

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITÉ de TLEMCEM



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie



Mémoire

Présentée par

HAMID AMEL

TERBECHE INSAF

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER en Immunologie

Thème

**Implication de thréonine et de glutamine dans la réponse
immunitaire au cours du sepsis chez les nouveau-nés prématurés**

Soutenu le **29 septembre**, devant le jury composé de :

Président: Pr. Aribi Mourad

Encadrant: Pr. Smahi Mohammed Chems Eddine

Examinatrice: Dr. El Mezouar Chahrazed

Année universitaire : 2021/2022

Résumé :

Introduction : La septicémie néonatale reste un problème de santé important de santé publique, en particulier chez les nouveaux nés de très faible poids de naissance (<1500 g), principalement en raison de l'imaturité de leur système immunitaire. Elle est associée à une morbidité et une mortalité élevées. La défense immunitaire du nouveau-né prématuré pendant les premiers mois de sa vie se fait essentiellement par le système immunitaire inné reposant sur des molécules solubles telles que les acides aminés comme la glutamine et la thréonine.

Objectif : étudier le mécanisme d'action de glutamine et de thréonine impliqués dans la réaction immunitaire au cours du sepsis chez les nouveaux nés prématurés.

But : montrer l'effet de glutamine et de thréonine au cours de la réaction immunitaire lutter contre le sepsis chez les nouveaux nés prématurés.

Matériels et méthodes : nous avons mené une étude comparative (cas/témoins) entre deux groupes des nouveau-nés prématurés de différents âges gestationnels, un groupe de nouveaux nés sains (témoins) et un groupe de nouveaux nés infectés (cas). Le dosage des acides aminés a été effectué par la technique de chromatographie en phase liquide sur couche mince (CCM).

Résultats : les résultats de la comparaison entre les patient et les témoins ont montré une augmentation non significative des concentrations sériques de glutamine ($p=0.3783$) et de thréonine ($p=0.3015$) chez patients par rapport aux témoins. Par contre, les résultats des moyennes des taux de CTCF de la glutamine et la thréonine ont montré une augmentation significative ($p=0,0045$) chez les patients.

Conclusion : chez les nouveaux nés prématurés infectés il y'a un taux élevé de la concentration sérique de glutamine et de thréonine par rapport aux nouveaux nés prématurés sains, la glutamine et la thréonine qui ont un rôle important dans la réponse immunitaire au cours du sepsis.

Mots clés : Nouveau-née prématuré, sepsis, glutamine, thréonine, la réponse immunitaire.

Abstract :

Introduction: Neonatal sepsis remains an important public health problem, especially in very low birth weight infants (<1500 g), mainly due to the immaturity of their immune system. It is associated with high morbidity and mortality. The immune defense of the preterm newborn during the first months of life is essentially through the innate immune system based on soluble molecules such as amino acids like glutamine and threonine.

Objective: To study the mechanism of action of glutamine and threonine involved in the immune response during sepsis in preterm neonates.

Aim: To show the effect of glutamine and threonine during the immune response against sepsis in preterm newborns.

Materials and methods: We conducted a comparative study (case/control) between two groups of preterm newborns of different gestational ages, a group of healthy preterm newborns and a group of infected. The determination of amino acids was performed by the thin layer liquid chromatography (TLC) technique.

Results: The results of the comparison between patients and controls showed a significant increase in serum Glutamine ($p=0.3783$) and Threonine ($p=0.3015$) concentrations of patients compared to controls.

Conclusion: In infected preterm newborns there is an elevated level of serum glutamine and threonine concentration compared to healthy preterm newborns, glutamine and threonine which have an important role in the immune response during sepsis.

Key Words: Preterm newborn, sepsis, glutamine, threonine, immune response

ملخص:

المقدمة: لا يزال الإنتان الوليدي مشكلة صحية شائعة وهامة، خاصة عند الأطفال حديثي الولادة ذوي الوزن المنخفض جداً (1500 جم). يرتبط بارتفاع معدلات الاعتلال والوفيات خلال فترة حديثي الولادة، حيث يعد عدم نضج جهاز المناعة لديهم من بين أحد الأسباب الرئيسية للإصابة بهذا المرض، وخاصة عند حديثي الولادة الخدج. يتم الدفاع المناعي للمواليد الخدج خلال الأشهر الأولى من حياته بشكل أساسي عن طريق الجهاز المناعي الفطري القائم على الجزيئات القابلة للذوبان مثل الأحماض الأمينية مثل الجلوتامين والثريونين.

الغاية: دراسة آلية عمل الجلوتامين والثريونين المتورطين في رد الفعل المناعي أثناء الإنتان عند حديثي الولادة الخدج.

الهدف: إظهار تأثير الجلوتامين والثريونين أثناء رد الفعل المناعي لمحاربة الإنتان عند الأطفال الخدج.

المواد والطرق: أجرينا دراسة مقارنة (حالة / مجموعة تحكم) بين مجموعتين من الأطفال حديثي الولادة الخدج من أعمار حمل مختلفة، بما في ذلك مجموعة صحية ومجموعة مصابة بالفعل. تم تحديد الأحماض الأمينية عن طريق تقنية الكروماتوغرافيا ذات الطبقة الرقيقة (CCM).

النتائج: أظهرت نتائج المقارنة بين مجموعة حديثي الولادة الخدج المصابون بالإنتان ومجموعة غير مصابون زيادة غير معنوية في تركيز الجلوتامين في الدم ($p = 0.3783$) والثريونين ($p=0.3015$) للمرضى مقارنة ب مجموعات غير مصابون. من ناحية أخرى، أظهرت نتائج متوسط مستويات CTCF من الجلوتامين والثريونين زيادة معنوية ($P = 0.0045$) عند المرضى المصابون بالإنتان.

الخلاصة: في الأطفال الخدج المصابين بالعدوى هناك مستوى مرتفع من تركيز الجلوتامين والثريونين في الدم مقارنة بالخدج الأصحاء والجلوتامين والثريونين الذين يلعبون دورًا مهمًا في الاستجابة المناعية أثناء الإنتان.

الكلمات المفتاحية: حديثي الولادة المبكرة (الخدج)، الإنتان، الجلوتامين، الثريونين، الاستجابة المناعية.

Remerciement :

Avant tout nous remercions “**Allah**” le tout puissant qui nous a aidé et nous a donné la force, le patient et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre encadrant, **Pr SMAHI Mohamed Chams Eddine**, pour son soutien, sa grande disponibilité, son encouragement et ses précieux conseils.

Nous tenons également à remercier, **Pr ARIBI Mourad**, le directeur de laboratoire **BIOMOLIM** pour son soutien et orientation en ce qui concerne les techniques d’analyses, les interprétations mais aussi de nous avoir autorisé à travailler dans un champ libre au sein de son laboratoire avec toutes les commodités nécessaires.

Nous tenons à remercier **Mme EL MEZOUAR Chahrazed**, d’avoir accepté d’examiner ce travail, ses remarques et critiques nous seront précieuses et enrichissantes.

Sans oublier **Mme MESSALI Rabiaa**, la technicienne de laboratoire **BIOMOLIM**, pour sa générosité, son soutien et son orientation en ce qui concerne les techniques d’analyses, les interprétations et son aide permanente.

Nos remerciements s’adressent aussi à tous nos enseignants du département de biologie à la faculté des sciences de la nature et la vie, des sciences de la terre et l’univers, Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen.

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail à:

*A mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments,
Pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de
mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*À mes chères sœurs<< **Hadjer, Dalal**>>*

*À mes chères copines<< **Hadjer, Samiha**>>*

*À mon binôme<<**Insaf**>>merci pour son soutien et son amitié.*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible

Je vous dis merci.

Hamid Amel

Dédicace :

Je tiens à dédier ce travail :

À ma très chère mère Hanifa et à mon très cher père Abd Elkader

Merci pour tout votre amour, vous êtes toujours prêt à tout donner pour moi.

Merci de m'aider pour tout, depuis que je suis née, jusqu'à aujourd'hui.

Merci pour vos affections inépuisables et vos précieux conseils. Vous n'aurez cessé de prier pour moi durant mon cursus scolaire et m'ont encouragé régulièrement.

Merci tout simplement.

À ma précieuse sœur Fatma et à mon cher frère Mohammed.

À mes grands-parents que Dieu vous protège.

À mes chères cousines Radjaa, Aya et Marwa.

À mon binôme Amel merci pour son soutien et son amitié.

À mes meilleurs amis : Bouchra, Amira et Amina.

À tous mes amis d'enfance et du long parcours scolaire et universitaire.

À Toute ma famille tous ceux qui m'aiment et que j'aime.

*Terbeche **I**nsaf*

SOMMAIRE

Introduction.....	01
Chapitre 1: Revue de la littérature.....	03
1. Nouveau- né prématuré	03
1.1 Définition.....	03
1.1.2 Etiologie.....	03
1.2.1 Naissance prématurée spontanée	03
1.2.2 Naissance prématurée induite... ..	04
1.3 Complications... ..	04
1.4 Système immunitaire	05
1.4.1 Immunité innée	05
1.4.1.1 Barrière cutané et muqueuse	05
1.4.1.2 Immunoglobulines... ..	06
1.4.1.3 Système du complément... ..	06
1.4.1.4 Protéines et peptides antimicrobiens... ..	07
1.4.1.5 Récepteurs Toll-Like.....	08
1.4.1.6 Neutrophiles... ..	08
1.4.1.7 Monocytes.....	09
1.4.1.8 Cellules tueuses naturelles... ..	10
1.4.2 Immunité adaptative.....	10
1.4.2.1 lymphocytes TCD4+ et les lymphocytes TCD8+	11
1.4.2.2 Cellules T régulatrices Treg.....	12
1.4.2.3 Lymphocytes B	12
1.4.3 Microbiote intestinale.....	13
2. Sepsis néonatal.....	14
2.1 Définition.....	14
2.1.1 Septicémie précoce (EOS)... ..	14
2.1.2 Septicémie tardive (LOS)... ..	14
2.2 Epidémiologie... ..	15
2.3 Facteurs de risque	15
2.3.1 Facteurs de risque de septicémie précoce	15
2.3.1.1 Colonisation par Streptococcus du groupe B (Streptococcus agalactiae).....	15
2.3.1.2 Rupture prématurée des membranes (RPM)... ..	16
2.3.1.3 Chorioamnionite.....	16
2.3.2 Facteur de risque de septicémie néonatale tardive... ..	16
2.3.2.1 Prématurité.....	16

2.3.2.2 Rupture des barrières naturelles	17
2.3.2.3 Les cathéters centraux	17
2.3.2.4 Utilisation de bloqueurs H2	17
2.3.2.5 Utilisation prolongée d'une antibiothérapie empirique	17
2.4 Symptômes.....	18
2.5 Physiopathologie.....	18
2.5.1 Dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire.....	18
2.5.2 Coagulopathie.....	18
2.5.3 Dysfonctionnement cardiovasculaire.....	19
2.5.4 Syndrome de dysfonctionnement multi-organique.....	19
2.6 Diagnostic.....	20
2.6.1 Biomarqueurs inflammatoires.....	20
2.6.2 Hémoculture automatisé	20
2.6.3 Méthodes microbiologiques moléculaires	21
2.6.4 Indices hématologiques.....	21
2.7 Traitement	22
3. Réponse immunitaire au cours de sepsis chez les nouveau-nés prématurés.....	23
3.1 Activation des récepteurs Toll-Like	23
3.2 Cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion.....	24
3.3 Activation du complément.....	25
3.4. Effets des protéines laitières bioactives sur l'inflammation	26
3.4.1. Caséines (CN)	26
3.4.2. Alpha-lactalbumine	27
3.4.3. L'actoferrine LF	27
3.4.4. Immunoglobulines	27
3.4.5. Facteur de croissance	28
3.5. Réponses immunologiques spécifiques de la muqueuse intestinale.....	28
3.6. Immunité adaptative.....	29
3.7. Mémoire entraîné.....	30
3.8. Glutamine	30
3.8.1. Barrière intestinale	31
3.8.2. Les muscles squelettiques	31
3.8.3. Foie.....	31
3.8.4. Système immunitaire.....	32
3.9. Thréonine.....	33
3.9.1. Barrière intestinale	33
3.9.2. Foie.....	34

3.9.3. Signalisation.....	35
---------------------------	----

Chapitre 2 : Matériels et méthodes... ..36

1. Conception de l'étude.....	36
2. Préparation des échantillons.....	36
3. Dosage des taux sériques des acides aminés.....	36
4. Matériels, produits et réactifs.....	36
5. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	37
5.1 Généralités et principe de CCM.....	37
5.2 Préparation de la cuve chromatographique.....	38
5.3 Préparation de la plaque CCM.....	38
5.4 Manipulation des échantillons.....	39
5.5 Révélation.....	39

