'activation de la signalisation TLRs. L'activation de TLR4 entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice intracellulaire MyD88 (la réponse primaire de différenciation myéloïde 88) et/ou le récepteur Toll/interleukin-1 (TIR). Cette voie dépendante de TRIF implique le recrutement de protéines adaptatrices TIR-domain-containing adaptator containing interféron- β (TRIF) et la molécule adaptatrice apparentée au TRIF (TRAM). Les signaux TRAM-TRIF activent le facteur de transcription Interferon Regulatory Factor-3 (IRF3) via TRAF3. L'activation d'IRF3 induit la production de médiateurs pro-inflammatoires notamment l'interférons de type 1^{249,250}. En plus des PAMP bactériens et des DAMP cellulaires, TLR4 reconnaît également les PAMP d'autres pathogènes, notamment les champignons, les parasites et les virus²⁵¹. La façon dont le complexe TLR4 est activé par les DAMP et les non-LPS PAMP, qui varient considérablement dans leur structure (non similaire à LPS) reste à déterminer.

Une fois le complexe LBP/CD14 et TLR4 / MD-2 formé et activé à la surface cellulaire, le signal intracellulaire suit une des deux voies de signalisation distinctes, TLR4 / MyD88 / NF- κ B et TLR4 / TRIF / Voies IRF3 (Figure 19). Les voies dépendantes de MyD88 et dépendantes de TRIF sont compétitives et s'excluent mutuellement²⁵². La voie TLR4 / MyD88 démarre à partir du complexe (LPS / MD-2 / TLR4) situé sur la membrane cytoplasmique, tandis que la transduction TLR4 / TRIF commence après l'internalisation complexe dans les endosomes.

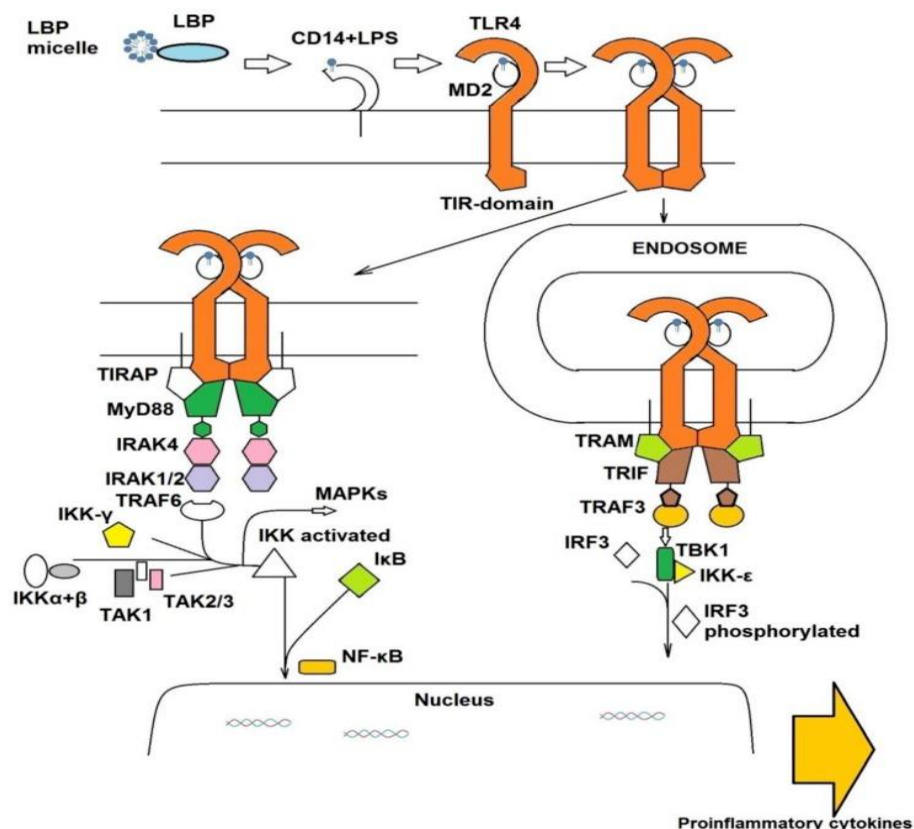


Figure 19: La voie de signalisation des lipopolysaccharides (LPS) / TLR4

La partie extracellulaire (médiée par la protéine de liaison au LPS (LBP), le cluster de différenciation 14 (CD14 et MD-2) et la partie intracellulaire (différenciation myéloïde) gène de réponse primaire (MyD88) et branches d'interféron- β (TRIF) induisant l'adaptateur contenant le domaine TIR²⁵⁰.

Dans la voie dépendante de MyD88, l'adaptateur TIRAP est recruté pour le dimère TIR-TIR des deux TLR4 constituant l'hétérodimère activé, et la liaison se produit *via* son domaine TIR. TIRAP est une protéine intracellulaire et possède un domaine de liaison au 4,5-bisphosphate de phosphatidylinositol qui est nécessaire pour l'ancrage de la membrane et forme un homodimère^{250,253}. Il se lie aux domaines TIR de TLR4 et forme ensemble une interface pour l'arrivée et la jonction de MyD88. Les molécules MyD88 forment un complexe et se lient à la sérine / thréonine kinases, aux kinases 2 et 4 associées aux récepteurs de l'interleukine-1 (IRAK2 et IRAK4), formant ce que l'on appelle le myddosome. La formation de myddosomes favorise l'autophosphorylation d'IRAK4. IRAK1 peut également se lier au complexe MyD88-IRAK4 et être phosphorylé par IRAK4. Ensuite, le facteur 6 associé au récepteur TNF (TRAF6) est recruté, ce qui forme un trimère²⁵². Il se lie à IRAK1 et TRAF6 phosphorylés, l'ubiquitine ligase E3, favorise la poly-ubiquitination de lui-même au site Lys63. Les chaînes de polyubiquitine de TRAF6 sont reconnues par les protéines adaptatrices TAB2 / TAB3 et la sous-unité IKK γ du complexe IKK²⁵⁰. Il permet le recrutement et l'activation de TAK1 et la phosphorylation du complexe I κ B, respectivement, favorisant sa dégradation et sa libération de NF- κ B. TAK1 active diverses protéines kinases activées par les mitogènes et, avec NF- κ B, elles induisent la production et la libération de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IL-6²⁵⁰⁻²⁵².

De manière générale, le complexe récepteur actif de LPS comprend, CD14, LBP, TLR4 et MD-2 (Figure18) mais des études suggèrent que CD14 et LBP ne sont pas absolument nécessaires pour la liaison et la signalisation LPS²⁵⁴. Quant à MD-2, elle détermine partiellement la spécificité de liaison du complexe récepteur TLR4 / MD-2 pour les variants de LPS et peut par conséquent, affecter la fonction du récepteur TLR4^{254,255}.

Myeloid differentiation factor-2 (MD-2)

MD-2 anciennement appelé LY96, est une protéine accessoire essentielle à la reconnaissance des ligands de TLR4, notamment LPS. MD-2 est une glycoprotéine de 160 acides aminés dont le gène se trouve sur le chromosome 8 et est constitué chez tous les vertébrés de 5 exons et de 4 introns. Elle pourrait jouer un rôle dans le développement des systèmes hématopoïétique et nerveux. Elle est exprimée dans les tissus embryonnaires, y compris les îlots vitellin-sang et le système nerveux en développement. On retrouve l'ARNm de MD-2 exprimé dans les tissus adultes (rate,

moelle osseuse, thymus, ovaires, testicules, foie, reins, intestin grêle et la peau)²⁵⁶. MD-2 est nécessaire pour la glycosylation de TLR4 pour son transfert à la surface cellulaire²⁵⁷. MD-2 est lié à TLR4 sous forme soluble dans les liquides biologiques. La forme soluble recombinante de MD-2 est un mélange en solution de monomères, dimères et multimères. Seule la forme monomérique est capable de se lier à TLR4 et de jouer son rôle de co-facteur dans la réponse au LPS²⁵⁸.

On note une absence de réaction au LPS chez Les souris MD-2 -/- , qui sont capables de survivre au choc endotoxique , soutenant un rôle significatif de MD-2 dans les réponses inflammatoires dépendant du TLR4 *in vivo*²⁵⁹. Chez les patients atteints de septicémie sévère MD-2 soluble s'infiltré dans l'espace extravasculaire et peut favoriser la réponse LPS dans les cellules épithéliales exprimant TLR4 dans les poumons et dans d'autres organes²⁶⁰.

III.2 Régulation de la réponse innée

La génétique est associée à l'immunité et est constamment mise à l'épreuve par la présence des pathogènes. Lors de la reconnaissance de composants microbiens (PAMP), les PRRs induisent des réseaux de signalisation intracellulaires pour activer des facteurs de transcription qui régulent les gènes impliqués dans les réponses inflammatoires et l'immunité anti-pathogène. L'expression des gènes fait appel à l'ensemble des processus biochimiques partant de d'ADN (acide désoxyribonucléique) à la protéine produite en passant par la production d'ARN (acide ribonucléique) codant ou non codant à partir de l'information stockée dans les gènes. De nombreux mécanismes sont mis en place pour réguler l'expression des gènes afin de permettre la différenciation cellulaire, le contrôle de l'infection et le maintien de l'hémostase^{261,262}. La régulation des gènes immunitaires implique également d'autres points de contrôle post-transcriptionnels supplémentaires qui se produisent au niveau de l'ARN messager (ARNm) et qui conduisent à la production des protéines fonctionnelles.

III.2.1 Transcription de l'ARN messager

Toutes les modifications de l'ARNm sont nécessaires et contribuent à la variation individuelle de chaque gène. Elles signent la spécificité de l'expression des gènes en fonction de leurs tissus d'expression et du microenvironnement dans lequel se trouvent les cellules. Chez les cellules eucaryotes et les procaryotes, la régulation des gènes est initiée par la transcription. Au cours de leur transcription, les ARN-pré messagers subissent des modifications nécessaires à leur maturation y compris l'épissage alternatif qui est un mécanisme de régulation pouvant effectuer un contrôle quantitatif de l'expression des gènes et une diversification fonctionnelle des protéines.

L'épissage alternatif

Contrairement aux gènes procaryotes, les gènes eucaryotes sont composés de courtes régions codantes (exons) et de longues régions non-codantes (introns). Ces régions sont bordées par des jonctions portant des motifs de séquence spécifiques. L'obtention d'ARN messager mature fonctionnel nécessite l'élimination des introns tout en maintenant les exons. L'épissage effectué par un supra-complexe ribonucléoprotéique appelé le spliceosome, permet de retirer les introns au sein du pré-ARNm et d'assembler les exons pour former le transcrit mature. Chez l'homme, il existe de nombreux introns dont les sites 5' et 3' d'épissage sont dégénérés par rapport aux séquences consensus. L'intervention de séquences régulatrices permet des modulations du taux d'utilisation des sites d'épissage entraînant un épissage dit alternatif des exons ²⁶³. L'épissage alternatif permet chez l'homme d'augmenter significativement la capacité codante du génome en exprimant plusieurs protéines avec des fonctions ou des spécificités distinctes voire même opposées, à partir d'un seul gène. Il résulte de ce processus, la formation de plusieurs isoformes alternatives et il est aujourd'hui estimé que plus de 94% des gènes humains subissent un épissage alternatif ²⁶¹. Les types d'épissage alternatif qui modifient la séquence codant les protéines comprend des exons mutuellement exclusifs, le saut d'exon, la rétention d'intron et l'utilisation alternative des sites d'épissage 5' ou 3' aux extrémités des introns.

L'épissage alternatif comprend plusieurs modèles de base (figure 20) : les exons peuvent être soit étendus soit raccourcis par l'utilisation de sites d'épissage alternatifs, soit sautés ou inclus, soit inclus de manière mutuellement exclusive ; les introns peuvent être soit retirés soit conservés. Souvent, plusieurs modèles d'épissage sont combinés dans le traitement d'un seul pré-ARNm et se produisent dans la même cellule ; le rapport entre les différentes formes d'épissage est généralement caractéristique d'un certain type de cellule ou de tissu. Par conséquent, l'épissage alternatif est capable de donner naissance à de multiples isoformes d'ARNm.

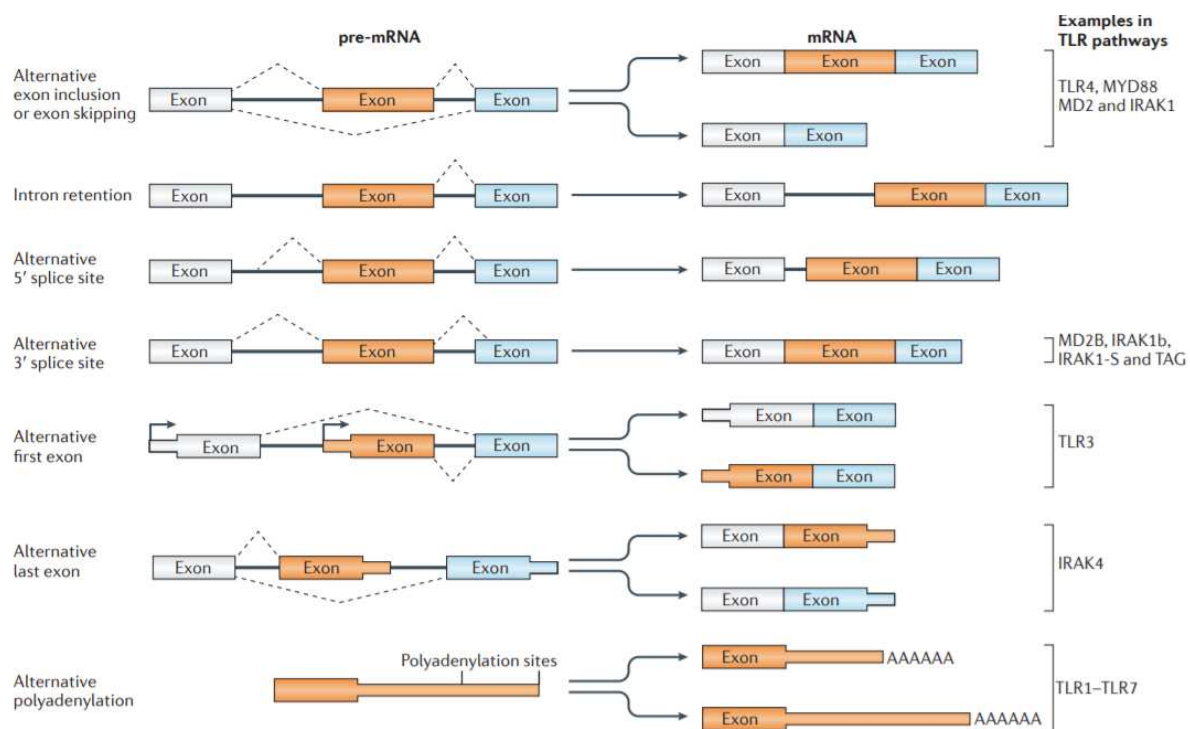


Figure 20: Différents Modèles d'épissage alternatif ²⁶¹

Régulation de la signalisation des TLRs par épissage alternatif

La voie de signalisation TLR est soumise à une régulation post-transcriptionnelle étendue, dans laquelle plus de 256 transcrits traités alternativement codent des variantes de récepteurs, d'adaptateurs et de molécules de signalisation ²⁶⁴. Chaque gène TLR possède de nombreux variants épissés alternativement ^{261,264}. Ces variantes de transcriptions ont une myriade d'effets sur la transduction du signal. Par exemple, les différentes isoformes des récepteurs TLR2 et TLR4 ont été associés à une augmentation de la sensibilité aux infections bactériennes ^{265,266}.

III.2.2 Régulation du complexe MD-2/TLR4

La régulation de TLR4

Des variabilités dans l'expression des isoformes du complexe de reconnaissance des endotoxines TLR4-MD-2 ont été décrites associées à des modifications de la réponse de l'hôte aux bactéries Gram négatif ²⁶⁷⁻²⁶⁹. L'analyse de l'épissage alternatif TLR4 a permis de mettre en évidence 4 variants (figure 21A) de transcription codant pour différentes isoformes chez l'humain ²⁶⁴.

On retrouve les séquences de référence des quatre variants de l'épissage des ARNm de TLR4 humain dans la base de données du National Center for Biotechnology

Information (NCBI). Les quatre variants du gène TLR4 contiennent l'exon I et l'exon IV tandis que les exons II et III sont des alternatives (figure 21B).

Chez la souris, il a été décrit un variant soluble de TLR4 dépourvu des domaines transmembranaires et intracellulaires : le smTLR4 qui inhibe les réponses inflammatoires excessives au LPS ²⁶⁹. La présence d'un codon stop dans l'exon II du TLR4 humain pourrait donner naissance à une petite protéine soluble semblable au smTLR4 et exercer une fonction inhibitrice dans la signalisation TLR4 ²⁶⁷.

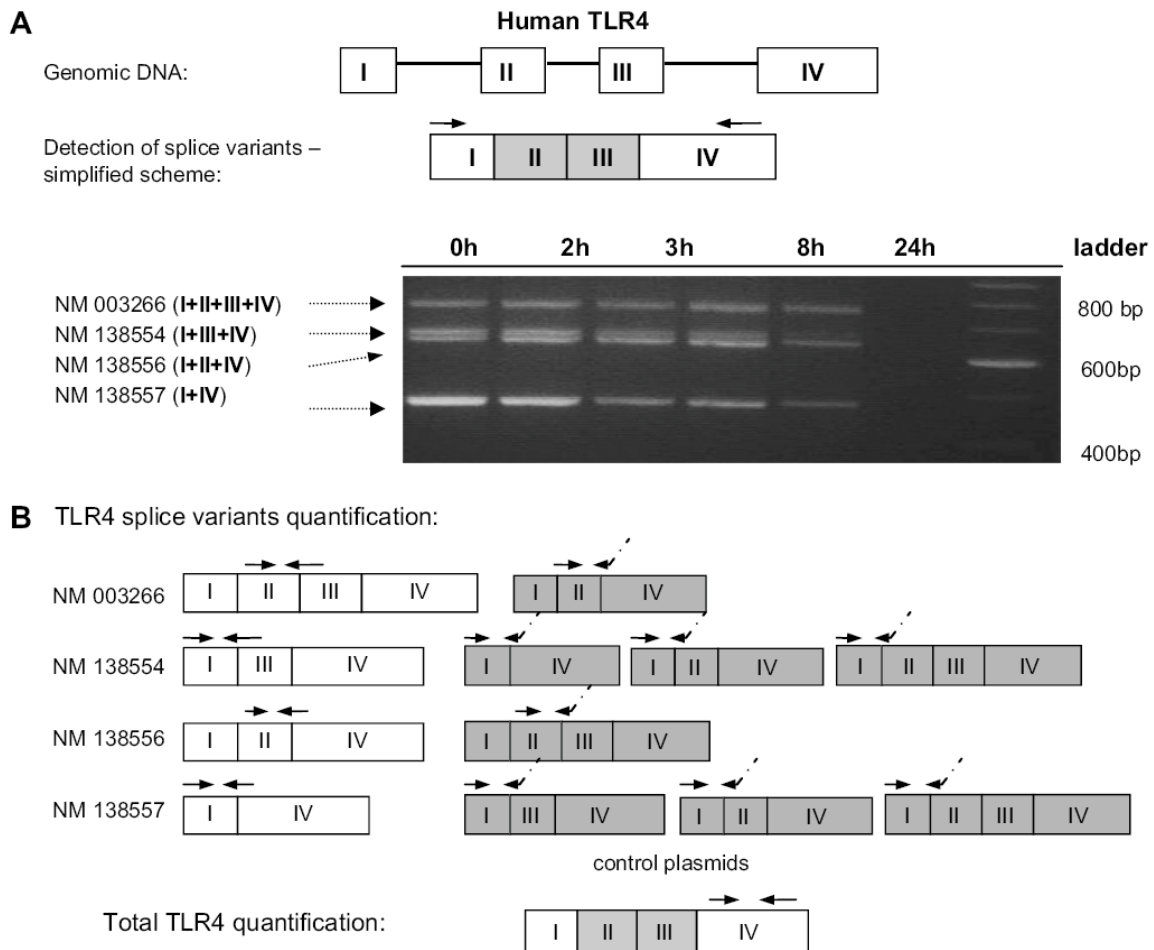


Figure 21: Épissage alternatif du gène TLR4

A, Structure de l'exon du gène TLR4 humain et la détection des variantes d'épissage TLR4 dans des cellules dendritiques (DC) humaines dérivées de monocytes et traitées avec 100 ng/ml LPS pour les heures indiquées. La TLR4 humaine contient quatre exons (représentés sous forme de boîtes). Les exons II et III sont alternatifs (marqués par un ombrage). B Représentation schématique de l'épissage TLR4. La détection quantitative des variantes. Les exons I et IV sont représentés par des cases et des flèches indiquant les amorces, conçues dans les jonctions d'exon ²⁶⁷.

La régulation de MD-2

MD-2 est une protéine de la phase aiguë dont les mécanismes de régulation ont été décrits par notre équipe^{270,271}. Les travaux de Gray et al., ont mis en évidence l'existence d'une nouvelle isoforme du MD-2 humain qui résulte d'un déficit de l'exon 2. Cette isoforme provient d'un épissage alternatif de l'ARN qui code pour la protéine totale. L'absence de l'exon 2 entraîne une délétion de 90pb et une substitution d'acide aminé (D38G) à la jonction entre l'exon 2 et 3. Cette nouvelle forme de MD-2 de 14,9 kDa est appelée MD-2SH (forme courte) par opposition à l'isoforme complète appelée MD-2 (forme longue)^{268,272} (figure 22). MD-2 est aussi présente sous forme soluble et existe en grande quantité dans le plasma et d'autres liquides organiques, dans les situations inflammatoires. C'est une opsonine pour les bactéries à Gram-négatif et sert de médiateur dans la phagocytose TLR4-dépendante de ces bactéries²⁷⁰. MD-2 se lie aux bactéries à Gram-négatives mais pas Gram-à positives, et la MD-2L sécrétée par les cellules hépatocytaires est un cofacteur essentiel pour l'activation des cellules exprimant TLR4 par les bactéries Gram-négatives. L'opsonisation MD-2SH par les bactéries Gram-négatives accélère et améliore la phagocytose, principalement les neutrophiles polymorphonucléaires.

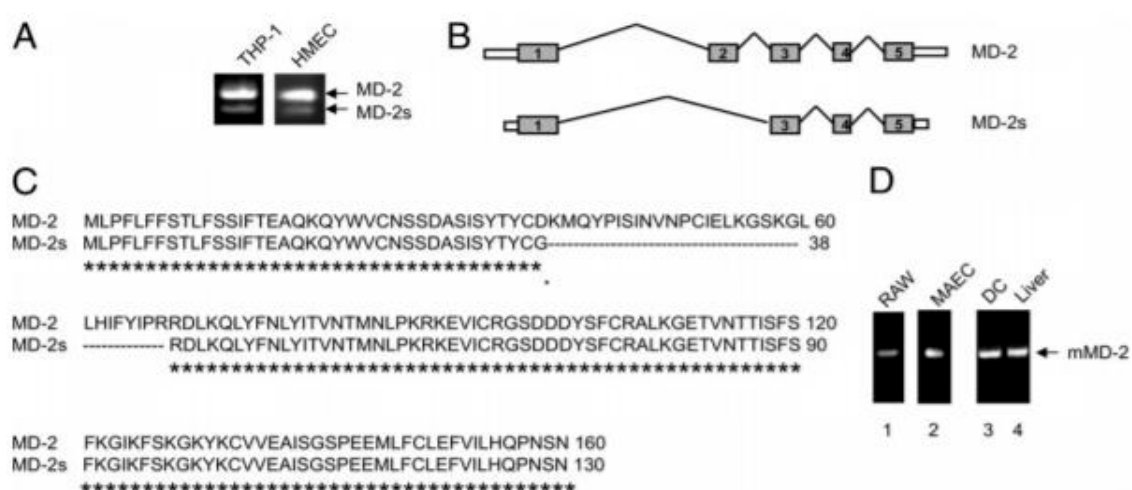


Figure 22: Identification du MD-2 humain

A, RT-PCR avec des amorces spécifiques du MD-2 humain sur l'ARN isolé de cellules THP-1 ou HMEC. B, représentation de la protéine MD-2 humaine mature montrée ci-dessus de l'isoforme MD-2sh épissée alternativement. Le MD-2sh est généré en sautant l'exon 2 (délétion de 90 pb). C, l'alignement de MD-2 et de MD-2sh. Les acides aminés qui sont communs aux deux protéines sont indiqués par un astérisque en dessous. D, RT-PCR avec des amorces spécifiques du MD-2 murin sur l'ARN isolé de cellules RAW, de MAEC et des cellules dendritiques²⁶⁸.

PARTIE II : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THESE

Malgré les progrès dans la prise en charge des nouveau-nés à risque d'infections graves, le sepsis reste encore aujourd'hui la première cause de mortalité chez les nouveau-nés. Pour lutter contre les infections, la réponse immunitaire du nourrisson repose sur l'expression de gènes initiée par des changements moléculaires complexes permettant en aval une défense appropriée. Parmi ces différents changements biologiques, nous avons le processus d'épissage pré-ARNm. Plusieurs études ont montré le rôle de l'épissage des pré-ARNm dans la réponse contre les infections bactériennes et son implication dans la régulation des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité lui confère un intérêt particulier dans l'étude de la réponse immunitaire^{247,262,273}.

Notre équipe a étudié le rôle et la régulation de l'épissage des gènes du système immunitaire inné dans le sepsis néonatal. L'expression des transcrits des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée déclenchée par l'activation des voies TLR4, y compris les récepteurs et les signalisations de transduction ont été évalués. Il en ressort que les nouveau-nés développant un sepsis à bactéries à Gram négatif ont une signature transcriptionnelle d'épissage spécifique (figure 23). Ce résultat préliminaire (travaux non publiés) démontre que dans un modèle complexe, le nouveau-né atteint de septicémie bactérienne, la réponse immunitaire innée subit une régulation massive, dynamique et adaptative impliquant la modification des récepteurs et de la voie de signalisation.

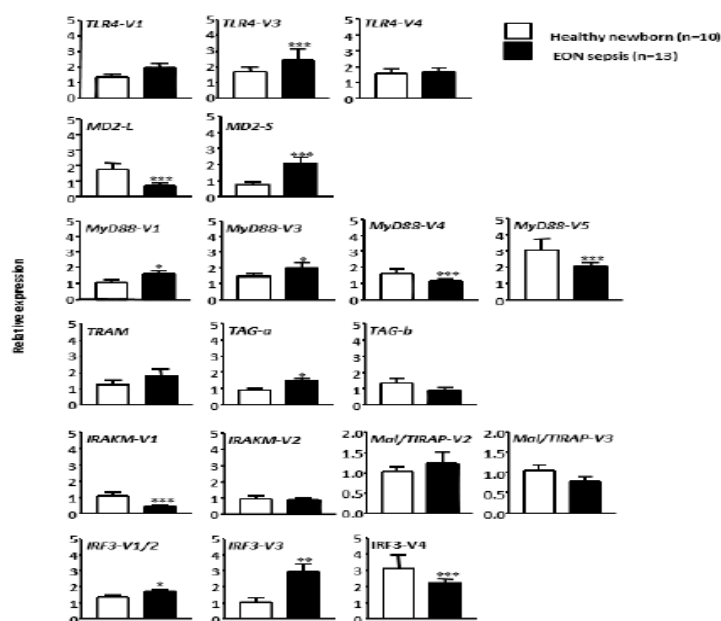


Figure 23: Expression des isoformes des gènes de l'immunité innée dans les EOS à bactéries à Gram négatif (Tissières, données non publiées)

Il se discute au travers de la littérature le caractère dépendant des infections maternelles vis-à-vis de la susceptibilité des nouveau-nés aux infections néonatales. En

effet, les infections bactériennes (chorioamniotite) ²⁷⁴, virales (Lassa, SARS-CoV-2) ^{275,276} et parasitaires ^{208,277} sont décrits comme associées au risque de prématurité, d'hypotrophie néonatale mais aussi aux infections futures du nourrisson.

Dans le cas spécifique des infections palustres au cours de la grossesse, la séquestration et la multiplication des parasites du paludisme au niveau du placenta participent à altérer la santé maternelle, fœtale et néonatale. Des études réalisées dans le sang de cordon ont montré une régulation des réponses humorales et cellulaires chez les nouveau-nés exposés *in utero* au paludisme. On sait à présent que la réponse immunitaire contre le paludisme chez le nouveau-né issu de mère impaludée est caractérisée par une suppression des réponses inflammatoires et par des fréquences élevées des cellules Treg ²⁷⁸. L'exposition *in utero* à des antigènes plasmodiaux peut conduire à l'initiation d'une immunité fœtale contre les antigènes plasmodiaux ou à une tolérance immunitaire fœtale chez certains nourrissons ^{226,279}. De plus, des études épidémiologiques ont montré une association entre le paludisme placentaire et une plus grande susceptibilité de l'enfant au paludisme ^{227,280} mais aussi à d'autres infections ²⁰⁸ pendant ses premières années de vie. Cependant, les facteurs au niveau transcriptionnel qui conduisent à cette susceptibilité aux infections bactériennes restent à établir.

La plupart des études sur l'effet du paludisme gestationnel sur la modification des réponses immunologiques du nouveau-né sont réalisées sur les fréquences de différentes populations des cellules immunitaires et les niveaux de production des cytokines. Très peu d'études explorent l'impact de l'exposition *in utero* aux antigènes de *Plasmodium falciparum* sur la régulation des gènes de l'immunité néonatale.

Des études préliminaires réalisées chez des enfants au Bénin suggèrent fortement que lorsqu'on a une infection palustre maternel, on a une absence de réponses aux endotoxines ²⁶. Dans cette étude on a effectué sur le sang des nouveau-nés non exposés et exposés *in utero* aux antigènes de *plasmodium falciparum*, des stimulations par LPS de son récepteur TLR4. On observe une absence de réponses aux endotoxines tandis qu'il y a toujours des différences significatives entre les deux groupes d'enfants lors qu'on stimule les autres axes TLR3, TLR7, TLR9. Le PAG pourrait être responsable d'un phénotype de tolérisation aux endotoxines.

Le premier objectif de ma thèse se situe dans ce contexte afin de mieux comprendre les mécanismes immunitaires qui expliqueraient la propension des nouveau-nés issus de mères infectées par *P. falciparum* à développer des infections pendant les trois premiers mois de vie. Mon hypothèse est que sous l'effet du paludisme gestationnel (passage d'ADN, antigène ou hémozoïne de *P. falciparum*), certains gènes du complexe de reconnaissance des endotoxines (le complexe MD-2/TLR4) subissent une régulation différentielle, modulant la capacité de reconnaissance du complexe et rendant les nouveau-nés plus à risque d'infections néonatales. J'ai réalisé dans ce cadre, une étude de l'expression des isoformes TLR4 et MD-2 chez les nouveau-nés de la cohorte SEPSIS

et préciser l'association en lien avec l'exposition *in utero* aux antigènes plasmodiaux et la survenue des infections néonatales.

Outre l'importance d'étudier et de caractériser l'altération de la réponse immunitaire, la prise en charge des nouveau-nés nés à risque accru d'infections néonatales en zone d'endémie palustre reste une priorité. Dans ce contexte, l'utilisation d'outils diagnostiques précis et rapides des infections néonatales sont des éléments essentiels.

Lors du sepsis néonatal, plusieurs médiateurs sont libérés dans le sang circulant et dans la pratique hospitalière certains sont dosés (CRP) afin de mieux distinguer les patients nécessitant un traitement anti-infectieux et de suivre l'infection. Malheureusement ces biomarqueurs ne sont pas suffisamment discriminants pour les nouveau-nés chez qui les causes d'inflammation sont non infectieuses^{88,281,282}. Il en résulte pour ces derniers une utilisation abusive des antibiotiques favorisant l'émergence des résistances aux antibiotiques classiques. Dans le cadre d'une collaboration avec la société bioMérieux, j'ai évalué la performance de biomarqueurs (i.e. procalcitonine (PCT), marqueurs associés à l'immunosuppression comme IL-10, *CD74* et *CX3CR1*, marqueurs inflammatoires comme TNF α et IL-6) associés aux premières infections du nouveau-né et à leur gravité (sepsis précoce ou tardif, infections respiratoires, paludisme, diarrhée).

PARTIE III : METHODOLOGIE



Article I : Présentation du protocole de recherche

Ce travail de thèse a été le fruit d'une collaboration entre l'unité MERIT/IRD, l'IRCB, le département «Open Innovation & Partnerships» de bioMérieux, l'unité ESA-MIIR/I2BC-UMR9198 de l'Université Paris Saclay, l'Université d'Abomey-Calavi à travers la Faculté des Sciences de la Santé et trois centres hospitaliers et universitaires du Bénin, le centre national hospitalo-universitaire Hubert Koutoukou Maga (CNHU-HKM), le centre hospitalo-universitaire mère et enfant lagune (CHU-MEL) et le centre hospitalo-universitaire d'Abomey-Calavi Sô-Ava (CHU-AS).

La méthodologie de ce travail a été publiée dans BMJ Open

BMJ Open SEPSIS project: a protocol for studying biomarkers of neonatal sepsis and immune responses of infants in a malaria-endemic region

Nadine Fievet,^{1,2} Sem Ezinmegnon,^{3,4} Gino Agbota,^{5,6} Darius Sossou,⁶ Rodolphe Ladekpo,⁶ Komi Gbedande,⁷ Valerie Briand,¹ Gilles Cottrell,^{8,9} Laurence Vachot,⁴ Javier Yugueros Marcos,⁴ Alexandre Pachot,¹⁰ Julien Textoris ^{10,11}, Sophie Blein,^{4,10} Ulrik Lausten-Thomsen,¹² Achille Massougoudji,¹³ Lehila Bagnan,^{6,14} Nicole Tchiakpe,^{6,15} Marceline d'Almeida,^{14,16} Jules Alao,¹⁷ Ida Dossou-Dagba,¹⁸ Pierre Tissieres ^{3,12}, SEPSIS study group collaborators, On behalf of the SEPSIS study group

To cite: Fievet N, Ezinmegnon S, Agbota G, *et al.* SEPSIS project: a protocol for studying biomarkers of neonatal sepsis and immune responses of infants in a malaria-endemic region. *BMJ Open* 2020;**10**:e036905. doi:10.1136/bmjopen-2020-036905

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2020-036905>).

Received 10 January 2020

Revised 13 April 2020

Accepted 12 June 2020



© Author(s) (or their employer(s)) 2020. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Professor Pierre Tissieres;
pierre.tissieres@aphp.fr

ABSTRACT

Introduction Neonatal sepsis outreaches all causes of neonatal mortality worldwide and remains a major societal burden in low and middle income countries. In addition to limited resources, endemic morbidities, such as malaria and prematurity, predispose neonates and infants to invasive infection by altering neonatal immune response to pathogens. Nevertheless, thoughtful epidemiological, diagnostic and immunological evaluation of neonatal sepsis and the impact of gestational malaria have never been performed.

Methods and analysis A prospective longitudinal multicentre follow-up of 580 infants from birth to 3 months of age in urban and suburban Benin will be performed. At delivery, and every other week, all children will be examined and clinically evaluated for occurrence of sepsis. At delivery, cord blood systematic analysis of selected plasma and transcriptomic biomarkers (procalcitonin, interleukin (IL)-6, IL-10, IP10, *CD74* and *CX3CR1*) associated with sepsis pathophysiology will be evaluated in all live births as well as during the follow-up, and when sepsis will be suspected. In addition, whole blood response to selected innate stimuli and extensive peripheral blood mononuclear cells phenotypic characterisation will be performed. Reference intervals specific to sub-Saharan neonates will be determined from this cohort and biomarkers performances for neonatal sepsis diagnosis and prognosis tested.

Ethics and dissemination Ethical approval has been obtained from the Comité d'Ethique de la Recherche – Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (CER-ISBA 85 - 5 April 2016, extended on 3 February 2017). Results will be disseminated through international presentations at scientific meetings and publications in peer-reviewed journals.

Trial registration number ClinicalTrials.gov registration number: NCT03780712.

Strengths and limitations of this study

- This prospective, multicentre study in a limited-resources environment aims to characterise value of neonatal sepsis diagnosis and prognosis biomarkers in a high-risk gestational malaria (GM) area.
- The identified biomarkers through this study could provide new diagnostic and prognostic tools to identify immunosuppressed newborns at risk of neonatal sepsis.
- Clinical and immunological phenotypes, and functional characterisations of a population with high risk of neonatal sepsis brings new insight to understanding the clinical and immune consequences of GM.
- Lack of biological antenatal malaria documentation in the hospital arm may limit the extrapolation to the first and second trimester GM impact.

INTRODUCTION

Sepsis remains the first cause of perinatal morbidity worldwide affecting more than 3 million neonates every year.¹ Nearly half of neonatal deaths in sub-Saharan Africa are due to sepsis.² In addition to neonatal sepsis, sub-Saharan Africa and South Asia that encompass 52% of world global live births, have an overweighed proportion of prematurity, which represents 60% of all preterm births worldwide.^{3,4} Low- and middle-income countries (LMIC) are supporting most of these neonatal morbidities and the societal and economic impacts are high, hampering most initiatives that target promotion of neonatal and paediatric health.^{5,6} Among others factors associated with neonatal infection, frequent endemic parasitic infections

such as malaria, toxoplasmosis and schistosomiasis affect fetal and perinatal growth and development. Its specific impact on early childhood immunity is recognised and may explain altered vaccination response as well as increased risk of infection.⁷⁻⁹ During gestational malaria (GM), the sequestration and cytoadhesion of infected red blood cells within intervillous space of the placenta will lead to local inflammatory responses and alteration of placental functions, and subsequently promote intra-uterine growth restriction and prematurity.^{10 11} In addition, in utero exposure to *Plasmodium falciparum* antigens impacts the newborn immune development^{12 13} and is a risk factor predisposing to malaria and other infections during the first year of life.^{14 15}

Understanding fetal immune maturation and more specifically during the last 3 months of pregnancy is a prerequisite to an accurate interpretation of neonatal response to infection.^{16 17} To respond to pathogens, newborns depend essentially on their innate immune system. The Toll-like receptors (TLRs) represent the first line of defence and play an important role in orchestrating regulatory and inflammatory responses to pathogens and in initiating specific T and B cell responses.¹⁷⁻¹⁹ Increased risk of early and late neonatal infection and impaired host response seen in premature infants is related to altered innate immune functions.²⁰⁻²² Although the underlying immunological basis are not well studied, small for gestational age (SGA) is also a recognised risk factors of neonatal infections.^{23 24} Defective innate immunity seen in premature infants is strongly correlated with the extent of immaturity where extremely low birth weight infants (ie, <28 weeks of gestational age) have a merely absent innate immune response.²¹ This state of 'innate' immunodepression, although potentially reversible, shares many similarities to 'acquired' immunodepression seen in critically ill and septic patients.²⁵⁻²⁷ Currently, the most robust and reproducible marker of immunodepression is the measurement of monocytic HLA-DR surface expression (mHLA-DR). Extended literature has correlated its level during the course of disease to 28 days mortality and occurrence of secondary infections.²⁸ Recently, two transcriptional biomarkers were shown to identify similarly those conditions. *CD74*, coding for the γ chain (Li chain) of class II CMH and *CX3CR1*, the fractalkine receptor, were shown to be associated with mortality and/or the occurrence of secondary infections.^{29 30} Currently, less data exist on mHLA-DR in neonates. Although not found in all series, mHLA-DR seems to be reduced in premature infants compared with term infants and predicts both early-onset neonatal sepsis (EONS) and late-onset neonatal sepsis (LONS) with an acceptable accuracy (receiver operating characteristic area under the curve 0.78; 95% CI: 0.61 to 0.92).^{21 31} No data exist on the value of both *CD74* and *CX3CR1* transcripts for prognostication of neonatal sepsis. However, current understanding of sepsis pathophysiology and, more specifically, sepsis-induced immunodepression, sustain the exploration of this specific condition, particularly in patients

where immunodepressed states are known to be part of the pathophysiology and impact severity. Exploring biomarkers for sepsis diagnosis and prognostication in neonates exposed to GM may prove to be particularly relevant. Both a better characterisation of the immunodepressed state encountered in those patients and optimisation of sepsis diagnosis could be expected by using combined biomarkers, mixing both sepsis diagnosis and immunosuppression identification.

RATIONALE OF THE STUDY

From a clinical perspective, increased incidence of neonatal sepsis, more specifically to Gram-negative bacteria, has been repetitively shown in sub-Saharan infants.³² Effect of GM and prematurity are well known factors associated with bacterial infection susceptibility.^{1 33} Although several studies have shown that in utero *P. falciparum* exposure impairs the immune development of newborns,³⁴⁻³⁷ making them more likely to develop malaria and other infections in their first months of life,¹² no study has detailed its immunological impact so far. The increased risk of neonatal sepsis has significant collateral consequences such sepsis overdiagnosis, overuse of broad-spectrum antibiotics and development of antibiotic resistance. In such clinical context, antibiotic stewardship is central but limited by the lack of accurate diagnostic tools. Use of biomarkers of neonatal sepsis in LMIC is limited not only by economic perspectives but also due to the lack of validation in those populations. Only few epidemiological data exploring those conditions exist, as large prospective study requires important clinical and financial support to overcome limited resources in LMIC.

From a biological perspective, both GM and prematurity could have similar impact on the newborn's immune system such as impaired TLRs and T regulatory cells responses explaining this increased susceptibility to infection.^{34 37-40} Those altered immune responses, similar to a state of immunodepression, may impact the accuracy of biomarkers for EONS. GM-induced and prematurity-induced immunodepression were partially characterised by immune functional assay (cytokines release after ex vivo Pathogens-Associated Molecular Patterns (PAMPs) stimulation) and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotyping, but most underlying molecular mechanism still remains to be identified.³⁸ Better characterisation of the state of immunosuppression may help in optimising neonatal sepsis diagnosis and management in addition to opening a potential avenue for immune stimulation and restoration of efficient response to pathogens.²¹

Hypothesis

To overcome the lack of epidemiological data on GM and neonatal sepsis as well as on infant's immune response, the SEPSIS study propose to prospectively follow infants born in an urban and suburban malarial endemic area from the peripartum period to 3 months of age. Biological biomarkers, PBMC phenotyping as well as immune

functional assays will be performed at delivery and during the follow-up. Reference values will be determined and correlation between the biological measurements and occurrence of clinical neonatal sepsis performed. To explain the increased susceptibility of infants with GM, we hypothesised that in utero exposure to *P. falciparum* antigens modifies the TLRs transcriptional response (specifically of the endotoxins recognition complex myeloid differentiation factor 2: TLR4) and the Treg and Breg function when exposed to Gram-negative bacteria, which would explain the state of immunodepression in their first month of life. Therefore, besides phenotypic and functional characterisation of the immune response, specific analysis of the molecular mechanisms triggering GM-mediated immunodepression will be investigated. The SEPSIS project will provide validated reference values for current and new biomarkers of sepsis and GM-induced immunosuppression in sub-Saharan Africa, and may open new perspective in global understanding of sepsis in immunosuppressed infants.

Aims and objectives

The primary objective of this study is to evaluate procalcitonin (PCT) for neonatal sepsis diagnosis and evaluate *CD74* and *CX3CR1* to prognose neonatal sepsis in GM endemic area. The secondary objectives are:

- To evaluate markers association (interleukin (IL)-6, TNF α , IL-10, IP10) to improve diagnosis and prognosis accuracy of PCT, and *CD74* and *CX3CR1*.
- To characterise the epidemiology of neonatal sepsis in this population.
- To characterise the effect of GM on the evolution of the innate and adaptive immune profiles between birth and 3 months of life in infants.

- To evaluate the molecular effect of GM on innate immune response to PAMPs.

The results of this large translational project in sub-Saharan Africa, where malaria, prematurity/SGA and neonatal infections are major public health issues, will contribute:

- To better understand the consequences of prematurity and GM on the neonatal immune system and the associated immunosuppression.
- To test the use of biomarkers (including immunosuppression biomarkers) to optimise diagnosis and severity assessments of neonatal sepsis in a population with GM-induced immunosuppression and obtain reference values in sub-Saharan Africa.
- To evaluate experimental ex vivo therapy to reverse GM-induced immunosuppression.

METHODS AND ANALYSIS

SEPSIS is a prospective longitudinal, multicentre observational study conducted in the Abomey-Calavi, Sô-Ava and Cotonou districts in South Benin (figure 1).

Study population

In this project, patients will be enrolled from (1) three suburban health centres (the suburban arm) in order to follow low-risk delivery and (2) three urban hospitals (the Hospital arm) in order to follow infants born from high-risk delivery. In both arms, only women living in the Abomey-Calavi region will be recruited to facilitate the follow-up and to work on infant from the same geographical area.

- The suburban arm aims to follow low-risk deliveries and includes a part of children born to mothers previously included in the RECIPAL cohort (that aims to

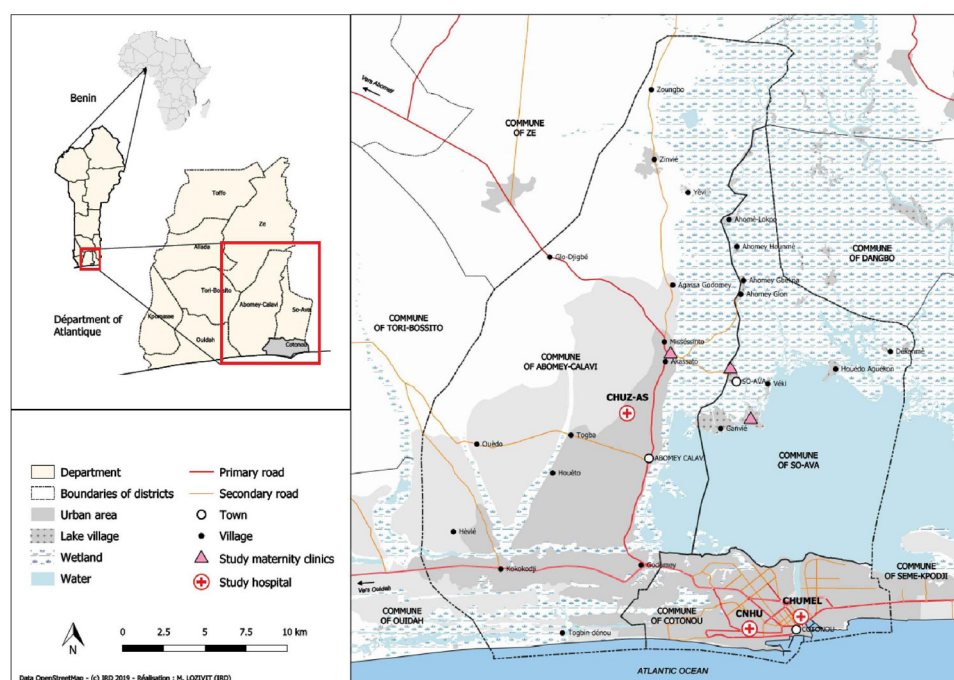


Figure 1 Geographical location of the six study centres in the Sô-Ava, Abomey-Calavi and Cotonou districts in Benin.

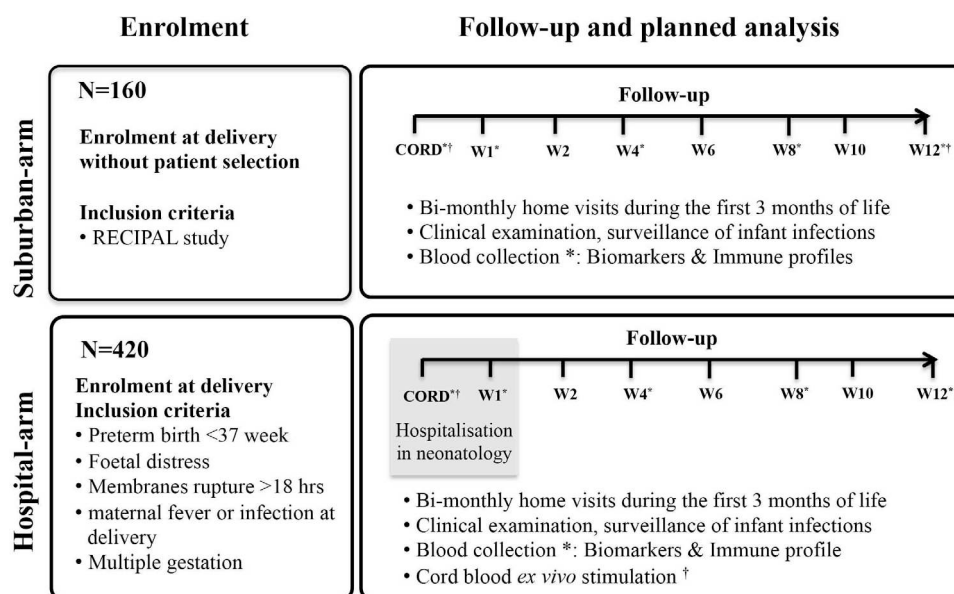


Figure 2 Schematic design of the sepsis study illustrating inclusion, planned biological analysis and follow-up time points.

evaluate the impact of GM on the fetal growth).⁴¹ In this study arm, out of 411 pregnant women, 273 will be followed until delivery for the study. Because of a delay in the timing between both projects, only the last 160 newborn of the RECIPAL cohort will be enrolled. The expected frequency of GM and prematurity are 40% and 12%, respectively. This cohort will provide specimen from the child and information on mother's pregnancy and newborn's follow-up.

- The Hospital arm aims to follow children born to mothers with high risk of developing neonatal sepsis. All consecutive deliveries with any perinatal risk of infection were included in the study. Those perinatal risk factors were as follows: prematurity, prolonged ruptures of membranes (>18 hours), maternal fever and/or infection, fetal distress, neonatal resuscitation at delivery and multiple gestation. Children will be recruited at birth in three main university hospitals: Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant Lagune (CHUMEL), Centre National Hospitalier Universitaire (CNHU) in Cotonou and the Centre Hospitalier Universitaire Zone Abomey Calavi / Sô Ava (CHU ZAC) in Calavi. Approximately 420 children will be followed with the inclusion and exclusion criteria presented in figure 2.
- The study is coordinated by the Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB).

All children from both arms will be followed clinically on a bimonthly base during the first 3 months of life. The length of the follow-up was decided as being the most risky period in terms of susceptibility to sepsis, neonatal mortality and the development period for the immune responses.¹⁷

The clinical follow-up of these children will be conducted during the first 12 weeks of life during home visits or in healthcare centres. Newborn from the hospital arm will also be followed in case of hospitalisation for

EONS. We expected that hospitalised newborns will stay from 1 to 10 days at the hospital after birth before going back to their home. The follow-up will consist of scheduled home visits and unscheduled emergency visits if the infant is sick.

1. Newborns will have a full clinical examination by a trained nurse at birth and during home visits (Birth, Week (W)1, W2, W4, W6, W8, W10 and W12).
2. Blood samples will be obtained at birth (cord blood), then at W1, W4, W8 and W12.
3. All sick infants identified during systematic home or unscheduled visits will come for a visit to a healthcare centre, where additional blood sample will be obtained. Unscheduled visits will be called emergency visits in the rest of the document.
4. Healthcare centres are only able to perform haemogram and blood smear. All infants with suspected sepsis needing additional therapeutic and diagnostic workup will be referred to the reference hospitals where sepsis workup can be performed. According to the clinical symptoms, the paediatrician will ask for specific bacteriological analysis to confirm a suspected infection.

Definition and neonatal sepsis diagnosis

Neonatal sepsis diagnosis will be established by the local paediatrician based on the child clinical examination and initial workup including haemogram, C-reactive protein (CRP) and microbiological cultures (blood, cerebral fluids and urine). In the Hospital arm of the study, neonatal sepsis will be suspected in neonates with perinatal infectious risk factors, as previously described, and more than two of the following criteria being present: neutrophil count $<7500/\text{mm}^3$ or $>14500/\text{mm}^3$, band form $>1500/\text{mm}^3$, immature/total neutrophils ratio >0.16 , platelets count $<150\,000/\text{mm}^3$ and CRP $>10\text{ mg/L}$. Suspected neonatal sepsis will be considered as clinical sepsis when the following clinical signs are associated:

temperature irregularity; respiratory distress or apnoea; seizures, altered tonus, irritability or lethargy; vomiting, altered feeding pattern, ileus; skin perfusion alteration, haemodynamic signs (tachycardia, hypotension); hypoglycaemic/hyperglycaemic, hyperlactatemia or identification of focal infection such as soft tissue infection or conjunctivitis. In the suburban arm, neonatal sepsis will be suspected if the child demonstrates clinical signs as mentioned. In such case, the child will be transferred to the hospital where further sepsis workup will be performed. Neonatal sepsis will be considered as EONS if occurring within the first 72 hours after delivery, and LONS thereafter. Neonatal sepsis diagnosis and subsequent management will be left at the discretion of the paediatrician in charge of the child. All newborns with a clinical diagnosis of sepsis will be subsequently adjudicated by two independent paediatricians (PT, ULT) and sorted into 'presumed sepsis' and 'definite clinical sepsis'. In addition to the full medical file review, microbiological cultures results will be monitored. Parallel to microbiological culture, we will use the specific BioFire Filmarray panels for all positive blood culture (Blood Culture Identification (BCID)

panel) and cerebrospinal fluids (meningitis/encephalitis panel). All studied biomarkers will be kept blinded to the adjudication. In parallel, neonatal risk assessment will be scored using the Neonatal Sepsis Trial Network grid and patients scored from 1 to 3.⁴² GM will be defined as a malaria infection during pregnancy or at delivery. For women in the suburban arm, malaria screening will be performed at each scheduled prenatal visit using a thick blood smear. Mothers from the Hospital arm will be screened only at the time of delivery. In this group, antenatal malaria will be established on the basis of mother's anamnesis. For both study arms, placental blood smear and mother's peripheral blood smear will be performed. The Lambaréné technique will be used to quantify parasitaemia with a detection threshold of five parasites per microlitre.⁴³

Sample and clinical data collection

Clinical and biological (biobanking) data dedicated to this project will be gathered according to [table 1](#).

Table 1 Clinical and biological data collection planning

	Mother	Birth	W01	W02	W04	W06	W08	W10	W12	Emergency
Patients characteristics										
Inclusion/exclusion criteria		x								
Consent form		x								
Demography	x	x								
Reproductive and obstetric	x									
Anthropometry	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Malaria in pregnancy	x									
Clinical examination	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Temperature	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pulse rate		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Breathing rate		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Breastfeeding and feeding		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Description of hospital stay										x
Biology										
Dry blood spot	x	x			x		x		x	x
Blood smear	x	x			x		x		x	x
Heparin tube sampling		x	x		x		x		x	x
Haemoglobin		x	x		x		x		x	x
TLRs stimulation		x							x	x
Plasma		x	x		x		x		x	x
Procalcitonin		x	x		x		x		x	x
PBMC		x							x	x
Paxgen tube sampling		x	x		x		x		x	x
Stool sampling		x	x		x		x		x	x
Placenta biopsy		x								

PBMC, peripheral blood mononuclear cell; TLR, toll-like receptor; W, weeks.

For the various biological tests to be performed in this study, the sample collection will allow us to establish several types of biobanking:

1. Heparin plasma for the study of protein biomarkers.
2. Supernatant from unstimulated whole blood and ex vivo stimulated with TLR ligands for the quantitative evaluation of cytokines release.
3. Messenger RNA (mRNA) biobank extracted from cell pellet of unstimulated whole blood and blood stimulated with TLR ligands, preserved in PAXgene (Qiagen, Hilden, Germany) for the study of gene transcripts of TLRs and signalling pathways.
4. mRNA biobank to study transcriptomic host biomarkers (RNA will be extracted from whole blood collected in PAXgene tubes).
5. Biobanking of PBMCs isolated from cord blood and peripheral blood by gradient separation of Ficoll (Sigma, Darmstadt, Germany) density for the exploration of Treg and Breg cells function.

Biomarkers measurements

This part of the study will consist of testing blood samples of the children from both arms to validate *CX3CR1*, *CD74*, IL-10, PCT, IP10, TNF α and IL-6. For transcriptomic biomarkers, after extraction of from whole blood using the QIAasympy SP/AS automated system (Qiagen, Hilden, Germany) with the QIAasympy PAXgene blood RNA kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland), mRNA from *CD74* and *CX3CR1* will be quantified by quantitative PCR (Q-PCR) using *CD74/HPRT1* and *CX3CR1/HPRT1* prototype kits (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) on an ABI7500 thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Protein biomarkers associated with immunosuppression and inflammation (PCT, IL-6, TNF α , IL-10, and IP10) will be measured in heparinised plasma using the multiplex Ella platform (ProteinSimple, San Jose, California, USA).

Dynamic immune profiles

Here, we plan to study the immune profile of the first 3 months of age. Biological samples will be used to determine and study the transcriptional and functional profiles of the innate and adaptive immunity. We foresee the following analyses:

1. Ex vivo functionality of the innate response via TLRs stimulation. Whole blood stimulation with TLRs agonists (LPS, FSL1, Pam3CSK4, Flagellin, PolyI:C, CPG-ODN, Imiquimod and Resiquimod) (Sigma, Darmstadt, Germany). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokine (IL-6, IL-10, TNF α) in supernatants (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and genes transcripts quantification by Q-PCR will be performed using a CFX90 thermocycler (Biorad, Hercules, California, USA). Analysis will be performed in selected patients divided into four groups (GM and sepsis, no GM and sepsis, GM and no sepsis, no GM and no sepsis). Patients will be selected from both study arms.

2. Ex vivo functionality and phenotyping of Treg and Breg lymphocytes. Using flow cytometry (FACS Canto, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), we will investigate different functional markers like the gut-homing $\alpha 4\beta 7$ integrins, CD39 and CTLA4 immunosuppressive markers. Second, the frequencies of Treg and Breg producing intracytoplasmic IL-10 and TGF β will be assessed in cord blood after mitogen or antigen ex vivo stimulation.^{44–48}

Modulation of the host response against *P. falciparum*

In this part, we aim to design an ex vivo experimental model of co-culture assays to mimic a clinical situation of malaria and Gram-negative infections. The objective is to perform in vitro co-culture functional assays with various stimuli combinations (TLRs agonists and/or *P. falciparum*-schizonte extract) to highlight the mechanisms of endotoxins anergy observed in infants with GM.

Sample size and data analysis plan

To assess the accuracy of new biomarkers of sepsis (PCT) and immunosuppression (CD74 and CX3CR1): we estimated that of the 400 children, 40 would get an infection (fever) within 7 days after birth and 189 would get an infection within 3 months of follow-up (W2 to W12) after birth. With an expected proportion of 75% infection in PCT+ and 25% in PCT– (knowing that the difference in proportions is probably even greater between the two groups), 168 subjects (34 in each group) will be required to reach a 99% power and risk of first kind of 5%, which shows that the size of this study (higher in both groups) will answer this question with a power reaching almost 100%. Statistical analyses were performed using R software V.3.6.1. Numbers and frequency were used for categorical data and means (SD) or medians (IQR) for continuous data. Categorical variables were compared using the χ^2 test (or Fisher's exact test for small expected numbers). The distribution of continuous data was compared using Student's t-test (or the Mann-Whitney test when distribution was not normal) if the outcome was two groups, and analysis of variance (or the Kruskal-Wallis test when distribution was not normal) if not. OR and 95% CI were assessed using logistic regression models. An adjustment to the p values (q value) was performed using False Discovery Rate (FDR) correction (Benjamini-Hochberg). The independent variables initially included in the model were those associated with the infection of the newborn or infant in univariate analysis with $p < 20\%$ and a stepwise or backward procedure was applied to assess variables that were significantly and independently associated with the infection of the newborn or infant at 5% level. When the linearity hypothesis was not respected, the continuous variables were transformed into ordered data (clinically meaningful classes or median separation). To analyse the infection of the newborn or infant, we considered variables associated with the patient (history of maternal infections, gestational age, child's age, birth weight, prematurity, GM, SGA and other risk factors) and/or

with the different biomarkers (PCT, *CD74* and *CX3CR1*). All reported p values are two-sided and the significance threshold was set at <0.05. Other machine models (Random Forest, Decision Tree, Support Vector Machine and k-Nearest Neighbour) will be used to increase performance. For this purpose, the data will be divided into two parts: a training part (algorithm training) and a test part (to obtain performance).

ETHICS AND DISSEMINATION

Ethics approval

The protocol, information documents and consent forms for legal representatives received approval from the ethical committee (CER-ISBA) in Benin (Approval code: CER-ISBA 85 - 5 April 2016). An amendment has been filed to extend the study to a second hospital cohort. This amendment was approved on 3 February 2017). This study complies with the Declaration of Helsinki principles of Good Practice and the Nagoya protocol.

Informed consent

- ▶ The study investigator who identified the child and the parents of the child will read the information document aloud and give them full details in the event of any questions.
- ▶ If the child's parents are literate, the information will be administered in French, and consent will be given to one of the parents (father or mother) of the child for proofreading. After reading and answering any questions from parents, the consent form will be signed. One of the parents and the interviewer will complete and sign the form in duplicate. One copy will be given to the parents and the second copy will be placed in the master file of the study.
- ▶ If the child's parents are illiterate, the information will be administered in the local language (Mainly, Fon, Toffin, Aizo or other). In addition, the information document will be given to an impartial witness, independent of the investigation and previously identified by the parents themselves, who will act as a signatory witness. This person may be a parent or guardian. After the parents' questions have been answered, consent will be signed: one of the parents will put the fingerprint of the left index finger in place of the signature and the witness present throughout the parent information process will sign the consent to his turn. Finally, the investigator will complete and sign the consent. The form will be completed in two copies. The parents will keep a copy of the consent and the second copy will be kept in the master file of the study.
- ▶ The consents will be kept at the IRCB premises for 5 years.

Safety of participants

This study includes no serious foreseeable risk to the health of the children involved. The only potential risk

is related to blood sample collection (maximum total blood per sampling 1 mL/kg, collected over all time points). In cases where children develop sepsis requiring hospitalisation, all related costs will be supported by the investigators.

Study management

The study is coordinated by bioMérieux and a dedicated team composed from members of the entire consortium. The clinical trial was coordinated by the IRCB.

Data management and handling

For each patient, a paper Case Report Form (CRF) including sociodemographic, anthropometric, clinical and paraclinical information will be completed by clinical assistants and healthcare providers. MS Access was used to gather all the data from this clinical study. RStudio V.1.1.383 (RStudio, Boston, Massachusetts, USA) will be used to perform the statistical analysis of data. All samples and initial processing of the biobanking will be performed at the IRCB. Subsequently, biobanking will either stay at the IRCB or be transferred to the Christophe Mérieux research centre in Grenoble, France, for further processing (*CD74* and *CX3CR1* Q-PCR; biomarkers dosing). Whole blood *ex vivo* stimulation will be transferred to the Institute of Integrative Biology of the Cell, Gif-sur-Yvette, France. Data set will be available from the IRCB.

Medical confidentiality

All the data collected will be pseudonymised and covered by medical confidentiality. To protect the participant's confidentiality, samples will be de-identified. The investigator will ensure that confidentiality is maintained. Patients will only be identified by their initials and study number (ID code) on the observation books or on all other documents. These ID codes will be kept separately. Patient data, identified by the ID code will be stored separately. The investigator will ensure the retention of the identification list of patients included in the study. This includes at least the first page of the CRF and the Access databases (Microsoft, Redmond, Washington, USA). All the CRFs will be kept in the IRCB premises for at least 5 years in an air-conditioned container. As part of data processing, data consultation and data analysis performed in France, all patients at each site will be informed of the data processing procedure as well as their rights including the right of access to and the right of opposition to the transmission of the data.

Professional secrecy will be respected by all the persons participating in the conduct of this study. The manager, the investigator and all their collaborators undertake the responsibility to not transmit to a third party any of the confidential information obtained through this research, including information on the health status of the patients or about the current study.

Author affiliations

¹Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Mère et enfant face aux infections tropicales (UMR216), Paris, France

²COMUE Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, Paris, Île-de-France, France

³Department of Microbiology, Institut de Biologie Integrative de la Cellule, Gif-sur-Yvette, France

⁴Medical Diagnostic Discovery Department (MD3), bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Rhône-Alpes, France

⁵UMR216-MERIT, French National Research Institute for Sustainable Development (IRD), Université Paris Descartes, Paris, France

⁶Institut de Recherche Clinique du Bénin, Calavi, Benin

⁷Institut de Recherche Clinique du Bénin, Cotonou, Benin

⁸UMR216, Institut de Recherche pour le Développement, Cotonou, Benin

⁹Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France

¹⁰EA 7426 Pathophysiology of Injury-Induced Immunosuppression, bioMérieux, LYON cedex 03, France

¹¹Département d'Anesthésie et de Réanimation, Hospices Civils de Lyon, LYON Cedex 03, France

¹²Pediatric Intensive Care, Hopitaux Universitaires Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

¹³Faculté des Sciences de la Santé (FSS), Cotonou, Benin

¹⁴Department of Paediatric, National University Hospital Center (CNHU), Cotonou, Benin

¹⁵Department of Paediatric, Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant Lagune (CHUMEL), Cotonou, Benin

¹⁶Institut de Recherche Clinique du Bénin, Calavi, Île-de-France, Benin

¹⁷CHU-MEL Hospital, Cotonou, Benin

¹⁸Calavi Hospital, Calavi, Benin

Twitter Pierre Tissieres @PierreTissieres

Acknowledgements We thank the entire RECIPAL and SEPSIS team, including research scientists, engineers, technicians and managers.

Collaborators SEPSIS study group collaborators: Aurax Fernando, Urbain Ahouayito, Basile Agossou, Caleb Ezinmegnon, Anael Fortunato, Josué Fiagbenou, Djamiou Dossa, Dramane Abdou, Canisius Fantodji, Nawal Sare, Wilisto Bara, Razack Monde, Erasme Gbagidi, Larissa Allokpe, Armand Housemenou, Landry Assongba, Manfred Accrombessi, Florent Kouhouenou, Armand Hounsemou, Amour Ridagba, Christiane Aguemou, Dissou Affolabi, René Perrin, Benjamin Hounkpatin, Dossou Dagba, Luis Augusto, Sophie Thibault, François Bartolo, Marine Mommert and Karen Brengel-Pesce

Contributors NF, JYM, AP, VB and PT conceived and designed the study. NF, GA, SE, RL, KG, DS, AM, LB, NT, Md, JA and IDD managed infants follow-up in the field hospital and in the lab. SE, NF, SB, GC, UL-T and PT analysed the data. NF, GA, SE, RL, KG and DS contributed reagents/materials/analysis tools. NF, SE and PT drafted and finalised the manuscript. LV, AP, JT, GA, VB and PT revised the manuscript. The final manuscript was read and approved by all authors.

Funding The project is funded by a consortium: bioMérieux, IRD and the CNRS. We are extremely grateful to all families who took part in this study, and to midwives, nurses and community health workers for recruiting and following families up. SE was co-funded by CIFRE PhD grant (CIFRE number 2016/1550) and bioMérieux. GA was funded by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number EC020160736054 to GA) for a PhD scholarship.

Map disclaimer The depiction of boundaries on this map does not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of BMJ (or any member of its group) concerning the legal status of any country, territory, jurisdiction or area or of its authorities. This map is provided without any warranty of any kind, either express or implied.

Competing interests JYM, LV, JT, AP and SB are employed by an in vitro diagnostic company, bioMérieux SA. The remaining authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could cause potential conflict of interest.

Patient and public involvement Patients and/or the public were involved in the design, or conduct, or reporting, or dissemination plans of this research. Refer to the Methods section for further details.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which

permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iDs

Julien Textoris <http://orcid.org/0000-0002-3821-9337>

Pierre Tissieres <http://orcid.org/0000-0001-5423-5532>

REFERENCES

- Seale AC, Blencowe H, Manu AA, *et al*. Estimates of possible severe bacterial infection in neonates in sub-Saharan Africa, South Asia, and Latin America for 2012: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014;14:731–41.
- Blencowe H, Cousens S. Addressing the challenge of neonatal mortality. *Trop Med Int Health* 2013;18:303–12.
- Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, *et al*. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012;379:2162–72.
- Katz J, Wu LA, Mullany LC, *et al*. Prevalence of small-for-gestational-age and its mortality risk varies by choice of birth-weight-for-gestation reference population. *PLoS One* 2014;9:e92074.
- Bailey PE, Andualem W, Brun M, *et al*. Institutional maternal and perinatal deaths: a review of 40 low and middle income countries. *BMC Pregnancy Childbirth* 2017;17:295.
- Ranjiva SL, Warf BC, Schiff SJ. Economic burden of neonatal sepsis in sub-Saharan Africa. *BMJ Glob Health* 2018;3:e000347.
- Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, *et al*. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e442.
- Dauby N, Goetghebuer T, Kollmann TR, *et al*. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect Dis* 2012;12:330–40.
- Sylvester B, Gasarasi DB, Aboud S, *et al*. Prenatal exposure to Plasmodium falciparum increases frequency and shortens time from birth to first clinical malaria episodes during the first two years of life: prospective birth cohort study. *Malar J* 2016;15:379.
- Briand V, Le Hesran J-Y, Mayxay M, *et al*. Prevalence of malaria in pregnancy in southern Laos: a cross-sectional survey. *Malar J* 2016;15:436.
- Accrombessi M, Fievet N, Yovo E, *et al*. Prevalence and associated risk factors of malaria in the first trimester of pregnancy: a preconceptional cohort study in Benin. *J Infect Dis* 2018;217:1309–17.
- Odorizzi PM, Feeney ME. Impact of in utero exposure to malaria on fetal T cell immunity. *Trends Mol Med* 2016;22:877–88.
- Barboza R, Hasenkamp L, Barateiro A, *et al*. Fetal-derived MyD88 signaling contributes to poor pregnancy outcomes during gestational malaria. *Front Microbiol* 2019;10:68.
- Le Hesran JY, Cot M, Personne P, *et al*. Maternal placental infection with plasmodium falciparum and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* 1997;146:826–31.
- Rachas A, Le Port A, Cottrell G, *et al*. Placental malaria is associated with increased risk of nonmalaria infection during the first 18 months of life in a beninese population. *Clin Infect Dis* 2012;55:672–8.
- Veru F, Laplante DP, Luheshi G, *et al*. Prenatal maternal stress exposure and immune function in the offspring. *Stress* 2014;17:133–48.
- Yu JC, Khodadadi H, Malik A, *et al*. Innate immunity of neonates and infants. *Front Immunol* 2018;9:9.
- Luciano AA, Arbona-Ramirez IM, Ruiz R, *et al*. Alterations in regulatory T cell subpopulations seen in preterm infants. *PLoS One* 2014;9:e95867.
- Sharma AA, Jen R, Brant R, *et al*. Hierarchical maturation of innate immune defences in very preterm neonates. *Neonatology* 2014;106:1–9.
- Lavoie PM, Huang Q, Jolette E, *et al*. Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. *J Infect Dis* 2010;202:1754–63.
- Tissières P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, *et al*. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon- γ . *PLoS One* 2012;7:e32863.
- Glaser K, Speer CP. Toll-Like receptor signaling in neonatal sepsis and inflammation: a matter of orchestration and conditioning. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9:1239–52.

- 23 Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, *et al.* Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD neonatal research network. *Pediatrics* 2010;126:443–56.
- 24 Tröger B, Müller T, Faust K, *et al.* Intrauterine growth restriction and the innate immune system in preterm infants of ≤ 32 weeks gestation. *Neonatology* 2013;103:199–204.
- 25 Boomer JS, To K, Chang KC, *et al.* Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011;306:2594–605.
- 26 Winkler MS, Rissiek A, Priefer M, *et al.* Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF α response: a diagnostic tool for immunosuppression? *PLoS One* 2017;12:e0182427.
- 27 Payen D, Faivre V, Miatello J, *et al.* Multicentric experience with interferon gamma therapy in sepsis induced immunosuppression. A case series. *BMC Infect Dis* 2019;19:931.
- 28 Venet F, Lukaszewicz A-C, Payen D, *et al.* Monitoring the immune response in sepsis: a rational approach to administration of immunoadjuvant therapies. *Curr Opin Immunol* 2013;25:477–83.
- 29 Pachot A, Cazalis M-A, Venet F, *et al.* Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol* 2008;180:6421–9.
- 30 Peronnet E, Venet F, Maucourt-Boulch D, *et al.* Association between mRNA expression of CD74 and IL10 and risk of ICU-acquired infections: a multicenter cohort study. *Intensive Care Med* 2017;43:1013–20.
- 31 Palojärvi A, Petäjä J, Siitonen S, *et al.* Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2013;73:469–75.
- 32 Medugu N, Iregbu K, Iroh Tam P-Y, *et al.* Aetiology of neonatal sepsis in Nigeria, and relevance of group B Streptococcus: a systematic review. *PLoS One* 2018;13:e0200350.
- 33 Agbota G, Polman K, Wieringa FT, *et al.* Maternal malaria but not schistosomiasis is associated with a higher risk of febrile infection in infant during the first 3 months of life: a mother-child cohort in Benin. *PLoS One* 2019;14:e0222864.
- 34 Gbédandé K, Varani S, Ibitokou S, *et al.* Malaria modifies neonatal and early-life Toll-like receptor cytokine responses. *Infect Immun* 2013;81:2686–96.
- 35 Natama HM, Rovira-Vallbona E, Somé MA, *et al.* Malaria incidence and prevalence during the first year of life in Nanoro, Burkina Faso: a birth-cohort study. *Malar J* 2018;17:163.
- 36 Adegnika AA, Köhler C, Agnandji ST, *et al.* Pregnancy-Associated malaria affects Toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood. *J Infect Dis* 2008;198:928–36.
- 37 Nouatin O, Gbédandé K, Ibitokou S, *et al.* Infants' peripheral blood lymphocyte composition reflects both maternal and post-natal infection with Plasmodium falciparum. *PLoS One* 2015;10:e0139606.
- 38 Brustoski K, Kramer M, Möller U, *et al.* Neonatal and maternal immunological responses to conserved epitopes within the DBL-gamma3 chondroitin sulfate A-binding domain of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun* 2005;73:7988–95.
- 39 Franklin BS, Parroche P, Ataíde MA, *et al.* Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:5789–94.
- 40 Mackroth MS, Malhotra I, Mungai P, *et al.* Human cord blood CD4+CD25hi regulatory T cells suppress prenatally acquired T cell responses to plasmodium falciparum antigens. *J Immunol* 2011;186:2780–91.
- 41 Accrombessi M, Yovo E, Cottrell G, *et al.* Cohort profile: effect of malaria in early pregnancy on fetal growth in Benin (RECIPAL preconceptional cohort). *BMJ Open* 2018;8:e019014.
- 42 Stocker M, van Herk W, El Helou S, *et al.* Procalcitonin-guided decision making for duration of antibiotic therapy in neonates with suspected early-onset sepsis: a multicentre, randomised controlled trial (NeoPIns). *Lancet* 2017;390:871–81.
- 43 Swysen C, Vekemans J, Bruls M, *et al.* Development of standardized laboratory methods and quality processes for a phase III study of the RTS, S/AS01 candidate malaria vaccine. *Malar J* 2011;10:223.
- 44 Lundell A-C, Johansen S, Adlerberth I, *et al.* High proportion of CD5+ B cells in infants predicts development of allergic disease. *J Immunol* 2014;193:510–8.
- 45 Lundell A-C, Hesselmar B, Nordström I, *et al.* Higher B-cell activating factor levels at birth are positively associated with maternal dairy farm exposure and negatively related to allergy development. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:e1073:1074–82.
- 46 Rueda CM, Moreno-Fernandez ME, Jackson CM, *et al.* Neonatal regulatory T cells have reduced capacity to suppress dendritic cell function. *Eur J Immunol* 2015;45:2582–92.
- 47 Rueda CM, Wells CB, Gisslen T, *et al.* Effect of chorioamnionitis on regulatory T cells in moderate/late preterm neonates. *Hum Immunol* 2015;76:65–73.
- 48 Rennó C, Nadaf MIV, Zago CA, *et al.* Healthy preterm newborns show an increased frequency of CD4(+) CD25(high) CD127(low) FOXP3(+) regulatory T cells with a naive phenotype and high expression of gut-homing receptors. *Scand J Immunol* 2016;83:445–55.

PARTIE IV : RESULTATS ET DISCUSSION



RESULTATS

En amont des résultats présentés dans cette partie, tout le travail qui a permis la collecte des données épidémiologiques, cliniques et la collecte des échantillons pour des expériences biologiques est présenté dans l'article 1 (Voire Méthodologie)

Dans la suite, Je présenterai successivement 2 travaux relatifs à la réalisation de mon projet de thèse.

1. Evaluation de biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic du sepsis néonatal dans les pays à revenus faibles.
2. Expression des isoformes MD-2/TLR4 chez les nouveau-nés exposés au paludisme gestationnel.

Article I: Host immunity biomarkers of neonatal sepsis: A prospective, multicentre study.

Sem Ezinmegnon, Marine Mommert, Francois Bartolo, Gino Agbota, Sossou Darius, Valérie Briand, Marceline d'Almeida, Maroufou Jules Alao, Ida Dossou-Dagba, Achille Massougbodji, Ulrik Lausten-Thomsen, Alexandre Pachot, Laurence Vachot, Javier Yugueros-Marcos, Karen Brengel-Pesce, Nadine Fievet, Pierre Tissieres

(Manuscrit soumis dans Intensive Care Medicine)

Les pays à faible et moyen revenu (LMIC) concentrent la majorité des décès dus au sepsis néonatal. Dans un environnement où le contexte économique est très important dans la gestion des infections néonatales, l'exploration de biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic de la septicémie chez les nouveau-nés exposés aux bactéries Gram négatif peut être particulièrement pertinente. Plusieurs biomarqueurs tels que la CRP et la procalcitonine sont couramment utilisés dans la pratique clinique. De nouveaux biomarqueurs ciblant la réponse de l'hôte apparaissent, et il est nécessaire d'évaluer leurs précisions dans les régions où la charge septicémique est élevée et où les ressources médico-économiques sont rares. On pourrait espérer une meilleure caractérisation de l'état d'immunosuppression rencontré chez ces patients et une optimisation du diagnostic du sepsis en utilisant des biomarqueurs combinés, mélangeant à la fois le diagnostic du sepsis et l'identification de l'immunosuppression. Le CD74 (la chaîne Li du CMH de classe II), et le CX3CR1 (le récepteur de la fractalkine), sont deux biomarqueurs associés à la mortalité et/ou à l'apparition d'infections secondaires chez les patients adultes en soins intensifs. Il n'existe pas de données sur la valeur des transcriptions des *CD74* et *CX3CR1* pour le pronostic du sepsis néonatal. Cependant, la compréhension actuelle de la physiopathologie du sepsis, et plus particulièrement de l'immunosuppression induite par le sepsis, soutient l'exploration de cette condition spécifique, en particulier chez les patients dont on sait que les états immunosuppresseurs font partie de la physiopathologie et contribue à la gravité.

Ce travail avait pour objectif d'évaluer dans le sang de cordon des enfants présentant un risque accru d'infections néonatales 1) la performance diagnostique de la procalcitonine (PCT) pour le sepsis néonatal, 2) la performance diagnostique et pronostic des transcrits CD74 et CX3CR1 pour le sepsis néonatal et 3) évaluer l'association des marqueurs (interleukine (IL)-6, TNF α , IL-10, IP-10) pour améliorer le diagnostic et le pronostic des biomarqueurs.