Chapitre 3 : Résultats et discussion..... 40

Chapitre 4 : Conclusion..... 46

Chapitre 5 : Bibliographie..... 47

LISTE DES ABREVIATIONS

SGA	: Small-for-gestational age	CRP	: C reactive protein
PRR	: Pattern recognition receptors	AP-1	: Activator protein
TLR	: Toll-Like receptor	CN	: Caséines
RPM	: Rupture prématurée des membranes		
NLR	: Nucleotide-like receptor		
PAMP	: Pathogen associated molecular pattern		
DAMP	: Damage associated molecular pattern		
APP	: Antimicrobial peptide/protein		
CD	: Dendritic cell		
NK	: Natural killer cell		
MBL	: Mannose binding levels		
EOS	: Early onset sepsis		
LOS	: Late onset sepsis		
ARDS	: Acute respiratory distress syndrome		
DIC	: Disseminated intravascular coagulation		
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate		
MAPK	: Mitogen activated protein kinases		
SAA	: Serum amyloid A		
PCR	: Polymerase chain reaction		
LPS	: Lipopolysaccharides		
HMGB-1	: High mobility group box-1		
SIRS	: Systemic inflammatory response syndrome		
IRF	: Interferon regulatory factor		
CAM	: Cell adhesion molecule		
PMN	: Polymorphonuclear		
CLR	: C-type lectin receptor		
NO	: Nitric oxide		
FAO	: Fatty acid oxidation		
FAS	: Fatty acid synthesis		
ANC	: Absolute neutrophil count		
TNF-α	: Tumor necrosis factor α		
MPV	: Mean platelet volume		

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Catégories de tests diagnostiques disponibles pour le sepsis néonatal.....	22
Figure 2: Cascade de signalisation des récepteurs Toll-Like dans les cellules néonatales...	24
Figure 3: Recrutement cellulaire et activation de l'endothélium suite à la détection pathogène.....	25
Figure 4: Réponse inflammatoire dans l'intestin d'un nouveau-né prématuré.....	29
Figure 5 : Moyenne des taux des CTCF des patients et des témoins.....	41
Figure 6 : Moyenne de la concentration de la thréonine des patients et des témoins.....	41
Figure 7 : Moyenne de la concentration de la glutamine des patients et des témoins.....	43
Figure 8: Moyenne de CTCF de glutamine chez les patients et les témoins.....	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Représente les valeurs de CTCF de glutamine et thréonine chez les nouveau-nés atteints de la septicémie par rapport au sujet sains.....	40
Tableau 2 : statistiques descriptive des taux des CTCF des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés non infectés.....	40
Tableau 3 : statistiques descriptive des taux des CTCF des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés infectés et les non infectés.....	40
Tableau 4 : Représente les concentrations de la glutamine et la thréonine chez nouveau-nés prématurés non infecté et infecté par la septicémie.....	42
Tableau 5 : statistiques descriptive des concentrations des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés non infectés.....	42
Tableau 6 : statistiques descriptive des concentrations des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés infectés.....	42

Introduction

La naissance prématurée survient dans 10 % des grossesses aux États-Unis (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2015) (AparnaPatra et al., 2017) et dans 5 à 18 % des grossesses dans 184 pays du monde (Blencowe et al., 2012). La naissance prématurée est définie comme toute naissance avant 37 semaines complètes de gestation. On estime que 15 millions de nouveau-nés naissent prématurément, avec les complications qui en résultent en raison de l'immatunité et le pré-développement d'organes ou système d'organes (Quinn et al., 2016).

En dépit de la reconnaissance de l'hétérogénéité étiologique des naissances prématurées, elles sont généralement classées en sous-types sur la base des présentations cliniques : naissance prématurée spontanée (rupture prématurée des membranes ou anomalies utérines) et les naissances prématurées induites sur indication médicale (Ananth et al., 2006).

Le terme de septicémie néonatale bactérienne est associée à des modifications hémodynamiques et à d'autres manifestations cliniques et qui entraîne la morbidité et de la mortalité (Shanee et al., 2017). La septicémie bactérienne néonatale se divise en deux formes en fonction du mode d'acquisition et par le moment où elle se manifeste: septicémie précoce et tardive (Kim, 2020).

Le risque d'infection systémique est particulièrement élevé chez les nouveau-nés prématurés qui ont une immaturité plus prononcée des mécanismes de défense innée et adaptative de l'hôte et nécessitent une intervention médicale accrue qui peuvent perturber les barrières anatomiques normales (Melville et Moss, 2013). Il existe également une forte relation inverse entre l'incidence de la septicémie, l'âge gestationnel et le poids à la naissance. Les nouveau-nés prématurés atteints de septicémie sont à risque élevé de dysfonctionnement de plusieurs organes au cours de la dernière étape de l'infection, le choc septique. Leur taux de mortalité au cours de la septicémie peut atteindre 35 % dans les cas de septicémie à début précoce (EOS) et entre 18 % et 36 % en cas de sepsis tardif (LOS) (McGovern et al., 2020).

La glutamine est un acide aminé non essentiel, le plus abondant dans le sang et les muscles. Il joue un rôle polyvalent dans les organes métaboliques (l'intestin, foie, muscle squelettique) et dans la génération de composés essentiels au métabolisme et à la fonction des leucocytes (macrophages, neutrophiles, lymphocytes) (Agostini et al., 2010).

Introduction

La thréonine, un acide aminé essentiel, participe à un certain nombre de processus métaboliques. Elle est un composant majeur de la mucine intestinale, constituant jusqu'à 30% de son contenu en acides aminés. En outre,

la thréonine représente 12 à 14 % du contenu en acides aminés de la protéine-1 de liaison à la 4E, une importante voie d'initiation de la traduction (**Combet et al., 2000**).

Dans ce travail, on va étudier le mécanisme d'action de la glutamine et de la thréonine dans la réponse immunitaire des nouveaux nés prématurés au cours du sepsis,

1. Nouveau-né prématuré

1.1. Définition

La prématurité est une priorité de santé publique explicite dans de nombreux pays à revenu élevé. La naissance prématurée a été définie par L'organisation mondiale de la santé (OMS) comme toute naissance avant 37 semaines complètes ou 259 jours de gestation (**Quinn et al., 2016**).

Les nouveau-nés prématurés pèsent habituellement moins de 2,5 kilogrammes ; certains ne pèsent que 500 grammes. Les symptômes dépendent souvent de l'immatrité de divers organes (**Arcangela, 2021**).

Un accouchement prématuré est un déterminant majeur de la mortalité et de la morbidité néonatale, il est la principale cause d'environ un million de décès de nouveau-nés par an au cours du premier mois critique de leur vie (**Richard et al., 2007**).

La naissance prématurée peut être subdivisée en fonction de l'âge gestationnel (**Marlow, 2012**):

- Extrêmement prématurée (<28 semaines)
- Très prématurée (28 - <32 semaines)
- Modérément prématurée (32 - <33 semaines)
- Peu prématuré (34 - <37 semaines complètes de gestation).

1.2. Etiologies

Malgré la mise en œuvre de nombreuses mesures de santé publique et d'interventions médicales, les naissances prématurées continuent à d'augmenter avec une variété de causes qui peuvent être subdivisés en deux grands sous-types : la naissance prématurée spontanée et la naissance prématurée initiée (**Hannah et al., 2013**).

1.2.1. Naissance prématurée spontanée

Une naissance prématurée spontanée est un processus multifactoriel, qui représente 60% à 70% des naissances prématurées. La mise en travail se fait sans intervention ni humaine ni médicamenteuse. Les précurseurs de l'accouchement prématuré spontané varient selon l'âge gestationnel et les facteurs sociaux et environnementaux (**Lansac et al., 2006**).

Parmi les facteurs directement responsables, on retrouve les grossesses multiples, les anomalies utérines, l'hydramnios, la rupture prématurée des membranes et les causes infectieuses (Les infections des voies urinaires, le paludisme, la vaginose bactérienne, le VIH et la syphilis) (**Hannahet al., 2013**).

Les facteurs favorisants peuvent être l'âge de la mère (inférieur à 18 ans ou supérieur à 35 ans), la mauvaise surveillance de la grossesse, l'abus de toxiques (tabac, alcool...), les antécédents d'accouchement prématuré sont probablement dus à l'interaction de facteurs de risque génétiques, les conditions de vie pendant la grossesse (travail difficile, stress, longs trajets, classe socioéconomique défavorisée...) et les affections médicales chroniques maternelles sous-jacentes (Diabète, hypertension, anémie, asthme) (**Menon, 2008**).

Enfin, il existe des accouchements spontanés qui pourraient être induits par le fœtus lui-même, en réaction à un environnement hostile (**Lansacet al., 2006**).

1.2.2. Naissance prématurée induite

L'accouchement prématurée induite est déclenché et réalisé fait suite à une décision médicale (par voie haute ou par voie basse) lorsque la poursuite de la grossesse est une menace pour la santé de la mère ou lorsqu'il est estimé que le risque pour l'enfant né avant terme est moins grand que s'il reste in utero. La prématurité induite représente 30 à 40 % des naissances prématurées (**Rozé J-C et al., 2007**).

Les principales conditions impliquées dans plus de la moitié des toutes les naissances prématurées médicalement indiqué peuvent être divisées en affections maternelles et fœtales, parmi lesquelles la prééclampsie sévère, la détresse fœtale, l'insuffisance de l'âge gestationnel (SGA), le décollement placentaire, cholestase et la rupture utérine (**Ananth et al., 2006**).

1.3. Complications

En raison de l'immaturation et le pré-développement d'organes ou système d'organes, les nouveau-nés prématurés sont exposés à plusieurs problèmes. Le risque de complications augmente selon le degré de la prématurité et la présence de certaines causes de prématurité (diabète, hypertension artérielle...).

Les risques qu'encourt le nouveau-né prématuré sont (**Moore et al., 2012**) :

- Complication métaboliques : hypothermie, hypoglycémie, hypocalcémie, ictère

- Complications respiratoires : apnée du prématuré, maladie des membranes hyalines, dysplasie broncho-pulmonaire.
- Complication hépatique : choléstase.
- Complication digestive : entérocolite ulcéro-nécrosante.
- Complication rénale : tubulopathie.
- Complications cardio-vasculaires : persistance du canal artériel avec risque décompensation cardiaque, d'hypertension artérielle pulmonaire.
- Complications neurologiques : hémorragie intraventriculaire, leucomalacie périventriculaire.
- Complication rétinienne : rétinopathie.

1.4. Système immunitaire

Le développement du système immunitaire du fœtus commence à partir de 4,5-6 semaines de gestation. Tout au long de la gestation, deux grands systèmes de défense du fœtus se développent progressivement : le mécanisme immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (**Clapp, 2006**). En outre, il est important de considérer que le système immunitaire se développe tout au long de la période fœtale (**Zasadaet al., 2014**). Le système immunitaire des nouveau-nés n'est pas complètement mature après la naissance (**Helmoet al., 2017**). Cette immaturité du système immunitaire est plus prononcée chez les nouveau-nés prématurément (**Melville et Moss, 2013**).

1.4.1. L'immunité innée

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes envahissants et comprend de nombreux mécanismes tels que les barrières cutanées et muqueuses, le réseau cellulaire (neutrophiles, monocytes, granulocytes, cellules présentatrices d'antigènes et cellules tueuses naturelles), les récepteurs TLR (toll-like receptors), qui sont chargés de reconnaître les PAMP (pathogen associated molecular pattern) (**Clapp, 2006**) et une multitude de protéines et de peptides solubles (dont des protéines et peptides antimicrobiens et le complément et les immunoglobulines) qui se lient aux micro-organismes, les opsonisant ou les détruisent directement (**Strunket al, 2011**).

1.4.1.1. Barrière cutanée et muqueuse

La première ligne de défense innée contre l'infection est la barrière physique (peau et muqueuse) qui empêche ou retarde l'entrée des agents pathogènes (**Levy O, 2007**). La couche la plus externe de la peau agit comme une barrière physique ; cependant, sa couche la plus résistante, le stratum corneum, ne se développe complètement qu'au cours des deux premières semaines de vie (**Marchant et al., 2013**), les prématurés mettant plus de temps que ceux nés plus près du terme. Le stratum

corneum des prématurés est plus fin et contient des taux plus élevés de l'involucrine, l'albumine et de cytokines pro-inflammatoires que le stratum corneum des enfants nés à terme (**Narendranet al., 2010**).

Il convient de noter qu'au cours du troisième trimestre de gestation, les glandes sébacées fœtales de la peau produisent une matière riche en lipides appelée vernix caseosa (vernis à croquer) qui hydrate la peau, maintient le pH et contient un sous-ensemble défini de protéines et de peptides antimicrobiens fonctionnellement actifs (APP) tels que les lysozymes, les β -défensines, l'ubiquitine et la psoriasine, ainsi que des acides gras libres antimicrobiens (**LevyO, 2007 ; Tollinet al., 2005**). Comme le vernix caseosa se forme principalement au cours du dernier trimestre de la gestation, le nouveau-né prématuré est relativement plus exposé et vulnérable. (**Marchant et al., 2013**).

1.4.1.2. Immunoglobulines

La production de facteurs solubles, tels que l'immunoglobuline (Ig), est limitée chez le fœtus, qui doit donc compter sur l'apport maternel. Les IgG spécifiques de l'antigène sont transférées à travers le placenta depuis la circulation maternelle en grandes quantités après 32 semaines de gestation (**van den Berg et al., 2011**). Par conséquent, les enfants nés à terme bénéficient d'une protection supplémentaire grâce aux ces anticorps maternels transférés (**Simister, 2003**). Les prématurés présentent des taux réduits d'IgG, une mauvaise opsonisation et phagocytose des agents pathogènes (**Melville et Moss, 2013**).

Les IgA, IgD, IgM et, dans la plupart des cas, les IgE ne traversent pas le placenta en quantités importantes. Les plasmocytes producteurs d'IgA sont largement absents de l'intestin du nourrisson jusqu'à l'âge d'un mois (**Gustafsonet al., 2014**). Une colonisation microbienne équilibrée de l'intestin du nouveau-né peut être essentielle au développement immunitaire intestinal normal et à l'induction d'IgA et de faibles taux d'IgA dans l'intestin du prématuré ont été considérés comme un facteur de risque de NEC (entérocolite nécrosante) (**Mirpuriet al., 2014**).

1.4.1.3. Système du complément

Le système du complément englobe trois voies de reconnaissance des pathogènes qui convergent vers le composant C3 du complément et conduisent à une voie lytique terminale commune. L'activité sérique du complément est réduite chez les nouveau-nés à terme par rapport aux adultes, et encore plus chez les prématurés, ce qui entraîne une activité du complément plus faible au début de la vie (**McGrealet al., 2012**). Les voies du complément classique, alternative et de la lectine sont toutes réduites dans leurs capacités d'élimination des pathogènes chez les prématurés (**Fiettaet al., 1987**).

Il convient de noter que le début de la synthèse des composants du complément C3 et C4 se produit à partir de la 5e et de la 8e semaine de développement, respectivement, et que la synthèse des autres composants du système du complément se produit entre la 18e et la 20e semaine (**Helmoet al., 2017**).

Les protéines du complément agissent par divers mécanismes pour activer la protéine C3 et induire la phagocytose. Les nouveau-nés prématurés sont déficients dans la production de C1, C4 (voie classique) et du facteur B (voie alternative) par rapport aux nouveau-nés à terme (**McGreal et al., 2012**). Les prématurés présentent également un déficit en lectine liant le mannose (MBL), un récepteur de reconnaissance des formes, dont la production augmente avec l'âge gestationnel (**Strunk et al., 2011 ; Sharma et al., 2012**). L'opsonisation et la phagocytose des agents pathogènes sont également altérées.

1.4.1.4. Protéines et peptides antimicrobiens

Dans le système immunitaire inné des prématurés, la production de facteurs solubles (par exemple, les immunoglobulines (Ig), les peptides et protéines antimicrobiens (APP) et les protéines du complément) responsables de l'élimination des agents étiologiques est limitée (**Helmoet al., 2017**). Les protéines et les peptides antimicrobiens (APP) sont détectables au début de la gestation et leurs niveaux présentent généralement une corrélation positive avec l'AG. Ces protéines et peptides solubles ont la capacité d'opsoniser les agents pathogènes (pour faciliter la phagocytose) et de tuer directement les agents pathogènes grâce à leurs propriétés antimicrobiennes (**van den Berg et al., 2011**).

La plupart de ces facteurs immunitaires innés solubles sont produits par les cellules immunitaires primaires, telles que les neutrophiles et les monocytes, mais il a été récemment démontré que les plaquettes, les hépatocytes et de nombreuses cellules épithéliales/muqueuses synthétisent également des quantités importantes de APP, fournissant ainsi une première ligne de défense au niveau des surfaces de la peau et des muqueuses (**Levy O, 2004**).

Les niveaux de la plupart des protéines individuelles du complément sont plus faibles chez les nouveau-nés que chez les adultes, ce qui entraîne une activité du complément plus faible au début de la vie. De même, la plupart des APP (par exemple, la lactoferrine, l'IPB et le peptide antimicrobien) ont des concentrations plasmatiques constitutives plus faibles au début de la vie par rapport à l'âge adulte, en particulier chez les nouveau-nés prématurés et de faible poids de naissance (**Singh et al., 2013 ; Strunk et al., 2009**). Les taux de APP dans le sang de cordon tels que la protéine BPI (protéine bactéricide/augmentant la perméabilité), la cathélicidine (LL-37), la phospholipase A2 sécrétoire et la β -défensine 2 humaine sont significativement réduits chez les prématurés par rapport aux enfants

à terme, tandis que d'autres (calprotectine, défensines neutrophiles humaines 1-3, HNP1-3) sont réduits dans le sang de cordon des nouveau-nés de tous âges gestationnels par rapport aux adultes (**Kollmann *et al.*, 2017**).

Les déficiences dans les réponses protéiques/peptidiques solubles à l'infection chez les prématurés réduisent la capacité de la réponse immunitaire innée à répondre de manière adéquate aux infections (**Melville et Moss, 2013**).

1.4.1. 5. Récepteurs TLR

C'est un type de récepteur de reconnaissance de forme PRR (pattern recognition receptor) qui reconnaît les PAMP (pathogen associated molecular pattern) (**Richetta et Faure, 2012**). L'expression de récepteur Toll-like TLR 2 (récepteur du peptidoglycane) et TLR4 (récepteur apparenté au lipopolysaccharide) a été détectée dans les tissus intestinaux de fœtus humains dès la 18^e semaine de gestation (**Fusunyan *et al.*, 2001**). L'expression basale des TLR chez les nouveau-nés à terme est comparable à celle des adultes, tant au niveau de l'ARNm que des protéines (**Levy O *et al.*, 2004**; **Viemann *et al.*, 2005**). De plus, il a été récemment démontré une expression basale similaire des TLR 2, 4 et 9 au niveau de l'ARNm et des protéines dans les cellules mononucléaires du sang de cordon des prématurés, des nouveau-nés à terme et des adultes (**Strunk T, manuscrit en préparation**).

La diminution de l'expression pulmonaire des molécules de détection des pathologies, telles que le TLR4 et le TLR2, est en corrélation avec l'incapacité des nouveaux nés à recruter des neutrophiles en réponse à une stimulation par un ligand TLR, ce qui contribue également à la morbidité des infections pulmonaires (**Collins *et al.*, 2018**). De même, on a observé chez les prématurés une altération de la phosphorylation des protéines kinases associées aux TLR, la p38 et la kinase 1/2 extracellulaire régulée, associée à une faible réponse aux cytokines (**Sadeghi *et al.*, 2007**).

1.4.1.6. Neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules phagocytaires qui jouent un rôle crucial dans la lutte contre les infections microbiennes (**Schmutz *et al.*, 2008**). Les nouveau-nés ont des réserves limitées de neutrophiles les prématurés et les enfants à croissance limitée ont un pool limité de précurseurs de neutrophiles, ce qui entraîne souvent une neutropénie, dont on pense qu'elle augmente le risque d'infections bactériennes (**Gessler *et al.*, 1995** ; **Carr, 2000**). La destruction intracellulaire des micro-organismes par le souffle respiratoire des neutrophiles de prématurés est nettement réduite par rapport aux cellules néonatales et adultes à terme. Il est intéressant de noter que ce phénomène persiste au moins pendant les deux premiers mois de la vie et qu'il est mieux corrélé avec la maladie clinique qu'avec l'âge postnatal (**strunk *et al.*, 2011**).

Les neutrophiles des nouveaux nés prématurés peuvent avoir des difficultés à :

- Migrer vers les sites d'infection (chimiotaxie) : Pour quitter la circulation sanguine, les neutrophiles doivent rouler le long de l'endothélium vasculaire, une activité médiée par les sélectines (L-sélectine sur les neutrophiles et P-sélectine sur l'endothélium). Comparés aux adultes, les neutrophiles néonataux expriment moins de la moitié de la L-sélectine sur leur surface cellulaire que les neutrophiles adultes et l'endothélium des prématurés a une expression réduite de la P-sélectine (**Lorant et al, 1999**).

L'expression basale des $\beta 2$ intégrines (Mac-1 (CD11b/CD18) et LFA-1 (CD11a/CD18) est nécessaire pour l'arrêt du roulement et l'adhésion à l'endothélium, mais ces intégrines sont réduites sur les neutrophiles prématurés et ne sont pas régulées en réponse à un stimuli (**McEvoy et al., 1996**).

- Quitter le système vasculaire (diapédèse) : La diapédèse à travers la paroi endothéliale nécessite la capacité de déformer/réformer le cytosquelette d'actine, propriété altérée chez les neutrophiles néonataux (**Linderkamp et al., 1998**).

- Phagocyter : la diminution de la capacité phagocytaire des neutrophiles de prématurés peut s'expliquer en partie par une faible activité opsonisante, la phagocytose des neutrophiles adultes étant diminuée dans le sérum des prématurés (**Tissières et al., 2012**).

Les déficiences dans chacune de ces fonctions contribuent probablement aux risques infectieux (**Raymond et al., 2017**).

1.4.1.7. Monocytes

Les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules prévenant les antigènes qui sécrètent des médiateurs inflammatoires (cytokines, complément, APP), ont une fonction phagocytaire et présentent les antigènes aux cellules T et B, reliant ainsi les branches innées et adaptatives du système immunitaire (**Kollmann et al., 2017**).

Les monocytes circulants apparaissent pour la première fois dans le sang fœtal à environ 18 ou 20 semaines de gestation. À la 30e semaine de gestation, les monocytes représentent 3 à 7 % des cellules sanguines formées en circulation et, à la naissance, les concentrations de monocytes en circulation dépassent 500/mm³, une valeur supérieure à celle de la plupart des adultes (**Kapure et al., 2005**). Les monocytes subissent une différenciation tissulaire spécifique en macrophages mononucléaires (**Dinauer, 2003**).

Les monocytes des prématurés ont une production réduite de cytokines, mais une efficacité similaire à celle des nouveau-nés à terme en matière de phagocytose et de destruction intracellulaire des agents pathogènes ; cependant, leur capacité à activer la réponse immunitaire adaptative peut être limitée car l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II est réduite sur les leucocytes des prématurés, ce qui limite leur capacité à présenter l'antigène aux lymphocytes T et à les activer (**Currie et al., 2011; Perez et al., 2010**).

Ces cellules présentent un profil d'expression des TLR similaire à celui des adultes, mais une réponse cytokinique orientée vers un profil Th17 anti-inflammatoire (IL-6, IL-23) et s'éloignant d'un profil Th1 pro-inflammatoire (faible interféron gamma (IFN- γ), IL-12 et facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α)) en faveur de cytokines Th2 (IL-5, IL-10, IL-13) (**Kollmann et al., 2017**). Les réponses anti-inflammatoires néonatales sont élevées, en particulier chez les prématurés en fin de gestation (**Sharma et al., 2012**).

Certaines données montrent également que les macrophages néonataux prématurés présentent une activation par explosion réduite par rapport aux nouveau-nés à terme (**Clapp, 2006**).

En outre, les cellules dendritiques (CD), un autre type de cellules présentatrices d'antigènes, sont fonctionnellement déficientes chez les fœtus du deuxième trimestre ; leur capacité à reconnaître, absorber, traiter et présenter des antigènes au système immunitaire adaptatif s'améliore avec l'AG mais reste immature à terme par rapport aux CD adultes (**Holloway et al., 2009**).

1.4.1.8. Cellules tueuses naturelles (NK)

Les NK jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre diverses infections, notamment celles causées par des virus. Les cellules NK fœtales et néonatales sont phénotypiquement et fonctionnellement immatures avec des réductions significatives de la production d'IFN γ et de TNF α ainsi qu'une fonction cytotoxique réduite (**Jinrong et al., 2013**). Ces cellules arrivent à maturité au cours de la 21^e semaine de gestation (**segura- cervantes et al., 2016**).

1.4.2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative, impliquant les lymphocytes (cellules B et T), est spécifique des agents pathogènes et nécessite l'acquisition d'une mémoire immunologique (**Melville et Moss, 2013**). La réponse immunitaire adaptative est relativement immature à la naissance en raison des limitations de l'exposition aux antigènes in utero et de l'altération des fonctions des lymphocytes B et T (**Zasada et al., 2014**). Le développement de la réponse immunitaire adaptative (spécificité et

mémoire) n'est établi que pendant la petite enfance (**Helmoet al., 2017**). Les lymphocytes ne sont pas complètement matures avant la 32^e semaine de gestation (**Segura-Cervantes et al., 2016**).

Le système immunitaire adaptatif peut être séparé en (**Collins et al., 2018**):

- Réponses à médiation cellulaire : les cellules T auxiliaires (Th, CD4+) et les cellules T cytotoxiques (CTL, CD8+).
- Réponses humorales : les cellules B.
- Fonctions immunorégulatrices : les cellules T régulatrices (Treg).

1.4.2.1. Lymphocytes TCD4+ et les lymphocytes TCD8+

Les lymphocytes T peuvent être détectés à partir de ~14 semaines de gestation (**Hong DK, 2015**). Le répertoire des récepteurs des cellules T fœtales se diversifie au cours des deuxième et troisième trimestres de la gestation des lymphocytes T (**Rechaviet al., 2015**).