Intensive Care Medicine

Host immunity biomarkers of neonatal sepsis: A prospective, multicentre study. --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	ICME-D-21-00392									
Full Title:	Host immunity biomarkers of neonatal sepsis: A prospective, multicentre study.									
Article Type:	Original									
Funding Information:	<table><tr><td>biomerieux</td><td>Not applicable</td></tr><tr><td>Agence Nationale Recherche Technologie (FR)</td><td>Dr Sem Ezinmegnon</td></tr><tr><td>Fondation Recherche Medicale (FR)</td><td>Dr Gino Agbota</td></tr><tr><td>Fondation Simone Beer (FR)</td><td>Dr Valérie Briand</td></tr></table>		biomerieux	Not applicable	Agence Nationale Recherche Technologie (FR)	Dr Sem Ezinmegnon	Fondation Recherche Medicale (FR)	Dr Gino Agbota	Fondation Simone Beer (FR)	Dr Valérie Briand
biomerieux	Not applicable									
Agence Nationale Recherche Technologie (FR)	Dr Sem Ezinmegnon									
Fondation Recherche Medicale (FR)	Dr Gino Agbota									
Fondation Simone Beer (FR)	Dr Valérie Briand									
Abstract:	Purpose Few biomarkers for sepsis diagnosis are commonly used in neonatal sepsis. Whilst host response is increasingly recognized in sepsis pathogenesis and prognosis, there is a need for evaluating the accuracy of new biomarkers targeting host response in regions where sepsis burden is high and medico-economic resources are scarce. Methods In this study conducted in five urbans and sub-urbans centres in the south Benin region, we evaluated the accuracy of transcriptional (CD74, CX3CR1), proteic (PCT, IL-6, IL-10, IP-10) biomarkers and clinical characteristics to diagnose and prognose neonatal sepsis. At delivery, cord blood from all consecutive newborn were sampled and analysed, and infants were followed for a 12 weeks' period. The primary endpoint was occurrence of early onset neonatal sepsis. The secondary endpoints were occurrence of late onset neonatal sepsis, and death. Results From April 17, 2016 through March 12, 2018, a total of 581 newborn were enrolled. One hundred and seventy-two newborn developed sepsis (29.6%) and death occurred in forty-nine infants (8.4%). Among all tested biomarkers and clinical criteria, CD74 /IP-10 ratio showed the best accuracy for neonatal sepsis diagnosis, while PCT accuracy was low. Among biomarkers and clinical criteria studied, only CD74 and PCT were independently associated with mortality, with CD74 showing an elevated predictive accuracy. Conclusions Cord blood PCT had a low accuracy for diagnosing early onset neonatal sepsis in Sub Saharan African neonates, while CD74 /IP-10 ratio had the best diagnostic accuracy. CD74 expression at birth had the best accuracy in prognosing sepsis mortality.									
Corresponding Author:	Pierre Tissieres, M.D., D.Sc. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP) Le Kremlin-Bicêtre, FRANCE									
Corresponding Author Secondary Information:										
Corresponding Author's Institution:	Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP)									
Corresponding Author's Secondary Institution:										
First Author:	Sem Ezinmegnon									
First Author Secondary Information:										

Order of Authors:	Sem Ezinmegnon
	Marine Mommert
	Francois Bartolo
	Gino Agbota
	Darius Sossou
	Valérie Briand
	Marceline d'Almeida
	Maroufou Jules Alao
	Ida Dossou-Dagba
	Achille Massougbojji
	Ulrik Lausten-Thomsen
	Alexandre Pachot
	Laurence Vachot
	Javier Yugueros-Marcos
	Karen Brengel-Pesce
	Nadine Fievet
	Pierre Tissieres, M.D., D.Sc.
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	Professor Guiseppe Citerio Editor-in-Chief Intensive Care Medicine March 10th, 2021 Dear Professor Citerio, It is our pleasure to submit the manuscript titled "Host immunity biomarkers of neonatal sepsis: A prospective, multicentre study " by S. Ezinmegnon and coll. for consideration as an original article in Intensive Care Medicine. In this prospective multicenter study on neonatal sepsis, we evaluate the diagnostic and prognostic accuracy of different biomarkers of sepsis in 581 infants delivered in five University Hospitals and semi-rural health care centers in the South Benin Abomey-Calavi District where gestational malaria is super-endemic. A prolonged clinical and biological follow-up of all these children up to 3 months of age was performed allowing to draw age-specific reference values of these biomarkers of sepsis. This study showed that among 172 infants with neonatal sepsis (29.6%), and an associated neonatal mortality of 8.4%, CD74 to IP10 ratio, the two facet of host antigen presentation, had the highest accuracy for diagnosing neonatal sepsis, whereas PCT accuracy was low. In addition, we observed that CD74 and PCT were independently associated with mortality, with CD74 showing an elevated predictive accuracy. This is the first study ever showing that CD74 have a prognosis accuracy in human sepsis. An innovative clinical research consortium associating the Institute of Clinical Research of Benin (IRCB), the French Institute for Research in Development (IRD), The French National Center for Scientific Research (CNRS) and an industrial partner, bioMerieux, allowed to provide a state of the art microbiologic and diagnostic facility, long-term clinical follow-up and research infrastructures.

	Beside this study provide the first insight ever published on biomarkers in a neglected population with high sepsis prevalence, this study highlights the importance of patient immune antigen presentation as a biomarker of sepsis diagnosis and severity, which concept is applicable beyond the pediatric field. I hereby certified that this manuscript or any part of it was never submitted, nor is submitted to any other journal. All authors have significantly contributed and have seen and approved the manuscript submission. Yours sincerely, Pierre Tissières, MD, DSc Division Head, Professor of Pediatrics Pediatric Intensive Care and Neonatal Medicine Department AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital
Suggested Reviewers:	

Host immunity biomarkers of neonatal sepsis: A prospective, multicentre study

Sem Ezinmegnon, M.Sc.^{1,2}, Marine Mommert Ph.D.¹, Francois Bartolo, M.Sc.¹, Gino Agbota, Ph.D.^{3,4}, Sossou Darius, M.Sc.⁴, Valérie Briand, M.D., Ph.D.⁵, Marceline d'Almeida, M.D.⁶, Maroufou Jules Alao, M.D.⁷, Ida Dossou-Dagba, M.D.⁸, Achille Massougbodji, M.D.⁴, Ulrik Lausten-Thomsen, M.D., Ph.D.⁹, Alexandre Pachot, Pharm.D.¹, Laurence Vachot, Ph.D.¹, Javier Yugueros-Marcos, Ph.D.¹, Karen Brengel-Pesce, Ph.D.¹, Nadine Fievet, Ph.D.^{3,4}, Pierre Tissières, M.D., D.Sc.^{2,9,10}, for the SEPSIS study group*

Author affiliations

1. Open Innovation & Partnerships Lyon Sud (OI&P), bioMérieux, Marcy l'Etoile, France
2. Institute of Integrative Biology of the Cell (I2BC), CNRS, CEA, University Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France.
3. Université de Paris, MERIT, Institute of Research for Development (IRD), Paris, France.
4. Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Calavi, Benin.
5. University of Bordeaux, INSERM, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR 1219, Bordeaux, France.
6. Pediatric Department, National University Hospital Center (CNHU), Cotonou, Benin.
7. Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin.
8. Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin.
9. Pediatric Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France.
10. FHU SEPSIS, AP-HP/Université Paris Saclay/Inserm, Le Kremlin-Bicêtre, France

* A list of collaborators in the SEPSIS study group is provided in the Supplementary Appendix 1, available at XX

Correspondance: Pierre Tissières, MD, DSc, Pediatric Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Paris Saclay University, Bicêtre Hospital, 78, Rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, France. pierre.tissieres@aphp.fr

Author Contributions:

Study conception and design: PT, NF, VB, AP, JYM, LV, KBP.

Acquisition, analysis, or interpretation of data: SE, MM, GA, DS, MA, MJA, IDD, AM, ULT, LV, NF, PT

Statistical analysis: SE, FB

Drafting and revision of the work: All authors

Final approval of the submitted publication: All authors

Take home message: In this prospective multicenter study, cord blood PCT had a low accuracy for diagnosing early onset neonatal sepsis, while CD74/IP-10 ratio, deciphering both aspects of antigen presentation, had the best diagnostic accuracy. CD74 expression at birth had the best accuracy in prognosing neonatal sepsis mortality.

Tweet: Markers of antigen presentation,CD74 and IP-10, have high diagnostic and prognosis accuracy in neonatal sepsis.

Funding/Support: Funded by a consortium including bioMérieux SA, the Institute for Research in Development (IRD), The National Centre for Scientific Research (CNRS), with support of the French National Agency for Research and Technology (ANRT), the Foundation Simone Beer under the auspices of the Foundation of France, and the Foundation for Medical Research (FRM).

Competing interest: JYM, LV, AP are employed by an in vitro diagnostic company, bioMérieux SA. The remaining authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could cause potential conflict of interest.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Clinical Trials Registration. NCT03780712.
- 2
- 3 **Keywords.** sepsis, neonate, biomarkers, procalcitonin, CD74.
- 4
- 5
- 6
- 7 **Acknowledgements:** A list of collaborators in the SEPSIS study group is provided in the
- 8
- 9 Supplementary Appendix 1
- 10
- 11
- 12 **Manuscript word count:** 4223 words
- 13
- 14
- 15
- 16 6
- 17
- 18
- 19 7
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

ABSTRACT (245 words)

Purpose. Few biomarkers for sepsis diagnosis are commonly used in neonatal sepsis. Whilst host response is increasingly recognized in sepsis pathogenesis and prognosis, there is a need for evaluating the accuracy of new biomarkers targeting host response in regions where sepsis burden is high and medico-economic resources are scarce.

Methods. In this study conducted in five urbans and sub-urbans centres in the south Benin region, we evaluated the accuracy of transcriptional (*CD74*, *CX3CRI*), proteic (PCT, IL-6, IL-10, IP-10) biomarkers and clinical characteristics to diagnose and prognose neonatal sepsis. At delivery, cord blood from all consecutive newborn were sampled and analysed, and infants were followed for a 12 weeks' period. The primary endpoint was occurrence of early onset neonatal sepsis. The secondary endpoints were occurrence of late onset neonatal sepsis, and death.

Results. From April 17, 2016 through March 12, 2018, a total of 581 newborn were enrolled. One hundred and seventy-two newborn developed sepsis (29.6%) and death occurred in forty-nine infants (8.4%). Among all tested biomarkers and clinical criteria, *CD74*/IP-10 ratio showed the best accuracy for neonatal sepsis diagnosis, while PCT accuracy was low. Among biomarkers and clinical criteria studied, only *CD74* and PCT were independently associated with mortality, with *CD74* showing an elevated predictive accuracy.

Conclusions. Cord blood PCT had a low accuracy for diagnosing early onset neonatal sepsis in Sub Saharan African neonates, while *CD74*/IP-10 ratio had the best diagnostic accuracy. *CD74* expression at birth had the best accuracy in prognosing sepsis mortality.

1 INTRODUCTION

2 Neonatal sepsis remains a major societal and economic burden in low- and middle-income countries.

3 The Institute for Health Metrics and Evaluation estimates that in 2017, 200,000 newborn deaths
4 occurred for every 2 million cases of sepsis in sub-Saharan Africa (SSA) [1]. Early diagnosis of
5 newborn with sepsis can reduce mortality and morbidity rates [2]. Unfortunately, the limited
6 specificity of clinical signs, the lack of appropriate biological testing and the high cost of treatment in
7 low-income countries hamper most initiatives to reduce neonatal and pediatric mortality [3]. Difficulty
8 in diagnosing sepsis in neonates is related to the conjunction of multiple variables, such as maternal
9 health, pregnancy conditions, gestational age at delivery, their immune functionality, timing of
10 infection and pathogens detection, as well as socio-economic environments and access to healthcare.

11
12 At birth, the immune defences go through rapid development and strengthen during the first years of
13 life [4]. Studies have shown that the increased risk of early and late neonatal infections observed in
14 both term and preterm infants are related to impaired innate immune function [5-7]. This innate
15 immaturity is characterized by altered cytokines production, decreased function of antigen-presenting
16 cells and has many similarities to the immunosuppression phenotypes observed in critically ill adults
17 and septic patients [8,9]. In addition to factors known to be associated with neonatal infection [10,11],
18 frequent parasitic infections in SSA, such as malaria, toxoplasmosis and schistosomiasis, affect foetal
19 and perinatal growth and development [12,13]. In low-income countries, the specific example of
20 gestational malaria (GM) shows that sequestration and cytoadhesion of infected red blood cells in the
21 placental intercellular space lead to local inflammatory responses, altered placental function and
22 subsequently promote intrauterine growth retardation and prematurity [14,15]. The *in utero* impact of
23 GM on immunity in early childhood is recognized and may explain the altered immune response to
24 vaccines and the increased risk of infection [16,17].

25
26 Blood culture remains the gold standard for the diagnosis of neonatal sepsis, but results are delayed
27 and have low sensitivity due to maternal antibiotic treatment, small sample volumes, and low

1 bacteremia [18,19]. Other tests routinely used for the diagnosis of neonatal sepsis, such as C-reactive
2 protein (CRP) and blood count (total and differential white blood cell counts, absolute and immature
3 neutrophil counts, and the ratio of immature to total neutrophils), are respectively non-specific and
4 non-sensitive [20-23]. Procalcitonin (PCT) has been shown to be an excellent marker for severe
5 bacterial infection in newborn [24-26]. However, high PCT values in newborn may reflect a state of
6 stress up to 48 hours after delivery rather than the presence of a neonatal infection [25,27]. PCT
7 therefore suffers, in some cases, of a lack of sensitivity for diagnosis of neonatal sepsis. Several
8 studies have shown that some pro-inflammatory (IL-6, IP-10) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines
9 are acute phase biomarkers that can be used for the diagnosis of bacterial infection in neonatal. Levels
10 of IL-6, IL-10 and IP-10 are significantly higher in both early (EONS) and late (LONS) onset neonatal
11 sepsis than in healthy controls [28-30]. IL-6 and IP-10 are associated with inflammation in newborn
12 [31,32], while IL-10 is associated with immunosuppression and mortality in adult septic patients [33].
13 However, those cytokine profiles may be influenced by the gestational age and time of onset of
14 infection in newborn [29,34]. Based on a microarray study, a panel of genes has been identified in
15 critically ill septic patients whose expression on peripheral blood could effectively help stratifying
16 patients at increased risk of secondary infection and/or death [35,36]. Among these genes, CD74 and
17 CX3CR1 were shown to be associated with mortality and/or the occurrence of secondary infections
18 [37-39]. Low expression of *CX3CR1* is associated with mortality and immunosuppression in adult
19 patients with septic shock [37,39]. Similarly, low expression of *CD74* is associated with mortality in
20 adult patients with septic shock while increasing expression of *CD74* in the first days of intensive care
21 is associated with the occurrence of secondary infections [38,40]. There are no data on the accuracy of
22 *CD74* and *CX3CR1* for the prognosis or diagnosis of neonatal sepsis, which hamper current use of
23 these biomarkers in neonates and children [22,23,27,41].

24
25 Neonatal sepsis epidemiology in malaria endemic SSA has rarely been studied and impact of perinatal
26 morbidities and systematic diagnostic workup never been accessed. In this study, we evaluated the

1 accuracy of transcriptional (*CX3CR1*, *CD74*) and proteic (IL6, IL10, IP-10, PCT) biomarkers and their
2 association with clinics and maternal risk factors to diagnose and prognose neonatal sepsis and
3 obtained the reference range of those biomarkers during the first three months of life.

4

METHODS

Study design and participants

Participants were delivered in 2 sub-urban health centres (sub-urban arm) and 3 urban University hospitals (hospital arm) in the Abomey-Calavi, Sô-Ava and Cotonou districts in the South Benin region where malaria is hyper-endemic [42]. In both arms, only infants born from mother living in the Abomey-Calavi district were recruited to facilitate the follow-up and minimize effect of geographical origins. In the sub-urban arm, all consecutive births were included, whereas in the hospital arm only newborn born from mothers with maternal-foetal risk factors for infections (prematurity, prolonged rupture of the membrane, maternal fever) were included. In both arms, the exclusion criteria included maternal HIV positive status, major congenital malformation and refusal of consent. All children from both arms were followed clinically on a bi-monthly base during the first 3 months of life. The follow-up consisted of scheduled home visits and unscheduled emergency visits if the infant was ill. The study protocol was approved by the local institutional review board (CER-ISBA 85-5). Written informed consent was obtained from parents.

End points

The primary end point was the diagnosis of clinical EONS, and secondary end points were diagnosis of LONS and mortality within the first three months of life. Neonatal sepsis diagnosis was established by the local paediatrician based on the clinical examination of the child and initial laboratory workup including haemogram, C-reactive protein (CRP) and microbiological cultures (blood, cerebral fluids and urine). EONS occurred within the first 72 hours following birth, LONS thereafter (for detailed algorithm for sepsis diagnosis, see published study protocol [43]).

Neonatal sepsis was suspected in neonates with perinatal infectious risk factors and more than two of the following criteria being present: neutrophil count $<7500/\text{mm}^3$ or $>14\,500/\text{mm}^3$, band form $>1500/\text{mm}^3$, immature/total neutrophils ratio >0.16 , platelets count $<150\,000/\text{mm}^3$ and CRP $>10\text{ mg/L}$. Suspected neonatal sepsis was considered as clinical sepsis when the following clinical signs

were associated: temperature irregularity; respiratory distress or apnoea; seizures, altered tonus, irritability or lethargy; vomiting, altered feeding pattern, ileus; skin perfusion alteration, haemodynamic signs (tachycardia, hypotension); hypoglycaemic/hyperglycaemic, hyperlactatemia or identification of focal infection such as soft tissue infection or conjunctivitis. All newborns with a clinical sepsis were subsequently adjudicated by two independent pediatricians (PT, ULT) and sorted into ‘presumed sepsis’ and ‘definite clinical sepsis’ grouped as “adjudicated sepsis”. In addition to the full medical file review, microbiological cultures results were monitored during the adjudication. Parallel to microbiological culture, specific BioFire® FilmArray® panels (bioMerieux, Marcy-l’Etoile, France) were ran for all positive blood cultures (Blood Culture Identification (BCID) panel), cerebrospinal fluids (meningitis/encephalitis panel), respiratory and gastrointestinal samples (Pneumonia and Gastro-Intestinal panels). All studied biomarkers were kept blinded for the adjudication.

At birth and at follow-up visits, the clinical examination data of the children were collected. Blood samples were obtained at birth, then at week (W)1, W4, W8 and W12. The study protocol has been described in detail elsewhere ⁴³. Sampling and analytical methods are presented in Supplementary Appendix 2

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software version 3.6.1. The variables were assessed for normality using Kolmogorov Smirnov test. Numbers and frequency were used for qualitative data and medians and IQR (inter-quartile range: [Q1–Q3]) for quantitative data. Qualitative variables were compared using the Chi-squared test (or Fisher’s exact test for small expected numbers). The distribution of quantitative data was compared using Student’s t-test (or the Mann-Whitney t-test when distribution was not normal or Welch test when homoscedasticity was rejected) if 2 groups were

compared. If more than 2 groups, the distribution of quantitative data was compared using Anova test
 (or the Kruskal-Wallis test when distribution was not normal or when homoscedasticity was rejected).
 To evaluate their diagnostic accuracy, biomarkers are used to discriminate between diseased and
 healthy populations. Selection of cut-off or discrimination value defining the positive and negative test
 results were performed. Several methods for selecting optimal cut-off in diagnostic tests have been
 proposed in the literature depending on the underlying reason for this choice. Here, we selected a cut-
 off to have a sensitivity of 0.95 and maximize specificity. This choice of cut-off was the same in the
 rest of the publication [44]. *CD74/IP-10* was the score corresponding to the division of *CD74* gene
 expression level by *IP-10* serum concentration. We used three datasets to test more complex models,
 either genes (noted *CX3CR1* & *CD74*), proteins (noted Protein biomarkers) or sets of biomarkers
 (noted All biomarkers). To avoid overfitting and to compare our models, we used random sampling
 which takes place within each class and must preserve the overall distribution of data by class. To do
 this, we created a distribution, repeated 200 times, of 75/25% of the data. This distribution is used to
 optimize hyperparameters with package *caret*. We then compared the average AUC and select the best
 average AUC for each dataset between all models. AUC accuracy were compared using Bootstrap
 approach. A *p value* <0.05 was considered as significant. Statistical algorithms description is displayed
 in Supplementary Appendix 2.

For comparison between clinical variables and biomarkers, we selected the clinical variables of
 interest following an expert opinion (PT) (Supplementary Table 1) and defined as significant a p-value
 of less than 0.05. In order to compare clinical and biomarker data, we transformed the data into the
 same referential to be able to compare them. We transformed the categorical clinical variables into a
 complete set of dummy variables [45]. Different transformations were then applied to the data set. A
 Yeo-Johnson transform is a non-linear transformation that reduces skewness and approximates a
 normal law. We centred (subtracts the mean of the variable's data) and scaled data (divides the
 standard deviation).

1
2 For the establishment of heatmap, Partial Least Squares (PLS) Regression was used to compare the two
3 datasets. This algorithm comes from the *mixOmics* package. Biomarkers were deflated with respect to
4 the information extracted/modelled from the local regression on Clinical Variables. Consequently, the
5 latent variables computed to predict Biomarkers from Clinical Variables are different from those
6 computed to predict Clinical Variables from Biomarkers. One matrix Clustered Image Map (CIM) is a
7 2-dimensional visualization with rows and/or columns reordered according to some hierarchical
8 clustering method to identify interesting patterns. The CIM allows to visualize correlations between
9 variables. Generated dendrograms from clustering were added to the left side and to the top of the
10 image. The used clustering method for rows and columns is the complete linkage method and the used
11 distance measure is the distance Euclidean. We showed only variables with co-variances greater than
12 $\max(\text{covariance})/2$.

13
14 N-integration and feature selection with Projection to Latent Structures models (PLS) with sparse
15 Discriminant Analysis was used to compare the two datasets and outcome (Circosplot). This algorithm
16 comes from the *mixOmics* package. The circos plot represents the correlations between variables of
17 different types, represented on the side quadrants. We showed within and between connexions
18 between blocks, expression levels of each variable according to each class. The circos plot is built
19 based on a similarity matrix, extended to the case of multiple data sets. We showed only variables with
20 co-variances greater than $\max(\text{correlation})/2$ [45].

RESULTS

Cohort description

Between April 17, 2016 and March 12, 2018, a total of 581 newborn were enrolled, 420 (72.3%) in the hospital arm and 161 (27.7 %) in the sub-urban arm. Patients' characteristics are displayed in Table 1. Median gestational age (GA) was 38.4 weeks (95% confidence interval [CI], 35.5 to 40 weeks), with a median birth weight of 2816 grams (95%CI, 2400 to 3150 grams). One hundred and eighty-four (31.6%) infants were born prematurely with thirty-four (5.8%) being less than 32 weeks of GA. More preterm infants were delivered in the hospital arm than in the sub-urban arm (41.2% vs 6.2%, $p<0.0001$) and had a lower birth weight (2700 grams vs 3006 grams, $p<0.001$). Forty-five multiple gestations (40 twins, 5 triplicate) happened. Gestational malaria occurred in forty-three mothers (8.1%), impacting 49 infants (8.4%). Intermittent preventive treatment of malaria was performed in 470/531 (88.5%) of all mothers. According to the study design, main differences between arms are related to the perinatal risks with more premature infants and maternal risk factors of neonatal sepsis in the hospital arm. In total, 432/581 (74.3 %) babies were born from mothers with maternal risk factors of infection (386/531, 72.7%). One hundred and seventy-two infants (29.6%) developed a clinical sepsis according to the definition. All occurred in the hospital arm. Among these, adjudication confirmed 168 cases (97.7%) (Figure 1). All but five clinical sepsis were EONS. In the hospital arm, 307/420 infants were hospitalized following birth, the remaining with uneventful delivery and normal perinatal adaptation were discharged. Only one infant from the sub-urban arm was hospitalized for prenatally undiagnosed omphalocele. The median hospital stay was 4 days (95% CI, 2 to 7 days). The global mortality was 49/581 (8.4%) with a significant difference between hospital and sub-urban arms, respectively 11.4 % (48/420) versus 0.62% (1/161) ($p<0.001$). Most death occurred in the first week of life (median 2 days).

Identification of microorganisms in neonatal sepsis was performed using conventional bacterial culture followed by Biofire® FilmArray® multiplexing panel testing. Results are described in Table 2. A total of 155 hemocultures were sampled, of which positive cultures was obtained in 59/155 (38.1%)

1 samples. Standard microbial cultures identified 59 pathogens and 14 hemocultures showed multiple
2 germs and were considered as contaminated. Fifty-six of the 155 hemocultures were positive using
3 Biofire® FilmArray® (56/155, 36.1%), in which 91 pathogens were identified. Gram-negative
4 bacteria represented the majority of pathogens (52.5% to 49.4% pending the microbiologic technique)
5 with *Enterobacter cloacae* complex, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens* and *Staphylococcus*
6 *spp.* being the most frequent germs identified (Table 2). Additional Biofire® FilmArray® panels
7 identified viral infections (including Norovirus GI/GII, Rotavirus A, Coronavirus OC43, human
8 rhinovirus and Respiratory Syncytial Virus) in 23 samples with negative standard cultures. Out of the
9 29 cerebrospinal fluid samples, one was positive for *Hemophilus influenzae*.

10 **Primary outcome: Sepsis diagnosis and prognosis accuracy**

11 Cord blood levels of studied biomarkers are displayed in Table 3. Procalcitonin level was significantly
12 higher in infants developing neonatal sepsis compared to both sub-urban arm and hospital healthy
13 infants (Figure 2A). A significant difference in cord blood from non-septic neonates between both
14 arms was observed. Diagnosis accuracy of cord blood PCT was low with an AUC of 0.62 (95% CI,
15 0.56 to 0.67) (Figure 2B). Procalcitonin value of 401.8 pg/mL had a sensitivity of 96% but a poor
16 specificity of 6% for clinical sepsis. Similarly, individual markers or most combinations had a low
17 accuracy for sepsis diagnosis, but *CD74*/IP-10 ratio showed a significant better accuracy than PCT
18 ($p=0.0015$), *CD74* ($p<0.001$) and all biomarkers model ($p=0.046$), respectively with an AUC of 0.77,
19 0.62, 0.59 and 0.68. No significant difference in diagnostic accuracy between biomarkers and clinical
20 criteria association was seen. *CD74*/IP-10 ratio value of 0.44 (Youden index 0.21) had a sensitivity of
21 73 % and specificity of 25% for clinical sepsis diagnosis. Correlation between biomarkers and clinical
22 variables showed that *CX3CR1*, IP-10, IL-6 and IL-10 are poorly correlated (Figure 3A). However,
23 *CD74* and PCT were strongly correlated (correlation cut-off <-0.5 or >0.5) with premature rupture of
24 membrane (PROM), maternal fever, Apgar score, heart and respiratory rate (Figure 3A). More
25 specifically, *CD74* and PCT were inversely correlated with Apgar score, maternal fever, and to a
26 lower extend with gestational age (Figure 3B).

Secondary outcome: Sepsis prognosis

At delivery, PCT, *CD74*, IL-6 and *CX3CR1* levels were significantly different between survivors and non survivors (Figure 4A). Prognosis accuracy of *CD74* was elevated (AUC 0.78; 95% CI, 0.68 to 0.87) and low for *CX3CR1* (AUC 0.51; 95% CI, 0.40 to 0.61) (Figure 4B). *CX3CR1*, PCT and IP-10 levels were significantly different in survivors from both arms, suggesting that clinical conditions (maternal risk factors, prematurity) may impact those biomarkers (Figure 4A). Out of studied biomarkers, only *CD74* and PCT were associated with mortality in a partial least squares regression model. *CD74* was positively correlated with Apgar score, gestational age, height and weight (Figure 5). Interestingly models combining clinical criteria and biomarkers had elevated accuracy for mortality, but were statistically similar. Model associating *CD74* expression, Apgar score at 1 minutes and abnormal amniotic fluid had an AUC of 0.86 (95%CI, 0.79 to 0.92).

Biomarkers reference range in the first 12 weeks of life

In healthy newborn, all biomarkers but PCT had a significant lower value on cord blood than in the first week following birth (Figure 6). Whereas most biomarkers range did not vary between weeks 1 and 12, *CD74* progressively increased during the first eight weeks of life. Following neonatal sepsis, at week 4, *CD74* was significantly lower in septic than in healthy newborn. We did not observe any significant differences in biomarker profiles between newborn exposed or not to gestational malaria.

DISCUSSION

This multicentre study performed in sub Saharan Africa showed that cord blood PCT has a low accuracy for diagnosing EONS whilst *CD74*/IP-10 ratio had the best diagnostic accuracy among tested biomarkers and clinical criteria. In addition, the study showed that *CD74* accuracy was elevated in prognosing sepsis mortality. The evaluation of clinical and biomarkers for neonatal sepsis diagnosis and prognosis in setting with high prevalence of sepsis and limited resources is bringing for the first time detailed assessment of potential biomarkers utility and establishment of reference values in neglected pediatric populations. As such, this study is a radical breach in biomarkers development paradigms by re-focusing their evaluation in setting with high prevalence of neonatal sepsis. Several large studies, occurring in setting with high resources and low sepsis prevalence, have suggested that cord blood PCT may be a robust biomarker for neonatal sepsis diagnosis, reporting elevated sensitivity and specificity for cut-off values ranging between 0.6-0.7 ng/mL [46-48]. These encouraging data were not confirmed by all. Few series in extreme premature infants and in setting where EONS prevalence was higher, showed lower sensitivity and specificity ranging between 48.7 to 69% and 68.6 to 70%, respectively [49,50]. Our study confirms the inaccuracy of cord blood PCT in diagnosing neonatal sepsis. The lack of specificity that we observed may be related to the effect of maternal and neonatal medical or environmental conditions on PCT levels. In a large series involving 2151 infants (26 with EONS), Joram *et al.* identified gestational age (28-32 weeks) and pH<7.10 to be the only factors associated with increased PCT levels [47]. In our series, PCT was strongly correlated with PROM, maternal fever, Apgar score, gestational age, infant heart and respiratory rate, suggesting that prenatal condition and newborn adaptation impact PCT level as displayed by a significant PCT level difference in healthy infants born from either the hospital (with maternal risk factors) or the sub-urban arm (no maternal risk factors). Interestingly, *CD74*/IP-10 ratio was shown for the first time to have a better accuracy for sepsis diagnosis than any studied biomarkers and clinical combinations. *CD74*, the invariant chain involved in MHC class II molecules transport, was previously shown to be a potential identification marker in adult critically ill patients developing healthcare associated infections [40]. In our study, *CD74* expression alone has a low accuracy for EONS diagnosis, but its association with IP-

10, the interferon- γ inducible protein-10, emerges as a strong combination of biomarker for neonatal sepsis diagnosis (AUC 0.77, 95% CI: 0.72 to 0.81). IP-10 is associated with various inflammatory conditions such as autoimmune diseases, hemophagocytic syndromes and viral infections where its combination with phospholipase A2, or IL-10 were suggested for sepsis diagnosis [31,51-53]. Combination of *CD74* and IP-10, illustrating both antigen presentation ability and response to type II interferon stimulation, may be representative of both faces of neonatal immunological competency to infection. Ontogeny of antigen presentation in early life is thought to be a key factor in determining age-specific responses to microbes and other antigens. IP-10 production in infants reflects a consequent Th1 response and as such it may represent in conjunction with a reduced *CD74* expression, despite IFN γ stimulation, a signature for severely dysregulated response associated with EONS.

Although well recognized in cancer, few publications relate *CD74* utility in sepsis, none in children and neonates [54,55]. In contrast, in a study of critically ill septic adults, low expression of *CD74* was frequently shown to be independently associated with mortality (OR 3.4, 95% CI: 1.2 to 9.8, $p=0.026$) [38] whereas secondary infection occurrence was associated with increased *CD74* expression in the first day following admission for septic shock [40]. Our study further extend *CD74* prognosis utility to EONS. *CD74* expression on cord blood of < 9.47 cutoff value (Youden index 0.09) was predictive of death in septic neonates with a sensitivity of 95% and a specificity of 13%. Indirectly those results confirm those related to histocompatibility leukocytes antigen-DR expression on monocytes (mHLA-DR) that is known to be highly correlated ($r=0.87$) with *CD74* expression [38]. Low mHLA-DR was shown to be associated with EONS in premature infants and mortality following LONS [56,57]. The underlying pathophysiologic rational behind the association of low *CD74*/low mHLA-DR in infants and sepsis mortality may be resumed by an altered antigen presentation, either acquired or secondary to a perinatal event. Primary defect or decreased expression of mHLA-DR was shown to be associated with prematurity [7,58] and altered myeloid cells functionality in extremely immature infants. Secondary decrease of mHLA-DR in response to diverse aggression is well recognized. Decrease in mHLA-DR expression was demonstrated following sepsis, and is recognized as one of the main

immunological characterization of post-infective immune failure [59-61]. As such, the prolonged alteration of mHLA-DR was shown to be associated with mortality in adults with sepsis [59,62-64]. Serial mHLA-DR kinetics in septic newborn is largely unknown although a rise in HLA-DR negative monocytes following severe sepsis is reported [65]. Interestingly, in our study, infants surviving sepsis showed a prolonged alteration of *CD74* expression up to one month following EONS. Nevertheless, such prolonged post-sepsis reduction in *CD74* transcription, as well as reduced mHLA-DR has never been described both in infants and adults. Newborn are known to have a rapidly evolving immunity during the first months of life. Olin *et al.* demonstrated in a longitudinal analysis of infant's immunity that a phenotypic convergence is occurring between term and preterm infants at three months of age, but in between environmental factors shape immune variation [66]. Interestingly they showed that drastic changes in cell composition and phenotypes, plasma protein concentrations occurred during the first few days of life bringing additional insights to the understanding of biomarkers kinetics and potential utility for diagnosing EONS. Accordingly, our study establishes the reference values of IL-6, IL-10, IP-10 and *CD74*, *CX3CR1* during the first 4 and 12 weeks of life, respectively. These are the first ever published set of reference values from newborn and infants living in Sub Saharan Africa. Extrapolation of these reference values to infants outside Africa may be acceptable. We showed that gestational malaria did not impact any biomarkers values making these applicable in region with no endemic malaria. In addition, a recent study showed that age-related immune patterns was not different between Africa, North America, South America and Europe despite environmental variations [67].

Impact of prematurity, as well as perinatal asphyxia are now identified as confounding criterion for PCT, and *CD74* value interpretation at birth. Prevalence of prematurity in this cohort (31.6%) is due to the recruitment strategy and may not be representative of Benin epidemiology. Nevertheless, the prevalence of neonatal sepsis in our cohort (29%) is consistent with previous studies (between 16 % to 28%) reducing the likelihood of potential skewness of the studied cohort [68,69]. Our study brings additional epidemiological information in regard to the pathogens encountered in Sub Saharan Africa

1 neonatal sepsis. Beside *Staphylococcus spp.* predominance as expected in premature infants, specific
2 Enterobacteriaceae, such *Enterobacter cloacae* complex, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*
3 were identified. This certainly raises an important question regarding the presence of resistant
4 *Enterobacteriaceae* usually considered as nosocomial pathogens. The early occurrence of those
5 neonatal sepsis suggests a materno-fetal transmission although hand carried infection could not be
6 excluded. The wide use of over the counter antibiotics (eg. Quinolones, β lactams) in Africa is known
7 to be associated with antimicrobial resistance [70]. All infants, but one, with neonatal sepsis were
8 delivered in University Hospitals for maternal risk factors such as prematurity, PROM, or maternal
9 fever. As per local protocols, use of prepartum antibiotics was performed uniquely if cervical carriage
10 of *Streptococcus agalactiae* occurred or in febrile mothers, however in practice no mother had any
11 cervical swabs. This observation certainly open significant avenue for infection prevention and
12 strategies focusing at reducing neonatal exposure to resistant pathogens [71-73].

13
14 In this study cord blood PCT was found to have a low accuracy for neonatal sepsis diagnosis and
15 *CD74* to be predictive of mortality in infants with neonatal sepsis. Kinetics of *CD74* expression
16 following neonatal sepsis showed a prolonged impairment in survivors. In addition, *CD74*/IP-10 ratio
17 was found to have a good accuracy for neonatal sepsis diagnosis, depicting a novel signature for
18 defective Th1 response and altered antigen presentation seen in sepsis and sepsis-associated immune
19 depression.

1 TABLES

2 Table 1. Patient characteristics

		Suburban	Hospital non sepsis	Hospital sepsis	All patients	<i>p-value</i>
		(n= 161)	(n= 248)	(n= 172)	(n=581)	
Female n (%)		81 (50.3)	129 (52)	77 (44.7)	287 (49.4)	0.33
Birth weight (grams)		3006 [2800- 3205]	2700 [2350- 3100]	2600 [1755- 3100]	2816 [2400- 3150]	< 0.001
Gestational age (week)		39.5 [38.4- 40.3]	38.1 [35.3- 39.6]	36.1 [33.3- 39.2]	38.4 [35.5- 40]	< 0.001
	≤ 37 weeks (%)	10 (6.2)	88 (35.4)	86 (50)	184 (31.6)	
	≤ 32 weeks (%)	1 (0.6)	8 (3.2)	24 (14)	34 (5.8)	
	≤ 28 weeks (%)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6)	1 (0.1)	
APGAR score (1 minute)		9 [9-9]	9 [8-9]	8 [6-9]	9 [8-9]	< 0.001
APGAR score (5 minute)		10 [10-10]	10 [9-10]	9 [8-10]	10 [9-10]	< 0.001
Hemoglobin (g/dL)		15 [13.4-16.4]	14.8 [13.1- 16.1]	14.9 [13.5- 16.2]	14.9 [13.3- 16.3]	0.49
Hospitalization		1 (0.6)	136 (54.8)	171 (99.4)	308 (53)	< 0.001
Hospitalization duration (Day)		0 [0]	3 [1-4]	5 [3-10]	4 [2-7]	N.C
Death		1 (0.6)	10 (4)	38 (22.1)	49(8.4)	< 0.001

Timing of death (Day)		0 [0-0]	1 [0.2-2]	3 [1-8]	2 [1-8]	<i>N.C</i>
Twins		4(0.6)	23(4)	18(3.1)	45 (7.7)	
Maternal characteristics		n= 157	n= 222	n= 152	n= 532	
Gestate		3 [2-4]	2 [1-4]	3 [1-4]	3 [1-4]	<i>0.005</i>
Maternal risk factors		12 (7.4)	248 (100)	172 (100)	432 (74.3)	<i>< 0.001</i>
	Fever at delivery*	3 (1.8)	56 (22.5)	62 (36)	108 (20.3)	<i>< 0.001</i>
	Abnormal amniotic fluid*	0 (0)	151 (60.9)	81 (47.1)	226 (42.5)	<i>< 0.001</i>
	PROM (> 18 hours)*	0 (0)	77 (31)	70 (40.7)	137 (25.8)	<i>< 0.001</i>
	Chorioamni onitis*	0 (0)	20 (8)	27 (15.7)	46 (8.6)	<i>< 0.001</i>
Malaria at delivery		6 (3.7)	24 (9.7)	19 (11)	49 (8.4)	<i>0.03</i>
IPT		160 (99.4)	203 (81.8)	143 (83.1)	506 (87)	<i>< 0.001</i>

* Associated with multiple risk factors

Biomarkers are expressed as median and IQR (inter-quartile range: [Q1–Q3]). Qualitative data are expressed as numbers and frequency and quantitative data are expressed as medians and IQR (inter-quartile range: [Q1–Q3]). Qualitative variables were compared using the Chi-squared test (or Fisher's exact test for small expected numbers). Anova test (or the Kruskal-Wallis test when distribution was not normal or when homoscedasticity was rejected) was performed to compare groups. A *p value*

1 <0.05 was considered as significant. *PROM*, Premature Rupture of Membranes; *IPT*, Intermittent

2 Preventive Treatment of malaria; *APGAR*, neonatal adaptation score.

3

Table 2. Microbiology investigation results

Pathogens	Standard culture	FilmArray®
Gram-positive bacteria	12 (20.3)	23 (25.3)
<i>Enterococcus</i>		1 (1.1)
<i>Staphylococcus</i> *	9 (15.2)	14 (15.4)
<i>Staphylococcus aureus</i> *		5 (5.5)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (group B)*		1 (1.1)
<i>streptococcus sp</i> *	3 (5.1)	2 (2.2)
Gram-negative bacteria	31 (52.5)	45 (49.4)
<i>Acinetobacter sp</i> *	1 (1.7)	2 (2.2)
<i>Campylobacter</i>		2 (2.2)
<i>Escherichia coli</i> *	4 (6.7)	6 (6.6)
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	11 (18.6)	12 (13.2)
<i>Haemophilus influenzae</i>		1 (1.1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	6 (10.1)	9 (10)
<i>Moraxella sp</i>	1 (1.7)	
<i>Serratia marcescens</i> *	8 (13.6)	13 (14.2)
Virus		23 (25.3)
Norovirus GI/GII		1 (1.1)
Rotavirus A		1 (1.1)
Coronavirus OC43		2 (2.2)
Detected Human Rhinovirus/Enterovirus		12 (13.2)
Respiratory Syncytial Virus		7 (7.7)
Other	16 (27.1)	
<i>Candida non albicans</i>	1 (1.7)	
Bacteria of different types (probable contamination)	14 (23.7)	
Bacteria non-identified	1 (1.7)	
Total	59 (100)	91 (100)

Data are shown as number (%) of patients

* Pathogens found in co-infection

1 **Table 3. Cord blood biomarkers level in neonatal sepsis**

Biomarkers	Suburban (Non sepsis)	Hospital (Non sepsis)	Hospital (sepsis)	<i>p-value</i>
Clinical sepsis				
<i>CD74</i> *	4.6 [3.2-7.2]	5.2 [3.1-7.1]	4.7 [2-7.5]	<i>0.03</i>
<i>CX3CR1</i>	1 [0.8-1.6]	0.8 [0.5-1.3]	0.8 [0.4-1.5]	<i>0.007</i>
IP-10 [pg/ml]	105 [72.6-223]	76.8 [49-134.6]	81.3 [56.9-143.1]	<i>< 0.001</i>
IL-10 [pg/ml]	4.3 [2.9-10.2]	4.8 [2.9-8]	5.3 [3-13.5]	<i>0.05</i>
IL-6 [pg/ml]**	23.1 [4.5-468.5]	7.3 [2.7-118.5]	29.9 [5.6-661.5]	<i>0.002</i>
PCT [pg/ml]***	383 [225.7-543.7]	458.3 [320.4-716.4]	506.6 [358.5-987.3]	<i>< 0.001</i>
Clinical Adjudication				
<i>CD74</i>	4.6 [3.2-7.2]	5.3 [3.3-7.3]	4.6 [1.8-6.8]	<i>0.23</i>
<i>CX3CR1</i>	1 [0.8-1.6]	0.8 [0.5-1.4]	0.7 [0.4-1.3]	<i>0.015</i>
IP-10 [pg/ml]	105 [72.6-223]	79.5 [52.2-134.6]	78.5 [49.8-142.8]	<i>< 0.001</i>
IL-10 [pg/ml]	4.3 [2.9-10.2]	4.7 [2.8-7.7]	5.5 [3.2-14]	<i>0.30</i>
IL-6 [pg/ml]***	23.1 [4.5-468.5]	8.3 [2.8-124.7]	26.8 [4.6-661.5]	<i>< 0.001</i>
PCT [pg/ml]	383 [225.7-543.7]	443.8 [304.3-670.2]	583.5 [384.5-1022.7]	<i>< 0.001</i>
Sepsis pronostic				
<i>CD74</i> ***	5.3 [1.7-11.4]	0.8 [0.2-6.9]	4.6 [1.8-20]	<i>< 0.001</i>
<i>CX3CR1</i>*	0.8 [0.5-1.4]	0.7 [0.3-1.3]	1 [0.8-1.6]	<i>0.007</i>
IP-10 [pg/ml]	77 [51.6-132.5]	89.7 [52.6-160.6]	105 [72.6-214.5]	<i>< 0.001</i>
IL-10 [pg/ml]	4.8 [2.9-9.4]	5.5 [3.8-14.1]	4.3 [3-10.3]	<i>0.28</i>
IL-6 [pg/ml]*	13.9 [4.1-212.7]	155.4 [11.7-1069.1]	22 [4.6-258.1]	<i>0.01</i>
PCT [pg/ml]**	460.7 [335.8-758.7]	671.5 [425-1126.6]	383.8 [227.8-557.5]	<i>< 0.001</i>

2

1 Biomarkers are expressed as median and IQR (inter-quartile range: [Q1–Q3]). CD74 and CX3CR1
2 expression are expressed as relative expression to *HPRT1*. Anova test was performed to compare
3 biomarkers levels between the groups. A *p value* <0.05 was considered as significant. Student's t-test
4 (or the Mann-Whitney t-test when distribution was not normal or Welch test when homoscedasticity
5 was rejected) were performed to compare hospital arm groups (* $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).
6 *CD74*, HLA class II histocompatibility antigen gamma chain; *CX3CR1*, CX3C chemokine receptor 1;
7 *IP10*, Interferon gamma-induced protein 10; *IL*, Interleukin.