Les cellules T reconnaissent les agents pathogènes lorsque leur récepteur de cellules T (TCR) reçoit des segments peptidiques d'un agent pathogène sur le CMH par une cellule présentatrice d'antigènes (CPA ; macrophages et CD). Les CTL CD8+ sont impliqués dans l'éradication des pathogènes intracellulaires tels que les virus et se voient présenter l'antigène par des CPA exprimant le CMH de classe I. Les cellules T helper CD4+, activées par le CMH II, sont ensuite divisées en cellules CD4+ Th1 et Th2, définies par leur profil cytokinique (**Melville et Moss, 2013**). La fonction efficace des cellules T dépend de l'expression du ligand CD40 (CD154), qui est réduite sur les cellules T CD4+ prématurées et à terme, et importante pour l'activation et la différenciation des cellules T CD4+ spécifiques de l'antigène, y compris celles ayant une fonction immunitaire Th1 (**Stuber et al., 1996**).

Les limitations du système immunitaire adaptatif sont plus marquées chez les nouveau-nés prématurés que chez les nouveau-nés à terme (**Wynnet al., 2010 ; Futataet al., 2012**). Les mécanismes d'ontogenèse ont montré que les récepteurs $T\gamma/\delta$ et β -1 matures prédominent chez les nouveau-nés à < 32 semaines d'âge gestationnel par rapport aux nouveau-nés à terme qui expriment des récepteurs $T\alpha/\beta$ et β -1b sur leurs cellules lymphocytaires (**Palmer, 2011**). La prédominance différentielle des populations lymphocytaires exprimant des récepteurs ayant des capacités de reconnaissance antigénique plus faibles pourrait expliquer l'altération de la réponse immunitaire adaptative chez les nouveau-nés prématurés (**Segura-Cervantes et al., 2016**).

On note aussi qu'une réduction des sous-populations lymphocytaires est évidente chez les enfants nés prématurément à 7 mois et à 8 ans, par rapport aux enfants appariés pour l'âge nés à terme

(**Berrington *et al.*, 2005 ; Pelkonen *et al.*, 1999**). Les nouveau-nés prématurés et à terme présentent une fonction déficiente des cellules T en raison d'une plus grande proportion de cellules T naïves dans la circulation et d'une faible sous-population de cellules T à mémoire (**Walker *et al.*, 2011**). La proportion accrue de cellules T naïves est le résultat d'une absorption et d'une présentation inefficaces de l'antigène par les CD, et elle est favorisée par une réduction de l'expression du CMH II sur les cellules présentant l'antigène (**Strunk *et al.*, 2011**).

1.4.2.2. Cellules T régulatrices (Tregs)

Les Tregs sont des cellules T CD4⁺ exprimant la protéine de type Forkhead-Box 3, qui ont un taux élevé de CD25 et de CD127. Ils sont abondants dans le sang périphérique et les tissus du fœtus humain et du prématuré, suppriment l'immunité fœtale anti-maternelle et persistent au moins jusqu'au début de l'âge adulte (**Mold *et al.*, 2008**). Les proportions de Tregs dans le sang du cordon des prématurés peuvent être plus élevées que celles des nouveau-nés à terme en bonne santé (**Collinet *et al.*, 2018**).

Il convient également de souligner que le pourcentage de Tregs CD31 β (cellules T régulatrices, une population de cellules T CD4 β qui jouent un rôle essentiel dans la tolérance périphérique et le contrôle des réponses immunitaires) et le pourcentage de Tregs CD31 étaient plus faibles chez les prématurés souffrant d'une chorioamniotite sévère que chez les patients qui ne présentaient pas cette complication (**Luciano *et al.*, 2014**).

1.4.2.3. Lymphocytes B

Les lymphocytes B matures peuvent être détectés dans le foie du fœtus à partir de 8 semaines de gestation (**Hong DK, 2015**). L'hypermutation somatique des cellules B périphériques et de la zone marginale (MZ) se développe et la commutation isotypique commence déjà in utero et conduit à la diversification fœtale du répertoire des récepteurs des cellules B (**Hong DK, 2015 ; Rechaviet *et al.*, 2015**).

Les cellules B reconnaissent les molécules entières de l'agent pathogène par le biais d'anticorps liés à la membrane, notamment les IgM, IgG, IgA et IgE. Les immunoglobulines IgM et IgD sont co-exprimées sur les cellules B naïves ; lors de l'activation, les cellules B changent de classe pour exprimer un autre isotype d'anticorps et perdent l'expression de l'IgD. Les cellules B, une fois activées, sécrètent des anticorps pour combattre l'agent pathogène par opsonisation (**Liu et Banchereau, 1997**).

Chez les nouveau-nés, la capacité à changer de classe est réduite, ce qui fait que les cellules B sécrètent principalement des anticorps IgM. Le changement de classe des cellules B est facilité par l'activation des cellules B dépendante des cellules T, par la liaison du CD40 et du CD40L (ligand du CD40). Les cellules T néonatales ont une expression réduite du CD40L, même lorsqu'elles sont activées, ce qui entraîne une production réduite des anticorps IgG et IgA par les cellules B néonatales par rapport aux cellules B adultes (**Nonoyama et al., 1995**). La réduction de l'expression de CD40 et CD40L est encore plus importante chez les prématurés (**Kaur et al., 2007**).

1.4.3 Microbiote intestinal :

Le corps humain héberge une population microbienne dynamique et complexe, qui comprend environ 500 à 1 000 espèces différentes. Le microbiote a un rôle dans la promotion et le maintien d'une réponse immunitaire équilibrée et l'établissement de la barrière intestinale au cours de la vie postnatale immédiate (**Collado et al., 2015**).

La composition du microbiote néonatal est influencée par de nombreux facteurs périnataux tels que l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, l'environnement, les mesures d'hygiène, le traitement antibiotique et les pratiques d'allaitement (**Collado et al., 2012**).

Les prématurés sont dotés d'une plus faible diversité microbienne que les nouveau-nés à terme. Cependant, l'établissement d'un microbiote intestinal stable chez les prématurés est plus tardif que chez les enfants nés à terme. Le tractus gastro-intestinal des prématurés est immature (**Collado et al., 2015**).

En plus, les prématurés présentent une colonisation retardée du microbiote par Bifidobacterium, une forte prévalence de Staphylococcus, Enterobacteriaceae, Enterococcaceae et d'autres bactéries lactiques comme le genre Lactobacillus et Weissella dans un écosystème bactérien peu diversifié (**Jacquot et al., 2011 ; Arboleya et al., 2012**).

La colonisation microbienne du méconium et des matières fécales de prématurés analysés au cours des premiers mois de vie a révélé que les Firmicutes constituaient le phylum prédominant dans le méconium, tandis que les Proteobacteria étaient présents dans les échantillons fécaux néonataux (**Collado et al., 2015**).

On note aussi qu'il y a une réduction probable de l'activité phagocytaire des cellules dendritiques intestinales, par rapport aux nouveau-nés à terme (**Currie et al., 2011**).

2. Sepsis néonatal

2.1. Définition

Le terme "septicémie" a une origine grecque "shjiz" qui désigne la "décomposition d'une matière animale, végétale ou organique en présence de bactéries, On rencontre le mot pour la première fois dans les poèmes d'Homère (**Geroulanos et Douka, 2006**). À la fin du XIXe siècle, le concept de septicémie était déjà bien assimilé par la communauté médicale, l'utilisant indistinctement avec le mot septicémie (**Van Arsdale, 1886**), il est introduit pour la première fois dans un dictionnaire médical français en 1834, bien avant la révolution microbiologique, et il est défini simplement comme putréfaction (**Béclard, 1834**).

La septicémie néonatale est une infection bactérienne, virale ou fongique systémique qui est associée à des changements hémodynamiques et à d'autres manifestations cliniques et qui entraîne une morbidité et une mortalité importantes en particulier dans les pays en développement (**Shane et al., 2017**).

On note que la fréquence de la septicémie augmente au fur et à mesure que le poids de naissance et l'âge gestationnel diminuent (**Shane et al., 2017**).

La septicémie néonatale se divise en deux formes, l'une précoce et l'autre tardive qui diffèrent par leur mode d'acquisition et, par conséquent, par le moment de leur apparition (**Kim, 2020**) :

2.1.1 Septicémie bactérienne précoce (EOS)

Le sepsis précoce (EOS) survient dans les 72 heures suivant la naissance (**Van Herk, 2016**). Elle est généralement acquise par transmission verticale lors de l'accouchement par voie vaginale à partir d'organismes présents dans l'appareil génital maternel ou dans le liquide amniotique contaminé (**Hornik et al., 2012**).

L'EOS se distingue généralement par une bactériémie, une méningite et une pneumonie. Elle est associée à une mortalité significative et à des complications à court, à moyen et à long terme (lésions auditives, crises d'épilepsie, anomalie ou retard du développement neurologique). La majorité des infections sont causées par des streptocoques du groupe B (SGB), des Escherichia coli (E. coli) et les staphylocoques à coagulase négative (CoNS) (**Shehab El-Din EMR et al., 2015**).

2.1.2 Septicémie bactérienne tardive (LOS)

Les nouveau-nés de très faible poids de naissance sont très sensibles à la septicémie tardive (LOS) qui survient entre le 4e et le 120e jour de vie (**Boettiger, 2017**). La septicémie néonatale tardive

survient le plus souvent chez les nouveau-nés qui restent hospitalisés pendant de longues périodes, comme les prématurés ou les nouveaux nés à terme qui nécessitent une hospitalisation prolongée et des procédures invasives (**Procianoy et Silveira, 2019**).

Ces infections sont plus susceptibles d'être attribuées à des organismes à Gram positif, y compris les staphylocoques coagulo-négatifs et les streptocoques (**Shane et al., 2017**).

2.2. Epidémiologie

Selon l'étude de 2015 sur la charge mondiale de morbidité, la septicémie néonatale est la troisième cause de mortalité néonatale (336 300 décès au total par an) et la seizième cause de perte d'années de vie dans tous les groupes d'âge (**Wang et al., 2015**).

Le nombre de décès des nouveau-nés au niveau mondial, était de 5 millions en 1999 et il a diminué à 2,5 millions en 2017 (**Belachew et Tewabe, 2020**).

L'incidence de la septicémie bactérienne néonatale peut varier d'un pays à l'autre ainsi qu'au sein d'un même pays. Dans les pays en développement, la mortalité néonatale est d'environ 34 pour 1000 naissances vivantes et survient principalement au cours de la première semaine de vie, alors qu'elle n'est que de 5 pour 1000 naissances vivantes dans les pays développés (**Costello et al., 2001**).

Aux États-Unis, 36 % des nouveau-nés nés avant 28 semaines de gestation complète souffrent d'au moins un épisode d'infection du sang au cours de leur hospitalisation à la naissance, avec une mortalité associée allant jusqu'à 50 %. Comparativement aux nouveaux nés à terme, la septicémie chez les prématurés est jusqu'à 1000 fois plus fréquente et elle est associée à des taux plus élevés de mortalité et de handicap neurodéveloppementaux à vie (**Wynn, 2016**).

2.3. Facteurs de risques

Différents micro-organismes sont responsables de la maladie selon l'âge d'apparition. La source de l'agent pathogène peut être attribuée à une infection in-utero, à une acquisition à partir de la flore maternelle, ou à une acquisition postnatale à l'hôpital ou dans la communauté. Le moment de l'exposition, la taille de l'inoculum, l'état immunitaire du nouveau-né et la virulence de l'agent pathogène influencent l'expression clinique de la septicémie néonatale (**Shane et al., 2017**).

2.3.1 Facteurs de risque de septicémie précoce

2.3.1.1 Colonisation par Streptococcus du groupe B (Streptococcus agalactiae) : Les maladies à streptocoques du groupe B (SGB) sont l'une des principales causes de morbidité et de mortalité

néonatales depuis les années 1970 La colonisation maternelle par des SGB dans les voies génito-urinaires ou gastro-intestinales et la transmission au nouveau-né pendant le travail et l'accouchement constituent le principal facteur de risque de maladie invasive à SGB à début précoce (**Baker et al., 1978; Baker et al., 1973**). Une femme enceinte colonisée par *Streptococcus agalactiae* qui n'a pas suivi de prophylaxie intrapartum a une probabilité 25 fois plus élevée d'avoir un nouveau-né atteint de septicémie néonatale précoce qu'une mère non colonisée (**Baker et al., 2011**).

2.3.1.2 Rupture prématurée des membranes (RPM): La rupture prématurée des membranes (RPM) est la rupture de la membrane amniotique avant le début du travail (**Hnat et al., 2005**). Elle est associée à des risques élevés de morbidité et de mortalité maternelle et périnatale (**Surayapalem et al., 2017**). Elle survient dans 5 à 10 % de toutes les grossesses et dans 8 à 10 % des grossesses à terme et dans 2,0 % à 3,5 % des grossesses prématurées, et constitue la cause la plus fréquente de naissance prématurée, présente dans 30 % à 40 % des cas (**Yudin et al., 2017**). Les nouveau-nés de mères ayant une rupture de la membrane amniotique pendant plus de 18 heures sont quatre fois plus susceptibles d'avoir une infection que ceux nés de mères n'ayant pas de rupture (**Schrag et al., 2006**).

2.3.1.3 Chorioamnionite : La chorioamnionite, souvent appelée infection intra-amniotique, est une inflammation aiguë des membranes fœtales, due à une infection bactérienne. La chorioamnionite résulte d'une invasion microbienne du liquide amniotique, souvent à la suite d'une rupture prolongée de la membrane chorioamniotique (**Wortham et al., Pediatrics 2016; Goldenberg et al., 2011**). La présence d'une chorioamnionite augmente la possibilité d'une infection néonatale précoce (**Jackson et al., 2012**). Les bactéries les plus fréquemment isolées des placentas présentant une chorioamnionite histologique et du liquide amniotiquesont sont : *Ureaplasma parvum* et *Ureaplasma urealyticum*. La relation entre la chorioamnionite et le SOE est systématiquement observée dans la population des prématurés, mais elle est beaucoup moins fréquente chez les nouveau-né à terme (**Higgins et al., 2016**).

2.3.2 Facteur de risque de septicémie néonatale tardive

2.3.2.1 Prématurité : la prématurité est un facteur important sur la survenue de la septicémie néonatale. Manuck et al ont également déclaré que la grossesse prématurée de moins de 37 semaines est la cause la plus fréquente de morbidité néonatale (**Manuck et al., 2016**). Les nouveaux nés prématurés de faible poids de naissance ont une incidence d'infection 3 à 10 fois plus élevée que les nouveaux nés à terme de poids normal (**Shane et al., 2017**).

Le dysfonctionnement immunitaire et l'absence d'anticorps maternels IgG acquis par voie transplacentaire chez les prématurés pourraient accroître le risque d'infection, et par conséquence l'absence d'allaitement maternel qui contient plusieurs substances liées au système immunitaire, telles

que l'IgG et les cytokines régulatrices, qui sont considérées comme protectrices et stimulent le système immunitaire peut être un facteur de risque (**Shane et al., 2017**).

De plus, les contacts avec le personnel hospitalier, les membres de la famille, les sources de nourriture et les équipements contaminés sont autant d'occasions d'exposition aux agents pathogènes. La contamination des mains est la source la plus courante d'infections postnatales chez les nouveau-nés admis à l'hôpital (**Shane et al., 2017**).

2.3.2.2 Rupture des barrières naturelles : les lésions et les lacérations de la peau et des muqueuses peuvent être une porte d'entrée pour l'invasion bactérienne (**Shane et al., 2017**).

2.3.2.3 Les cathéters centraux à demeure laissés longtemps sont des portes d'entrée pour les bactéries (**Shane et al., 2017**).

2.3.2.4 Utilisation de bloqueurs H2 : l'acidité gastrique agit comme une barrière à la prolifération et à l'invasion bactérienne ; l'utilisation de bloqueurs H2 diminue le mécanisme de défense et augmente le risque d'invasion bactérienne (**Romaine et al., 2016**).

2.3.2.5 Utilisation prolongée d'une antibiothérapie empirique : l'utilisation d'une antibiothérapie empirique pour la septicémie néonatale précoce pendant plus de cinq jours augmente l'incidence de la septicémie néonatale tardive, en particulier dans les unités où l'on utilise peu de lait maternel et où l'on prescrit trop de céphalosporines de troisième génération (**Cotten et al., 2009**; **Greenberg RG, Chowdhury et al., 2019**).

Une incidence plus élevée de septicémie a été suggérée chez les nouveau-nés de sexe masculin, probablement sur la base de l'hypothèse du désavantage masculin (**Cortese et al., 2016**; **Satar M, O'zlu" F. 2012**). Les nouveau-nés de sexe masculin sont plus sensibles aux conditions environnementales périnatales et postnatales défavorables et sont plus susceptibles de naître prématurément et avec un poids de naissance inférieur, deux facteurs qui augmentent le risque de septicémie néonatale (**Roy et al., 2014**).

Le nouveau-né peut également être infecté par des agents pathogènes provenant de la mère pendant l'allaitement, par les sécrétions et les gouttelettes respiratoires et par contact avec les lésions, surtout si les lésions se trouvent dans le sein et le mamelon direct (**Lanari et al., 2012**).

La surveillance et l'évaluation précises de ces facteurs sont essentielles pour améliorer le pronostic et réduire la mortalité en cas de septicémie néonatale.

2.4. Symptômes

La septicémie représente un facteur majeur de menace vitale à toutes les tranches d'âge, particulièrement en période néonatale (**Mahalleiet al., 2018**). Les signes et symptômes de la septicémie néonatale sont souvent non spécifiques (**Wynn, 2016**). Cette infection est considérée comme présente si au moins deux des signes suivants sont observés: Température centrale supérieure à 38,5°C ou inférieure à 36°C, une détresse respiratoire, vomissements, diarrhée, l'irritabilité, la léthargie ou une mauvaise alimentation, une hypothermie ou une hypotension avec une mauvaise perfusion de la peau, convulsions, cyanose, ictère (jaunisse), difficulté à téter, abcès, pétéchies, purpura cutané, apnée, tachypnée (**Shane et al., 2017**).

Bien que plusieurs organes ou systèmes puissent être atteints au cours de l'infection néonatale précoce, les signes d'infection néonatale tardive et très tardive peuvent être multisystémiques ou focaux (comme la méningite, la pneumonie, l'omphalite, l'ostéomyélite, l'arthrite septique) (**Sealeet al., 2014**).

2.5. Physiopathologie

2.5.1. Dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire

Le rôle de l'activation de l'endothélium au cours du sepsis et du choc septique chez le nouveau-né, en particulier chez le nouveau-né prématuré, a été moins bien étudié. Il a été démontré que les toxines du Streptocoque groupe B (SGB) endommagent l'endothélium pulmonaire et participent probablement aux complications pulmonaires associées à la pneumonie à SGB telles que le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS) et le développement d'une hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né. Les niveaux des molécules d'adhésion E-sélectine et P-sélectine, exprimées et sécrétées par l'endothélium activé, sont augmentés dans le sérum des nouveau-nés atteints de septicémie et reflètent probablement une activation endothéliale significative (**Wynn et Wong, 2017**).

2.5.2. Coagulopathie

Le développement d'un état procoagulant dans la microvasculature environnante permet le piégeage des agents pathogènes envahisseurs et empêche leur dissémination, il est lié à une activation cellulaire intense (plaquettes, leucocytaire et endothéliale) via l'induction de cytokines pro-inflammatoires et des modifications phénotypiques de l'endothélium vasculaire (prothrombotique) (**van der Poll et Herwald, 2014**).

Au cours des infections graves, comme le sepsis et choc septique, l'activation de la coagulation devient systémique et pathologique, peut aboutir à la coagulation intravasculaire disséminée (DIC), car elle est excessive et dérégulée (**Fourrier, 2012**).

La septicémie est associée à une thrombocytopénie chez les nouveau-nés, les plaquettes sont hyporéactives pendant les premiers jours après la naissance avec formation de microthrombus, ce qui complique la capacité du système immunitaire à contenir une menace microbiologique et augmente le risque d'hémorragie (**Kuhle et al., 2003**).

2.5.3. Dysfonctionnement cardiovasculaire

La réponse hémodynamique chez les nouveau-nés est beaucoup plus variable et compliquée par une association peu claire entre une pression artérielle « normale » et un débit sanguin systémique adéquat. Les nouveau-nés prématurés atteints de septicémie ont des débits cardiaques gauche et droit relativement élevés et de faibles résistances vasculaires systémiques. Un débit ventriculaire gauche élevé suggère que le choc septique chez les nouveau-nés prématurés est principalement dû à une défaillance vasorégulatrice (**Koert de Waal et Evans, 2010**).

Une vasorégulation périphérique anormale avec ou sans dysfonctionnement myocardique sont les principaux mécanismes de l'hypotension accompagnant le choc septique chez le nouveau-né. Les nouveau-nés atteints de septicémie peuvent présenter une tachycardie, une hypotension et une perfusion adéquate (choc chaud, vasodilatation) ou une perfusion inadéquate (choc froid, vasoconstriction) (**McKiernan et Lieberman, 2005**).

Chez les nouveaux-nés prématurés porteurs d'une persistance du canal artériel, un remplissage important pour pallier à l'hypotension artérielle peut entraîner une surcharge hydrique, un œdème pulmonaire ou une insuffisance cardiaque (**Luce WA et al., 2007**).

2.5.4. Syndrome de dysfonctionnement multi-organique

Un syndrome de dysfonctionnement multi-organique peut représenter le stade final d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique grave ou d'un sepsis (**Despondet al., 2001**). Un débit cardiaque insuffisant et une défaillance microcirculatoire, qui peuvent être combinés à la formation de microthrombus et de DIC, peuvent entraîner une mauvaise perfusion des reins, du foie, de l'intestin, et du système nerveux central (**Csaicsichet al., 2008**). Des études suggèrent que le mécanisme de défaillance d'organe dans la septicémie peut être lié à une diminution de l'utilisation de l'oxygène associée à un dysfonctionnement mitochondrial plutôt qu'à un mauvais apport d'oxygène aux tissus (**Harris et al., 2005**). Augmentation de la dépense énergétique et de la consommation d'oxygène et

une diminution de la fonction oxydative mitochondriale précipitée par l'hypoxie et la présence de radicaux libres nocifs peuvent entraîner une croissance corporelle altérée et un manque d'énergie (**Bauer et al., 2002**).

2.6. Diagnostic

Le diagnostic de sepsis néonatal est difficile car les signes cliniques, en particulier au début de la maladie, sont difficiles à distinguer des autres causes de maladies néonatales.

2.6.1. Biomarqueurs inflammatoire

Plusieurs Biomarqueurs inflammatoires de la phase aiguë sont produits par le foie en réponse aux cytokines tels que : protéine C réactive (CRP), interleukine-6 (IL-6), IL-8, facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), amyloïde sérique A (SAA), procalcitonine. Les niveaux de Biomarqueurs augmentent avec le degré de l'inflammation. Parmi ces Biomarqueurs, les plus utilisés pour le diagnostic d'une infection néonatale sont : la CRP, procalcitonine (**Eschborn et Weitkamp, 2019**)

.

La protéine C réactive (CRP) est l'un des tests de laboratoire les plus facilement disponibles et les plus fréquemment utilisés dans le diagnostic de la septicémie néonatale (**Ismail AQ et Gandhi, 2014**). Sa synthèse est stimulée par les cytokines, principalement l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-1 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (**Brown et al., 2019**). Il a été démontré que les mesures en série de la CRP augmentent la sensibilité du diagnostic de septicémie 24 à 48 heures après l'apparition des symptômes. (**Arnon et Litmanovitz, 2008**).

2.6.2. Hémoculture automatisée

Les techniques de culture conventionnelle restent le « gold standard » pour confirmer le diagnostic de septicémie néonatale. Cela peut prendre beaucoup de temps. L'introduction de systèmes automatisés qui détectent la présence de croissance à partir de la production bactérienne de CO₂ a réduit le temps de détection de l'organisme à 24-48h (**Anja vonLaeret al., 2021**). Les facteurs susceptibles d'influencer la récupération des agents pathogènes dans le sang comprennent la quantité de volume sanguin obtenue (2ml), le moment du prélèvement et le nombre d'échantillons prélevés (**Istemi Han Celiket al., 2022**).

Chez les nouveau-nés, la présence d'une bactériémie faible ou intermittente et l'exposition maternelle aux antimicrobiens pendant l'accouchement peuvent diminuer la sensibilité des hémocultures. La nécessité d'obtenir des cultures anaérobies chez les nouveau-nés avant de

commencer les antibiotiques n'est pas claire. L'incidence globale d'isolats anaérobies cliniquement significatifs trouvés dans une population néonatale était de 0,2 % de toutes les hémocultures réalisées (Messbarger et Neemann, 2018). Le retard dans l'identification des agents pathogènes et les tests de sensibilité aux antibiotiques augmente l'exposition aux antibiotiques à large spectre (Cotten CM, 2016).

2.6.3. Méthodes microbiologiques moléculaires

Plusieurs systèmes de diagnostic ont été développés pour l'identification rapide des organismes trouvés dans les hémocultures positives directement à partir du sang et offrent des délais d'exécution plus rapides par rapport aux méthodes conventionnelles. Ces tests identifient rapidement les organismes qui se développent dans des hémocultures positives, mais n'éliminent pas le temps nécessaire à la croissance de ces culture (Kothari *et al.*, 2014)

Les progrès récents des techniques moléculaires permettent l'amplification d'agents pathogènes microbiens directement à partir d'échantillons de sang total en moins de 12 h sans dépendre de la croissance microbienne initiale dans les hémocultures. Cela offre l'avantage d'une identification le jour même et d'une thérapie antimicrobienne ciblée précoce et spécifique à l'agent pathogène (Kothari *et al.*, 2014).