1 **Supplementary Table 1. Clinical Variables Legend**

Designates	Clinical variables
a	Apgar 1m
b	Apgar 5m
c	Heart frequency
d	Heart frequency 1P
e	Gravidity
f	Chorioamnionitis
g	Abnormal amniotic fluid
h	Location of consultation
i	Amniotic fluid
j	Birth weight
k	Sex
l	Height
m	Term of birth
n	Prematurity
o	Premature membranes rupture
p	Maternal fever
q	Birth temperature
r	Intermittent preventive treatment
s	Skin color
t	Ethnicity
u	Gravidity

2

3

FIGURES LEGEND

Figure 1: Flow diagram of study population

Recruitment and flow of newborn with risk of neonatal sepsis. At delivery, clinical sepsis diagnosis was established by the local pediatricians based on the child clinical examination and initial workup including haemogram, C-reactive protein (CRP) and microbiological cultures (blood, cerebral fluids and urine). All newborns with a clinical sepsis were subsequently adjudicated by two independent pediatricians and sorted into 'LOS' and 'EOS'.

Figure 2: Cord blood biomarkers level in septic neonates

A) Box-plot of transcriptional and protein biomarkers in clinical sepsis diagnosis. *CD74* and *CX3CR1* mRNA level were evaluated by RT-qPCR with ABI7500 fast and plasma PCT; IL6; IL10 and IP-10 concentrations were measured by multiplexed assay with the Ella platform in cord blood sample obtained from sepsis neonates and no sepsis neonates. Results are presented as box-plots as well as individual values in groups (hospital non-sepsis, hospital sepsis and non-sepsis suburban). Anova test (or the Kruskal-Wallis test when distribution was not normal or when homoscedasticity was rejected) was used to compare biomarkers. A *p* value <0.05 was considered as significant. A post hoc Student t test was performed to compare the groups against each other (**p* ≤ 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

B) The AUC forest plot of biomarkers used alone, in combination with other biomarkers or in combination with clinical variables to discriminate sepsis and non-sepsis neonates. The AUC presented are those chosen by statistical methods to have cutoffs with 0.95 sensitivity and maximum specificity. The AUC are represented as median and range (95%IC). 6 biomarkers +17VC (*CD74*; *CX3CR1*; IP-10; IL10; IL6; a; b; c; d; e; f; g; h; i; j; k; l; m; n; o; p; q); 2 biomarkers +5VC: IP-10; Procalcitonin; a; h; k; i; q); 1 biomarkers +5VC: Procalcitonin; f; a; h; l; q). Cutoffs value: *CX3CR1*

(13.55); *CD74* (12.24); IL10 (2.70 pg/ml); IL6 (1.44 pg/ml); IP-10 (416.97 pg/ml); PCT (401.81 pg/ml).

See clinical variables legend in Supplementary Table 1.

Figure 3: Biomarkers and clinical variables correlation in neonatal clinical sepsis diagnosis

A) Heatmap of correlation matrix (Partial Least Squares Regression) to predict biomarkers from Clinical Variables. The rows and columns correspond to clinical variables and biomarkers. Respectively positive correlations are red and negative correlations are blue. The figure shows only variables with covariances greater than $\max(\text{covariance})/2$. **B)** Circosplots of correlations between the same types and different types of variables (biomarkers and clinical variables). Positive correlations are shown in orange and negative in black (threshold $r = 0.2$). The blue and orange lines outside the circle represent the high and low expression levels of each variable respectively according to sepsis and non-sepsis.

Figure 4: Cord blood biomarkers level according to neonatal sepsis prognostic

A) Transcriptional and protein biomarkers expression in sepsis non survivors neonates and survivors neonates. *CD74* and *CX3CR1* mRNA level were evaluated by RT-qPCR with ABI7500 fast and plasma PCT; IL6; IL10 and IP-10 concentrations were measured by multiplexed assay with the Ella platform in cord blood sample obtained from non-surviving neonates and surviving neonates. Results are presented as box-plots as well as individual values in groups (hospital survivors, hospital non-survivors and suburban survivors). Anova test (or the Kruskal-Wallis test when distribution was not normal or when homoscedasticity was rejected) was used to compare biomarkers levels in suburban survivors, hospital non survivors and hospital survivor groups (statistically significant test $p \leq 0.05$). A post hoc Student t test was performed to compare the groups against each other ($*p \leq 0.05$; $**p < 0.01$;

*** $p < 0.001$). **B)** The AUC forest plot of biomarkers used alone, in combination with other biomarkers or in combination with clinical variables to discriminate sepsis-non surviving neonates and surviving neonates. The AUC presented are those chosen by statistical methods to have cutoffs with 0.95 sensitivity and maximum specificity. 6 biomarkers +16VC (CD74; CX3CR1; IP-10; IL10; IL6; Procalcitonin; s; t; a; b; u; v; f; g; w; j; n; k; l; q; m; r); 5 biomarkers +6VC (Procalcitonin; a; b; h; l; j); 3 biomarkers +4VC (CD74; IP-10; IL10; a; l; j; m). 1 biomarkers +2VC: (CD74; a; j). Calculated Cutoff : CX3CR1 (1.71); CD74 (9.47); IL-10 (3.75 pg/ml); IL-6 (22.37 pg/ml); IP-10 (44.29 pg/ml); PCT (214.83 pg/ml). See clinical variables legend in Supplementary Table 1.

Figure 5: Biomarkers and clinical variables correlation in sepsis neonatal prognostic

Circosplots of correlations (PLS Discriminant Analysis) between the same types and different types of variables (biomarkers and clinical variables). Positive correlations are shown in orange and negative in black (threshold $r = 0.4$). The blue and orange lines outside the circle represent the high and low expression levels of each variable respectively according to survival and death.

Figure 6: Biomarkers kinetics during 3 months of follow-up

The figure shows the biomarkers profile during the first 3 months of life in healthy infants with median value (in blue), 95% confidence interval (in gray), and median value in septic infants (in red). Biomarkers were measured at delivery in cord blood (Cord) and at first, four, eight and twelve weeks in peripheral blood. Data are expressed as medians. Anova test was used to compare biomarkers levels.

REFERENCES

1. IHME. Global Burden of Disease Collaborative Network. **2018**.
2. Watkins RR, Haller N, Wayde M, Armitage KB. A Multicenter Survey of House Staff Knowledge About Sepsis and the "Surviving Sepsis Campaign Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock". *J Intensive Care Med* **2020**;35:187-90.
3. Bailey PE, Andualem W, Brun M, et al. Institutional maternal and perinatal deaths: a review of 40 low and middle income countries. *BMC Pregnancy Childbirth* **2017**;17:295.
4. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci* **2015**;282:20143085.
5. Glaser K, Speer CP. Toll-like receptor signaling in neonatal sepsis and inflammation: a matter of orchestration and conditioning. *Expert Rev Clin Immunol* **2013**;9:1239-52.
6. Collins A, Weitkamp JH, Wynn JL. Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **2018**;103:F391-F4.
7. Tissieres P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, et al. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon-gamma. *PLoS One* **2012**;7:e32863.
8. Medugu N, Iregbu K, Iroh Tam PY, Obaro S. Aetiology of neonatal sepsis in Nigeria, and relevance of Group b streptococcus: A systematic review. *PLoS One* **2018**;13:e0200350.
9. Odorizzi PM, Feeney ME. Impact of In Utero Exposure to Malaria on Fetal T Cell Immunity. *Trends Mol Med* **2016**;22:877-88.
10. Adata P, Afaya A, Salia SM, et al. Risk Factors Associated with Neonatal Sepsis: A Case Study at a Specialist Hospital in Ghana. *ScientificWorldJournal* **2019**;2019:9369051.
11. Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am* **2013**;60:367-89.
12. Ndibazza J, Webb EL, Lule S, et al. Associations between maternal helminth and malaria infections in pregnancy and clinical malaria in the offspring: a birth cohort in entebbe, Uganda. *J Infect Dis* **2013**;208:2007-16.

13. Mpairwe H, Tweyongyere R, Elliott A. Pregnancy and helminth infections. *Parasite Immunol* **2014**;36:328-37.
14. Accrombessi M, Yovo E, Fievet N, et al. Effects of Malaria in the First Trimester of Pregnancy on Poor Maternal and Birth Outcomes in Benin. *Clin Infect Dis* **2018**; 69:1385-93.
15. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* **1997**;146:826-31.
16. Sylvester B, Gasarasi DB, Aboud S, et al. Prenatal exposure to *Plasmodium falciparum* increases frequency and shortens time from birth to first clinical malaria episodes during the first two years of life: prospective birth cohort study. *Malar J* **2016**;15:379.
17. Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS Negl Trop Dis* **2009**;3:e442.
18. Savas EM, Oguz SH, Samadi A, et al. Apoptosis Inhibitor of Macrophage, Monocyte Chemotactic Protein-1, and C-Reactive Protein Levels Are Increased in Patients with Metabolic Syndrome: A Pilot Study. *Metab Syndr Relat Disord* **2020**; 18:197-205.
19. Tzialla C, Manzoni P, Achille C, Bollani L, Stronati M, Borghesi A. New Diagnostic Possibilities for Neonatal Sepsis. *Am J Perinatol* **2018**;35:575-7.
20. Meem M, Modak JK, Mortuza R, Morshed M, Islam MS, Saha SK. Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: A systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics. *J Glob Health* **2011**;1:201-9.
21. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* **1998**;102:E41.
22. Quadir AF, Britton PN. Procalcitonin and C-reactive protein as biomarkers for neonatal bacterial infection. *J Paediatr Child Health* **2018**;54:695-9.
23. Hornik CP, Benjamin DK, Becker KC, et al. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* **2012**;31:799-802.
24. Elbirt D, Frenkel Rubin M, Ergaz D, Sthoeger Z. [Procalcitonin--a specific marker for severe bacterial infection and sepsis]. *Harefuah* **2001**;140:343-6.

25. Alima Yanda AN, Kobela M, Nansseu JR, et al. [Serum procalcitonin: a reliable tool for the diagnosis and follow-up of neonatal bacterial infections in Sub-Saharan Africa]. *Arch Pediatr* **2015**;22:1015-20.
26. Stocker M, van Herk W, El Helou S, et al. Procalcitonin-guided decision making for duration of antibiotic therapy in neonates with suspected early-onset sepsis: a multicentre, randomised controlled trial (NeoPIIns). *Lancet* **2017**;390:871-81.
27. Lee J, Bang YH, Lee EH, Choi BM, Hong YS. The influencing factors on procalcitonin values in newborns with noninfectious conditions during the first week of life. *Korean J Pediatr* **2017**;60:10-6.
28. Shahkar L, Keshtkar A, Mirfazeli A, Ahani A, Roshandel G. The role of IL-6 for predicting neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Iran J Pediatr* **2011**;21:411-7.
29. Ng PC, Li K, Chui KM, et al. IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants. *Pediatr Res* **2007**;61:93-8.
30. Wagner TA, Gravett CA, Healy S, et al. Emerging biomarkers for the diagnosis of severe neonatal infections applicable to low resource settings. *J Glob Health* **2011**;1:210-23.
31. Chen HL, Hung CH, Tseng HI, et al. Plasma IP-10 as a predictor of serious bacterial infection in infants less than 4 months of age. *J Trop Pediatr* **2011**;57:145-51.
32. Machado JR, Soave DF, da Silva MV, et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm* **2014**;2014:269681.
33. Wu HP, Chen CK, Chung K, et al. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm Res* **2009**;58:385-93.
34. Poggi C, Dani C. Sepsis and Oxidative Stress in the Newborn: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Targets. *Oxid Med Cell Longev* **2018**;2018:9390140.
35. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mouglin B, Monneret G. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol Lett* **2006**;106:63-71.
36. Tang BM, Huang SJ, McLean AS. Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Crit Care* **2010**;14:R237.

37. Friggeri A, Cazalis MA, Pachot A, et al. Decreased CX3CR1 messenger RNA expression is an independent molecular biomarker of early and late mortality in critically ill patients. *Crit Care* **2016**;20:204.
38. Cazalis MA, Friggeri A, Cave L, et al. Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Crit Care* **2013**;17:R287.
39. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol* **2008**;180:6421-9.
40. Peronnet E, Venet F, Maucourt-Boulch D, et al. Association between mRNA expression of CD74 and IL10 and risk of ICU-acquired infections: a multicenter cohort study. *Intensive Care Med* **2017**;43:1013-20.
41. Teggert A, Datta H, Ali Z. Biomarkers for Point-of-Care Diagnosis of Sepsis. *Micromachines (Basel)* **2020**;11:286.
42. Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors* **2010**;3:83.
43. Fievet N, Ezinmegnon S, Agbota G, et al. SEPSIS project: a protocol for studying biomarkers of neonatal sepsis and immune responses of infants in a malaria-endemic region. *BMJ Open* **2020**;10:e036905.
44. Max Kuhn JW, Steve Weston, Andre Williams, Chris Keefer, Allan Engelhardt], Tony Cooper, Zachary Mayer, Brenton Kenkel, R Core Team, Michael Benesty, Reynald Lescarbeau, Andrew Ziem, Luca Scrucca, Yuan Tang, Can Candan, Tyler Hunt. caret: Classification and Regression Training. **2020**.
45. Gonzalez I, Cao KA, Davis MJ, Dejean S. Visualising associations between paired 'omics' data sets. *BioData Min* **2012**;5:19.

- 1 46. Chiesa C, Pacifico L, Osborn JF, Bonci E, Hofer N, Resch B. Early-Onset Neonatal Sepsis:
2 Still Room for Improvement in Procalcitonin Diagnostic Accuracy Studies. *Medicine (Baltimore)*
3 **2015**;94:e1230.
- 4 47. Joram N, Muller JB, Denizot S, et al. Umbilical cord blood procalcitonin level in early
5 neonatal infections: a 4-year university hospital cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*
6 **2011**;30:1005-13.
- 7 48. Lencot S, Cabaret B, Sauvage G, et al. A new procalcitonin cord-based algorithm in early-
8 onset neonatal infection: for a change of paradigm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2014**;33:1229-38.
- 9 49. Altunhan H, Annagur A, Ors R, Mehmetoglu I. Procalcitonin measurement at 24 hours of age
10 may be helpful in the prompt diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Int J Infect Dis* **2011**;15:e854-8.
- 11 50. Frerot A, Baud O, Colella M, et al. Cord blood procalcitonin level and early-onset sepsis in
12 extremely preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2019**;38:1651-7.
- 13 51. Mearelli F, Fiotti N, Altamura N, et al. Heterogeneous models for an early discrimination
14 between sepsis and non-infective SIRS in medical ward patients: a pilot study. *Intern Emerg Med*
15 **2014**;9:749-57.
- 16 52. Ng PC, Li K, Leung TF, et al. Early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular
17 coagulation with interleukin-10, interleukin-6, and RANTES in preterm infants. *Clin Chem*
18 **2006**;52:1181-9.
- 19 53. Maruoka H, Inoue D, Takiuchi Y, et al. IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 as novel markers for
20 the diagnosis of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol* **2014**;93:393-401.
- 21 54. Wang ZQ, Milne K, Webb JR, Watson PH. CD74 and intratumoral immune response in breast
22 cancer. *Oncotarget* **2017**;8:12664-74.
- 23 55. Cheng SP, Liu CL, Chen MJ, et al. CD74 expression and its therapeutic potential in thyroid
24 carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **2015**;22:179-90.
- 25 56. Birle A, Nebe CT, Gessler P. Age-related low expression of HLA-DR molecules on
26 monocytes of term and preterm newborns with and without signs of infection. *J Perinatol*
27 **2003**;23:294-9.

- 1 57. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor
2 outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect* **2010**;60:224-8.
- 3 58. Palojarvi A, Petaja J, Siitonen S, Janer C, Andersson S. Low monocyte HLA-DR expression
4 as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. *Pediatr Res* **2013**;73:469-75.
- 5 59. Pachot A, Monneret G, Brion A, et al. Messenger RNA expression of major histocompatibility
6 complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med* **2005**;33:31-8;
7 discussion 236-7.
- 8 60. Payen D, Lukaszewicz AC, Belikova I, et al. Gene profiling in human blood leucocytes during
9 recovery from septic shock. *Intensive Care Med* **2008**;34:1371-6.
- 10 61. Fumeaux T, Pugin J. Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients
11 with sepsis? *Intensive Care Med* **2006**;32:1106-8.
- 12 62. Satoh A, Miura T, Satoh K, et al. Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral
13 monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis. *Pancreas* **2002**;25:245-50.
- 14 63. Pfortmueller CA, Meisel C, Fux M, Schefold JC. Assessment of immune organ dysfunction in
15 critical illness: utility of innate immune response markers. *Intensive Care Med Exp* **2017**;5:49.
- 16 64. Sundar KM, Sires M. Sepsis induced immunosuppression: Implications for secondary
17 infections and complications. *Indian J Crit Care Med* **2013**;17:162-9.
- 18 65. S Fotopoulos FD, E Stamokosta, G Paterakis, C Stavropoulos-Giokas, A Germanis & M
19 Xanthou. The Monocyte HLA-DR Expression of Healthy and Infected Premature Neonates. *Pediatric*
20 *Research* **1999**; 45:763.
- 21 66. Olin A, Henckel E, Chen Y, et al. Stereotypic Immune System Development in Newborn
22 Children. *Cell* **2018**;174:1277-92 e14.
- 23 67. Smolen KK, Ruck CE, Fortuno ES, 3rd, et al. Pattern recognition receptor-mediated cytokine
24 response in infants across 4 continents. *J Allergy Clin Immunol* **2014**;133:818-26 e4.
- 25 68. Ogundare E, Akintayo A, Aladekomo T, Adeyemi L, Ogunesi T, Oyelami O. Presentation
26 and outcomes of early and late onset neonatal sepsis in a Nigerian Hospital. *Afr Health Sci*
27 **2019**;19:2390-9.

69. Aku FY, Akweongo P, Nyarko K, et al. Bacteriological profile and antibiotic susceptibility pattern of common isolates of neonatal sepsis, Ho Municipality, Ghana-2016. *Matern Health Neonatol Perinatol* **2018**;4:2.
70. Tadesse BT, Ashley EA, Ongarello S, et al. Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. *BMC Infect Dis* **2017**; 17(1):616.
71. Mitgang EA, Hartley DM, Malchione MD, Koch M, Goodman JL. Review and mapping of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Africa: Using diverse data to inform surveillance gaps. *Int J Antimicrob Agents* **2018**;52:372-84.
72. Jesumirhewe C, Springer B, Lepuschitz S, Allerberger F, Ruppitsch W. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Isolates from Edo State, Nigeria. *Antimicrob Agents Chemother* **2017**;61:e00255-17.
73. Lester R, Musicha P, van Ginneken N, et al. Prevalence and outcome of bloodstream infections due to third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in sub-Saharan Africa: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* **2020**;75:492-507.

1 **Supplementary Appendix 1**

2 **SEPSIS study group collaborators**

3
4 **For IRCB:** Darius Sossou, Aurax Fernando, Rodolphe Ladekpo , Urbain Ahouayito, Basile Agossou,

5
6
7 4 Caleb Ezinmegnon, Anael Fortunato, Josué Fiagbenou, Achille Massougbdji, Komi Gbedande,

8
9 5 Djamirou Dossa, Dramane Abdou, Canisius Fantodji, Nawal Sare, Wilisto Bara, Razack Monde,

10
11 6 Erasme Gbaguidi, Larissa Allokpe, Armand Housemenou, Landry Assongba, Manfred Accrombessi,

12
13 7 Florent Kouhouenou, Armand Hounsemenou, Amour Ridagba.

14
15 8 **For CNHU:** Christiane Aguemon, Dissou Affolabi, Lehila Bagnan, Marceline D’Almeida

16
17 9 **For CHUMEL:** René Perrin, Benjamin Hounkpatin, Nicole Tchiakpe, Jules Alao

18
19
20 10 **For Calavi Hospital:** Dossou Dagba, Ida Dossou Yovo

21
22 11 **For Université de Paris, MERIT, IRD :** Nadine Fievet, Gino Agbota, Valérie Briand, Gilles Cottrel

23
24 12 **For the Institute of Integrative Biology of the Cell and AP-HP Paris Saclay University:** Pierre

25
26 13 Tissieres, Ulrik Lausten-Thomsen, Sem Ezinmegnon, Luis Augusto

27
28 14 **For BioMérieux:** Laurence Vachot, Javier Yugueros Marcos, Sophie Blein, Alexandre Pachot, Julien

29
30 15 Textoris, François Bartolo, Marine Mommert, Karen Brengel-Pesce.

31
32
33 16

Supplementary Appendix 2

Methods and statistical algorithms

Sampling

In brief, 18 mL cord blood at birth and 2 mL peripheral blood were collected in PAXgene™ Blood RNA tubes (PreAnalytix, Hilden, Germany) for transcriptomic biomarkers study. For protein biomarkers study 9 mL cord blood at birth and 500 µL to 1 mL peripheral blood were collected in heparin tubes. PAXgene™ Blood samples were stabilized at least 2 h at room temperature after collection and frozen at –80 °C following the manufacturer’s guidelines. Heparin blood samples were centrifuged at 1500 to 2000 rpm for 5 min. The plasma obtained was stored at -80°C.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA was extracted from cord blood by QIAasympohy SP/AS (QIAGEN Hilden, Germany) using PAXgene™ Blood RNA Kit (PreAnalytix, Hilden, Germany) according manufacturer guidelines. The RNA integrity was measured prior to RNA amplification using a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) in accordance with the manufacturer’s instructions (RNA integrity number ≤ 6 were excluded [min 6.5–max 9.4]). The expression level of *CX3CR1* and *CD74* was measured by RT-qPCR using ABI7500 thermocycler (Applied BioSystems®, California,USA) from 10 ng of RNA samples using prototype Argene® kit (bioMerieux, France) following the manufacturer's instructions. The determination of the copy concentration of each gene is performed using a calibration curve. The results are expressed as the ratio of the concentrations of *CX3CR1* or *CD74* to those of *HPRT1* (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1) used to normalize the gene expression results.

Protein quantification

PCT, IL-6, IL-10 and IP-10 proteins in plasma were analyzed in a batch by Simplex Assays™ according to the manufacturer’s instructions as previously described ¹. The Ella microfluidic analyzer (Protein Simple, San Jose, CA, USA) was used to assess cytokine concentrations ².

Statistical Algorithms

We tested several algorithms: Bagged CART (package `ipred`), CART (package `rpart`), Naive Bayes (package `klaR` and `naivebayes`), Multi-Step Adaptive MCP-Net (package `msaenet`), Bagged Flexible Discriminant Analysis and Flexible Discriminant Analysis (package `earth`), Multi-Layer Perceptron (package `RSNNS`), Regularized Random Forest (package `RRF`), Quadratic Discriminant Analysis and Linear Discriminant Analysis (package `MASS`), Robust Linear Discriminant Analysis (package `rrcov`), Robust Mixture Discriminant Analysis (package `robustDA`), High Dimensional Discriminant Analysis (package `HDclassif`), Random Forest (package `randomForest` and `ranger`), Stochastic Gradient Boosting (package `gbm`), Conditional Inference Tree (package `party`), Neural Network and Neural Networks with Feature Extraction (package `nnet`), Generalized Additive Model using Splines (package `mgcv`), Distance Weighted Discrimination with Polynomial Kernel and Distance Weighted Discrimination with Radial Basis Function Kernel (package `kerndwd`), Support Vector Machines with Radial Basis Function Kernel (package `kernlab`), Single C5.0 Ruleset (package `C50`), Boosted Logistic Regression (package `caTools`), Oblique Random Forest (package `obliqueRF`), Sparse Partial Least Squares (package `mixOmics`), k-Nearest Neighbors.

For the outcome “sepsis adjudicated”, the model Multi-Layer Perceptron was selected for “All biomarkers”, the model Quadratic Discriminant Analysis was selected for “Protein Biomarkers” and k-Nearest Neighbors for “CX3CR1 & CD74”. For the outcome “clinical sepsis”, the model Generalized Additive Model using Splines was selected for “All biomarkers”, the model Distance Weighted Discrimination with Polynomial Kernel was selected for “Protein Biomarkers” and Support Vector Machines with Radial Basis Function Kernel for “CX3CR1 & CD74”. For the outcome death, the model Sparse Partial Least Squares was selected for “All biomarkers”, the model Sparse Partial Least Squares was selected for “Protein Biomarkers” and Neural Network for “CX3CR1 & CD74”. The random forest model did not select any variables (6Biom + 16 VC). The Stochastic Gradient Boosting model selected “5 Biomarkers and 6 Clinical Variables”. The Flexible Discriminant Analysis

model selected “3 Biomarkers and 4 Clinical Variables”. The Multi-Step Adaptive MCP-Net model selected “1 biomarker and 2 Clinical Variables”. See clinical variables legend in Supplementary Table 1.

References

1. Dysinger M, Marusov G, Fraser S. Quantitative analysis of four protein biomarkers: An automated microfluidic cartridge-based method and its comparison to colorimetric ELISA. J Immunol Methods 2017;451:1-10.

2. Aldo P, Marusov G, Svancara D, David J, Mor G. Simple Plex() : A Novel Multi-Analyte, Automated Microfluidic Immunoassay Platform for the Detection of Human and Mouse Cytokines and Chemokines. Am J Reprod Immunol 2016;75:678-93.

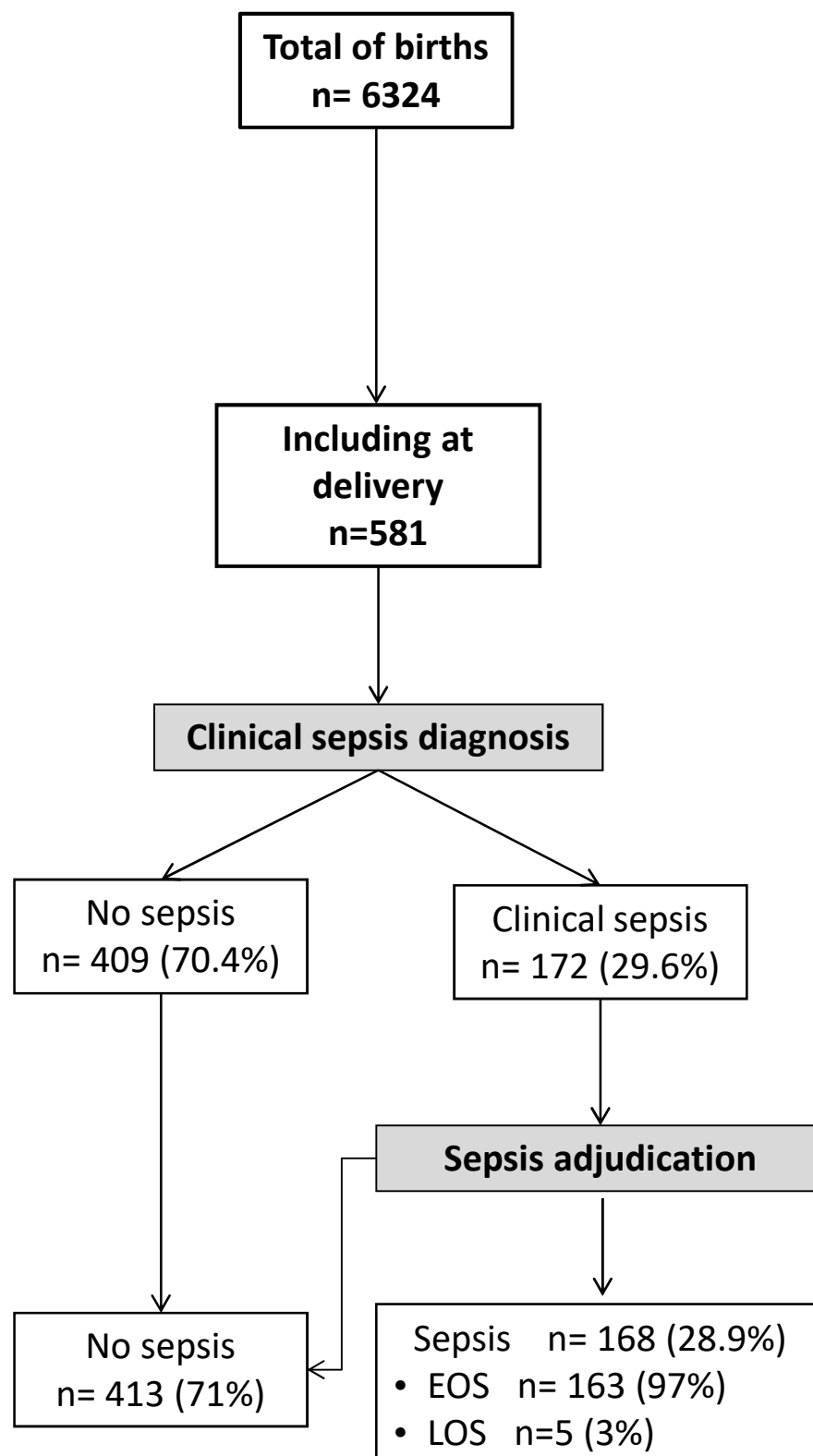
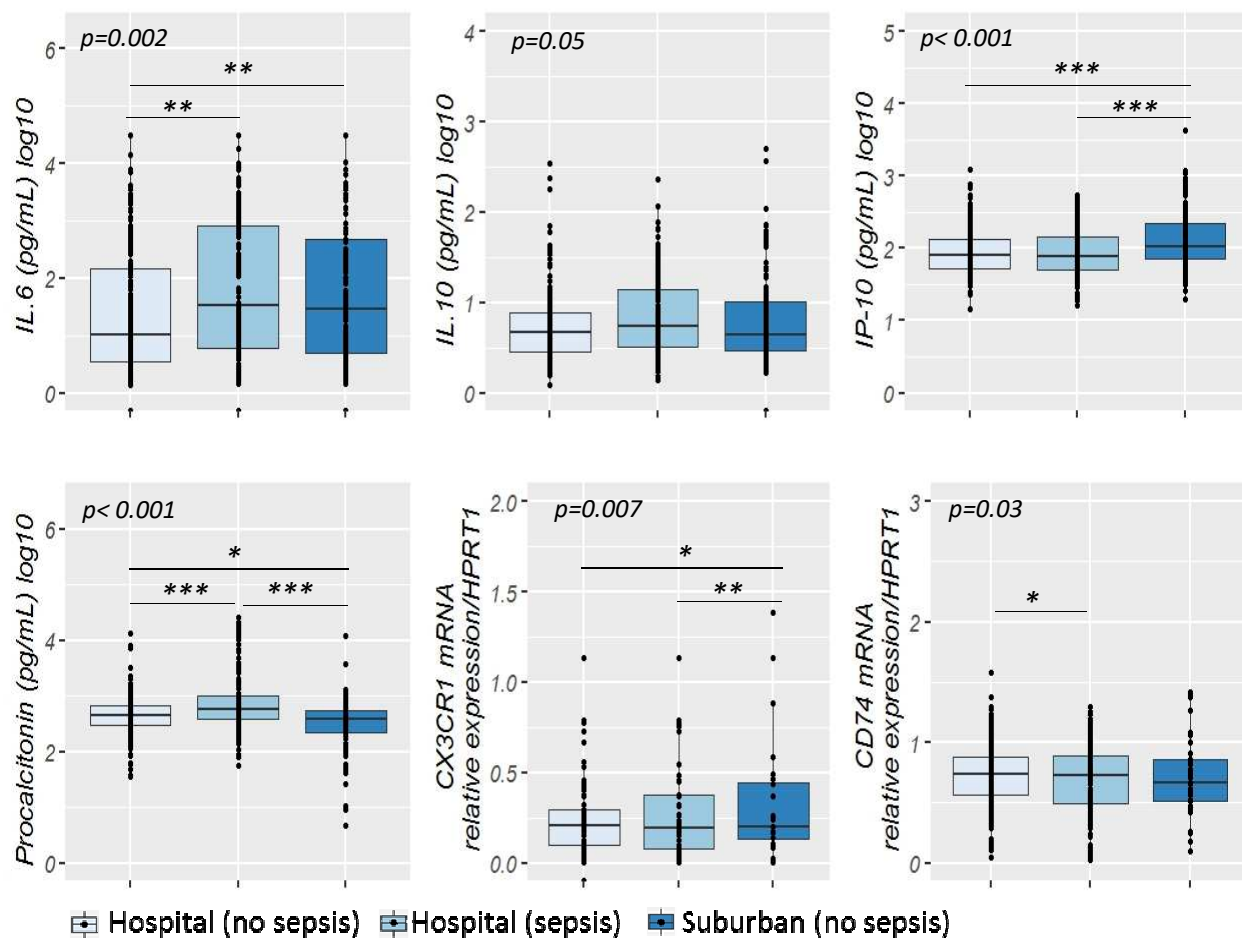
Figure 1

Figure 2

A



B

Biomarkers

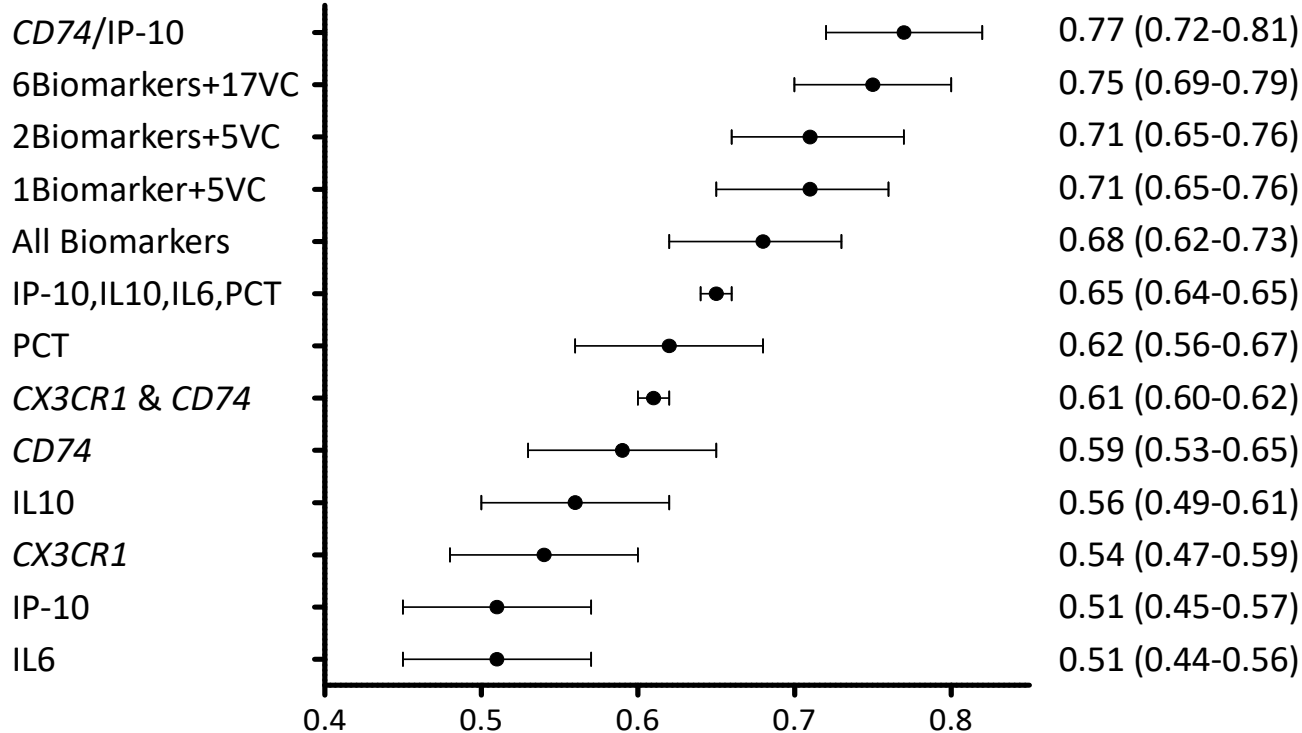
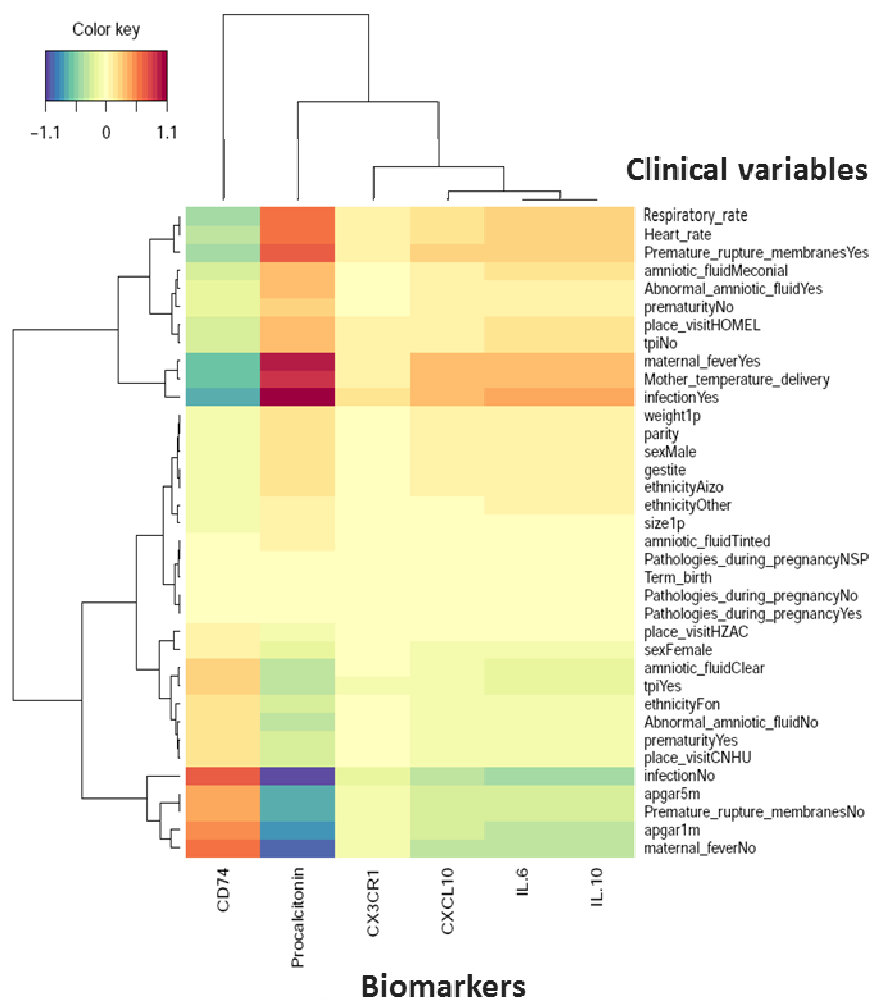


Figure 3

A



B

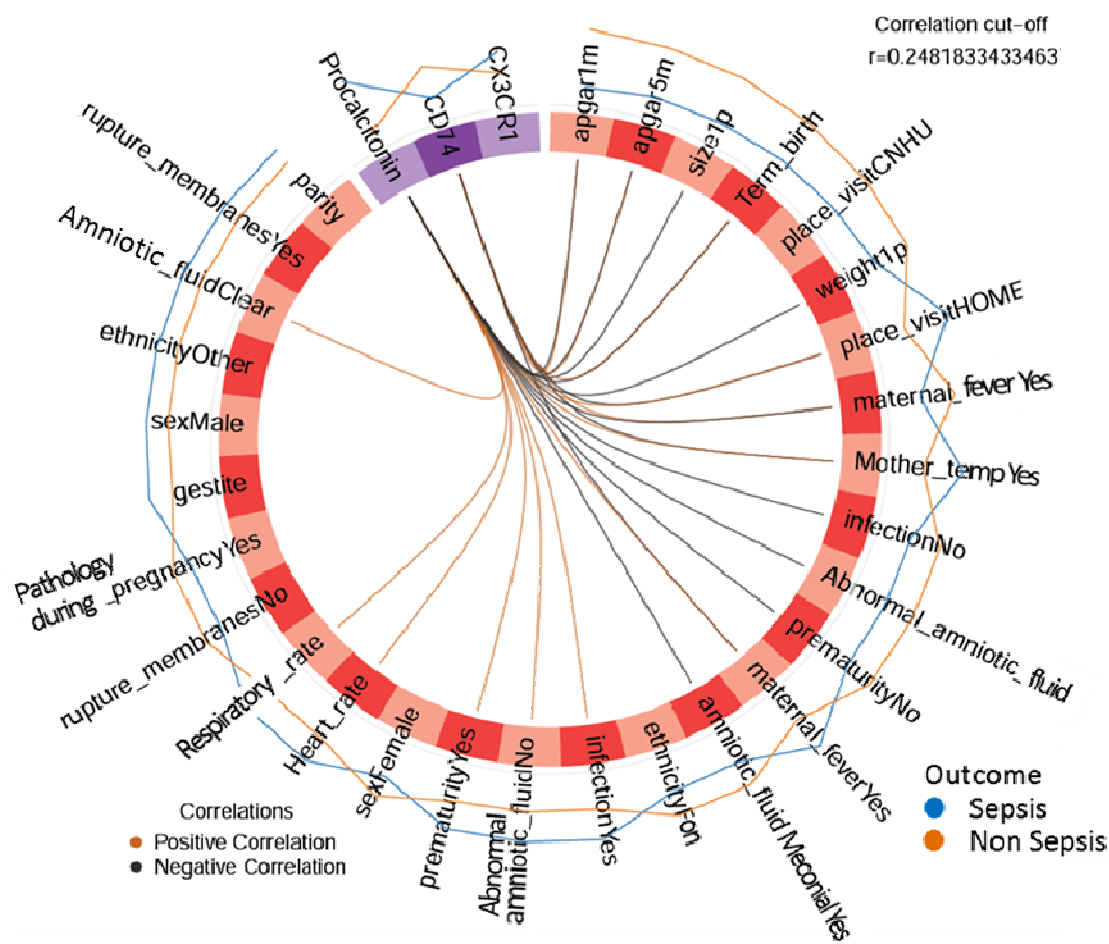
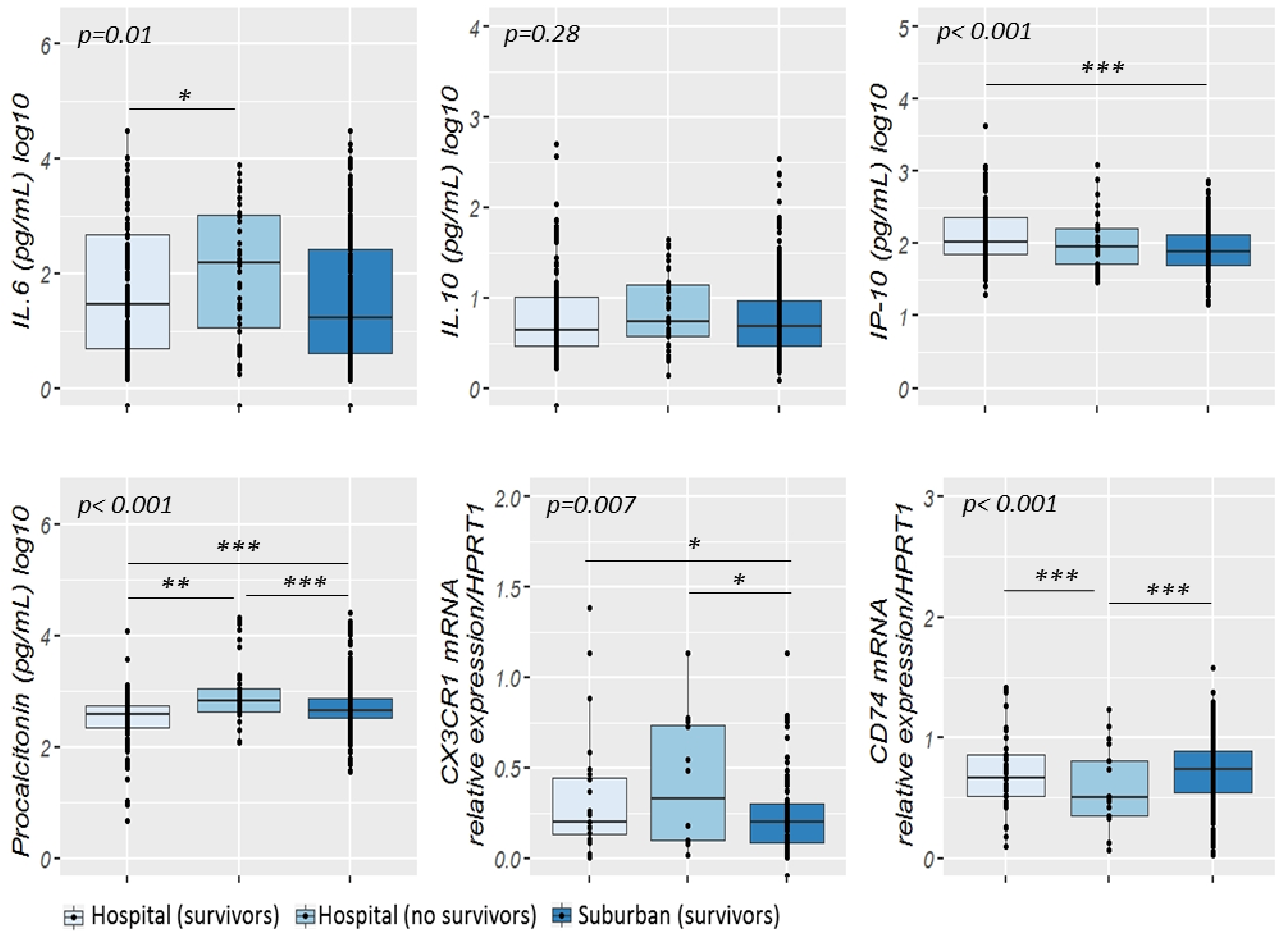


Figure 4

A



B

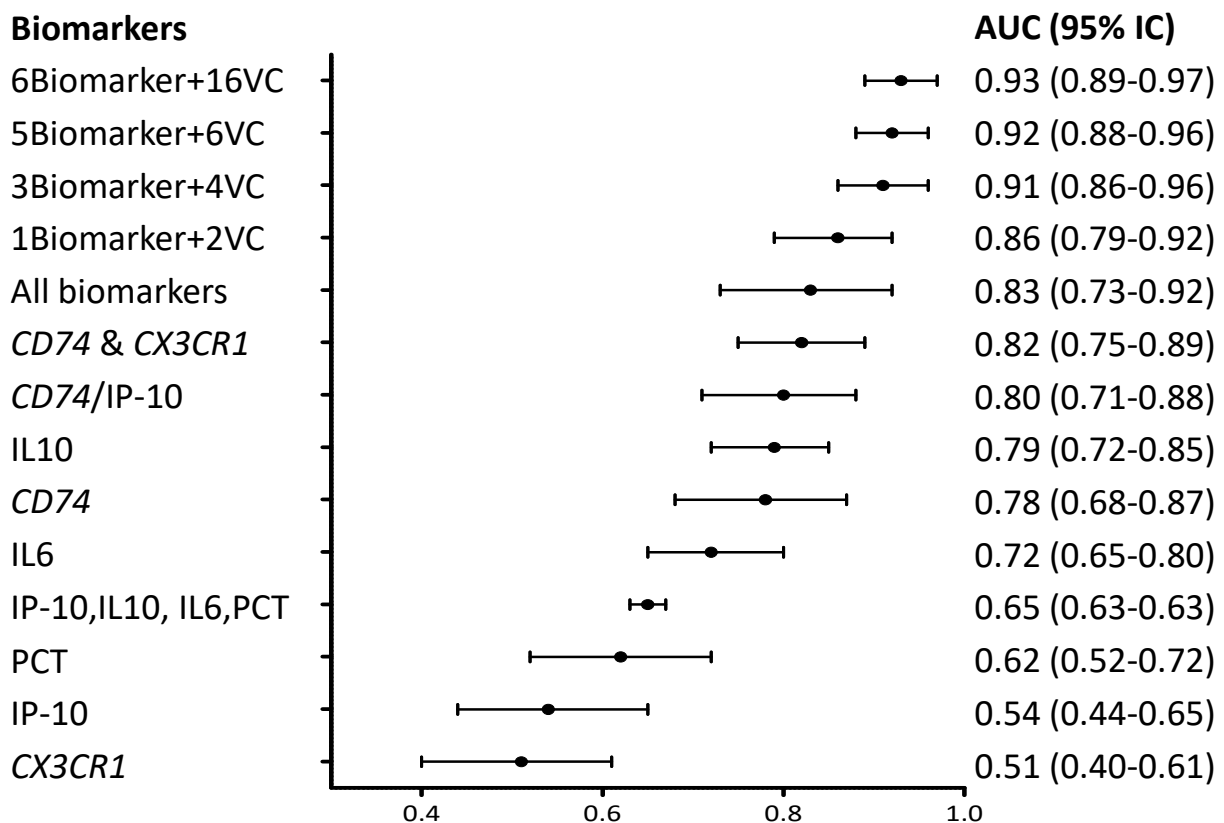


Figure 5

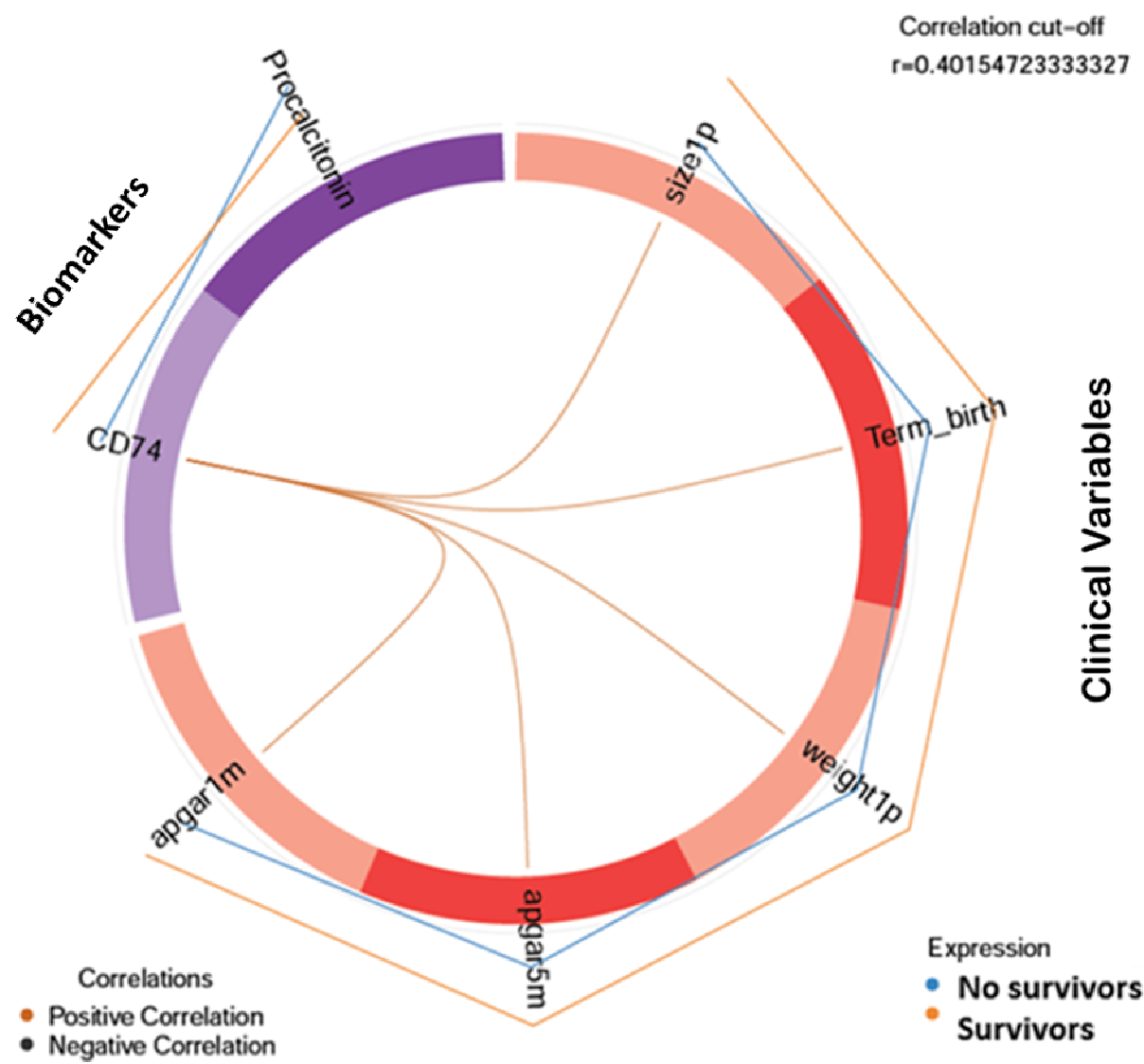
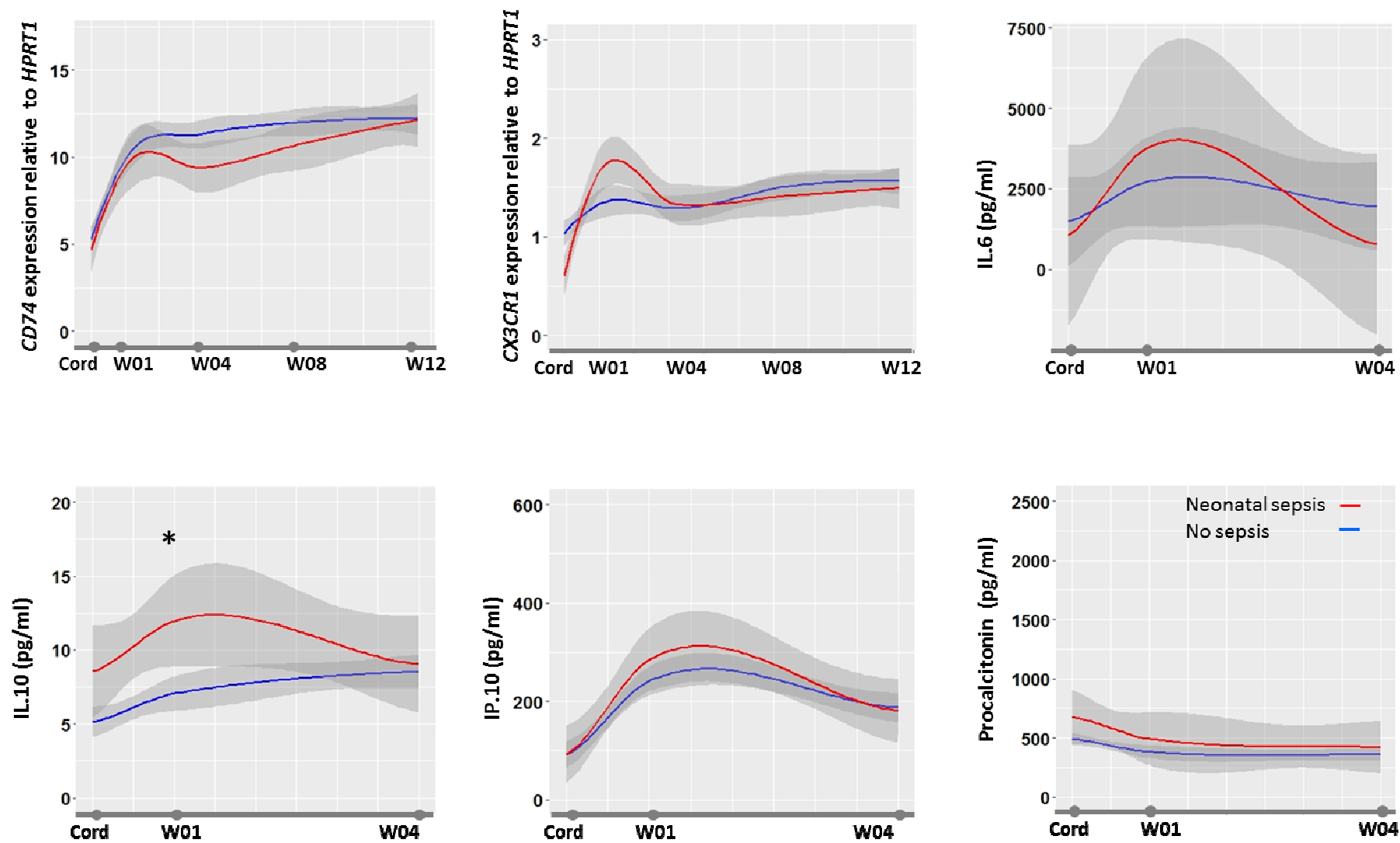


Figure 6



Article II : Perinatal risk factors of sepsis and not gestational malaria modules neonatal expression of MD-2/TLR4 isoforms.

Sem Ezinmegnon, Sophie Thibault, Darius Sossou, Gino Agbota, Valérie Briand, Komi Gbedande, Rodolphe Ladekpo, Achille Massougboji, Marceline D'Almeida, Jules Maroufou Alao, Luis Augusto, Marine Mommert, Karen Brengel-Pesce, Nadine Fievet, Pierre Tissières

(Manuscrit en préparation)

Perinatal risk factors of sepsis and not gestational malaria modules neonatal expression of MD-2/TLR4 isoforms. (en préparation)

Sem Ezinmegnon, MSc ^{1,2}, Sophie Thibault ¹, Darius Sossou, MSc ⁴, Gino Agbota, PhD ⁴, Valérie Briand, MD, PhD ³, Komi Gbedande, PhD ⁴, Rodolphe Ladekpo⁴, Achille Massougbodji, MD ⁴, Marceline D'Almeida MD ⁵, Jules Maroufou Alao, MD ⁶, Luis Augusto, PhD ¹, Marine Mommert PhD ², Karen Brengel-Pesce, PhD ², Nadine Fievet, PhD ^{3,4}, Pierre Tissières, MD, DSc ^{1,7}, for the SEPSIS study group*

Affiliations:

1) Institute of Integrative Biology of the Cell, CNRS, CEA, Paris Saclay University, Gif-sur-Yvette, France

2) Open Innovation & Partnerships Lyon Sud (OI&P), bioMérieux, Marcy l'Etoile, France
3) Université de Paris, MERIT, Institute of Research for Development (IRD), Paris, France.

4) Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Calavi, Benin.

5) Pediatric Department, National University Hospital Center (CNHU), Cotonou, Benin.

6) Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin.

7) Pediatric Intensive Care and Neonatal Medicine, AP-HP Paris Saclay University, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Corresponding author: Pierre TISSIERES, MD, DSc
Institute of Integrative Biology of the Cell
CNRS, CEA, Paris Saclay University
1, Avenue de la Terrasse
91190 Gif sur Yvette, France
Email: pierre.tissieres@i2bc.paris-saclay.fr

Running title: Gestational malaria and neonatal toll like receptors

Keywords: sepsis, neonate, malaria, Plasmodium, innate immunity, IL-6, Toll like receptors, MD-2, TLR4

DECLARATIONS

Conflicts of interest: All authors disclose no conflict of interest related to the present study.

Funding: Funded by a consortium including bioMérieux, the Institute for Research in Development (IRD), The National Centre for Scientific Research (CNRS), with support of the French National Agency for Research and Technology (ANRT), the Foundation Simone Beer under the auspices of the Foundation of France, and the Foundation for Medical Research (FRM).

Authors contributions:

Study conception and design: PT, NF, VB, KG

Acquisition, analysis or interpretation: SE, ST, DS, GA, RL, LA, MM, NF, PT

Drafting and revision of the work : all authors

Final approval of the submitted publication: All authors

Acknowledgements: Authors acknowledge all nursing and midwife involved in the clinical management of the newborns facilitating the completion of this study.

Collaborators: SEPSIS study group collaborators *: For IRCB: Darius Sossou, Aurax Fernando, Rodolphe Ladekpo , Urbain Ahouayito, Basile Agossou, Caleb Ezinmegnon, Anael Fortunato, Josué Fiagbenou, Achille Massougbedji, Komi Gbedande, Djamirou Dossa, Dramane Abdou, Canisius Fantodji, Nawal Sare, Wilisto Bara, Razack Monde, Erasme Gbaguidi, Larissa Allokpe, Armand Housemenou, Landry Assongba, Manfred Accrombessi, Florent Kouhouenou, Armand Hounsemenou, Amour Ridagba. **For CNHU:** Christiane Aguemou, Dissou Affolabi, Lehila Bagnan, Marceline D’Almeida. **For CHUMEL:** René Perrin, Benjamin Hounkpatin, Nicole Tchiakpe, Jules Alao. **For Calavi Hospital:** Dossou Dagba, Ida Dossou Yovo. **For Université de Paris, MERIT, IRD :** Nadine Fievet, Gino Agbota, Valérie Briand, Gilles Cottrel. **For the Institute of Integrative Biology of the Cell and AP-HP Paris Saclay University:** Pierre Tissieres, Ulrik Lausten-Thomsen, Sem Ezinmegnon, Luis Augusto, Sophie Thibault, Claire Boithias, Laure Jule. **For bioMérieux:** Laurence Vachot, Javier Yugueros Marcos, Sophie Blein, Alexandre Pachot, Julien Textoris, François Bartolo, Marine Mommert, Karen Brengel-Pesce.

ABSTRACT

Background Gestational malaria (GM) is recognized to impair neonatal immunity and significantly increase risk of developing malaria and non-malarial fever during the first year of life. Innate immunity is the principal defense mechanism in newborn infant. As such, effect of GM on innate immune response of the host is poorly understood. Hereby, we evaluate the transcriptional effect of GM on Myeloid Differentiation Factor 2 (MD-2) and Toll Like Receptor 4 (TLR4) and its relation with the development of early onset neonatal sepsis. We hypothesized that MD-2/TLR4 isoforms may play a regulatory mechanism in GM-mediated innate immunity.

Methods Basal level of MD-2 and TLR4 isoforms expression were measured on cord blood. Transcription regulation of MD-2/TLR4 isoforms following stimulation with TLRs agonists were tested.

Results Among the five isoforms of the endotoxin receptor complex MD-2/TLR4, GM failed to show any effect on isoforms expression level. However, presence of maternal risk factors for neonatal sepsis significantly modified expression of the short isoforms of MD-2 (MD-2SH) that showed to be correlated with IL-6 plasma level.

Conclusion Our results do not support any effect of GM on MD-2/TLR4 isoforms expression, but show that MD-2 expression is impacted by the presence of maternal risk factors, suggesting that the short MD-2 isoform may play a role in the innate immune response to neonatal sepsis.

Clinicaltrial.gov registration number: NCT03780712

INTRODUCTION

La fièvre maternelle pendant la grossesse et surtout à l'accouchement est l'un des facteurs associés à une morbidité accrue chez le nouveau-né ^{283 284}. Elle est dans certains cas d'origine bactérienne associée à une infection materno-fœtale, mais peut également être due à des infections virales et parasitaires tel que le paludisme ^{285,286}. En zones d'endémie palustre, la prévalence du paludisme est plus élevée chez les femmes enceintes entraînant une exposition *in utero* du fœtus aux antigènes de *Plasmodium* ²⁸⁷. Cette exposition est un facteur de risque important aux infections néonatales, notamment le paludisme pendant la première année de vie mais aussi aux infections bactériennes ^{22,208}. Il est vraisemblable que l'infection gestationnelle par *Plasmodium* modifie le développement des réponses immunitaires du nouveau-né. Des études ont rapporté que l'exposition *in utero* à des antigènes plasmodiaux peut conduire à l'initiation d'une immunité fœtale contre les antigènes plasmodiaux et à une tolérance immunitaire chez certains nourrissons ^{226,279,288}.

Le système immunitaire inné est le principal mécanisme par lequel les nouveau-nés répondent aux infections bactériennes. Il est caractérisé par une expression de récepteurs de l'immunité, nommés Pattern of Recognition Receptor (PRR), avec notamment une expression de Toll Like Receptors (TLR) fonctionnels capable de développer une réponse immune innée contre les pathogènes, ce sans une préexposition. TLR4 est l'un des TLR les plus étudiés et reconnaît un répertoire varié de ligands (Pathogens Associated Molecular Patterns, PAMP), tels que les lipopolysaccharides (LPS), qui sont les principaux constituants du feuillet externe de la membrane des bactéries à Gram négatif, et dont le lipide A est connu pour être un constituant immunogène majeur responsable d'état de choc endotoxinique ^{289,290}. Les LPS induisent une rapide signalisation inflammatoire par leur liaison au TLR4 en conjonction avec le MD-2 (myeloid differentiation factor-2) ^{291,292} et le CD14. Pris ensemble, le CD14 et le MD-2 sont des protéines essentielles pour la détection des LPS et la dimérisation du TLR4, lequel est responsable de la transduction de la signalisation induite par les LPS. Les TLRs jouent un rôle important dans la réponse immunitaire aux infections palustres. Lors d'une infection à *P. falciparum*, les TLR7 et TLR9 sont activés par l'ARN et l'ADN parasitaires transportés par l'hémozoïne, tandis que les ancras du glycosylphosphatidylinositol (GPI) du parasite activent les hétérodimères TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 ou l'homodimère TLR4 ^{185,293}. Les GPI stimulent les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales via le récepteur de surface TLR2 et TLR4, entraînant une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires, tels que le TNF- α ou l'IL-6 ²⁹⁴. Les stimulations par le poly I:C (TLR3), le LPS (TLR4) et l'oligonucléotide CpG de type A (TLR9) ont été associées à une altération de la production de cytokines dans le sang de cordon des enfants nés de mères exposées au paludisme gestationnel ²⁹⁵. Natama et al. ont montré que chez les enfants exposés au paludisme gestationnel, une

concentration plus élevée d'IP-10 dans le sang du cordon après une stimulation TLR3 ou TLR9 était associée à un faible risque paludisme dans la petite enfance ²⁹⁶.

Dans une étude précédente chez les enfants exposés au paludisme gestationnel, nous avons montré une association entre un risque accru de paludisme au cours de la première année de vie et la production élevée d'IL-10 et de TNF- α , suite à une stimulation par les agonistes TLR3, TLR9 ou TLR7/8 dans le sang du cordon ²⁶. Ces travaux confirment ceux de Matthew et al. montrant qu'une pré-exposition *ex vivo* de Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) à du lysat érythrocytaire de *P. falciparum* potentialise la réponse à une stimulation par différents agonistes tels que LPS (TLR4), Pam3Cys (TLR2-TLR1), MALP2 (TLR2-TLR6) et flagellin (TLR5) ²⁹⁷. Toutefois cet effet semble être retrouvé *in vivo* dans la phase précoce suivant une primo-infection à *Plasmodium* uniquement pour le LPS ²⁹⁷. Ces données suggèrent donc que l'activation des TLRs par *Plasmodium* est un mécanisme important dans la pathogénèse de l'infection palustre et des co-morbidités associées telles que les infections à entérobactéries dont l'incidence est augmentée dans cette population ²⁰⁸. Les mécanismes responsables de cette altération de la réponse aux agonistes TLRs et plus particulièrement ceux associés à *P. falciparum* sont mal étudiés. L'objectif de ce travail est de caractériser l'impact du paludisme gestationnel sur l'expression quantitative ou qualitative des PRR. Afin de contextualiser les conséquences fonctionnelles d'une modification de l'expression des TLRs secondairement à un paludisme gestationnel, nous étudierons spécifiquement le complexe de reconnaissance des endotoxines MD-2/TLR4 chez des enfants développant ou non un sepsis néonatal à entérobactéries.

MATERIELS ET METHODES

Patients

Les patients inclus dans ce projet proviennent tous des communes contiguës de Sô-Ava et d'Abomey-Calavi, situées au Sud du Bénin, à 25 km de Cotonou. La commune de Sô-Ava est une zone rurale et lacustre, tandis que celle d'Abomey-Calavi est semi-rurale. Plusieurs maladies parasitaires sont endémiques dans notre zone d'étude. Le paludisme y est pérenne et sévit de façon hyper endémique. *P. falciparum* est l'espèce parasitaire prédominante²⁹⁸ et le taux d'inoculation entomologique moyen est de 2,1 piqûres infestantes d'anophèles/personne/100 nuits²⁹⁹. Le projet SEPSIS a été décrit dans notre protocole précédemment publié³⁰⁰. Le projet SEPSIS a reçu le consentement du Comité d'Ethique de la Recherche - Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (CER-ISBA 85 - 5 avril 2016, amendé le 3 février 2017) et est enregistré sur Clinicaltrial.gov (NCT03780712). Au total, 581 nouveau-nés ont été suivis dans le projet. Les données cliniques, parasitologiques et immunologiques, ont ensuite été recueillies à la naissance et lors des visites de suivi mensuelles durant les trois premiers mois de vie de l'enfant. Pour notre étude, un sous-groupe de 35 nouveau-nés à terme a été rétrospectivement sélectionné sur la base d'une exposition *in utero* aux antigènes de *P. falciparum* (infection placentaire) et du diagnostic clinique et microbiologique de la survenue d'un sepsis néonatal (Figure 1). Ces 35 patients ont été subdivisés en quatre groupes sur la base de la présence d'un paludisme gestationnel ou d'un sepsis néonatal précoce (EONS, early onset neonatal sepsis). Nous avons également constitué un groupe de 10 nouveau-nés sains, hors zone d'endémie palustre et sans facteur de risque de sepsis nés à l'hôpital du Kremlin-Bicêtre. Les données de ce groupe ont servi de contrôle. Des biomarqueurs sur le sang de cordon ont été mesurés incluant procalcitonine (PCT), IL-6, IL-10, IP-10 ainsi que les transcrit CD74 et CX3CR1 (papier wp2).

Diagnostic d'infection à *P. falciparum* et d'EONS

Pour évaluer l'impact de *P. falciparum* sur l'immunité néonatale, les données cliniques et parasitologiques étaient collectées auprès des mères à l'accouchement. Le diagnostic microscopique de l'infection palustre a été réalisé par goutte épaisse et frottis sanguin chez la mère et sur une apposition de biopsie placentaire. La parasitémie a été ensuite quantifiée par la technique de Lambaréné³⁰¹. La technique de Lambaréné consiste en la lecture exhaustive d'une goutte épaisse calibrée de sang (10 µL sur une surface de 1,8 cm² d'une lame de microscope).

Le diagnostic d'EONS est établi lorsqu'il survient dans les 72 heures suivant l'accouchement. Dans un premier temps, le diagnostic de septicémie néonatale a été établi par le pédiatre du centre hospitalier sur la base de l'examen clinique de l'enfant et du bilan initial comprenant un hémogramme, une protéine C-réactive (PCR) et des

cultures microbiologiques (sang, fluides cérébraux et urine). Le sepsis néonatal est suspecté chez les nouveau-nés présentant des facteurs de risque infectieux périnataux et présentant plus de deux des critères suivants : numération des neutrophiles $<7500/\text{mm}^3$ ou $>14\,500/\text{mm}^3$, forme de bande $>1500/\text{mm}^3$, rapport neutrophiles immatures/total $>0,16$, numération plaquettaire $<150\,000/\text{mm}^3$ et CRP $>10\text{ mg/L}$.

Les nouveau-nés présentant un sepsis néonatal ont ensuite été examinés par deux pédiatres indépendants (PT, ULT) et classés en "septicémie présumée" et "septicémie clinique certaine", regroupés sous la rubrique "septicémie déclarée". En plus de l'examen complet du dossier médical, les résultats des cultures microbiologiques ont été contrôlés pendant l'adjudication. L'algorithme détaillé du diagnostic du sepsis néonatal est présenté dans l'article de description de la cohorte ³⁰⁰.

Stimulation cellulaire avec des agonistes TLRs

Dix millilitres de sang de cordon (10 mL) ont été prélevés dans des tubes contenant du citrate phosphate dextrose adénine (CPDA) comme anticoagulant. Tous les échantillons ont été transportés au laboratoire du Centre de recherche sur le paludisme pendant la grossesse et l'enfance (CERPAGE) à Cotonou, où les tests de stimulation ont été effectués dans les 6 heures suivant le prélèvement. Pour chaque patient, le sang du cordon a été dilué à 1:1 avec du RPMI, et des aliquots de 600 μl ont été distribués dans 10 tubes de stimulation. Neuf tubes ont été stimulés avec chacun un agoniste TLR différents et un tube a été laissé sans stimulation : poly(I-C) (ligand TLR3 ; 25 $\mu\text{g/ml}$; Invivogen, tlr1-pic (HMW)), lipopolysaccharide (LPS purifié extrait de E.coli J5 ; ligand TLR4 ; 100ng/ml), resiquimod (R848 ; TLR7/8 ligand ; 10 $\mu\text{g/ml}$; Invivogen), CpG oligonucléotide de ClassA (CpG ODN2216 ; ligand TLR9_pDC ; 5 $\mu\text{g/ml}$; Invivogen), CpG oligonucléotide de ClassB (CpG ODN1668 ; ligand TLR9_B cells +pDC ; 5 $\mu\text{g/ml}$; Invivogen), FSL1 (TLR2/6 ligand ; 100 ng/ml; Invivogen), Pam3CSK4 (TLR2/1 ; 250 ng/ml ; Invivogen, tlr1-pms), Flagellin-ST (TLR5 ; 500ng/ml ; Invivogen), Imiquimod (R837 ; TLR7; 500 $\mu\text{g/ml}$; Invivogen). Après 24 h d'incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂, les surnageants de culture ont été collectés par centrifugation et stockés à -80°C pour la mesure ultérieure des cytokines. Les culots cellulaires ont été également conservés à -80°C dans des tubes contenant du PAXgene (PreAnalytix, Hilden, Germany) pour les analyses de transcrits par qPCR.

Analyse quantitative et qualitative du registre transcriptionnel du complexe MD-2/TLR4

Les ARNm ont été extraits avec le kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, France) et ensuite transformés en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse en utilisant le Kit iScript™ Reverse transcription Supermix for RT-QPCR (Bio-Rad laboratoires, France). Les QPCR ont été réalisés avec un thermocycler CFX96 (Bio-Rad laboratoire, France) en utilisant le kit SsoAdvanced SYBR green Supermix (Bio-Rad laboratoires,

France). Les séquences nucléotidiques de différentes amorces (Genbank) sont indiquées ci-dessous (Supplementary Table 1). Les différentes isoformes constituant le registre transcriptionnel de MD-2 (*MD-2SH*, short et *MD-2L*, long) et TLR4 (*TLR4V1*, *TLR4V3*, *TLR4V4*, voir les références NCBI dans table 1) ont été mesurées par la méthode comparative des Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). *HPRT1* a été utilisé comme gène de ménage.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de la version 3.6.1 du logiciel R. La normalité des variables a été évaluée à l'aide du test de Kolmogorov Smirnov. Les données qualitatives sont représentées en fréquence et les données quantitatives sont représentées en médianes et IQR (intervalle interquartile : [Q1-Q3]). Les variables qualitatives ont été comparées en utilisant le test du Chi carré (ou le test exact de Fisher pour les petits nombres attendus). La distribution des données quantitatives a été comparée en utilisant le test t de Student (ou le test t de Mann-Whitney lorsque la distribution n'était pas normale ou le test de Welch lorsque l'homoscédasticité était rejetée) si 2 groupes étaient comparés. Si plus de 2 groupes, la distribution des données quantitatives a été comparée en utilisant le test d'Anova (ou le test de Kruskal-Wallis lorsque la distribution n'était pas normale ou lorsque l'homoscédasticité était rejetée). Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS

Description de la population

Les caractéristiques des patients sont présentées dans le tableau 1. L'âge médian des mères à l'accouchement était de 28 ans. La plupart des mères de l'étude SEPSIS étaient multigestes et toutes présentaient au moins un facteur de risque d'infection materno-fœtale. Le terme de naissance médian des nouveau nés était de 39 semaines (95% confidence interval [CI], 35.3 -39.6) avec un poids médian 2720 g (95% CI, 2675 - 3165). Vingt-huit pourcent (29%) des enfants étaient prématurés. Au total, dix-huit nouveau-nés (51,4 %) sont nés de mères infectées à l'accouchement par *P. falciparum* et dix-huit nouveau-nés (48,6%) ayant fait un sepsis néonatal ont été sélectionnés pour réaliser cette étude (Figure1).