Ces techniques moléculaires reposent principalement sur les méthodes d'amplification de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour les gènes d'ARNr 16S ou 23S bactériens et le gène d'ARNr 18S de champignons (Straub *et al.*, 2017).

2.6.4. Indices hématologique

Le nombre de leucocytes ($< 5\ 000$ ou $\geq 20\ 000/\text{mm}^3$) de neutrophiles absolus ($< 1\ 000$ ou $\geq 5\ 000/\text{mm}^3$) et de neutrophiles immatures/total ($> 0,2$) et de frottis sanguin périphérique (granulation toxique, vacuolisation et corps de Dohle) sont traditionnellement utilisé pour faciliter le diagnostic de la septicémie néonatale (Arnon et Litmanovitz, 2008).

Le nombre de leucocytes commence entre $6\ 000$ et $30\ 000/\text{mm}^3$ le premier jour de la vie et diminue à $5\ 000$ – $20\ 000/\text{mm}^3$ plus tard (Cantey et Baird, 2018). Une revue de la littérature par Sharma *et al.* a rapporté que la leucopénie (nombre de globules blancs $< 5000/\text{mm}^3$) a une faible sensibilité (29 %) mais une spécificité élevée (91 %) pour le diagnostic de septicémie néonatale (Sharma. D *et al.*, 2018).

La numération absolue des neutrophiles (ANC < 1 000/mm³ à ≥ 4 h) est considérée comme plus spécifique de la septicémie néonatale précoce par opposition à la neutrophilie.

Une analyse des concentrations de neutrophiles dans le sang de 30 354 tests effectués sur des nouveau-nés de 23 à 42 semaines de gestation a démontré que le pic de ANC était plus tardif chez les nouveau-nés prématurés <28 semaines de gestation par rapport aux nouveau-nés ≥28 semaines de gestation (Schmutz *et al.*, 2008).

La thrombocytopénie est associée à une septicémie néonatale. Le volume plaquettaire moyen (MPV) augmente tout en étant plus actif et associé aux cytokines et médiateurs inflammatoires. Une méta-analyse qui comprenait 11 études et 932 patients, a rapporté que le MPV était plus élevé dans la septicémie néonatale (Wang *et al.*, 2020).

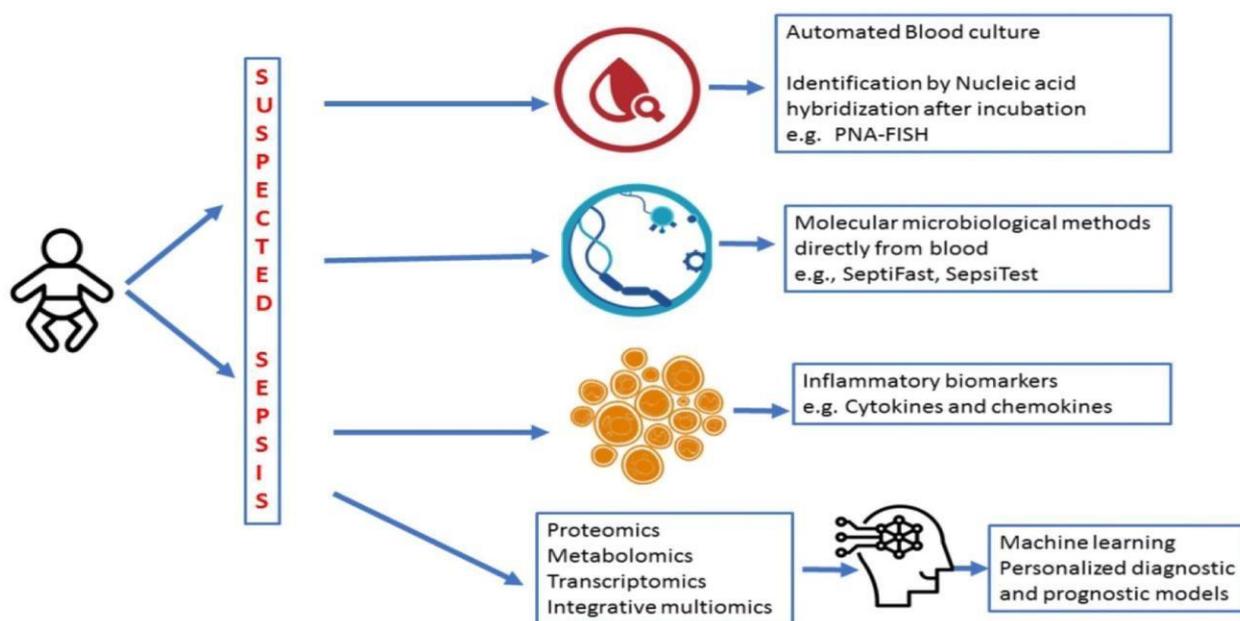


Figure 1: Tests diagnostiques disponibles pour le sepsis néonatal

(Istemi Han *et al.*, 2021)

2.7. Traitement

Le traitement du sepsis néonatal est difficile. Plusieurs thérapeutiques ont été essayées pour contrôler l'inflammation systémique et combattre les agents pathogènes. Cependant, ce processus inflammatoire systémique peut devenir incontrôlé, des dysfonctionnements d'organes entraînant des dysfonctionnements d'organes potentiellement mortels. Ainsi, il est logique d'essayer de contrôler le SIRS chez les patients atteints de septicémie en utilisant des molécules actives contre les cytokines

pro inflammatoires (anti-IL-1, anti-IL-10 et anti-PAF: facteur d'agrégation plaquettaire) (**Vincent et al., 2013**).

Le choix le plus couramment utilisé pour prévenir la septicémie néonatale précoce est le traitement antibiotique intrapartum visant le streptocoque B chez les mères porteuses (**Behjatiet al., 2012**). Cependant, l'incidence de la septicémie néonatale tardive a augmenté avec l'augmentation du taux de survie des bébés prématurés et de très faible poids (**IlkayOzmeral et Ali Bulbul, 2020**)

L'administration empirique immédiate d'antimicrobiens à large spectre, la réanimation liquidienne agressive et le soutien vasoactif ou inotrope (ou les deux) sont les piliers de la prise en charge thérapeutique de la septicémie néonatale (**Du Pont-Thibodeauet al., 2014**)

3. Réponse immunitaire au cours du sepsis

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) chez un nouveau-né prématuré est une condition caractérisée par une réponse de défense exagérée de l'organisme à un facteur de stress nocif comme les infections. Elle implique la libération des réactifs de la phase aiguë tels que les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines, les APP, les protéines de système du complément. Ainsi, l'activation des cellules immunitaires innées (neutrophiles, monocytes, CD) et adaptatives (lymphocytes T et B).

3.1. L'activation des récepteurs Toll-Like

Les capteurs innés les plus connus sont les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR), parmi lesquels les récepteurs Toll-like (TLR). Les TLR s'engagent avec des protéines accessoires et adaptatrices tels que les lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycanes, triacyl-lipopeptide, et avec les protéines intracellulaires ou les médiateurs libérés par les cellules mourantes ou endommagées comme le groupe de haute mobilité box-1 (HMGB-1), les protéines de choc thermique (Hsps) et l'acide urique) pour faciliter la reconnaissance des agents pathogènes et leur activation du récepteur. La régulation à la hausse des ARNm de TLR2 et de TLR4 dans les leucocytes des nouveau-nés se produit respectivement au cours de l'infection à Gram positif et à Gram négatif, à tous les âges gestationnels (**Zhang et al., 2007**).

Tous les TLR, à l'exception du TLR3, utilisent la voie de signalisation dépendante de MyD88 qui va culminer avec l'activation du facteur de transcription nucléaire factor-kappa B (NF- κ B) et la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) qui vont ensuite activer le facteur de

transcription protéine activatrice 1 (AP-1). NF- κ B et AP-1 vont promouvoir l'expression accrue de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6) et de cytokine anti-inflammatoire (IL-10) qui est produit par le sang de cordon des prématurés (Maria Diasset *al.*, 2021).

la voie de signalisation dépendante de TRIF, utilisée par TLR3; TLR4; TLR7 et TLR9, elle mène à l'activation de NF- κ B, mais également une activation diminuée du facteur de transcription de facteur régulateur de l'interféron (IRF) dans les cellules dendritiques DC néonatales ce qui explique l'altération de la production néonatale de l'interféron de type 1 (IFN- β et IFN- α) et IL-12p35. Les TLR8 endosomaux dans les cellules néonatales se produit au mois à des niveaux adultes, conduisant à une production intense de TNF- α (Kollmann *et al.*, 2012).

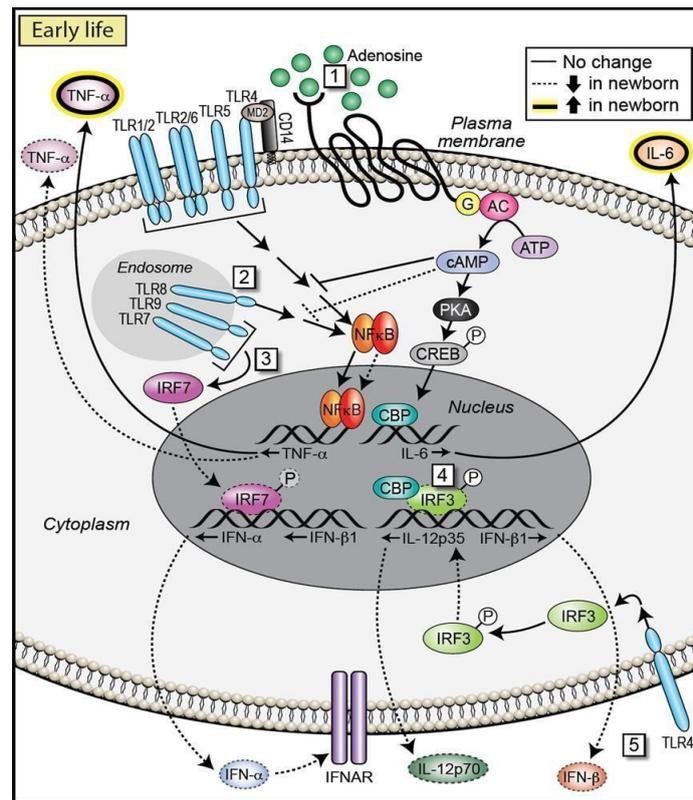


Figure 2: Cascade de signalisation des récepteurs Toll-Like dans les cellules néonatales (Kollmann *et al.*, 2012)

3.2. Cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion

Comparativement aux adultes septiques, les nouveau-nés septiques produisent moins d'IL-1 β , d'IFN- γ et d'IL-12. La diminution de la production de cytokines est due en partie à une diminution de la production d'importants médiateurs intracellulaires de la signalisation TLR, notamment le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88), le facteur de régulation de l'interféron 5 (IRF5) et p38 qui présentent une diminution spécifique à l'âge gestationnel (Sadeghi *et al.*, 2007).

La production de cytokines pro-inflammatoires conduit à l'activation des cellules endothéliales, y compris une expression accrue des molécules d'adhésion cellulaire (CAM), la production de

chimiokines tels que: IP-10, CCL5 (RANTES), MCP-1, MIP-1 et IL-8 et de substances vasoactives, l'activation du complément et le développement d'un état procoagulant qui facilitent le recrutement des leucocytes et la diapédèse. La régulation à la hausse des CAM [ICAM soluble, VCAM, L, P et E-sélectines et CD11b/CD18] pendant la septicémie facilite le roulement et la migration extravasculaire des leucocytes. La diminution de l'expression néonatale des cellules polymorphonucléaire (PMN) et des monocytes L-sélectine et MAC-1 altère l'accumulation aux sites d'inflammation (**Figueras-Aloyet al., 2007**).

Les cytokines anti-inflammatoires s'opposent aux actions des cytokines pro-inflammatoires afin de prévenir une activation et un recrutement cellulaires excessifs qui peuvent entraîner des lésions tissulaires et une inflammation systémique. L'endothélium peut être endommagé lorsque les PMN libèrent des intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO). LTE-leucotriène, NO-oxyde nitrique, PMN-neutrophile (**Ng PC et al., 2007**).