Effet du paludisme gestationnel sur le profil transcriptionnel

Nous avons examiné si l'exposition *in utero* des enfants à *P. falciparum* au troisième trimestre de grossesse avait un impact sur la transcription des isoformes TLR4 et MD-2, en comparant le sang total du cordon des nouveau-nés non exposés (GM-/sepsis-) et exposés (GM+/sepsis-) *in utero* à *P. falciparum*. Aucune différence significative dans l'expression des variants de MD-2 et TLR4 n'a été observée (Figure 2), tant au niveau basal qu'après stimulation par les différents agonistes bactériens. De manière similaire,

les taux des différents biomarqueurs mesurés à la naissance sur le sang de cordon n'ont pas montré de différence significative entre le groupe exposé et non exposé à *P. falciparum* (Figure 3). Toutefois les nouveau-nés développant un sepsis néonatal ont dans le sang du cordon une augmentation significative du taux d'IL-6 et ce indépendamment de la présence d'un paludisme gestationnel. Parmi les nouveau-nés non exposés au paludisme gestationnel, les profils transcriptionnels de MD-2/TLR4 des enfants qui vont faire un sepsis néonatal ne montrent pas de différence significative majeure hormis une réponse aux ligands imiquimod et FSL1 dont les profils transcriptionnels sont légèrement moindre chez les patients développant un sepsis (Figure 4).

Effet de la présence d'un risque infectieux périnatal sur le profil transcriptionnel

L'analyse des profils transcriptionnels au niveau basal montrent que seul *MD-2SH* présente une différence d'expression entre les groupes (Table 2). Le niveau d'expression chez les patients du groupe contrôle, sans facteurs de risque d'infection, montre une réduction du niveau d'expression de *MD-2SH* de -54% à -75% selon le groupe de comparaison. La comparaison des niveaux d'expression entre le groupe contrôle (K-B) et le groupe paludisme gestationnel négatif et sepsis négatif bien que ne montrant pas différence significative au niveau basal, montre une augmentation significative du niveau d'expression de MD-2SH après la plupart des stimulations par agonistes TLRs (Figure 5). En comparant les enfants du groupe KB aux enfants exposés au paludisme gestationnel (GM+/Sep-), ces derniers présentent une expression élevée de l'isoforme *MD-2SH* au niveau basal et après stimulation avec certains ligands TLR (figure 6). Par ailleurs une corrélation significative a été identifiée entre le niveau d'expression basal de MD-2SH et l'IL-6 ($r=0.58$, $p=0.02$) (Figure 7).

Discussion

Cette étude montre que les infections maternelles à *P. falciparum* au troisième trimestre de grossesse n'affectent pas les profils des transcrits primaires *TLR4* (*NM_138554.5*, *NM_003266.4* et *NM_138557.3* respectivement nommés *V1*, *V3*, *V4* dans notre étude) et *MD-2* (L-long et SH-Short). Toutefois, les enfants nés de mères présentant des facteurs de risque d'infections néonatales présentent une modulation de l'isoforme MD-2SH par rapport aux enfants nés de mères sans facteurs de risque d'infection suggérant que les stimulations immunologiques périnatales impactent qualitativement la réponse TLR postnatale.

Les mécanismes d'épissage alternatif sont reconnus pour réguler les réponses cellulaires. Dans le cas des TLRs, dont la mission principale est d'initier une réponse anti-infectieuse lors de toute exposition à un pathogène, l'épissage semble être un mécanisme important pour le maintien de l'homéostasie et de l'intégrité cellulaire. Il a été identifié environ 256 transcrits alternativement épissés, impliqués dans la cascade de signalisation des TLR ²⁶⁴. Par exemple, l'expression d'une isoforme TLR3, dépourvu de l'ensemble des domaines TIR transmembranaires et cytoplasmiques, régule négativement les voies de signalisation TLR3 induites par poly (I: C) ³⁰². Cette isoforme pourrait avoir une fonction immunomodulatrice dans l'inflammation cérébrale et dans certaines conditions pathologiques ³⁰². Certains transcrits retrouvés dans la cascade de signalisation inhibent spécifiquement la réponse LPS. En effet, des modifications dans l'expression des variants des isoformes de TLR4 et de MD-2 ont été décrites associées à une modulation de la capacité de reconnaissance du complexe MD-2/TLR4 ²⁶⁷⁻²⁶⁹. Les travaux de Iwami et al., chez la souris, ont montré qu'une forme alternativement épissée de l'ARNm de TLR4 code pour l'expression d'une isoforme soluble de TLR4 (mTLR4) dépourvue des domaines transmembranaires et intracellulaires. Cette isoforme est capable d'inhiber les réponses inflammatoires après stimulation par du LPS dans certaines lignées de macrophages ²⁶⁹. L'analyse de l'épissage alternatif de TLR4 chez l'homme a mis en évidence 4 variants de transcription codant pour différentes isoformes ²⁶⁷. Les quatre variants contiennent l'exon I et l'exon IV tandis que les exons II et III sont alternatifs. La transcription du variant (V2 : *NM_138556.1*) ne contenant pas de codon stop (Open reading frame) n'est pas traduit en protéine. Il est à ce jour supprimé de la banque de séquence de référence NCBI. Les travaux de Jaresova ont montré que l'augmentation de l'ARNm total de TLR4 après stimulation aux LPS est provoquée par une régulation positive spécifique des variants d'épissage V1 et V3, tous deux contenant l'exon III ²⁶⁷. Le rôle spécifique du variant V4 ne contenant que les exons I et IV n'est pas encore connu. Les travaux d'Iwami ont montré que la présence d'un codon stop dans l'exon II de TLR4 humain pourrait traduire une protéine semblable à l'isoforme mTLR4 de la souris qui est inhibitrice de la réponse LPS ²⁶⁹.

Un nombre important d'études a montré le rôle de la régulation des TLRs ³⁰³⁻³⁰⁵ et particulièrement celle de TLR4 ^{248,306} dans la pathogenèse des maladies infectieuses et

inflammatoires chez le nouveau-né. Cependant la plupart des études sur TLR4, évaluent l'expression de l'ARNm totale TLR4 sans s'intéresser à la régulation des différents variants alternativement épissés. A notre connaissance, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée ni à l'expression de MD-2 : molécule indispensable à la signalisation de TLR4^{291,292}, ni aux isoformes du complexe MD-2/TLR4 chez le nouveau-né lors des infections pré partum à *P. falciparum*. Notre étude met en évidence pour la première fois la présence de différentes isoformes du complexes MD-2/TLR4 chez des patients. L'existence des protéines issues de la traduction de ces transcrits n'a pas été démontrée et dès lors l'expression biologique de cet épissage ne peut pas permettre de tirer une quelconque conclusion fonctionnelle dans notre étude. Toutefois, nous avons pu montrer que l'expression de MD-2SH semble être différentiellement régulée par une exposition à des facteurs de risque d'infection, et positivement corrélée avec l'IL-6, une cytokine signant la présence d'une réponse pro-inflammatoire systémique. L'IL-6 est une cytokine d'induction des protéines de phases aiguës et son mécanisme de régulation de l'expression de MD-2 a été étudié par notre équipe^{270,271}. Ainsi l'IL-6 en conjonction avec le facteur de transcription C/EBP β (CAAT Enhancing Binding Protein β) régule l'expression de MD-2, toutefois l'effet spécifique de ce mécanisme de régulation transcriptionnel sur les deux isoformes n'est pas connu²⁷¹. L'ensemble des données existantes suggère que l'épissage de MD-2 est un mécanisme présent lors d'infection chez l'humain et dont les conséquences fonctionnelles pourraient tendre à moduler la réponse aux endotoxines et contribuer ainsi à une expression coordonnée des co-récepteurs impliqués dans la reconnaissance des endotoxines^{268,307}.

Dans notre étude, l'impact d'un paludisme gestationnel ne semble pas modifier la réponse aux agonistes TLRs. Les données issues de primo-infection paludéenne suggèrent que cette modulation de la réponse aux PRRs est précoce et transitoire²⁹⁷. De nombreuses évidences suggèrent également que la reconnaissance innée de *Plasmodium* se concentre sur les activations de TLR9, TLR7, TLR4 et TLR2-TLR1/6, dont la reconnaissance de l'ADN (TLR9) et de l'ARN (TLR7) plasmodial joue un rôle essentiel dans la réponse Interféron de type I, élément important dans la réponse de l'hôte^{188,308,309}. Ainsi, notre étude ne permet pas de confirmer un effet du paludisme gestationnel sur l'expression, chez le nouveau-né, du complexe de reconnaissances MD-2/TLR4 et sa réponse aux endotoxines. Toutefois, notre étude suggère pour la première fois que l'exposition prénatale à des facteurs de risques infectieux modifie de manière significative l'expression du complexe MD-2/TLR4 avec notamment une sur expression de l'isoforme courte de MD-2 dont la fonction inhibitrice sur la reconnaissance aux endotoxines est reconnue. Ceci suggère donc que les nouveau-nés exposés à un risque infectieux périnatal (eg. chorioamionite, fièvre maternelle, PROM) associée vraisemblablement à un syndrome inflammatoire fœtal (IL-6) présentent à la naissance un état d'immunodépression induit caractérisé par une altération de la réponse aux entérobactéries³¹⁰. Les conséquences immunologiques et cliniques de cette modulation de l'épissage de MD-2 ne sont pas connues.

TABLES

Table 1. Patients characteristics

Characteristics		(n= 45)
Female		25 (56%)
Birth weight (Gram)		3000 (2485-3090)
Gestational age at delivery (weeks)		39.3 (36.6- 39.60)
Parasite blood density (parasite/ μ l) *		0 (0- 13,428)
Hospital stay		24 (53 %)
Hospital lenght of stay (day)		4.5 (0-7)
Death		3 (6.6%)
Maternal risk factors of infection *		35 (100%)
	Maternal fever	14 (40%)
	Abnormal amniotic fluid	22 (63%)
	PROM	16 (46%)
	Vaginal infection	4 (11%)
	Prematurity	10 (29%)

Values are expressed as median (IQR) or number (%). * in SEPSIS cohort.

PROM, Premature Rupture of Membranes.

Table 2. Basal expression of MD-2/TLR4 isoforms

	GM-/Sep- (N = 8)	GM-/Sep+ (N = 9)	GM+/Sep- (N = 9)	GM+/Sep+, (N = 9)	K-B (N = 10)	<i>p</i>- value
<i>TLR4V1</i>	0.98 (0.77, 1.46)	0.61 (0.30, 1.43)	0.93 (0.77, 2.29)	0.66 (0.18, 0.98)	0.66 (0.63, 1.34)	<i>0.4</i>
<i>TLR4V3</i>	1.05 (0.89, 1.28)	1.04 (0.64, 1.36)	0.78 (0.62, 1.32)	0.81 (0.79, 1.05)	0.96 (0.80, 1.15)	<i>0.8</i>
<i>TLR4V4</i>	0.90 (0.81, 1.22)	0.80 (0.45, 1.01)	0.67 (0.66, 1.60)	0.73 (0.60, 1.04)	0.68 (0.56, 1.15)	<i>0.4</i>
<i>MD-2L</i>	1.30 (0.53, 3.17)	0.98 (0.41, 1.50)	1.29 (0.55, 1.98)	0.47 (0.17, 0.78)	0.44 (0.29, 1.60)	<i>0.6</i>
<i>MD-2SH</i>	1.08 (0.73, 1.22)	2.01 (0.89, 2.72)**	1.41 (1.18, 2.47) *	1.15 (1.08, 1.52)	0.49 (0.38, 0.75)	<i>0.028</i>

Values are expressed as median (IQR) relative to HPRT1

GM, Gestationnel Malaria; *Sep*, Sepsis néonatal ; *K-B*, Kremlin-Bicêtre group.

ANOVA was performed to compare groups. Kruskal-Wallis was performed to compared individual group to the KB group: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A p value < 0.05 was considered as significant.

Supplementary Table 1: Primers sequences

Transcripts	NCBI Reference Sequence	Direction	Sequence (5' → 3')
<i>TLR4V1</i>	NM_138554.5	Forward	CCTGCGTGGAGGTGGTTCCTAATA
		Reverse	TCTTGGTTGAGAAGGGGAGGTTGT
<i>TLR4V3</i>	NM_003266.4	Forward	GAGACTTGGCCCTAAACCACACAGAA
		Reverse	AGCAAGAAGCAATGGAATCG
<i>TLR4V4</i>	NM_138557.3	Forward	CGTGGAGGTGTGAAATCCAGACAA
		Reverse	AACTCTGGATGGGGTTTCCTGTCA
<i>MD-2L</i>	NM_015364.5	Forward	ATTGGGTCTGCAACTCATCC
		Reverse	TGTGCAATAATCCTTTGGATCTT
<i>MD-2SH</i>	NM_001195797.2	Forward	ATTGGGTCTGCAACTCATCC
		Reverse	TGCTTTAAATCTCTCCCACAGTAG
<i>HPRT1</i>	NM_000194.3	Forward	AACGTCTTGCTCGAGATGTGAT
		Reverse	GCACACAGAGGGCTACAATGTG

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Flow chart

Figure 2. Basal and stimulated expression of *MD-2/TLR4* isoforms expression according to exposure to gestational malaria in infants without sepsis

MD-2 and *TLR4* isoforms expression level normalized with *HPRT1* following 24 hours' stimulation with TLR agonists of cord blood from newborn exposed or not to gestational malaria and not developing neonatal sepsis. GM, Gestational Malaria; Sep, Early onset neonatal sepsis. A Kruskal-Wallis test was performed to compare both groups. A p value <0.05 was considered as significant.

Figure 3. Cord blood IL-6, IL-10, IP-10 and *CD74* values in patients with gestational malaria and early onset neonatal sepsis

Cord blood plasma values of IL-6, IL-10, IP-10 and *CD74* expression levels in newborn exposed or not to gestational malaria and developing early onset neonatal sepsis. *CD74*, Cluster of Differentiation 74 ; *IL*, Interleukin; *IP*, Interferon-inducible protein; GM, Gestational Malaria ; Sep, Early onset neonatal sepsis.

A Kruskal-Wallis test was performed to compare groups with patients without gestational malaria and early onset neonatal sepsis. A p value <0.05 was considered as significant (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figure 4. Basal and stimulated expression of *MD-2/TLR4* isoforms expression according to development of early onset neonatal sepsis in newborn not exposed to gestational malaria

MD-2 and *TLR4* isoforms expression level normalized with *HPRT1* following 24 hours' stimulation with TLR agonists of cord blood from newborn developing or not early onset neonatal sepsis without exposure to gestational malaria. GM, Gestational Malaria ; Sep, Early onset neonatal sepsis. A Kruskal-Wallis test was performed to compare both groups. A p value <0.05 was considered as significant (* $p < 0,05$).

Figure 5. Basal and stimulated expression of *MD-2/TLR4* isoforms expression according to the presence of maternal risk factors of infections.

MD-2 and *TLR4* isoforms expression level normalized with *HPRT1* following 24 hours' stimulation with TLR agonists of cord blood from newborn developing or not early onset neonatal sepsis without exposure to gestational malaria. GM, Gestational

Malaria; Sep, Early onset neonatal sepsis. A Kruskal-Wallis test was performed to compare both groups. A p value <0.05 was considered as significant (* $p < 0.05$).

Figure 6. Basal and stimulated expression of *MD-2 short* isoforms

MD-2 short isoform expression level normalized with HPRT1 following 24 hours' stimulation with TLR agonists of cord blood from newborn developing or not early onset neonatal sepsis without exposure to gestational malaria. GM, Gestational Malaria; Sep, Early onset neonatal sepsis. A Kruskal-Wallis test was performed to compare groups with patients without gestational malaria and early onset neonatal sepsis. A p value <0.05 was considered as significant (* $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 7. Correlation matrix of cord blood biomarkers and MD-2/TLR4 isoforms in newborn

Correlation matrix between cord blood IL-6, IL-10, IP-10, *MD-2SH*, *MD-2L*, *TLR4V1*, *TLR4V3*, *TLR4V4*.

CD74, *MD-2* and *TLR4* isoforms expression level were normalized with *HPRT1*. IL-6 and IL-10 values were expressed as log (pg/mL). Value distribution were presented on the diagonal and dispersion chart on the lower part of the figure. Upper part displays corresponding Pearson correlation coefficient for each pairs. A p value <0.05 was considered as significant (* $p \leq 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

REFERENCES

1. Burgess APH, Katz JE, Moretti M, Lakhi N. Risk Factors for Intrapartum Fever in Term Gestations and Associated Maternal and Neonatal Sequelae. *Gynecol Obstet Invest* 2017;82:508-16.
2. Huang J, Qian Y, Gao M, Ding H, Zhang L, Jia R. Analysis of factors related to preterm birth: a retrospective study at Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital in China. *Medicine (Baltimore)* 2020;99:e21172.
3. Rogerson SJ. Management of malaria in pregnancy. *Indian J Med Res* 2017;146:328-33.
4. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007;7:93-104.
5. Broen K, Brustoski K, Engelmann I, Luty AJ. Placental *Plasmodium falciparum* infection: causes and consequences of in utero sensitization to parasite antigens. *Mol Biochem Parasitol* 2007;151:1-8.
6. Rachas A, Le Port A, Cottrell G, et al. Placental malaria is associated with increased risk of nonmalaria infection during the first 18 months of life in a Beninese population. *Clin Infect Dis* 2012;55:672-8.
7. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* 1997;146:826-31.
8. Fievet N, Moussa M, Tami G, et al. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis* 2001;183:1530-4.
9. King CL, Malhotra I, Wamachi A, et al. Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol* 2002;168:356-64.
10. Odorizzi PM, Jagannathan P, McIntyre TI, et al. In utero priming of highly functional effector T cell responses to human malaria. *Sci Transl Med* 2018;10.
11. Freudenberg MA, Tchaptchet S, Keck S, et al. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology* 2008;213:193-203.
12. Hodyl NA, Krivanek KM, Lawrence E, Clifton VL, Hodgson DM. Prenatal exposure to a pro-inflammatory stimulus causes delays in the development of the innate immune response to LPS in the offspring. *J Neuroimmunol* 2007;190:61-71.
13. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-82.

14. Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2001;276:38044-51.
15. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol* 2018;9:3006.
16. Kalantari P. The Emerging Role of Pattern Recognition Receptors in the Pathogenesis of Malaria. *Vaccines (Basel)* 2018;6.
17. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004;4:169-80.
18. Adegnika AA, Kohler C, Agnandji ST, et al. Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood. *J Infect Dis* 2008;198:928-36.
19. Natama HM, Moncunill G, Rovira-Vallbona E, et al. Modulation of innate immune responses at birth by prenatal malaria exposure and association with malaria risk during the first year of life. *BMC Med* 2018;16:198.
20. Gbedande K, Varani S, Ibitokou S, et al. Malaria modifies neonatal and early-life toll-like receptor cytokine responses. *Infect Immun* 2013;81:2686-96.
21. McCall MB, Netea MG, Hermesen CC, et al. Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *J Immunol* 2007;179:162-71.
22. Akogbeto M, Modiano D, Bosman A. Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin. *Parassitologia* 1992;34:147-54.
23. Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors* 2010;3:83.
24. Fievet N, Ezinmegnon S, Agbota G, et al. SEPSIS project: a protocol for studying biomarkers of neonatal sepsis and immune responses of infants in a malaria-endemic region. *BMJ Open* 2020;10:e036905.
25. Mischlinger J, Pitzinger P, Veletzky L, et al. Validity and reliability of methods to microscopically detect and quantify malaria parasitaemia. *Trop Med Int Health* 2018;23:980-91.
26. Wells CA, Chalk AM, Forrest A, et al. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade. *Genome Biol* 2006;7:R10.
27. Seo JW, Yang EJ, Kim SH, Choi IH. An inhibitory alternative splice isoform of Toll-like receptor 3 is induced by type I interferons in human astrocyte cell lines. *BMB Rep* 2015;48:696-701.
28. Jaresova I, Rozkova D, Spisek R, Janda A, Brazova J, Sediva A. Kinetics of Toll-like receptor-4 splice variants expression in lipopolysaccharide-stimulated antigen presenting cells of healthy donors and patients with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 2007;9:1359-67.

29. Gray P, Michelsen KS, Sirois CM, et al. Identification of a novel human MD-2 splice variant that negatively regulates Lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Immunol* 2010;184:6359-66.
30. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikachoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2000;165:6682-6.
31. Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, et al. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 2010;68:323-9.
32. Weitkamp JH, Stuber F, Bartmann P. Pilot study assessing TNF gene polymorphism as a prognostic marker for disease progression in neonates with sepsis. *Infection* 2000;28:92-6.
33. El-Behedy EM, Akeel N, El-Maghraby HM, Shawky A. Serum Level and Genetic Polymorphism of Mannose-Binding Lectin in Infants with Neonatal Sepsis at Zagazig University Hospitals. *Egypt J Immunol* 2019;26:91-9.
34. Redondo AC, Ceccon ME, Silveira-Lessa AL, et al. TLR-2 and TLR-4 expression in monocytes of newborns with late-onset sepsis. *J Pediatr (Rio J)* 2014;90:472-8.
35. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
36. Tissieres P, Dunn-Siegrist I, Schappi M, et al. Soluble MD-2 is an acute-phase protein and an opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 2008;111:2122-31.
37. Tissieres P, Araud T, Ochoda A, Drifte G, Dunn-Siegrist I, Pugin J. Cooperation between PU.1 and CAAT/enhancer-binding protein beta is necessary to induce the expression of the MD-2 gene. *J Biol Chem* 2009;284:26261-72.
38. Bhattacharyya S, Wang W, Qin W, et al. TLR4-dependent fibroblast activation drives persistent organ fibrosis in skin and lung. *JCI Insight* 2018;3.
39. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001;167:416-23.
40. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005;280:8606-16.
41. He X, Xia L, Tumas KC, Wu J, Su XZ. Type I Interferons and Malaria: A Double-Edge Sword Against a Complex Parasitic Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:594621.
42. Bermick J, Gallagher K, denDekker A, Kunkel S, Lukacs N, Schaller M. Chorioamnionitis exposure remodels the unique histone modification landscape of neonatal monocytes and alters the expression of immune pathway genes. *FEBS J* 2019;286:82-109.

Figure 1

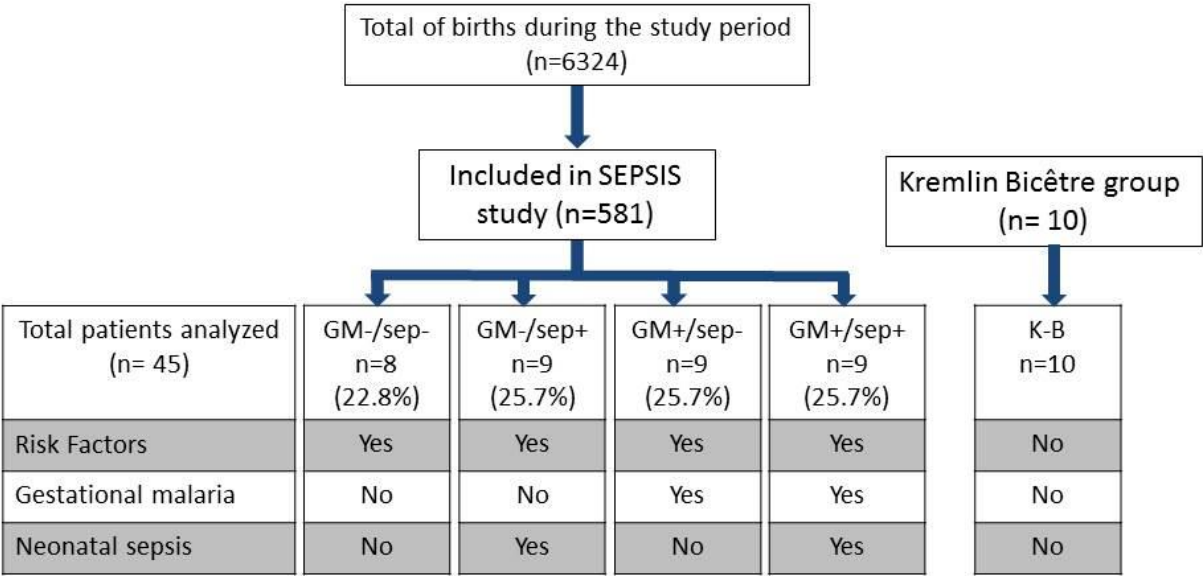


Figure 2

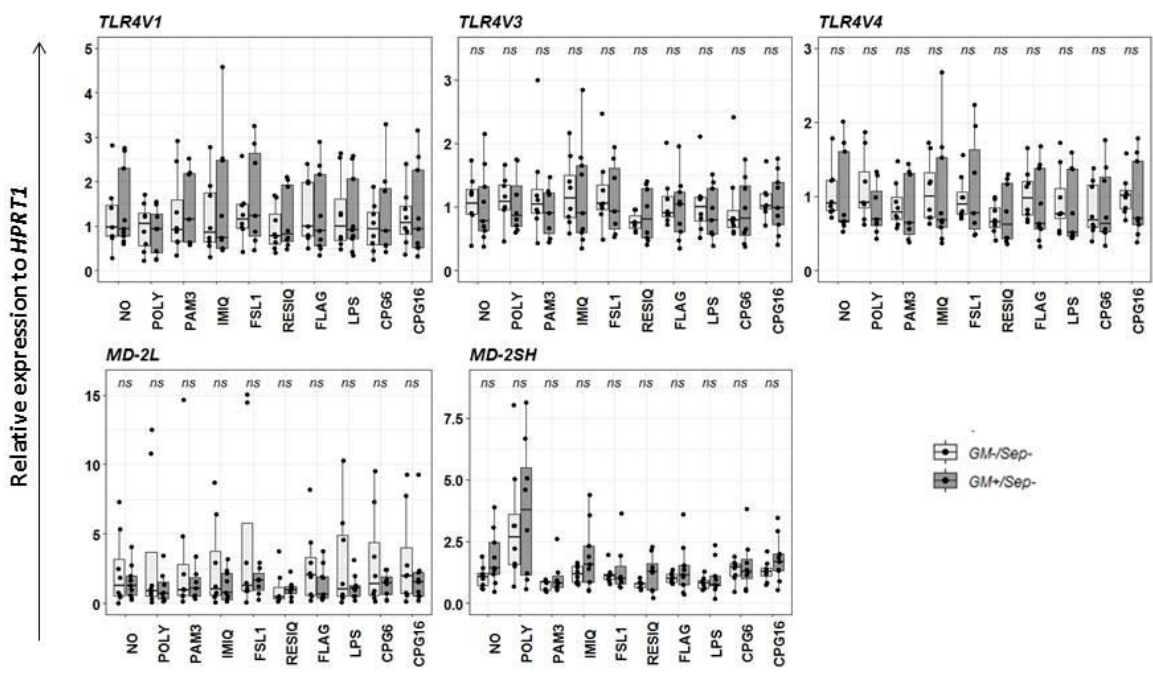


Figure 3

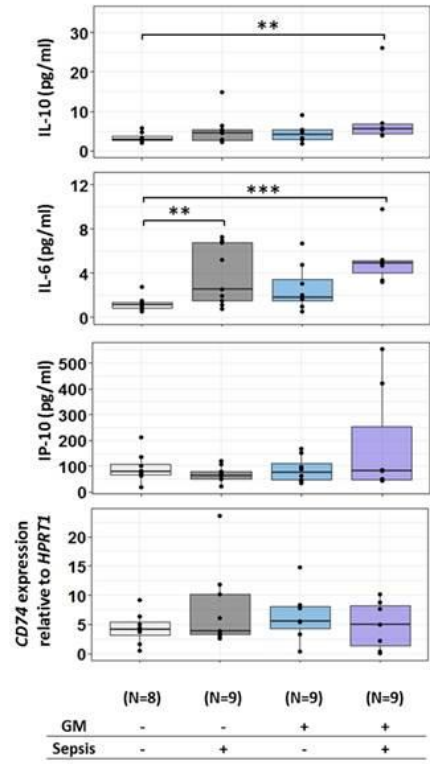


Figure 4

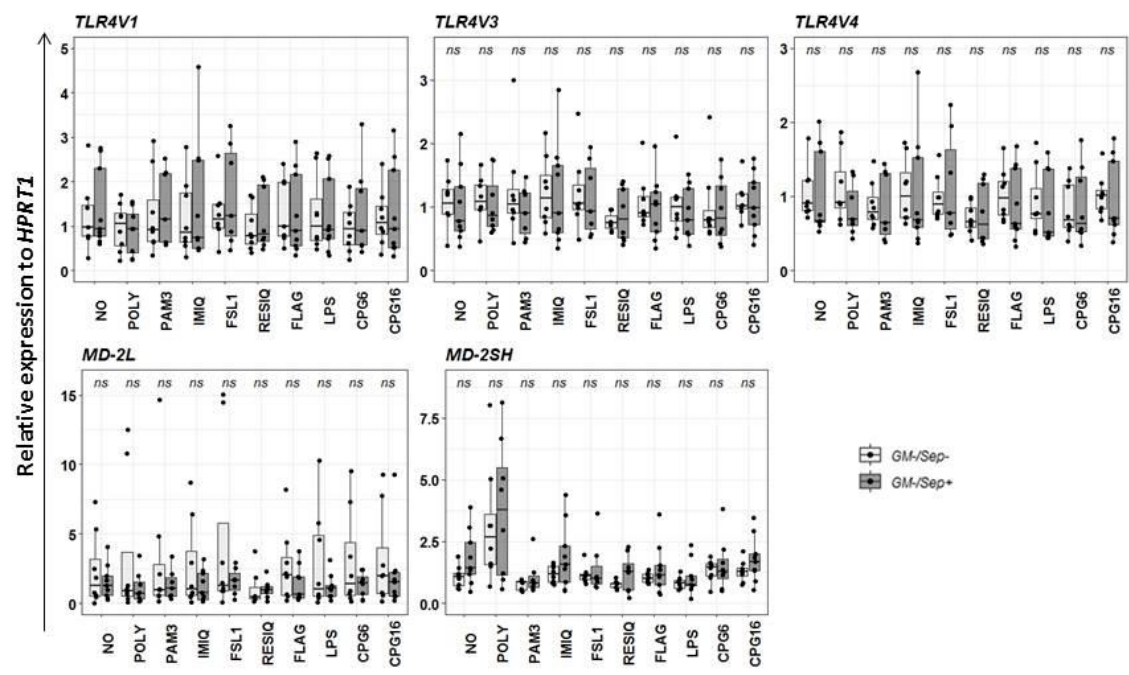


Figure 5

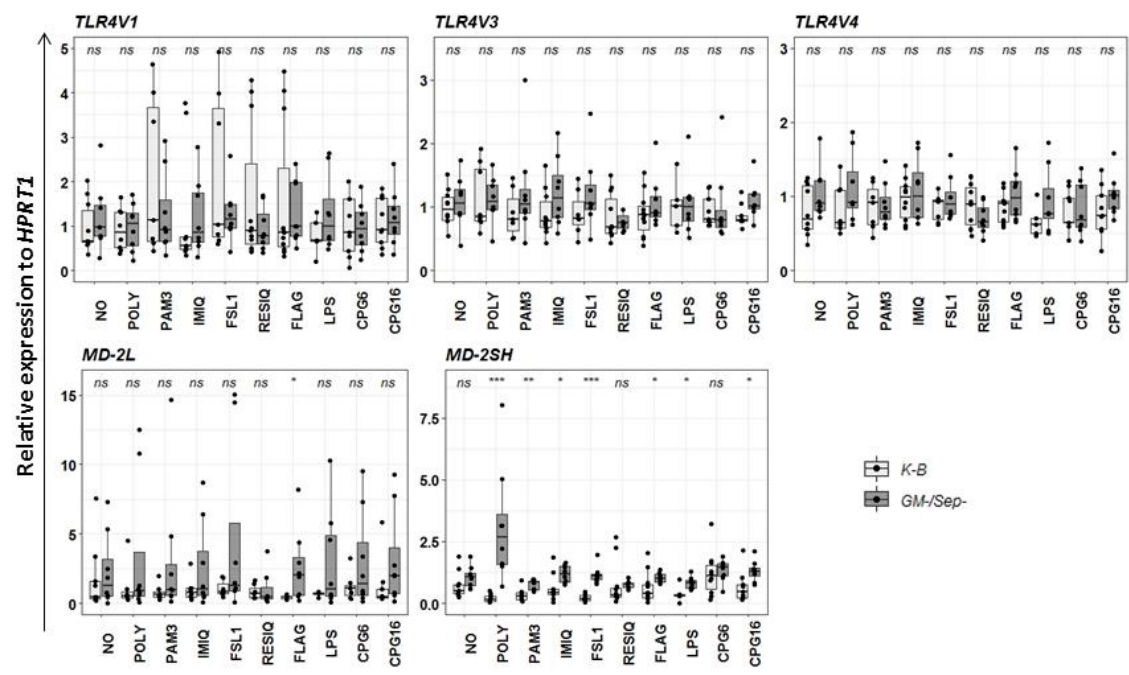


Figure 6

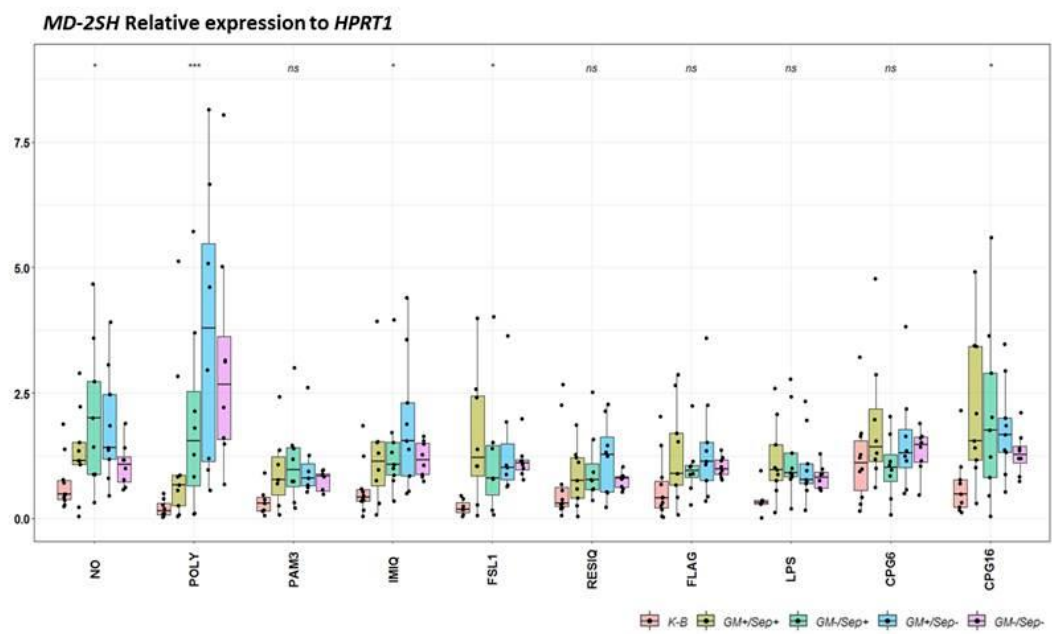
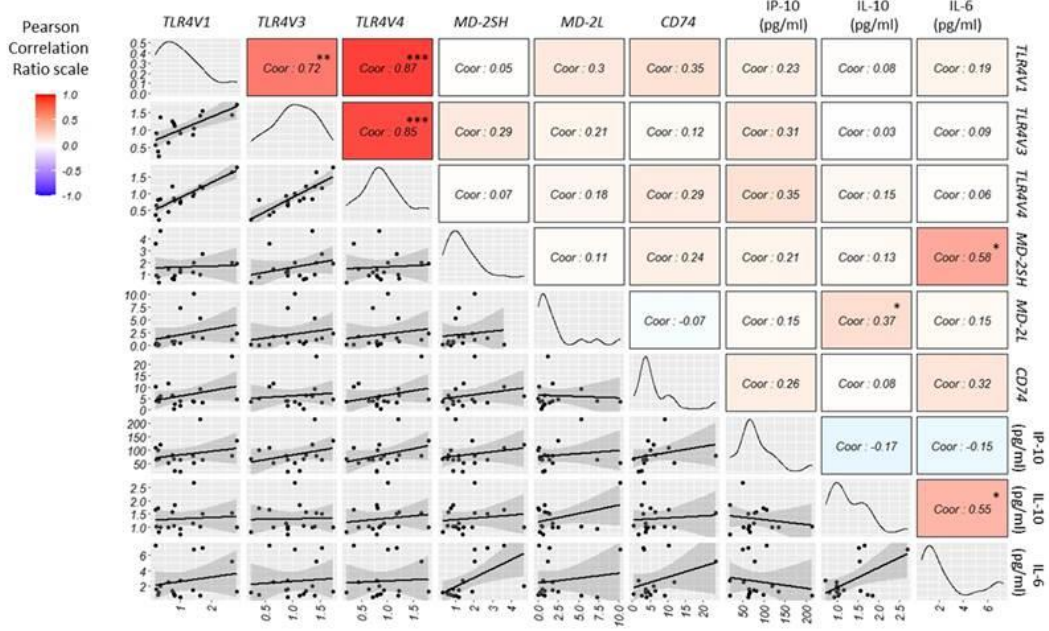
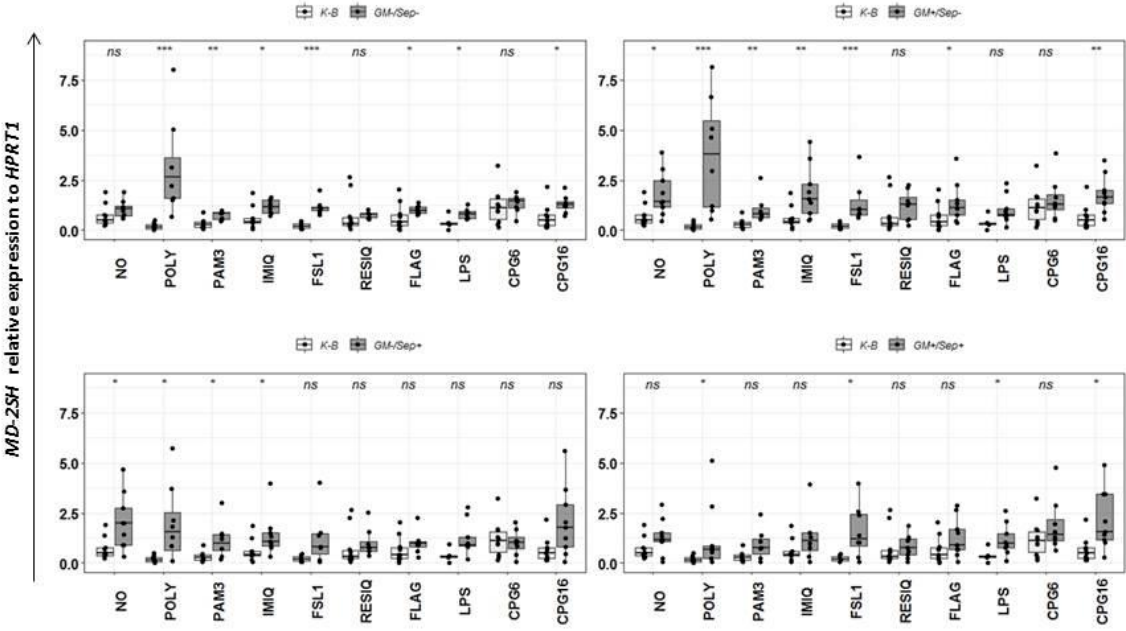


Figure 7



Supplementary Figure 1



DISCUSSION



Dans les pays à faibles revenus, le pourcentage des infections néonatales est élevé jusqu'à 75% ^{42,56}. Les infections chroniques pendant la grossesse, tels que le paludisme et autres parasitoses fréquentes en Afrique subsaharienne (ASS) altèrent les fonctions immunes du fœtus et sont à l'origine d'une plus grande susceptibilité du nouveau-né aux infections et d'une altération de la réponse vaccinale ^{16,17}. Dans un contexte où les infections néonatales constituent un réel problème de santé publique, et où les politiques de santé visent à baisser la mortalité infantile, mon travail de thèse s'est intéressé principalement aux conséquences du paludisme gestationnel sur les réponses immunologiques du nouveau-né et l'évaluation de biomarqueurs pour le diagnostic et/ou le pronostic du sepsis néonatal.

Ce travail se décompose en trois parties :

- L'épidémiologie des sepsis néonataux
- L'évaluation de biomarqueurs transcriptionnels (*CX3CR1*, *CD74*) et protéiques (IL-6, IL-10, IP-10, PCT) pour le diagnostic et au pronostic du sepsis néonatal
- L'impact des expositions *in utero* aux antigènes plasmodiaux sur la modulation de l'expression du complexe de reconnaissance des endotoxines MD-2/TLR4

La cohorte SEPSIS sur laquelle j'ai travaillé au cours de cette thèse est unique par le fait qu'elle repose sur un suivi longitudinal et utilise des approches multidisciplinaires afin de répondre à nos objectifs. L'originalité de cette cohorte repose sur la collecte des données cliniques, anthropométriques, parasitologiques et immunologiques des premiers mois de vie des nouveau-nés. La qualité des données collectées nous a permis de créer des sous-groupes particuliers en fonction des statuts cliniques des nourrissons afin de mieux apprécier d'une part l'effet des facteurs de risques d'infections néonatales et d'autre part de mieux apprécier l'impact des expositions *in utero* aux antigènes palustres sur les modifications des réponses immunologiques futures du nouveau-né.

Nous discuterons dans un premier temps des données épidémiologiques et ensuite de la contribution de nos résultats à l'amélioration de la prise en charge des nouveau-nés dans les pays à faibles revenus. Nous présenterons ensuite les limites et les points forts de l'étude, pour finir par une mise en perspective du travail réalisé.

Epidémiologie du sepsis néonatal dans les pays à faibles revenus

Notre étude est une étude prospective, multicentrique réalisée sur une cohorte de 581 nourrissons. Après l'accouchement, 308 (53%) étaient hospitalisés pour suspicion d'infections néonatales sur la base des critères anamnestiques et cliniques. Une proportion de la suspicion inférieure à celui retrouvé par Ouedraogo et al. au Burkina en 2015 (62,8%) ⁵⁶ et de Ambe et al. (62,3 %) au Niger ³¹¹. La proportion des nouveau-nés suspectés d'infections est plus faible dans notre étude en raison de la présence des nouveau-nés de la cohorte suburbaine qui sont nés de mères sans facteurs de risque d'infections néonatales. Comparé aux données des pays industrialisés, les proportions

observées dans les pays émergents sont 10 fois plus élevées et pose la question de l'importance de la prévention des infections materno-fœtales, des bonnes pratiques des interventions intrapartum (Hersent (4,5 %), Noguer et al. (1,7 %) en France). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence entre les pays du nord et ceux du sud. Les mesures défaillantes d'hygiène et d'asepsie en milieu hospitalier ou dans l'entourage familial, les difficultés financières pour l'accès à au diagnostic biologique complet (examens sérologiques et microbiologiques) et le défaut de définition consensuelle du sepsis néonatal sont tant des facteurs qui pourraient expliquer la différence observée entre les pays émergents et les pays du nord.

Notre étude a rapporté 68,5 % de nouveau-nés à terme, et 37,5 % de prématurés. Les proportions de prématurité dans les populations africaines sont beaucoup plus basses et le rapport de l'OMS en 2018 souligne que les taux de naissances prématurées les plus élevés des pays à ressources limitées étaient compris entre 15 et 18 %. Au Bénin le taux national est de 10 à 12 %. Le taux élevé dans notre étude peut s'expliquer par les critères de sélection de la cohorte hospitalière qui n'inclut que les mères présentant des facteurs de risque d'infections néonatales dont la prématurité.

Après analyses des données biologiques et microbiologiques, le diagnostic de sepsis néonatal a ensuite été rendu pour 172 (29%) nouveau-nés. Ce résultat approche celui de Glorion à Dakar (20,8%) en 2009 et de Dao et al. (28,5%) au Burkina Faso en 2012 et montre à la nécessité de tests biologiques afin de réduire le nombre important de nouveau-nés traités pour suspicion d'infection néonatale.

Les principaux facteurs de risque associés au sepsis néonatal et à la mortalité dans notre étude étaient la prématurité < à 37 SA, la fièvre maternelle, la rupture prématurée des membranes > 18h et les anomalies du liquide amniotique. Les mêmes facteurs ont été également rapportés par d'autres auteurs africains ^{56,312,313}. Tout comme dans les pays du nord, le ministère de la santé au Bénin recommande une identification des nouveau-nés à risque sur la base des antécédents obstétricaux maternels afin de permettre en amont une prise en charge précoce et donc une approche plus efficace dans la prévention des événements morbides du sepsis néonatal. Soixante-dix pour cent des nouveau-nés prématurés de moins de 32 SA développent un sepsis néonatal et 22% décèdent dans les 3 premiers jours. Les analyses statistiques confirment que la prématurité est corrélée avec le sepsis néonatal et le décès qu'il peut en résulter ^{314,315}. Nos résultats sont conformes à la littérature et soulignent l'importance de certains facteurs de risque, notamment de la prématurité dans la survenue du sepsis néonatal et des décès des nouveau-nés au cours de la période néonatale précoce (de la naissance à J7 de vie).

Contrairement au pays du nord où le *streptocoque* du groupe B est la principale étiologie des infections bactériennes néonatales ³¹⁶, le profil bactérien réalisé par la culture microbienne et le FilmArray a révélé de façon globale une prédominance des bacilles Gram négatifs avec pour chef de file *Enterobacter cloacae* complex, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* et *Staphylococcus spp.* Ces microorganismes sont

généralement associés aux infections nosocomiales chez les patients hospitalisés ou séjournant dans les établissements de soins. D'autres études africaines ont retrouvé les mêmes micro-organismes dans les infections néonatales et ont établi des liens avec la contamination nosocomiale ^{317,318} pouvant se faire par le personnel soignant. Des études de surveillance ont révélé une association entre la colonisation du nouveau-né et un certain nombre de facteurs périnataux, y compris l'intubation endotrachéale des bébés de faible poids de naissance, de l'hospitalisation prolongée, des procédures d'allaitement, et de l'utilisation d'antibiotiques ³¹⁹. La présence des Enterobacteriaceae spécifiques (*Enterobacter cloacae* complex, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*) soulève la question de l'émergence des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) entraînant de plus en plus de résistance à plusieurs classes d'antibiotiques couramment utilisés dans plusieurs pays africains ³²⁰.

Au Bénin comme dans la plupart des pays émergents, le test hémoculture n'est pas souvent réalisé du fait d'un coût financier important pour les familles qui ne disposent pas de couverture sociale. En absence de la microbiologie, les cliniciens engagent des traitements d'antibiothérapie probabiliste à tous les enfants suspectés d'infections néonatales. Ceci a pour conséquence de favoriser l'apparition des antibiorésistances.

La performance des biomarqueurs

Un des objectifs de cette thèse est d'apporter une évaluation détaillée de l'utilité potentielle des biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic de la septicémie néonatale et l'établissement de valeurs de référence dans les populations pédiatriques dans les pays à faibles ressources. Nous avons donc dans nos travaux, évalué la performance des biomarqueurs transcriptionnels (*CX3CR1*, *CD74*) et protéiques (IL6, IL10, IP-10, PCT) et leur association avec les arguments cliniques et les facteurs de risque maternels pour diagnostiquer et pronostiquer le sepsis néonatal en zone à ressources limitées.

En néonatalogie, la PCT plasmatique est considérée comme un biomarqueur hautement sensible dans le diagnostic des infections bactériennes avec une valeur prédictive négative très élevée ^{94,97,98}. Mais peu d'études ont évalué les performances diagnostiques de la PCT dans le sang du cordon. Dans notre étude, nous avons évalué l'efficacité de la PCT dans le sang du cordon pour le diagnostic et le pronostic du sepsis néonatal. Nos résultats ont montré que la PCT du sang de cordon n'était pas un biomarqueur robuste pour le diagnostic de la septicémie néonatale en contradiction à certaines études menées dans les pays à ressources moins limitées ³²¹. En considérant des études menées chez les grands prématurés et dans les milieux où la prévalence de l'EONS était plus élevée, notre étude confirme le manque de précision de la PCT du sang de cordon pour diagnostiquer la septicémie néonatale ^{100,322}. Le manque de spécificité que nous avons observé peut-être lié à l'effet des conditions médicales ou environnementales maternelles et néonatales sur le niveau de PCT. Dans notre cohorte, la PCT du sang de cordon était fortement corrélée avec la PROM, la fièvre maternelle,

le score d'Apgar, l'âge gestationnel, et la fréquence cardiaque et respiratoire du nouveau-né, suggérant que l'état prénatal et l'adaptation du nouveau-né ont un impact sur le niveau de la PCT, comme le montre une différence significative du niveau de la PCT chez les nourrissons en bonne santé nés soit à l'hôpital (avec des facteurs de risque maternels), soit dans le bras suburbain (sans facteurs de risque maternels).

Nous montrons pour la première fois que le ratio *CD74*/IP-10 pourrait être plus précis pour le diagnostic de la septicémie que tous les biomarqueurs et combinaisons cliniques étudiés dans notre étude. *CD74*, la chaîne invariante impliquée dans le transport des molécules du CMH de classe II, s'était auparavant révélée être un marqueur d'identification potentielle des patients adultes gravement malades développant des infections associées aux soins de santé. Dans notre étude, l'expression de *CD74* seule a une faible précision pour le diagnostic de l'EONS, mais son association avec IP-10, la protéine 10 inducible par l'interféron (γ), apparaît comme une forte combinaison de biomarqueurs pour le diagnostic de la septicémie néonatale (ASC 0,77, 95 % IC : 0,72 à 0,81). L'IP-10 est associée à diverses conditions inflammatoires telles que les maladies auto-immunes, les syndromes hémophagocytaires et les infections virales où sa combinaison avec la phospholipase A2, ou IL-10 a été suggérée pour le diagnostic de la septicémie ^{116,323}. La combinaison de *CD74* et d'IP-10, illustrant à la fois la capacité de présentation de l'antigène et la réponse à la stimulation par l'interféron de type II peut être représentative des deux facettes de la compétence immunologique néonatale face à l'infection. L'ontogenèse de la présentation de l'antigène au début de la vie est considérée comme un facteur clé dans la détermination des réponses spécifiques à l'âge, aux microbes et autres antigènes. La production d'IP-10 chez les nourrissons reflète une réponse Th1 consécutive et peut donc représenter, conjointement avec une expression réduite de *CD74*, malgré la stimulation de l'IFN- γ , une signature pour une réponse gravement dérégulée associée à l'EONS.

En tant que chaîne invariante du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, *CD74* est principalement exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes. Les faibles expressions de *CD74* sont associées à la mortalité chez les patients adultes en état de choc septique dans les unités de soins intensifs (AUC = 0.67, 95% (CI) = 0.55 à 0.79) ¹⁴⁷, tandis que les expressions élevées de *CD74* sont associées à la survenue d'infections secondaires (sdHR 1,51 (95 % IC 1,11-2,06)) ¹⁶². Les courbes de survie montrent qu'une diminution du niveau de *CD74* est associée à un risque élevé de mortalité après un choc septique chez l'adulte (test Log rank, P = 0,0043, Hazard Ratio = 3,0, 95 % IC : 1,4 à 6,5) ¹⁴⁷. Une faible expression de *CD74* dans la phase précoce du choc septique chez les adultes est associée à une régulation négative de HLA-DR à la surface des monocytes (mHLA-DR) ^{324,325}. Birle et al. ont montré qu'une diminution de l'expression de mHLA-DR chez les nouveau-nés prématurés de moins de 32 SA et non prématurés présentant des facteurs de risque périnataux est associée à une susceptibilité accrue d'infections néonatales ³²⁶. Tandis que Genel et al., montrent que

les faibles niveaux d'expression de mHLA-DR sont associés à la mortalité chez les nouveau-nés présentant un sepsis tardif ¹⁴¹.

Le raisonnement physiopathologique qui sous-tend l'association d'un faible taux de CD74/faible taux de mHLA-DR chez les nourrissons et d'une mortalité par sepsis peut être résumé par une présentation modifiée de l'antigène, soit acquise, soit secondaire à un événement périnatal. Il a été démontré qu'un défaut primaire ou une expression réduite de mHLA-DR était associée à la prématurité ^{7,327} et à une altération de la fonctionnalité des cellules myéloïdes chez les nourrissons extrêmement immatures. La diminution secondaire du mHLA-DR en réponse à diverses agressions est bien connue. Il est intéressant de noter que, dans notre étude, les nourrissons survivant à une septicémie ont présenté une altération prolongée de l'expression de CD74 jusqu'à un mois après l'EONS. Néanmoins, une telle réduction post-sepsis prolongée de la transcription des CD74, ainsi qu'une réduction du mHLA-DR n'ont jamais été décrites chez les nourrissons et les adultes. On sait que les nouveau-nés ont une immunité qui évolue rapidement pendant les premiers mois de leur vie. Dans une analyse longitudinale de l'immunité des nourrissons, Olin et al. ont démontré qu'une convergence se produit entre les nourrissons à terme et les prématurés à l'âge de trois mois, mais qu'entre temps, les facteurs environnementaux façonnent la variation immunitaire ³²⁸. Il est intéressant de noter qu'ils ont montré que des changements drastiques dans la composition cellulaire et les phénotypes, les concentrations de protéines plasmatiques se produisent au cours des premiers jours de la vie, ce qui apporte des informations supplémentaires pour la compréhension de la cinétique des biomarqueurs et l'utilité potentielle pour le diagnostic des EONS. En conséquence, notre étude établit les valeurs de référence de l'IL-6, de l'IL-10, de l'IP-10 et du CD74, CX3CR1 pendant les 4 et 12 premières semaines de vie, respectivement. Il s'agit du premier ensemble de valeurs de référence jamais publié pour les nouveau-nés et les nourrissons vivant en Afrique Sub-Saharienne. L'extrapolation de ces valeurs de référence aux nourrissons vivant en dehors de l'Afrique peut être acceptable. Nous avons montré que le paludisme gestationnel n'avait pas d'impact sur les valeurs des biomarqueurs, ce qui les rend applicables dans les régions où le paludisme n'est pas endémique. En outre, les profils immunitaires liés à l'âge peuvent ne pas être différents entre l'Afrique, l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud et l'Europe malgré les variations environnementales, bien que des différences significatives puissent apparaître au niveau régional, ce qui n'exclut pas un effet possible ³²⁹.

L'épissage alternatif est reconnu être un mécanisme essentiel par lequel les organismes augmentent la complexité de la régulation immunitaire. Il permet la génération des plusieurs ARNm distincts à partir d'un gène donné via un processus dans lequel des exons ou des introns sont sautés ou introduits, conduisant à la production d'isoformes protéiques dont les fonctions sont distinctes. Un nombre très important d'études ont montré le rôle de la diversité des isoformes dans la régulation de la réponse

immunitaire. Par exemple, l'expression d'une isoforme TLR3, dépourvue de l'ensemble des domaines TIR transmembranaires et cytoplasmiques, régule négativement les voies de signalisation TLR3 induites par poly (I: C) ³⁰². Cette isoforme pourrait avoir une fonction immunomodulatrice dans l'inflammation cérébrale et dans certaines conditions pathologiques ³⁰². TLR4 subit également un épissage alternatif et produit 4 isoformes dont les conséquences fonctionnelles ne pas encore complètement élucidées. En effet certains transcrits retrouvés dans la cascade de signalisation sont inhibitrices de la réponse spécifique aux LPS. Des modifications dans l'expression des variants des isoformes de TLR4 et de MD-2 ont été décrites associées à une modulation de la capacité de reconnaissance du complexe MD-2/TLR4 ²⁶⁷⁻²⁶⁹. Dès lors que les modifications dans l'expression des variants des isoforme du complexe MD-2/TLR4 peuvent modifier la réponse de l'hôte aux endotoxines, il est important de préciser les impacts potentiels des infections à *P. falciparum* sur la transcription des ARNm MD-2/TLR4.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier le rôle des infections palustres de la mère au troisième trimestre de grossesse dans la survenue des sepsis néonataux, en mettant l'accent sur les modifications transcriptionnelles du complexe de reconnaissance MD-2/TLR4 qui pourraient survenir dans le sang du cordon lors de l'exposition du fœtus aux antigènes plasmodiaux. Il est établi que les expositions précoces *in utero* aux antigènes parasitaires pourraient entraîner une tolérance immunitaire chez les nouveau-nés de mères ayant développé un paludisme gestationnel. L'altération de l'immunité des enfants est soutenue par une augmentation de la fréquence des Lymphocytes T régulateurs dans le sang du cordon ombilical des nouveau-nés dans les zones d'endémie palustre ^{330,331}. Nous avons étudié l'hypothèse selon laquelle l'exposition *in utero* aux antigènes de *P. falciparum* modifierait la transcription du complexe de reconnaissance des endotoxines MD-2/TLR4 conduit à une susceptibilité de l'hôte aux infections bactériennes ^{208,332}.

Nous avons constaté que dans notre population d'étude, l'exposition à *P. falciparum* *in utero* juste avant ou au moment de l'accouchement n'a pas d'impact sur la modulation de la signature transcriptionnelle du complexe MD-2/TLR4. Nos résultats montrent plutôt une variabilité du niveau d'expression de MD-2SH par une exposition à des facteurs de risque d'infections materno-fœtales suggérant donc que l'exposition prénatale à des facteurs de risques infectieux (eg. Chorioamniotite, fièvre maternelle, PROM) modifie de manière significative l'expression du complexe MD-2/TLR4 avec notamment une surexpression de l'isoforme courte de MD-2 dont la fonction inhibitrice sur la reconnaissance aux endotoxines est reconnue ^{268,307}. Cette expression de MD-2SH chez les enfants nés de mères avec des facteurs de risque d'infection est positivement corrélée à l'IL-6, cytokine d'induction des protéines de phases aiguës d'inflammatoire systémique ^{270,271}. Au final, Les modulations de l'expression de MD-2SH seraient associées à la production des cytokines nécessaires au contrôle des infections.

Notre travail présente cependant quelques limites. Nous avons choisi de travailler sur une population de nouveau-nés tous issus de mères présentant pour la majorité, au moins un facteur de risque d'infections néonatales³⁰⁰. Tous les enfants présenteraient déjà un état d'immuno-modulation qui empêcherait de bien apprécier l'effet des expositions *in utero* aux antigènes de *P. falciparum*. Plusieurs études ont déjà apporté des preuves selon lesquelles le fœtus est capable de développer des réponses immunes quand il se produit un changement de l'environnement intra-utérin^{333,334}. De plus les facteurs de risque périnataux, y compris la chorioamniotite, sont reconnus associés à un syndrome de réponse inflammatoire fœtale qui peut moduler l'expression des gènes de la réponse innée chez le nouveau-né pendant la vie post-natale³¹⁰.

Deux autres limites de notre étude seraient le timing et la technique avec lesquels nous avons évalué les infections palustres maternelles. En effet, l'infection à *P. falciparum* a été évaluée au dernier trimestre de grossesse qui suivant certaines études, ne constitue pas la période pendant laquelle les infections palustres maternelles ont des conséquences sur le développement du fœtus³³⁵. Bien que plusieurs études aient associé les infections palustres au dernier trimestre de grossesse à des modifications de la réponse immune des nouveau-nés^{295,296}, plusieurs études ont montré que les infections à *P. falciparum* au premier trimestre de grossesse étaient beaucoup plus responsables des anémies maternelles, des faibles poids de naissance et des retards de croissance intra utérin³³⁵.

Dans notre étude les infections maternelles à *P. falciparum*, ont été déterminées par microscopie. Plusieurs études ont rapporté que dans les zones d'endémie palustre, une forte proportion d'individus hébergeant des parasites indétectables par microscopie, mais qui peuvent néanmoins être détecté à l'aide d'outils moléculaires tels que la PCR^{336,337}. Avec une détermination des infections à *P. falciparum* par la microscopie dans notre étude, nous avons certainement sous évalué l'importance des infections submicroscopiques et par conséquence mal identifié avec précision tous les enfants exposés au paludisme gestationnel.

PARTIE V : CONCLUSION ET PERSPECTIVES



En conclusion notre travail a permis d'infirmer l'intérêt de la PCT au cordon pour le diagnostic du sepsis néonatal en Afrique sub-saharienne. Toutefois nos résultats suggèrent que la combinaison de deux autres biomarqueurs, le CD74 et l'IP-10 ont une haute valeur pronostic et diagnostic pour le sepsis néonatal.

Ces deux biomarqueurs représentent deux facettes de la réponse aux antigènes que sont la présentation de ceux-ci et la réponse induite par l'IFN- γ . L'intérêt de ces biomarqueurs est d'autant plus grand qu'ils signent une réponse protéique et transcriptionnelle. L'utilisation du CD74 et de l'IP-10 dans le diagnostic du sepsis néonatal, permet d'interpréter l'état d'immunosuppression associé aux infections et plus particulièrement chez le nouveau-né. L'utilisation de différents biomarqueurs ciblant tant la réponse que l'état immunitaire est actuellement un domaine d'étude important dans le monde du diagnostic des infections chez l'homme. Par exemple, Wong et collaborateurs ont identifiés douze biomarqueurs pronostiques du sepsis chez des patients pédiatriques présentant un choc septique en utilisant le profil de l'expression génomique³³⁸. Combinés avec l'âge des enfants, cinq de ces biomarqueurs (CCL3, IL8, GZMB, HSPA1B, et MMP8) rassemblés sous l'appellation PERSEVERE (PEdiatRIC SEpsis biomarkER Risk modEl), sont prédictifs de la mortalité. L'arbre de décision comprenant les cinq biomarqueurs a une sensibilité à la mortalité de 93% et une valeur prédictive négative de 99%³³⁸. Nos données renforcent l'importance d'une analyse multiparamétrique incluant aussi bien biomarqueurs protéiques, transcriptomiques et peut être métabolomiques, dans la caractérisation phénotypique des syndromes infectieux.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons montré qu'un épissage alternatif de MD-2 semblait être lié à la présence de facteurs de risques d'infections materno-fœtales. Ainsi, nous avons montré chez les nourrissons nés de mères portant des facteurs de risque d'infections présentent un épissage alternatif et une expression de l'isoforme courte de MD-2 (MD-2Short), sans que celui-ci ne soit affecté par une exposition *in utero* aux antigènes de *P. falciparum*.

A notre connaissance, chez les patients septiques c'est la première fois que l'on identifie la présence d'une modulation des isoformes de MD-2. Le rôle et la fonctionnalité des isoformes courtes de MD-2 ne sont pas encore connus. Cependant, selon les travaux de Gray, les isoformes courtes de MD-2 sont des composantes de la régulation négative de la voie de signalisation TLR4²⁶⁸. Ainsi nos données avec celles de la littérature suggèrent que l'épissage du complexe MD-2/TLR4 peut jouer un rôle important dans la modulation de la réponse aux infections chez le nouveau-né. Plusieurs questions en lien avec les caractéristiques de la réponse immune néonatales sont ouvertes. Par exemple, il est bien démontré que la réponse pro-inflammatoire, caractérisée entre autre par la sécrétion de différentes cytokines tels que l'IL-1beta, l'IL-

6, l'IL-8 et le TNF-alpha, était altérée chez les nouveau-nés et ce d'autant plus qu'ils sont nés prématurément ³³⁹. Il n'est donc pas exclu que la présence de MD-2SH participe à l'altération, ou la régulation de la réponse anti-infectieuse néonatales, ceci plus spécifiquement aux bactéries à Gram négatif expliquant la très grande susceptibilité des prématurés à ce type d'infection.

Paradoxalement, il a aussi été montré que les nouveau-nés à terme présentaient un déséquilibre de la balance pro/anti inflammatoire en réponse aux infections aux bactéries à Gram négatif et positif et ce avec des profils hyper-inflammatoires ³⁴⁰. Les travaux de Levy et al ont montré que l'altération de la signalisation par l'adénosine chez le nouveau-né serait impliquée dans une perte de l'inhibition de la production de TNF- α à médiation TLR ³⁴⁰. Nous pouvons donc imaginer que ce déséquilibre dans la réponse soit aussi dû à un épissage alternatif de MD-2, et ce spécifique à certaines conditions cliniques tels que la présence d'un risque infectieux périnatal. Nos travail confirme les données préliminaires sur la régulation de l'expression de MD-2, ou Tissières et al ont bien démontré l'importance des facteurs de régulation transcriptionnel (IL-6, PU.1, CAAT/enhancer-binding protein β) impliquées dans la réponse de phase aigüe ²⁷¹. Toutefois les mécanismes précis de régulation de l'épissage de MD-2 sont actuellement inconnus.

Dès lors notre travail met en évidence deux complexes immunitaires impliqués dans la réponse au sepsis néonatal : CD74 et la présentation des antigènes, IP-10 et la réponse interféron- γ ainsi que l'épissage du complexe de reconnaissance des endotoxines MD-2/TLR4 à travers la modulation de l'isoforme MD-2SH.

Les perspectives seraient de continuer à exploiter la biobanque de cette cohorte du projet SEPSIS du Bénin afin de mieux explorer le rôle des expositions *in utero* aux antigènes de *P. falciparum* dans la réponse immunitaire du nouveau-né aux infections néonatales. Nous proposons dans un premier temps 1) une analyse détaillée du transcriptome et du spliceosome qui semble nécessaire afin de mieux préciser les mécanismes adaptatifs de la réponse anti-infectieuse chez le nouveau-né. Cette approche pourrait être complétée par une étude plus globale en fonction de l'âge. Nous serons attentifs aux variations de d'expression des autres TLRs (TLR1, TLR2, TLR5, TLR6 et TLR9) du fait de leur rôle dans la réponse anti palustre et antibactérienne. D'autre part 2) nous avons prévu d'analyser plus spécifiquement les phénotypes cellulaires observés chez les nouveau-nés de notre cohorte. Mais ceci est autre histoire !

REFERENCES



1. UNICEF W, World Bank, UN-DESA Population Division. Levels and trends in child mortality report 2019. 2019;52.
2. Akombi BJ, Renzaho AM. Perinatal Mortality in Sub-Saharan Africa: A Meta-Analysis of Demographic and Health Surveys. *Ann Glob Health* 2019;85.
3. Luciano AA, Arbona-Ramirez IM, Ruiz R, et al. Alterations in regulatory T cell subpopulations seen in preterm infants. *PLoS One* 2014;9:e95867.
4. Sharma AA, Jen R, Brant R, et al. Hierarchical maturation of innate immune defences in very preterm neonates. *Neonatology* 2014;106:1-9.
5. Lavoie PM, Huang Q, Jollette E, et al. Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. *J Infect Dis* 2010;202:1754-63.
6. Mukhopadhyay S, Dukhovny D, Mao W, Eichenwald EC, Puopolo KM. 2010 perinatal GBS prevention guideline and resource utilization. *Pediatrics* 2014;133:196-203.
7. Tissieres P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, et al. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon-gamma. *PLoS One* 2012;7:e32863.
8. Glaser K, Speer CP. Toll-like receptor signaling in neonatal sepsis and inflammation: a matter of orchestration and conditioning. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9:1239-52.
9. Sharma AA, Jen R, Butler A, Lavoie PM. The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area. *Clin Immunol* 2012;145:61-8.
10. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2010;126:443-56.
11. Troger B, Muller T, Faust K, et al. Intrauterine growth restriction and the innate immune system in preterm infants of ≤ 32 weeks gestation. *Neonatology* 2013;103:199-204.
12. Vongbhavit K, Itdhi S, Panburana J, Prommalikit O. Early Onset Neonatal Sepsis Due to *Salmonella enterica* Serovar 4,5,12:i:-: A Case Report with Literature Review. *J Med Assoc Thai* 2015;98 Suppl 10:S143-6.
13. Neu J, Mihatsch WA, Zegarra J, Supapannachart S, Ding ZY, Murguia-Peniche T. Intestinal mucosal defense system, Part 1. Consensus recommendations for immunonutrients. *The Journal of pediatrics* 2013;162:S56-63.
14. Sherman MP, Minnerly J, Curtiss W, Rangwala S, Kelley ST. Research on neonatal microbiomes: what neonatologists need to know. *Neonatology* 2014;105:14-24.
15. Sherman MP, Zaghoulani H, Niklas V. Gut microbiota, the immune system, and diet influence the neonatal gut-brain axis. *Pediatric research* 2015;77:127-35.
16. Dauby N, Goetghebuer T, Kollmann TR, Levy J, Marchant A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect Dis* 2012;12:330-40.

17. Labeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e442.
18. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, et al. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. *J Infect Dis* 2000;181:1740-5.
19. Takem EN, D'Alessandro U. Malaria in pregnancy. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013;5:e2013010.
20. Milner DA, Jr. Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8.
21. Rota C, Carles D, Schaeffer V, Guyon F, Saura R, Horovitz J. [Perinatal prognosis of pregnancies complicated by placental chronic intervillitis]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 2006;35:711-9.
22. Le Hesran JY, Cot M, Personne P, et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. *Am J Epidemiol* 1997;146:826-31.
23. Rachas A, Le Port A, Cottrell G, et al. Placental Malaria is Associated With Increased Risk of Nonmalaria Infection During the First 18 Months of Life in a Beninese Population. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012.
24. Brustoski K, Kramer M, Moller U, Kremsner PG, Luty AJ. Neonatal and maternal immunological responses to conserved epitopes within the DBL-gamma3 chondroitin sulfate A-binding domain of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun* 2005;73:7988-95.
25. Mackroth MS, Malhotra I, Mungai P, Koech D, Muchiri E, King CL. Human cord blood CD4+CD25hi regulatory T cells suppress prenatally acquired T cell responses to *Plasmodium falciparum* antigens. *J Immunol* 2011;186:2780-91.
26. Gbedande K, Varani S, Ibitokou S, et al. Malaria modifies neonatal and early-life toll-like receptor cytokine responses. *Infect Immun* 2013;81:2686-96.
27. Lawn JE, Blencowe H, Oza S, et al. Every Newborn: progress, priorities, and potential beyond survival. *Lancet* 2014;384:189-205.
28. Giannoni E, Agyeman PKA, Stocker M, et al. Neonatal Sepsis of Early Onset, and Hospital-Acquired and Community-Acquired Late Onset: A Prospective Population-Based Cohort Study. *J Pediatr* 2018;201:106-14 e4.
29. Stocker M, van Herk W, El Helou S, et al. Procalcitonin-guided decision making for duration of antibiotic therapy in neonates with suspected early-onset sepsis: a multicentre, randomised controlled trial (NeoPIIns). *Lancet* 2017;390:871-81.
30. Hood M, Janney A, Dameron G. Beta hemolytic streptococcus group B associated with problems of the perinatal period. *Am J Obstet Gynecol* 1961;82:809-18.
31. Najeeb S, Gillani S, Rizvi SK, Ullah R, ur Rehman A. Causative bacteria and antibiotic resistance in neonatal sepsis. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2012;24:131-4.
32. Randis TM, Rice MM, Myatt L, et al. Incidence of early-onset sepsis in infants born to women with clinical chorioamnionitis. *J Perinat Med* 2018;46:926-33.

33. Sharma CM, Agrawal RP, Sharan H, Kumar B, Sharma D, Bhatia SS. "Neonatal Sepsis": Bacteria & their Susceptibility Pattern towards Antibiotics in Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Diagn Res* 2013;7:2511-3.
34. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:21-47.
35. El-Amir MI, El-Feky MA, Abo Elwafa DA, Abd-Elmawgood EA. Rapid diagnosis of neonatal sepsis by PCR for detection of 16S rRNA gene, while blood culture and PCR results were similar in E.coli-predominant EOS cases. *Infect Drug Resist* 2019;12:2703-10.
36. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, et al. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatr Neonatol* 2016;57:265-73.
37. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA* 2004;292:2357-65.
38. Tolsma KW, Allred EN, Chen ML, Duker J, Leviton A, Dammann O. Neonatal bacteremia and retinopathy of prematurity: the ELGAN study. *Arch Ophthalmol* 2011;129:1555-63.
39. Seale AC, Blencowe H, Manu AA, et al. Estimates of possible severe bacterial infection in neonates in sub-Saharan Africa, south Asia, and Latin America for 2012: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014;14:731-41.
40. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med* 2018;6:223-30.
41. Velaphi SC, Westercamp M, Moleleki M, et al. Surveillance for incidence and etiology of early-onset neonatal sepsis in Soweto, South Africa. *PLoS One* 2019;14:e0214077.
42. Medugu N, Iregbu K, Iroh Tam PY, Obaro S. Aetiology of neonatal sepsis in Nigeria, and relevance of Group b streptococcus: A systematic review. *PLoS One* 2018;13:e0200350.
43. Jiang Z, Ye GY. 1:4 matched case-control study on influential factor of early onset neonatal sepsis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:2460-6.
44. Santos RP, Tristram D. A practical guide to the diagnosis, treatment, and prevention of neonatal infections. *Pediatr Clin North Am* 2015;62:491-508.
45. Nath S, Hardelid P, Zylbersztejn A. Are infant mortality rates increasing in England? The effect of extreme prematurity and early neonatal deaths. *J Public Health (Oxf)* 2020.
46. McGuire W, Clerihew L, Fowlie PW. Infection in the preterm infant. *BMJ* 2004;329:1277-80.
47. Hornik CP, Fort P, Clark RH, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev* 2012;88 Suppl 2:S69-74.

48. Kielar M, Tokarz A, Dumnicka P, Maraj M, Burzynska B, Stepniewski S. Parechovirus and enterovirus infections in neonates. *Folia Med Cracov* 2019;59:37-47.
49. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues. *Pediatrics* 2011;127:817-26.
50. Shane AL, Sanchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet* 2017;390:1770-80.
51. Softic I, Tahirovic H, Di Ciommo V, Auriti C. Bacterial sepsis in neonates: Single centre study in a Neonatal intensive care unit in Bosnia and Herzegovina. *Acta Med Acad* 2017;46:7-15.
52. Pinninti SG, Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatr Clin North Am* 2013;60:351-65.
53. Looker KJ, Magaret AS, May MT, et al. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. *Lancet Glob Health* 2017;5:e300-e9.
54. Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am* 2013;60:367-89.
55. T GE, Moges F, Eshetie S, Yeshitela B, Abate E. Bacterial etiologic agents causing neonatal sepsis and associated risk factors in Gondar, Northwest Ethiopia. *BMC Pediatr* 2017;17:137.
56. Ouedraogo SO, Meda D, Dao L, et al. [Factors associated with death in newborns suspected of bacterial infections in Pediatric Teaching Hospital of Charles de Gaulle in Ouagadougou, Burkina Faso]. *Pan Afr Med J* 2016;24:7.
57. Abdel-Wahab F, Ghoneim M, Khashaba M, El-Gilany AH, Abdel-Hady D. Nosocomial infection surveillance in an Egyptian neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2013;83:196-9.
58. Furuichi M, Miyairi I. Risk factors for persistent bacteremia in infants with catheter-related bloodstream infection due to coagulase-negative Staphylococcus in the neonatal intensive care unit. *J Infect Chemother* 2016;22:785-9.
59. Salman O, Procter SR, McGregor C, et al. Systematic Review on the Acute Cost-of-illness of Sepsis and Meningitis in Neonates and Infants. *Pediatr Infect Dis J* 2020;39:35-40.
60. Kim JK, Chang YS, Sung S, Ahn SY, Park WS. Trends in the incidence and associated factors of late-onset sepsis associated with improved survival in extremely preterm infants born at 23-26 weeks' gestation: a retrospective study. *BMC Pediatr* 2018;18:172.
61. Wynn JL, Scumpia PO, Delano MJ, et al. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. *Shock* 2007;28:675-83.
62. Acunas BA, Peakman M, Liossis G, et al. Effect of fresh frozen plasma and gammaglobulin on humoral immunity in neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1994;70:F182-7.
63. Grosu N, Ciobanu M. [Prematurity--a risk factor in neonatal morbidity and mortality]. *Viata Med Rev Inf Prof Stiint Cadrelor Medii Sanit* 1987;35:203-4.
64. Stimac M, Juretic E, Vukelic V, Matasic NP, Kos M, Babic D. Effect of chorioamnionitis on mortality, early onset neonatal sepsis and bronchopulmonary

dysplasia in preterm neonates with birth weight of < 1,500 grams. *Coll Antropol* 2014;38:167-71.

65. Suryavanshi A, Kalra R. Study of Association of C-Reactive Protein with Maternal Chorioamnionitis and Early-Onset Neonatal Sepsis in Premature Rupture of Membranes Deliveries: A Diagnostic Dilemma. *Int J Appl Basic Med Res* 2019;9:236-40.

66. Boghossian NS, Geraci M, Lorch SA, Phibbs CS, Edwards EM, Horbar JD. Racial and Ethnic Differences Over Time in Outcomes of Infants Born Less Than 30 Weeks' Gestation. *Pediatrics* 2019;144.

67. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun* 2020;11:3572.

68. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-7.

69. Wynn JL, Guthrie SO, Wong HR, et al. Postnatal Age Is a Critical Determinant of the Neonatal Host Response to Sepsis. *Mol Med* 2015;21:496-504.

70. Schuller SS, Kramer BW, Villamor E, Spittler A, Berger A, Levy O. Immunomodulation to Prevent or Treat Neonatal Sepsis: Past, Present, and Future. *Front Pediatr* 2018;6:199.

71. ANAES Sdrerp. Diagnostic et traitement curatif de l'infection bactérienne précoce du nouveau-né 2002.

72. Iroh Tam PY, Bendel CM. Diagnostics for neonatal sepsis: current approaches and future directions. *Pediatr Res* 2017;82:574-83.

73. Shah AJ, Mulla SA, Revdiwala SB. Neonatal sepsis: high antibiotic resistance of the bacterial pathogens in a neonatal intensive care unit of a tertiary care hospital. *J Clin Neonatol* 2012;1:72-5.

74. Abzug MJ. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr Drugs* 2004;6:1-10.

75. Adatara P, Afaya A, Salia SM, et al. Risk Factors Associated with Neonatal Sepsis: A Case Study at a Specialist Hospital in Ghana. *ScientificWorldJournal* 2019;2019:9369051.

76. Tuzun F, Ozkan H, Cetinkaya M, et al. Is European Medicines Agency (EMA) sepsis criteria accurate for neonatal sepsis diagnosis or do we need new criteria? *PLoS One* 2019;14:e0218002.

77. English M, Ngama M, Mwalekwa L, Peshu N. Signs of illness in Kenyan infants aged less than 60 days. *Bull World Health Organ* 2004;82:323-9.

78. Kayange N, Kamugisha E, Mwizamholya DL, Jeremiah S, Mshana SE. Predictors of positive blood culture and deaths among neonates with suspected neonatal sepsis in a tertiary hospital, Mwanza-Tanzania. *BMC Pediatr* 2010;10:39.

79. Klingenberg C, Olomi R, Oneko M, Sam N, Langeland N. Neonatal morbidity and mortality in a Tanzanian tertiary care referral hospital. *Ann Trop Paediatr* 2003;23:293-9.

80. Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr* 1996;129:275-8.

81. Hornik CP, Benjamin DK, Becker KC, et al. Use of the complete blood cell count in early-onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:799-802.
82. Bhandari V, Wang C, Rinder C, Rinder H. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. *Pediatrics* 2008;121:129-34.
83. Ng PC, Lam HS. Biomarkers for late-onset neonatal sepsis: cytokines and beyond. *Clin Perinatol* 2010;37:599-610.
84. Salazar J, Martinez MS, Chavez-Castillo M, et al. C-Reactive Protein: An In-Depth Look into Structure, Function, and Regulation. *Int Sch Res Notices* 2014;2014:653045.
85. Kawai T. [Inflammatory markers, especially the mechanism of increased CRP]. *Rinsho Byori* 2000;48:719-21.
86. Savas EM, Oguz SH, Samadi A, et al. Apoptosis Inhibitor of Macrophage, Monocyte Chemotactic Protein-1, and C-Reactive Protein Levels Are Increased in Patients with Metabolic Syndrome: A Pilot Study. *Metab Syndr Relat Disord* 2020.
87. Vincent JL, Donadello K, Schmit X. Biomarkers in the critically ill patient: C-reactive protein. *Crit Care Clin* 2011;27:241-51.
88. Abdollahi A, Shoar S, Nayyeri F, Shariat M. Diagnostic Value of Simultaneous Measurement of Procalcitonin, Interleukin-6 and hs-CRP in Prediction of Early-Onset Neonatal Sepsis. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4:e2012028.
89. Ehl S, Gehring B, Pohlandt F. A detailed analysis of changes in serum C-reactive protein levels in neonates treated for bacterial infection. *Eur J Pediatr* 1999;158:238-42.
90. Hisamuddin E, Hisam A, Wahid S, Raza G. Validity of C-reactive protein (CRP) for diagnosis of neonatal sepsis. *Pak J Med Sci* 2015;31:527-31.
91. Benitz WE, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* 1998;102:E41.
92. Ng PC, Lee CH, Fok TF, et al. Central nervous system candidiasis in preterm infants: limited value of biochemical markers for diagnosis. *J Paediatr Child Health* 2000;36:509-10.
93. Rhodes B, Furnrohr BG, Vyse TJ. C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:282-9.
94. Elbirt D, Frenkel Rubin M, Ergaz D, Sthoeger Z. [Procalcitonin--a specific marker for severe bacterial infection and sepsis]. *Harefuah* 2001;140:343-6.
95. Florianczyk B. Structure and diagnostic value of procalcitonin. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* 2003;58:338-42.
96. Vasilcan G, Avasiloaiei A, Moscalu M, Dimitriu AG, Stamatin M. [Procalcitonine--early marker of neonatal infection]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2011;115:1243-50.
97. Mathur NB, Behera B. Blood Procalcitonin Levels and Duration of Antibiotics in Neonatal Sepsis. *J Trop Pediatr* 2019;65:315-20.
98. Ballot DE, Perovic O, Galpin J, Cooper PA. Serum procalcitonin as an early marker of neonatal sepsis. *S Afr Med J* 2004;94:851-4.
99. Vouloumanou EK, Plessa E, Karageorgopoulos DE, Mantadakis E, Falagas ME. Serum procalcitonin as a diagnostic marker for neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2011;37:747-62.