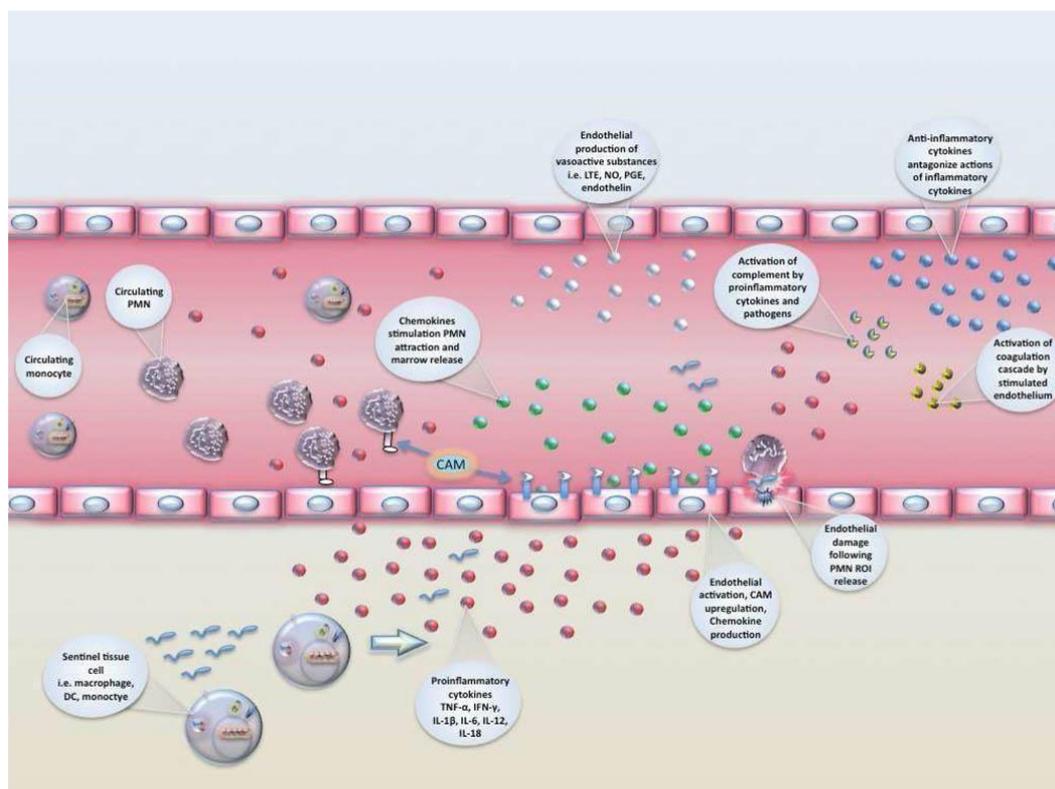


Figure 3: Recrutement cellulaire et activation de l'endothélium suite à la détection du pathogène (Wynn et Wong, 2010)

3.3. Activation de système du complément

Les récepteurs des lectines de type C (CLR) sont un composant essentiel de l'immunité innée néonatale, qui reconnaissent les fractions glucidiques des bactéries, des virus, des champignons et des

parasites. Les CLR sont soit exprimés à la surface des cellules (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin [DC-SIGN] et Dectin-1) soit sécrétés sous forme de protéines solubles (la lectine se liant au mannose [MBL]). La MBL déclenche l'activation de la voie du complément de la lectine une fois qu'elle est liée à son ligand glucidique (**Yongqing et al., 2012**). La production de complément génère des acteurs de complément C3b, C3a, C5a et C5b. Le C5b est impliqué dans la formation du complexe d'attaque des membranes, tandis que C5a et C3a recrutent des cellules phagocytaires grâce à leurs propriétés chimiotactiques, C3b facilite l'opsonisation. Les macrophages et les neutrophiles activés ont recours à l'explosion oxydative par des produits toxiques tels que anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux, le monoxyde d'oxyde nitrique (NO) et le peroxyde nitrite pour tuer les agents pathogènes (**Nordenfelt et Tapper, 2011**). Le NO altère la contractilité des vaisseaux microvasculaires et la fonction de barrière épithéliale en augmentant la perméabilité.

3.4. Effets des protéines laitières bioactives sur l'inflammation

Le lait maternel est une source connue de molécules qui agissent en synergie pour protéger la barrière intestinale et améliorer la maturation de la réponse immunitaire liée à l'intestin. Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns (**Chattertona et al., 2013**).

Le lait maternel contient des composants bioactifs qui influencent directement le développement du nourrisson et façonnent le développement du microbiote intestinal. Au-delà de sa composition nutritionnelle, il contient plusieurs substances liées au système immunitaire, telles que des cytokines régulatrices et des facteurs de croissance, qui sont considérées comme protectrices et stimulent le système immunitaire avec un impact positif sur la santé. En outre, il contient d'autres facteurs actifs non spécifiques, tels que le lysozyme, la lactoferrine, les oligosaccharides et aussi, les microorganismes, qui contribuent également à renforcer les propriétés anti-infectieuses et immunomodulatrices (**Walker, 2010**).

3.4.1. Caséines (CN)

Les CN sont immuno-modulateurs, régulent l'adhésion et la chimiotaxie des leucocytes, suppriment la croissance cellulaire et améliorent l'inflammation. Elles activent la granulopoïèse et la S1-CN stimule la maturation des monocytes humains en cellules dendritiques via le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) (**Vordenbaumen et al., 2011 ; Dominguez-Melendez et al., 2012 ; Santiago-Osorio et al., 2010**).

3.4.2. Alpha-lactalbumine

Humaine α -La protège le CD14 soluble de la dégradation protéolytique, ce qui pourrait lui permettre de neutraliser les agents pathogènes dans la lumière du tube digestif (**Spencer et al., 2010**).

La α -La est un chimioattractant qui stimule la sécrétion de CXCL8, MIP-1 et MIP-1 par les neutrophiles humains. Il dirige également les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes vers les sites inflammatoires (**Rusu et al., 2010**).

La α -La a stimulé la libération de l'IL-1 et de l'IL-1ra de manière dose-dépendante. Il est intéressant de noter qu'un excès d'IL-1ra par rapport à celui d'IL-1 a été observé, ce qui a modulé l'inflammation et l'efficacité de α -La s'est rapprochée de celle de l'anti-inflammatoire, le diclofénac (**Yamaguchi et al., 2009**).

3.4.3. L'actoferrine LF

Le FL a des effets anti-inflammatoires et pro-inflammatoires in vivo (**Wong et al., 2009**). Le LF active les macrophages par des mécanismes dépendants et indépendants de TLR4. D'autre part, le FL active les macrophages directement par des mécanismes dépendants du TLR-4, indépendamment du LPS (**Curran et al., 2006**). Ceci est lié à la glycosylation des FL qui entraîne une capacité modérée d'activation immunitaire médiée par le TLR-4, activant le NF-kB (**Ando et al., 2010**). Les LF administrées par voie entérale augmentent également la production de cellules NK et élèvent l'IL-18 dans la circulation portale (**Kuhara et al., 2006**).

3.4.4. Immunoglobulines

Les nouveau-nés, en particulier les prématurés, peuvent présenter des taux réduits d'Ig circulants (IgA, IgM et IgE) et la protection locale du tube digestif liée aux Ig contre les antigènes entériques est facilitée par l'ingestion de lait maternel pendant l'allaitement (**Holt et Jones, 2000 ; Brandtzaeg, 2003**). Les Ig ont également des effets anti-inflammatoires plus directs en chélatant directement les antigènes bactériens et viraux (**Kvistgaard et al., 2004 ; Bojsen et al., 2007**). L'IgA sécrétoire humaine (sIgA) et le composant sécrétoire sont stable aux effets de la digestion dans l'estomac lorsqu'ils sont traités dans des conditions simulant celles in vivo (**Chatterton et al., 2004**). Ces IgA et d'autres IgG polymériques, comme l'IgM pentamère, sont capturées par le récepteur d'Ig polymérique (pIgR) situé dans l'intestin, ce qui facilite leur transcytose (**Newburg et Walker, 2007 ; Asano et Komiyama, 2011**). L'IgA humaine réduit le burst oxydatif et régule à la baisse le TNF- et l'IL-6 dans les monocytes humains (**Wolf et al., 1994, Wolf et al., 1996**).

3.4.5. Facteur de croissance

Il a été observé par la suite que le TGF- régule de nombreuses voies, telles que la prolifération et la différenciation des lymphocytes, des phagocytes, des cellules dendritiques et régule la tolérance orale ainsi que la modulation des réponses inflammatoires et de l'allergie (**Penttila, 2010**).

Le TGF- régule la différenciation des cellules Th17 qui, de manière importante, maintiennent l'intégrité de la barrière intestinale et produisent de l'IL-10 (**Li et Flavell, 2008**).

Le facteur de croissance épidermique 8 des globules gras du lait entraîne une reprogrammation inflammatoire des cellules endothéliales et des macrophages humains et murins (**Brissette et al., 2012**).

3.5. Réponses immunologiques spécifiques de la muqueuse intestinale

La barrière de la muqueuse intestinale agit comme la première ligne de défense contre l'environnement hostile luminal. Par conséquent, la fonction de barrière de la muqueuse intestinale est cruciale pour la santé humaine (**Blikslager et al., 2007**).

Le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale dépend principalement de la défense de la barrière muqueuse qui est composée de réponses immunologiques spécifiques et de mécanismes de barrière non spécifiques :

Le système immunitaire spécifique de la muqueuse intestinale diffère largement des autres systèmes immunitaires de l'organisme. Les réponses immunologiques spécifiques du système immunitaire de la muqueuse intestinale comprennent l'expression de l'immunoglobuline A sur les surfaces lumineales apicales ; et les lymphocytes sensibilisés sur les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes, ainsi que dans la lamina propria et l'épithélium intra-muqueux (**Magalhaes et al., 2007; Snoeck et al., 2005**).

Les mécanismes de barrière non spécifiques consistent en la capacité de régénération de l'épithélium muqueux, les jonctions intercellulaires entre les cellules épithéliales et la couche de gel de mucus (**Jankowski et al., 1994**). L'épithélium muqueux a une grande capacité de régénération, en raison de la capacité potentiellement puissante des cellules souches pluripotentes pour la migration, la prolifération et la différenciation (**Wang, 2005**).

La couche de gel de mucus peut protéger la muqueuse intestinale contre les sécrétions digestives, les agents pathogènes et les dommages physico-chimiques (**J.F. Forstner et G.G. Forstner, 1994**). Elle participe aussi à la filtration des nutriments lumineux et peut affecter la digestion et l'absorption des nutriments. En outre, la muqueuse peut produire un large spectre d'agents antimicrobiens, tels que des peptides antimicrobiens, pour maintenir l'intégrité de la muqueuse (**Lehrer et Ganz, 2002**).

Le mucus possède des propriétés viscoélastiques et polymériques qui sont dérivées des principaux composants glycoprotéiques gélifiants, à savoir les mucines. Les mucines sont sécrétées par les cellules des gobelets intestinaux et peuvent être largement classées en sous-types neutres et acides. En raison des analogies entre les mucines et la glycoprotéine de la membrane entérocytaire, elles peuvent agir comme des concurrents à la liaison de nombreux antigènes étrangers (**Xiangbing et al., 2011**).

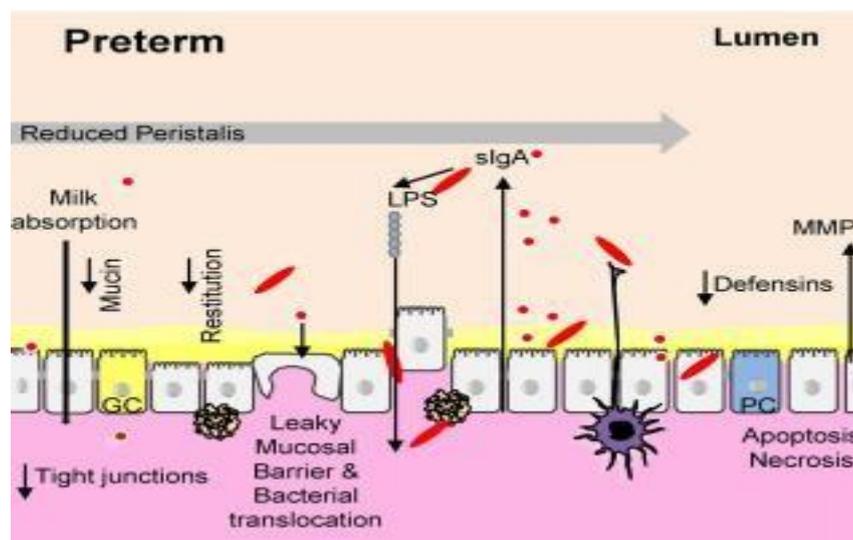


Figure 4: Réponse inflammatoire dans l'intestin d'un nouveau-né prématuré (Dereck et al., 2013).

3.6. Immunité adaptative

L'immunité adaptative est une réponse immunitaire plus lente mais plus dirigée par les lymphocytes et les anticorps acquis par la mère (**Delaney et al., 2019**).

L'immunité à médiation cellulaire est conférée par des cellules T CD4⁺ effectrices qui activent diverses cellules immunitaires via la production de cytokines, et des cellules T CD8⁺ suppressives qui jouent un rôle cytotoxique. Les cellules CD4⁺, connues sous le nom de cellules T helper ou Th, sont ensuite classées en cellules Th1 ou Th2. Les cellules Th1 jouent un rôle important dans la réponse pro inflammatoire contre les agents pathogènes microbiens. Les cellules Th2 sécrètent des cytokines et organisent une réponse anti-inflammatoire contre les parasites et les allergènes (**Margaret et al., 2020**).

L'immunité humorale implique principalement les cellules B qui fonctionnent dans la production d'anticorps, agissent comme APC pour activer les cellules CD4⁺, et répondent aux antigènes familiers en cas d'exposition répétée. Les anticorps produits par les cellules B activent les composants cellulaires du système inné, initient une voie du système du complément et inhibent directement les

agents pathogènes. Ce type d'immunité est initialement acquis par l'immunoglobuline G (IgG) transplacentaire et l'immunoglobuline A (IgA) sécrétée dans le lait maternel (**Delaney et al., 2019**).