100. Altunhan H, Annagur A, Ors R, Mehmetoglu I. Procalcitonin measurement at 24 hours of age may be helpful in the prompt diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Int J Infect Dis* 2011;15:e854-8.
101. Benitz WE. Adjunct laboratory tests in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 2010;37:421-38.
102. Watkin RW, Harper LV, Vernallis AB, et al. Pro-inflammatory cytokines IL6, TNF-alpha, IL1beta, procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and C-reactive protein in infective endocarditis. *J Infect* 2007;55:220-5.
103. Shahkar L, Keshtkar A, Mirfazeli A, Ahani A, Roshandel G. The role of IL-6 for predicting neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Iran J Pediatr* 2011;21:411-7.
104. Mishra UK, Jacobs SE, Doyle LW, Garland SM. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F208-12.
105. Hu J, Du PF, Bei DD. [Diagnostic value of interleukin 6 for neonatal sepsis: a Meta analysis]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2015;17:1176-82.
106. Cernada M, Badia N, Modesto V, et al. Cord blood interleukin-6 as a predictor of early-onset neonatal sepsis. *Acta Paediatr* 2012;101:e203-7.
107. Wang ZL, Yu JL. [Recent progress in the diagnosis of neonatal septicemia]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2013;15:236-41.
108. Fukuda H, Masuzaki H, Ishimaru T. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in amniotic fluid and cord blood in patients with pre-term, premature rupture of the membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;77:123-9.
109. Dollner H, Vatten L, Austgulen R. Early diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6, soluble tumour necrosis factor receptors and soluble adhesion molecules. *J Clin Epidemiol* 2001;54:1251-7.
110. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res* 2014;2:288-94.
111. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* 2011;89:207-15.
112. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res* 2011;317:620-31.
113. Delano MJ, Moldawer LL. CXCR3 blockade: a novel anti-sepsis approach? *Crit Care* 2012;16:176.
114. Chan T, Gu F. Early diagnosis of sepsis using serum biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn* 2011;11:487-96.
115. Thair SA, Walley KR, Nakada TA, et al. A single nucleotide polymorphism in NF-kappaB inducing kinase is associated with mortality in septic shock. *J Immunol* 2011;186:2321-8.
116. Chen HL, Hung CH, Tseng HI, et al. Plasma IP-10 as a predictor of serious bacterial infection in infants less than 4 months of age. *J Trop Pediatr* 2011;57:145-51.
117. van den Borne P, Quax PH, Hoefer IE, Pasterkamp G. The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *Biomed Res Int* 2014;2014:893106.

118. Foey AD, Parry SL, Williams LM, Feldmann M, Foxwell BM, Brennan FM. Regulation of monocyte IL-10 synthesis by endogenous IL-1 and TNF- α : role of the p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 1998;160:920-8.
119. Capsoni F, Minonzio F, Mariani C, Ongari AM, Bonara P, Fiorelli G. Development of phagocytic function of cultured human monocytes is regulated by cell surface IL-10. *Cell Immunol* 1998;189:51-9.
120. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* 2009;15:277-84.
121. Li C, Corraliza I, Langhorne J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. *Infect Immun* 1999;67:4435-42.
122. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212:28-50.
123. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;103:131-6.
124. Li X, Xu Z, Pang X, et al. Interleukin-10/lymphocyte ratio predicts mortality in severe septic patients. *PLoS One* 2017;12:e0179050.
125. Amir O, Rogowski O, David M, Lahat N, Wolff R, Lewis BS. Circulating interleukin-10: association with higher mortality in systolic heart failure patients with elevated tumor necrosis factor- α . *Isr Med Assoc J* 2010;12:158-62.
126. Ye Q, Du LZ, Shao WX, Shang SQ. Utility of cytokines to predict neonatal sepsis. *Pediatr Res* 2017;81:616-21.
127. Boskabadi H, Maamouri G, Tavakol Afshari J, et al. Evaluation of serum interleukins-6, 8 and 10 levels as diagnostic markers of neonatal infection and possibility of mortality. *Iran J Basic Med Sci* 2013;16:1232-7.
128. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr* 2001;160:345-50.
129. Penalzoza HF, Schultz BM, Nieto PA, et al. Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016;32:17-30.
130. Xu J, Ban Y, Wan Z, et al. CD64 Expression on Polymorph Nuclear Cells as a Sensitive and Specific Diagnostic Biomarker for Neonate Pneumonia. *Clin Lab* 2019;65.
131. 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. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017;30:1709-14.
132. Tamulyte S, Kopplin J, Brenner T, Weigand MA, Uhle F. Monocyte HLA-DR Assessment by a Novel Point-of-Care Device Is Feasible for Early Identification of ICU Patients With Complicated Courses-A Proof-of-Principle Study. *Front Immunol* 2019;10:432.
133. S EL, Mohamed W, I EL, Bahagat K. Role of Neutrophil CD11b Expression in Diagnosis of Early- Onset Neonatal Sepsis in Full -Term Infant. *Clin Exp Pediatr* 2020.

134. Dai J, Jiang W, Min Z, et al. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker for neonatal sepsis: Meta-analysis. *Adv Clin Exp Med* 2017;26:327-32.
135. Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, et al. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:777-81.
136. Lynema S, Marmer D, Hall ES, Meinzen-Derr J, Kingma PS. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker of sepsis: impact on neonatal care. *Am J Perinatol* 2015;32:331-6.
137. Sheneef A, Mohamed T, Boraey NF, Mohammed MA. Neutrophil CD11b, CD64 and Lipocalin-2: Early Diagnostic Markers of Neonatal Sepsis. *Egypt J Immunol* 2017;24:29-36.
138. Cheron A, Monneret G, Landelle C, Floccard B, Allaouchiche B. [Low monocytic HLA-DR expression and risk of secondary infection]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2010;29:368-76.
139. Stortz JA, Murphy TJ, Raymond SL, et al. Evidence for Persistent Immune Suppression in Patients Who Develop Chronic Critical Illness After Sepsis. *Shock* 2018;49:249-58.
140. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence* 2014;5:45-56.
141. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect* 2010;60:224-8.
142. Wong HR, Salisbury S, Xiao Q, et al. The pediatric sepsis biomarker risk model. *Crit Care* 2012;16:R174.
143. Wong HR, Cvijanovich NZ, Anas N, et al. Pediatric Sepsis Biomarker Risk Model-II: Redefining the Pediatric Sepsis Biomarker Risk Model With Septic Shock Phenotype. *Crit Care Med* 2016;44:2010-7.
144. Jacobs L, Berrens Z, Stenson EK, et al. The Pediatric Sepsis Biomarker Risk Model (PERSEVERE) Biomarkers Predict Clinical Deterioration and Mortality in Immunocompromised Children Evaluated for Infection. *Sci Rep* 2019;9:424.
145. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mouglin B, Monneret G. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol Lett* 2006;106:63-71.
146. Friggeri A, Cazalis MA, Pachot A, et al. Decreased CX3CR1 messenger RNA expression is an independent molecular biomarker of early and late mortality in critically ill patients. *Crit Care* 2016;20:204.
147. Cazalis MA, Friggeri A, Cave L, et al. Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Crit Care* 2013;17:R287.
148. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol* 2008;180:6421-9.
149. Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:171-97.

150. White GE, McNeill E, Channon KM, Greaves DR. Fractalkine promotes human monocyte survival via a reduction in oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:2554-62.
151. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-4.
152. de Bont ES, Martens A, van Raan J, et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 1993;33:380-3.
153. Lee M, Lee Y, Song J, Lee J, Chang SY. Tissue-specific Role of CX3CR1 Expressing Immune Cells and Their Relationships with Human Disease. *Immune Netw* 2018;18:e5.
154. Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, et al. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:837-46.
155. Ge XY, Fang SP, Zhou M, et al. TLR4-dependent internalization of CX3CR1 aggravates sepsis-induced immunoparalysis. *Am J Transl Res* 2016;8:5696-705.
156. Zhivaki D, Lemoine S, Lim A, et al. Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity. *Immunity* 2017;46:301-14.
157. Moller P, Moldenhauer G. Cd74. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000;14:299-301.
158. Stein R, Mattes MJ, Cardillo TM, et al. CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res* 2007;13:5556s-63s.
159. Farr L, Ghosh S, Moonah S. Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair. *Front Immunol* 2020;11:1273.
160. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:345-50.
161. Roger T, Froidevaux C, Martin C, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Endotoxin Res* 2003;9:119-23.
162. Peronnet E, Venet F, Maucourt-Boulch D, et al. Association between mRNA expression of CD74 and IL10 and risk of ICU-acquired infections: a multicenter cohort study. *Intensive Care Med* 2017;43:1013-20.
163. Schroder B. The multifaceted roles of the invariant chain CD74--More than just a chaperone. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:1269-81.
164. Cagno CK, Pettit JM, Weiss BD. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: updated CDC guideline. *Am Fam Physician* 2012;86:59-65.
165. Committee on Infectious D, Committee on F, Newborn, Baker CJ, Byington CL, Polin RA. Policy statement-Recommendations for the prevention of perinatal group B streptococcal (GBS) disease. *Pediatrics* 2011;128:611-6.
166. Shane AL, Stoll BJ. Recent developments and current issues in the epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 2013;30:131-41.

167. Pascal BOILEAU CG-LG, Laurence FOIX-L' HELIAS et le groupe de travail des Recommandations pour la pratique clinique HAS 2017 « Prise en charge du nouveau-né à risque d' infection néonatale bactérienne précoce (≥ 34 SA) »*. De nouvelles recommandations pour la prise en charge de l'infection néonatale bactérienne précoce chez le nouveau-né. 2018.
168. Frischknecht F, Matuschewski K. Plasmodium Sporozoite Biology. Cold Spring Harb Perspect Med 2017;7.
169. Combemorel P. Le cycle de vie de Plasmodium falciparum. planet-vie 2019.
170. WHO. World malaria report 2020. 2020:299.
171. Macarayan E, Papanicolas I, Jha A. The quality of malaria care in 25 low-income and middle-income countries. BMJ Glob Health 2020;5:e002023.
172. Jones CO, Williams HA. The social burden of malaria: what are we measuring? Am J Trop Med Hyg 2004;71:156-61.
173. A.S. Kouadio GC, Brigit Obrist, Kaspar Wyss et J. Zingsstag. Fardeau économique du paludisme sur les ménages démunis des quartiers défavorisés d'Abidjan, Côte d'Ivoire. 2006.
174. Elizabeth AA, P; Charles; JWoodrow. Malaria. The Lancet 2018;Volume 391:1608-21
175. Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. Malar J 2006;5:85.
176. Watermeyer JM, Hale VL, Hackett F, et al. A spiral scaffold underlies cytoadherent knobs in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Blood 2016;127:343-51.
177. Atkinson CT, Aikawa M, Perry G, et al. Ultrastructural localization of erythrocyte cytoskeletal and integral membrane proteins in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Eur J Cell Biol 1988;45:192-9.
178. Kraemer SM, Smith JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. Curr Opin Microbiol 2006;9:374-80.
179. Cooke B, Coppel R, Wahlgren M. Falciparum malaria: sticking up, standing out and out-standing. Parasitol Today 2000;16:416-20.
180. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (Plasmodium knowlesi) malaria: Duffy blood group determinants. Science 1975;189:561-3.
181. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, et al. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency. Blood 1998;92:2527-34.
182. Luzzatto L. Sick cell anaemia and malaria. Mediterr J Hematol Infect Dis 2012;4:e2012065.
183. Moller AS, Ovstebo R, Haug KB, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. Chemokine production and pattern recognition receptor (PRR) expression in whole blood stimulated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Cytokine 2005;32:304-15.

184. Barreiro LB, Ben-Ali M, Quach H, et al. Evolutionary dynamics of human Toll-like receptors and their different contributions to host defense. *PLoS Genet* 2009;5:e1000562.
185. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol* 2018;9:3006.
186. Dunst J, Azzouz N, Liu X, Tsukita S, Seeberger PH, Kamena F. Interaction between Plasmodium Glycosylphosphatidylinositol and the Host Protein Moesin Has No Implication in Malaria Pathology. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:183.
187. Ropert C, Gazzinelli RT. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:395-403.
188. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 2005;280:8606-16.
189. Durai P, Govindaraj RG, Choi S. Structure and dynamic behavior of Toll-like receptor 2 subfamily triggered by malarial glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum. *FEBS J* 2013;280:6196-212.
190. Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med* 1993;177:145-53.
191. Zhu J, Krishnegowda G, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem* 2005;280:8617-27.
192. Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 1996;156:1886-96.
193. Omodeo-Sale F, Motti A, Dondorp A, White NJ, Taramelli D. Destabilisation and subsequent lysis of human erythrocytes induced by Plasmodium falciparum haem products. *Eur J Haematol* 2005;74:324-32.
194. Coban C, Ishii KJ, Kawai T, et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005;201:19-25.
195. Kalantari P, DeOliveira RB, Chan J, et al. Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep* 2014;6:196-210.
196. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1919-24.

197. Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J Immunol* 2010;184:4338-48.
198. Hirako IC, Gallego-Marin C, Ataide MA, et al. DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14⁺ CD16⁺ CD64^{high} CD32^{low} Inflammatory Monocytes from Malaria Patients. *mBio* 2015;6:e01605-15.
199. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 2014;14:744-57.
200. Liehl P, Zuzarte-Luis V, Chan J, et al. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat Med* 2014;20:47-53.
201. Baccarella A, Fontana MF, Chen EC, Kim CC. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. *Infect Immun* 2013;81:4431-42.
202. Maltha J, Gillet P, Jacobs J. Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:399-407.
203. WHO. Global Health Observatory (GHO) data. 2018.
204. Coppi A, Natarajan R, Pradel G, et al. The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *J Exp Med* 2011;208:341-56.
205. Mahmoudi S, Keshavarz H. Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13:2098-101.
206. Moore KA, Simpson JA, Scoullar MJL, McGready R, Fowkes FJI. Quantification of the association between malaria in pregnancy and stillbirth: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017;5:e1101-e12.
207. Moore KA, Fowkes FJI, Wiladphaingern J, et al. Mediation of the effect of malaria in pregnancy on stillbirth and neonatal death in an area of low transmission: observational data analysis. *BMC Med* 2017;15:98.
208. Rachas A, Le Port A, Cottrell G, et al. Placental malaria is associated with increased risk of nonmalaria infection during the first 18 months of life in a Beninese population. *Clin Infect Dis* 2012;55:672-8.
209. Sylvester B, Gasarasi DB, Aboud S, et al. Prenatal exposure to Plasmodium falciparum increases frequency and shortens time from birth to first clinical malaria episodes during the first two years of life: prospective birth cohort study. *Malar J* 2016;15:379.
210. Hromatka BS, Ngeleza S, Adibi JJ, Niles RK, Tshetu AK, Fisher SJ. Histopathologies, immunolocalization, and a glycan binding screen provide insights into Plasmodium falciparum interactions with the human placenta. *Biol Reprod* 2013;88:154.
211. Ndam NT, Deloron P. Molecular aspects of Plasmodium falciparum Infection during pregnancy. *J Biomed Biotechnol* 2007;2007:43785.
212. Kamaliddin C, Salnot V, Leduc M, et al. PFI1785w: A highly conserved protein associated with pregnancy associated malaria. *PLoS One* 2017;12:e0187817.

213. Salanti A, Dahlback M, Turner L, et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med* 2004;200:1197-203.
214. Viebig NK, Levin E, Dechavanne S, et al. Disruption of var2csa gene impairs placental malaria associated adhesion phenotype. *PLoS One* 2007;2:e910.
215. Gangnard S, Lewit-Bentley A, Dechavanne S, et al. Structure of the DBL3X-DBL4epsilon region of the VAR2CSA placental malaria vaccine candidate: insight into DBL domain interactions. *Sci Rep* 2015;5:14868.
216. Hviid L, Salanti A. VAR2CSA and protective immunity against pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitology* 2007;134:1871-6.
217. Doritchamou JY, Herrera R, Aebig JA, et al. VAR2CSA Domain-Specific Analysis of Naturally Acquired Functional Antibodies to *Plasmodium falciparum* Placental Malaria. *J Infect Dis* 2016;214:577-86.
218. Bordbar B, Tuikue-Ndam N, Bigey P, Doritchamou J, Scherman D, Deloron P. Identification of Id1-DBL2X of VAR2CSA as a key domain inducing highly inhibitory and cross-reactive antibodies. *Vaccine* 2012;30:1343-8.
219. Bigey P, Gnidehou S, Doritchamou J, et al. The NTS-DBL2X region of VAR2CSA induces cross-reactive antibodies that inhibit adhesion of several *Plasmodium falciparum* isolates to chondroitin sulfate A. *J Infect Dis* 2011;204:1125-33.
220. Chene A, Houard S, Nielsen MA, et al. Clinical development of placental malaria vaccines and immunoassays harmonization: a workshop report. *Malar J* 2016;15:476.
221. Nielsen MA, Resende M, de Jongh WA, et al. The Influence of Sub-Unit Composition and Expression System on the Functional Antibody Response in the Development of a VAR2CSA Based *Plasmodium falciparum* Placental Malaria Vaccine. *PLoS One* 2015;10:e0135406.
222. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478-82.
223. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:601-10.
224. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
225. Suguitan AL, Jr., Leke RG, Fouda G, et al. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2003;188:1074-82.
226. Fievet N, Moussa M, Tami G, et al. *Plasmodium falciparum* induces a Th1/Th2 disequilibrium, favoring the Th1-type pathway, in the human placenta. *J Infect Dis* 2001;183:1530-4.
227. Smith JD, Deitsch KW. Pregnancy-associated malaria and the prospects for syndrome-specific antimalaria vaccines. *J Exp Med* 2004;200:1093-7.
228. Tassi Yunga S, Kayatani AK, Fogako J, Leke RJI, Leke RGF, Taylor DW. Timing of the human prenatal antibody response to *Plasmodium falciparum* antigens. *PLoS One* 2017;12:e0184571.

229. Malhotra I, Mungai P, Muchiri E, Kwiek JJ, Meshnick SR, King CL. Umbilical cord-blood infections with *Plasmodium falciparum* malaria are acquired antenatally in Kenya. *J Infect Dis* 2006;194:176-83.
230. Harrington WE, Kanaan SB, Muehlenbachs A, et al. Maternal Microchimerism Predicts Increased Infection but Decreased Disease due to *Plasmodium falciparum* During Early Childhood. *J Infect Dis* 2017;215:1445-51.
231. Tollin M, Bergsson G, Kai-Larsen Y, et al. Vernix caseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2390-9.
232. Rutter N. Clinical consequences of an immature barrier. *Semin Neonatol* 2000;5:281-7.
233. Oranges T, Dini V, Romanelli M. Skin Physiology of the Neonate and Infant: Clinical Implications. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015;4:587-95.
234. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol* 2020;15:493-518.
235. Gentile LF, Moldawer LL. DAMPs, PAMPs, and the origins of SIRS in bacterial sepsis. *Shock* 2013;39:113-4.
236. Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89:F229-35.
237. Kurtoglu S, Caksen H, Hallac IK, Ustunbas HB, Uzum K, Kilic H. Serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels in neonatal sepsis. *Pediatr Emerg Care* 2003;19:219-20.
238. Ng PC, Li K, Wong RP, et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F209-13.
239. Wynn JL, Wong HR. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. *Clin Perinatol* 2010;37:439-79.
240. Sedegah M, Finkelman F, Hoffman SL. Interleukin 12 induction of interferon gamma-dependent protection against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10700-2.
241. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol* 2008;214:211-23.
242. Sikora JP, Chlebna-Sokol D, Krzyzanska-Oberbek A. Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8), cytokine inhibitors (IL-6sR, sTNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in newborns and infants. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001;49:399-404.
243. de Diego JL, Gerold G, Zychlinsky A. Sensing, presenting, and regulating PAMPs. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2007:83-95.
244. Siednienko J, Miggin SM. Expression analysis of the Toll-like receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *Methods Mol Biol* 2009;517:3-14.
245. Fanfano S. structure TLR et IL 1R. 2015
246. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.

247. Binnie A, Tsang JLY, Hu P, Carrasqueiro G, Castelo-Branco P, Dos Santos CC. Epigenetics of Sepsis. *Crit Care Med* 2020;48:745-56.
248. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
249. Anand RJ, Kohler JW, Cavallo JA, Li J, Dubowski T, Hackam DJ. Toll-like receptor 4 plays a role in macrophage phagocytosis during peritoneal sepsis. *J Pediatr Surg* 2007;42:927-32; discussion 33.
250. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines (Basel)* 2017;5.
251. Mukherjee S, Karmakar S, Babu SP. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Braz J Infect Dis* 2016;20:193-204.
252. Guven-Maiorov E, Keskin O, Gursoy A, et al. The Architecture of the TIR Domain Signalosome in the Toll-like Receptor-4 Signaling Pathway. *Sci Rep* 2015;5:13128.
253. Valkov E, Stamp A, Dimaio F, et al. Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14879-84.
254. Lizundia R, Sauter KS, Taylor G, Werling D. Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex. *Innate Immun* 2008;14:223-31.
255. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Pillars Article: Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol.* 1999. 162: 3749-3752. *J Immunol* 2016;197:2563-6.
256. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002;168:554-61.
257. Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. *Semin Immunol* 2004;16:11-6.
258. Re F, Strominger JL. Monomeric recombinant MD-2 binds toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. *J Biol Chem* 2002;277:23427-32.
259. Yamamoto M, Akira S. Lipid A receptor TLR4-mediated signaling pathways. *Adv Exp Med Biol* 2010;667:59-68.
260. Pugin J, Stern-Voefferly S, Daubeuf B, Matthay MA, Elson G, Dunn-Siegrist I. Soluble MD-2 activity in plasma from patients with severe sepsis and septic shock. *Blood* 2004;104:4071-9.
261. Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, Fitzgerald KA. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2014;14:361-76.
262. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 2009;9:692-703.
263. Lim LP, Burge CB. A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11193-8.

264. Wells CA, Chalk AM, Forrest A, et al. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade. *Genome Biol* 2006;7:R10.
265. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.
266. Esposito S, Molteni CG, Zampiero A, et al. Role of polymorphisms of toll-like receptor (TLR) 4, TLR9, toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein (TIRAP) and FCGR2A genes in malaria susceptibility and severity in Burundian children. *Malar J* 2012;11:196.
267. Jaresova I, Rozkova D, Spisek R, Janda A, Brazova J, Sediva A. Kinetics of Toll-like receptor-4 splice variants expression in lipopolysaccharide-stimulated antigen presenting cells of healthy donors and patients with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 2007;9:1359-67.
268. Gray P, Michelsen KS, Sirois CM, et al. Identification of a novel human MD-2 splice variant that negatively regulates Lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Immunol* 2010;184:6359-66.
269. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikachoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2000;165:6682-6.
270. Tissieres P, Dunn-Siegrist I, Schappi M, et al. Soluble MD-2 is an acute-phase protein and an opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 2008;111:2122-31.
271. Tissieres P, Araud T, Ochoda A, Drifte G, Dunn-Siegrist I, Pugin J. Cooperation between PU.1 and CAAT/enhancer-binding protein beta is necessary to induce the expression of the MD-2 gene. *J Biol Chem* 2009;284:26261-72.
272. Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Jones HD, et al. Alternatively spliced myeloid differentiation protein-2 inhibits TLR4-mediated lung inflammation. *J Immunol* 2015;194:1686-94.
273. Cross D, Drury R, Hill J, Pollard AJ. Epigenetics in Sepsis: Understanding Its Role in Endothelial Dysfunction, Immunosuppression, and Potential Therapeutics. *Front Immunol* 2019;10:1363.
274. Odabasi IO, Bulbul A. Neonatal Sepsis. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul* 2020;54:142-58.
275. Kayem ND, Benson C, Aye CYL, et al. Lassa fever in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2020;114:385-96.
276. Yang R, Mei H, Zheng T, et al. Pregnant women with COVID-19 and risk of adverse birth outcomes and maternal-fetal vertical transmission: a population-based cohort study in Wuhan, China. *BMC Med* 2020;18:330.
277. Roberts T, Gravett CA, Velu PP, et al. Epidemiology and aetiology of maternal parasitic infections in low- and middle-income countries. *J Glob Health* 2011;1:189-200.
278. Gbedande K, Fievet N, Viwami F, et al. Clinical development of a VAR2CSA-based placental malaria vaccine PAMVAC: Quantifying vaccine antigen-specific memory B & T cell activity in Beninese primigravidae. *Vaccine* 2017;35:3474-81.

279. King CL, Malhotra I, Wamachi A, et al. Acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in the human fetus. *J Immunol* 2002;168:356-64.
280. Ouedraogo S, Bodeau-Livinec F, Briand V, et al. Malaria and gravidity interact to modify maternal haemoglobin concentrations during pregnancy. *Malar J* 2012;11:348.
281. Meem M, Modak JK, Mortuza R, Morshed M, Islam MS, Saha SK. Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: A systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics. *J Glob Health* 2011;1:201-9.
282. Teggert A, Datta H, Ali Z. Biomarkers for Point-of-Care Diagnosis of Sepsis. *Micromachines (Basel)* 2020;11.
283. Burgess APH, Katz JE, Moretti M, Lakhi N. Risk Factors for Intrapartum Fever in Term Gestations and Associated Maternal and Neonatal Sequelae. *Gynecol Obstet Invest* 2017;82:508-16.
284. Huang J, Qian Y, Gao M, Ding H, Zhang L, Jia R. Analysis of factors related to preterm birth: a retrospective study at Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital in China. *Medicine (Baltimore)* 2020;99:e21172.
285. Rogerson SJ. Management of malaria in pregnancy. *Indian J Med Res* 2017;146:328-33.
286. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007;7:93-104.
287. Broen K, Brustoski K, Engelmann I, Luty AJ. Placental *Plasmodium falciparum* infection: causes and consequences of in utero sensitization to parasite antigens. *Mol Biochem Parasitol* 2007;151:1-8.
288. Odorizzi PM, Jagannathan P, McIntyre TI, et al. In utero priming of highly functional effector T cell responses to human malaria. *Sci Transl Med* 2018;10.
289. Freudenberg MA, Tchaptchet S, Keck S, et al. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. *Immunobiology* 2008;213:193-203.
290. Hodyl NA, Krivanek KM, Lawrence E, Clifton VL, Hodgson DM. Prenatal exposure to a pro-inflammatory stimulus causes delays in the development of the innate immune response to LPS in the offspring. *J Neuroimmunol* 2007;190:61-71.
291. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999;189:1777-82.
292. Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2001;276:38044-51.
293. Kalantari P. The Emerging Role of Pattern Recognition Receptors in the Pathogenesis of Malaria. *Vaccines (Basel)* 2018;6.
294. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004;4:169-80.

295. Adegnika AA, Kohler C, Agnandji ST, et al. Pregnancy-associated malaria affects toll-like receptor ligand-induced cytokine responses in cord blood. *J Infect Dis* 2008;198:928-36.
296. Natama HM, Moncunill G, Rovira-Vallbona E, et al. Modulation of innate immune responses at birth by prenatal malaria exposure and association with malaria risk during the first year of life. *BMC Med* 2018;16:198.
297. McCall MB, Netea MG, Hermesen CC, et al. *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *J Immunol* 2007;179:162-71.
298. Akogbeto M, Modiano D, Bosman A. Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin. *Parassitologia* 1992;34:147-54.
299. Djenontin A, Bio-Bangana S, Moiroux N, et al. Culicidae diversity, malaria transmission and insecticide resistance alleles in malaria vectors in Ouidah-Kpomasse-Tori district from Benin (West Africa): A pre-intervention study. *Parasit Vectors* 2010;3:83.
300. Fievet N, Ezinmegnon S, Agbota G, et al. SEPSIS project: a protocol for studying biomarkers of neonatal sepsis and immune responses of infants in a malaria-endemic region. *BMJ Open* 2020;10:e036905.
301. Mischlinger J, Pitzinger P, Veletzky L, et al. Validity and reliability of methods to microscopically detect and quantify malaria parasitaemia. *Trop Med Int Health* 2018;23:980-91.
302. Seo JW, Yang EJ, Kim SH, Choi IH. An inhibitory alternative splice isoform of Toll-like receptor 3 is induced by type I interferons in human astrocyte cell lines. *BMB Rep* 2015;48:696-701.
303. Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, et al. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 2010;68:323-9.
304. Weitkamp JH, Stuber F, Bartmann P. Pilot study assessing TNF gene polymorphism as a prognostic marker for disease progression in neonates with sepsis. *Infection* 2000;28:92-6.
305. El-Behedy EM, Akeel N, El-Maghraby HM, Shawky A. Serum Level and Genetic Polymorphism of Mannose-Binding Lectin in Infants with Neonatal Sepsis at Zagazig University Hospitals. *Egypt J Immunol* 2019;26:91-9.
306. Redondo AC, Ceccon ME, Silveira-Lessa AL, et al. TLR-2 and TLR-4 expression in monocytes of newborns with late-onset sepsis. *J Pediatr (Rio J)* 2014;90:472-8.
307. Bhattacharyya S, Wang W, Qin W, et al. TLR4-dependent fibroblast activation drives persistent organ fibrosis in skin and lung. *JCI Insight* 2018;3.
308. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001;167:416-23.
309. He X, Xia L, Tumas KC, Wu J, Su XZ. Type I Interferons and Malaria: A Double-Edge Sword Against a Complex Parasitic Disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:594621.

310. Bermick J, Gallagher K, denDekker A, Kunkel S, Lukacs N, Schaller M. Chorioamnionitis exposure remodels the unique histone modification landscape of neonatal monocytes and alters the expression of immune pathway genes. *FEBS J* 2019;286:82-109.
311. Ambe JP, Gasi IS, Mava Y. Review of neonatal infections in University of Maiduguri Teaching Hospital: common bacterial pathogens seen. *Niger J Clin Pract* 2007;10:290-3.
312. Nyenga A, Mukuku O, Mutombo AM, Luboya ON. [Neonatal infections: what is the place of obstetric history in the prevention of risk?]. *Pan Afr Med J* 2014;19:133.
313. Nguefack S, Enyama D, Chiabi A, et al. [Abnormal EEG in pediatric neurology: 500 records at the Maternity and Pediatric Hospital, Yaounde (Cameroon)]. *Pan Afr Med J* 2013;15:63.
314. Katz J, Wu LA, Mullany LC, et al. Prevalence of small-for-gestational-age and its mortality risk varies by choice of birth-weight-for-gestation reference population. *PLoS One* 2014;9:e92074.
315. Green RJ, Kolberg JM. Neonatal pneumonia in sub-Saharan Africa. *Pneumonia (Nathan)* 2016;8:3.
316. Raabe VN, Shane AL. Group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol Spectr* 2019;7.
317. Ben Jaballah N, Bouziri A, Kchaou W, et al. [Epidemiology of nosocomial bacterial infections in a neonatal and pediatric Tunisian intensive care unit]. *Med Mal Infect* 2006;36:379-85.
318. Nejari N, Benomar S, Lahbabi MS. [Nosocomial infections in neonatal and pediatric intensive care. The appeal of ciprofloxacin]. *Arch Pediatr* 2000;7:1268-73.
319. Aku FY, Akweongo P, Nyarko K, et al. Bacteriological profile and antibiotic susceptibility pattern of common isolates of neonatal sepsis, Ho Municipality, Ghana-2016. *Matern Health Neonatol Perinatol* 2018;4:2.
320. Teklu DS, Negeri AA, Legese MH, Bedada TL, Woldemariam HK, Tullu KD. Extended-spectrum beta-lactamase production and multi-drug resistance among Enterobacteriaceae isolated in Addis Ababa, Ethiopia. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019;8:39.
321. Joram N, Muller JB, Denizot S, et al. Umbilical cord blood procalcitonin level in early neonatal infections: a 4-year university hospital cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:1005-13.
322. Frerot A, Baud O, Colella M, et al. Cord blood procalcitonin level and early-onset sepsis in extremely preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;38:1651-7.
323. Mearelli F, Fiotti N, Altamura N, et al. Heterogeneous models for an early discrimination between sepsis and non-infective SIRS in medical ward patients: a pilot study. *Intern Emerg Med* 2014;9:749-57.
324. Pachot A, Monneret G, Brion A, et al. Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med* 2005;33:31-8; discussion 236-7.

325. Payen D, Lukaszewicz AC, Belikova I, et al. Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med* 2008;34:1371-6.
326. Birle A, Nebe CT, Gessler P. Age-related low expression of HLA-DR molecules on monocytes of term and preterm newborns with and without signs of infection. *J Perinatol* 2003;23:294-9.
327. Palojarvi A, Petaja J, Siitonen S, Janer C, Andersson S. Low monocyte HLA-DR expression as an indicator of immunodepression in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2013;73:469-75.
328. Olin A, Henckel E, Chen Y, et al. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell* 2018;174:1277-92 e14.
329. Smolen KK, Ruck CE, Fortuno ES, 3rd, et al. Pattern recognition receptor-mediated cytokine response in infants across 4 continents. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:818-26 e4.
330. Ibitokou S, Oesterholt M, Brutus L, et al. Peripheral blood cell signatures of *Plasmodium falciparum* infection during pregnancy. *PLoS One* 2012;7:e49621.
331. Flanagan KL, Halliday A, Burl S, et al. The effect of placental malaria infection on cord blood and maternal immunoregulatory responses at birth. *Eur J Immunol* 2010;40:1062-72.
332. Takem EN, Roca A, Cunningham A. The association between malaria and non-typhoid *Salmonella* bacteraemia in children in sub-Saharan Africa: a literature review. *Malar J* 2014;13:400.
333. Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:587-600.
334. Madsen-Bouterse SA, Romero R, Tarca AL, et al. The transcriptome of the fetal inflammatory response syndrome. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:73-92.
335. Accrombessi M, Yovo E, Fievet N, et al. Effects of Malaria in the First Trimester of Pregnancy on Poor Maternal and Birth Outcomes in Benin. *Clin Infect Dis* 2018.
336. Mbouamboua Y, Koukouikila-Koussounda F, Ntouni F, et al. Sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infections in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from asymptomatic Congolese women at delivery. *Acta Trop* 2019;193:142-7.
337. Adegnik AA, Verweij JJ, Agnandji ST, et al. Microscopic and sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infection, but not inflammation caused by infection, is associated with low birth weight. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:798-803.
338. Wong HR, Cvijanovich NZ, Anas N, et al. Improved Risk Stratification in Pediatric Septic Shock Using Both Protein and mRNA Biomarkers. PERSEVERE-XP. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:494-501.
339. Schultz C, Temming P, Bucsky P, Gopel W, Strunk T, Hartel C. Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin Exp Immunol* 2004;135:130-6.
340. Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF- α production in the human newborn. *J Immunol* 2006;177:1956-66.

Titre : Effets de la régulation des « Toll like receptors » dans la réponse immunitaire néonatale aux infections à Gram négatif en zone d'endémie palustre

Mots clés : Sepsis néonatal, paludisme gestationnel, biomarqueurs, immunité innée, *P. falciparum*, MD-2/TLR4

Résumé : Le sepsis néonatal est une des causes majeures de mortalité chez le nouveau-né dans le monde et particulièrement en Afrique sub-saharienne. Dans cette partie du monde où les infections palustres sont fréquentes chez les femmes enceintes, les expositions *in utero* aux antigènes de *P. falciparum* sont connues pour altérer les fonctions immunes du fœtus et sont à l'origine d'une plus grande susceptibilité du nouveau-né aux infections palustres et non palustres. Nos données précédentes et celles d'autres équipes suggèrent que le paludisme gestationnel jouerait un rôle important dans la pathogenèse des infections à bactérie Gram négatif par modulation *in utero* de la signalisation médiée par les Toll Like receptors (TLR). Notre hypothèse est que l'exposition *in utero* aux antigènes de *P. falciparum*, module la signature transcriptionnelle du complexe de reconnaissance des endotoxines MD-2/TLR4 du nouveau-né, modifiant la réponse de future l'hôte aux infections bactériennes. Nos résultats montrent que la procalcitonine dans le sang de cordon n'est pas un biomarqueur suffisamment précis pour le diagnostic et le pronostic du sepsis néonatal.

Une faible expression du *CD74* est prédictive de mortalité chez les nourrissons développant un sepsis néonatal et le ratio *CD74/IP-10* pourrait être plus précis pour le diagnostic du sepsis néonatal comparé à tous les biomarqueurs et combinaisons cliniques étudiés.

La deuxième partie de notre travail s'est intéressée aux conséquences de l'exposition *in utero* aux antigènes plasmodiaux sur la régulation de l'expression des isoformes des transcrits primaires TLR4 (V1, V3, et V4) et MD-2 (L-long et SH-Short) dans la mise en place des réponses immunologiques du nouveau-né. Nos résultats ne montrent pas un effet du paludisme gestationnel sur la modulation de l'expression du complexe de reconnaissance MD-2/TLR4 et sa réponse aux endotoxines, mais plutôt un effet de l'exposition prénatale à des facteurs de risques infectieux sur l'expression du complexe MD-2/TLR4 avec une surexpression de l'isoforme courte MD-2SH impliquée dans l'inhibition de la réponse aux endotoxines.

Title : Effects of Toll-like receptor regulation in the neonatal immune response to Gram-negative infections in malaria-endemic areas

Keywords : Neonatal sepsis, gestational malaria, biomarkers, innate immunity, *P. falciparum*, MD-2/TLR4

Abstract : Neonatal sepsis is one of the major causes of newborn mortality in the world and particularly in sub-Saharan Africa. In this part of the world where malaria infections are common among pregnant women, *in utero* exposure to *P. falciparum* antigens is known to impair the immune functions of the foetus and is responsible for a greater susceptibility of the newborn to malaria and non-malarial infections. Our previous data and those of other teams suggest that gestational malaria may play an important role in the pathogenesis of Gram-negative bacterial infections through *in utero* modulation of Toll Like receptors (TLR) signalling pathways. Our hypothesis is that *in utero* exposure to *P. falciparum* antigens modulates the transcriptional signature of the primary mRNA transcripts of the MD-2/TLR4 endotoxin recognition complex of the newborn, modifying the host response to bacterial infections. Our results show that procalcitonin in cord blood is not a sufficiently accurate biomarker for the diagnosis and prognosis of neonatal sepsis.

Low *CD74* expression is predictive of mortality in infants developing neonatal sepsis and the *CD74/IP-10* ratio may be more accurate for the diagnosis of neonatal sepsis than all biomarkers and clinical combinations studied.

The second part of our work focused on the consequences of *in utero* exposure to plasmodial antigens on the regulation of TLR4 (V1, V3, and V4) and MD-2 (L-long and SH-Short) primary transcript isoform expression in the development of immunological responses in the newborn. Our results do not show an effect of gestational malaria on the modulation of the expression of the MD-2/TLR4 recognition complex and its response to endotoxins, but rather an effect of prenatal exposure to infectious risk factors on the expression of the MD-2/TLR4 complex with an overexpression of the short isoform MD-2SH involved in the inhibition of the endotoxin response.