3.7. Mémoire entraîné

Au cours des dernières décennies, il a été démontré que l'immunité innée peut construire une mémoire immunologique, ce phénomène s'appelle "mémoire entraîné" ou "la mémoire de l'immunité innée".

Chez les patients souffrant d'une immunodéficience spécifiquement les nouveau-nés prématurés, la mémoire immunitaire innée est décrite comme une reprogrammation fonctionnelle des cellules immunitaires innées après une stimulation avec un agent pathogène conduisant à une réponse renforcée (immunité entraînée) ou diminuée (tolérance immunitaire) à un stimulus secondaire (**Neteaet al., 2016**).

L'immunité entraînée est orchestrée par la reprogrammation épigénétique qu'est définie au sens large comme des modifications durables de l'expression des gènes et de la physiologie cellulaire qui n'impliquent pas de modifications génétiques permanentes telles que les mutations et la recombinaison (**Saeedet al., 2014**). Les nouveau-nés septiques présentent une régulation à la hausse significative de plusieurs gènes impliqués dans l'immunité innée par rapport aux nouveau-nés non infectés avec une expression accrue des neutrophiles et des monocytes (**Cernadaet al., 2014**).

Des études récentes démontrent l'implication de la reprogrammation métabolique dans ce processus. L'immunité entraînée est associée à des voies métaboliques qui jouent un rôle important dans la génération de produits clés qui favorisent la survie des cellules immunitaires innées, parmi ces voies : la glycolyse (également des voies telles que la glutaminolyse ou la synthèse du cholestérol), le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (également appelé cycle de Krebs), l'oxydation des acides gras (FAO), la synthèse des acides gras (FAS) (**Conti et al., 2019**).

3.8. Glutamine

La glutamine est l'acide aminé le plus abondant dans le sang et les muscles avec une concentration de 10 à 100 fois supérieure à tout autre acide aminé. C'est un acide aminé non essentiel dont le corps est capable de la synthétiser lui-même, à partir de plusieurs aliments, en fonction de ses besoins (**Agostiniet al., 2010**).

La glutamine est considérée comme un acide aminé semi-essentiel chez les nouveau-nés prématurés. Une observation clé a été faite par Lemons et al en 1976, a montré qu'il y avait un flux

net de glutamate du fœtus vers le placenta. Cela signifie que le glutamate était formé à l'intérieur du fœtus. Cependant, de tous les acides aminés transférés de la mère et du placenta au fœtus, le glutamate est le plus important avec une concentration élevée (Neu, 2001).

La glutamine est abondante dans le lait maternel, mais présente uniquement à des niveaux beaucoup plus faibles dans le lait maternisé et non présente dans les solutions de nutrition parentérale standard (Tubman *et al.*, 2005).

3.8.1. Barrière intestinale

La concentration de glutamine dans les tissus intestinaux est faible à cause de la forte activité de l'enzyme GLS qui hydrolyse la glutamine en glutamate pour maintenir l'intégrité tissulaire et permettre une absorption adéquate des nutriments et prévenir la translocation bactérienne dans la circulation sanguine (Kim M.H., Kim H., 2017).

La glutamine stimule la synthèse des protéines et réduit la protéolyse dépendante de l'ubiquitine dans l'entérocyte puisque cet acide aminé réduit l'expression du gène de l'ubiquitine, par conséquent, réduit la production de cytokines pro-inflammatoires par la muqueuse intestinale (Stehle *et Kuhn*, 2015).

3.8.2. Les muscles squelettiques

La disponibilité et le métabolisme de la glutamine dans l'organisme sont directement associés au tissu musculaire squelettique puisqu'il s'agit de l'un des tissus les plus abondants du corps humain. Les muscles squelettiques sont quantitativement le site le plus pertinent pour le stockage, la synthèse et la libération de glutamine (Tirapegui *et Cruzat*, 2015)

La glutamine est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes associés au contenu musculaire et dans la médiation de l'activation de voies, telles que la cible mammifère de la rapamycine (mTOR), qui est considérée comme un régulateur essentiel de la taille et de la masse des tissus, chez les patients sains ou malades (Curi *et al.*, 2005)

3.8.3. Foie

Le principal consommateur de glutamine est le foie, prend en charge de nombreuses activités hépatiques: catabolisme des acides aminés (Désamination ou transamination), la production de l'énergie et la synthèse des lipides et glucides (la séparation de l'azote de squelette carboné et la

synthèse de l'ammoniac NH₃), la synthèse des nucléotides (purines, pyrimidines et sucres aminés), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), les antioxydants et l'activité de cycle d'urée (**Cruzat et al., 2014 ; Curiet et al., 2016**).

Pendant le sepsis, la glutamine endogène est mobilisée, l'absorption de la glutamine par l'intestin est diminuée et le foie et le système immunitaire deviennent les principaux fournisseurs de glutamine. Une étude a révélé que la glutamine et ses dipeptides sont uniques pour inverser les effets des médiateurs septiques sur le métabolisme oxydatif du foie de rat néonatal. Une supplémentation en glutamine, en dipeptides de glutamine ou en glutathion dans la nutrition parentérale totale (TPN) peut être bénéfique pour la prévention des lésions hépatiques en cas de septicémie néonatale (**Babu, R et al., 2001**).

3.8.4. Système immunitaire

La glutamine est considérée comme un carburant pour le système immunitaire. La glutamine agit comme un substrat énergétique pour les leucocytes et joue un rôle essentiel dans:

-La prolifération cellulaire par l'activation de protéines, telles que les kinases ERK et JNK, conduisent à la transcription de gènes liés à la prolifération cellulaire (**Carr et al., 2010**).

-L'activité du processus de réparation tissulaire, la modulation des réponses de protection et de résistance aux blessures, dans lesquelles l'activité et l'expression des voies inflammatoires médiées par NF- κ B sont modulées (**Tirapegui et Cruzat, 2015**).

-Les voies intracellulaires associées à la reconnaissance des agents pathogènes: une concentration appropriée de glutamine conduit à l'expression de marqueurs clés de surface des cellules lymphocytaires (clusters de différenciation), tels que CD25, CD45RO et CD71, et à la production de cytokines, telles que l'interféron gamma (IFN- γ), TNF- α , IL-6 et IL-2 (**Branzk et al., 2014**).

-La glutamine et le glutamate jouent un rôle important dans la génération de composés essentiels au métabolisme et à la fonction des leucocytes:

- Modulation et support synergique de l'activation et la reprogrammation métabolique des macrophages pour la formation des phénotypes M1 et M2;
- Augmentation de la génération de superoxyde par la NADPH oxydase dans les neutrophiles pour assurer une activité antimicrobienne;
- Contrôle de l'immunité et de l'inflammation dans les cellules immunitaires innées et adaptatives (**Nelson et al., 2018**).

Les cellules du système immunitaire utilisent la glutamine à des taux élevés dans des conditions cataboliques: comme la septicémie, la guérison de brûlures ou d'une intervention chirurgicale et la

malnutrition, où une faible concentration sanguine peut altérer la fonction des cellules immunitaires (**Cruzat et al., 2018**).

Les nouveau-nés prématurés présentent des exigences métaboliques élevées et l'administration de la nutrition entérale est limitée par l'immaturation du tube digestif. Les néonatal de faible poids corporel peuvent être particulièrement sensibles à la déplétion en glutamine car l'apport placentaire cesse soudainement à la naissance. La tolérance à la nutrition entérale est limitée et la nutrition parentérale ne contient pas de glutamine (**Anemone van et al., 2004**).

3.9. Thréonine

La thréonine est un acide aminé essentiel nécessaire à la synthèse des glycoprotéines intestinales telles que la mucine MUC2 pour maintenir une fonction de barrière intestinale adéquate. Chez les nouveaux nés prématurés, la réduction de la fonction de barrière peut contribuer au développement de l'entérocolite nécrosante (**Patrycja et al., 2010**).

L'augmentation du taux de thréonine sérique est plus marquée chez les nouveau-nés dont l'âge gestationnel réel est le plus bas ; avec un apport élevé en thréonine, les nouveau-nés les plus prématurés ont des taux de thréonine sérique deux fois plus élevés que les nouveau-nés prématurés, des taux sanguins élevés de certains acides aminés ont été rapportés en relation avec une "carence enzymatique transitoire" et/ou un apport protéique élevé (**J. RIGO et al., 1979**).

L'acide aminé thréonine est un carburant métabolique efficace nécessaire à l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires (CSE) en fournissant des sources de carbone pour la biosynthèse des macromolécules et la régulation épigénétique (**Guohua Chena et Jian Wang, 2014**).

3.9.1. Barrière intestinale

L'intestin, un tissu hautement sécrétoire et prolifératif, joue une multitude de fonctions, telles que la digestion et l'absorption des nutriments, et la défense immunitaire contre les agents pathogènes et les toxines (**Turner, 2009**). Dans une large mesure, la fonction intestinale dépend de l'intégrité de la muqueuse intestinale. La muqueuse intestinale, composée de cellules épithéliales colonnaires, de la lamina propria et de la muqueuse musculaire, peut sécréter des quantités considérables d'hydrolases digestives et protéger les organismes des substances nocives (**Ismail et Hooper, 2005**).

La thréonine est considérée comme l'acide aminé le plus important pour l'entretien de la muqueuse intestinale car elle est utilisée dans la synthèse de la mucine qui recouvre la surface de la muqueuse (**Bertolo et al. 1998**).

Le rôle clé de l'intestin dans le maintien de la santé néonatale, l'importance du métabolisme intestinal de premier passage des AA alimentaires a suscité un intérêt considérable. Les AA absorbés par voie entérique peuvent être utilisés pour être incorporés dans les protéines cellulaires de la muqueuse, pour produire de l'énergie ou pour être transformés en d'autres AA, en substrats métaboliques et en intermédiaires de biosynthèse (**Sophie et al., 2007**).

Cependant, la muqueuse intestinale est protégée par un réseau complexe de glycoprotéines, et les protéines centrales des domaines hautement glycosylés des mucines intestinales contiennent de grandes quantités de thréonine. Il est probable qu'une proportion importante de la thréonine utilisée soit canalisée vers la production de mucines. Ces mucines sécrétoires jouent un rôle clé dans la défense de la muqueuse (**Bengmark et Jeppsson, 1995**).

En particulier chez les prématurés qui sont vulnérables aux infections pendant les premières semaines de vie, le mucus serait un aspect important de la défense (**Sophie et al., 2007**).

La thréonine joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale et de la fonction de barrière, ce qui peut être indiqué par la morphologie intestinale, la production de mucus, la perméabilité transépithéliale, l'activité enzymatique de la bordure en brosse et les performances de croissance (**Xiangbing et al., 2011**).

La restriction en thréonine alimentaire peut diminuer la production d'enzymes digestives et augmenter la perméabilité paracellulaire de la muqueuse (**Xiangbing et al., 2011**).

La disponibilité de la thréonine peut influencer la synthèse des mucines intestinales et d'autres protéines. Dans des conditions pathologiques, telles que l'iléite et la septicémie, les besoins en thréonine peuvent être accrus pour maintenir la morphologie et la physiologie intestinales (**Xiangbing et al., 2011**).

3.9.2. Foie

La dégradation de la thréonine, principalement dans le foie, fait intervenir un certain nombre d'enzymes et de cofacteurs.

Le catabolisme oxydatif de la thréonine suit soit la voie indépendante de la glycine, soit la voie dépendante de la glycine.

La voie indépendante de la glycine est catalysée par la sérine/thréonine déshydratase (STDH), qui convertit irréversiblement la thréonine en cétobutyrate. Le cétobutyrate est ensuite décarboxylé pour former du propionyl-CoA L'activité de la STDH est régulée par les protéines alimentaires, par leur teneur en thréonine, et par l'insuline, le glucagon et le cortisol (**House et al., 2001**).

L'oxydation dépendante de la glycine implique la conversion de la thréonine en glycine et en acétyl-CoA par une réaction enzymatique couplée de la thréonine déshydrogénase (TDH) et de la 2-amino-3-oxobutyrate-CoA ligase. La glycine ainsi formée a plusieurs destins, y compris le clivage pour former du CO₂ et de l'ammoniac par le système de clivage de la glycine (**Prabhu *et al.*, 2005**).

3.9.3. Signalisation

La phosphorylation des protéines est d'une importance capitale dans les systèmes de signalisation et est employée par les cellules pour modifier de façon transitoire les propriétés des protéines telles que l'activité des enzymes, leurs interactions avec d'autres protéines, leur localisation et leurs conformations, ou pour les cibler en vue de leur destruction. Chez les eucaryotes, la phosphorylation se produit presque exclusivement sur les résidus Ser, Thr et Tyr, qui représentent environ 17 % du total des acides aminés d'une protéine humaine moyenne (**Echols *et al.*, 2002**).

1. Conception de l'étude

Type d'étude : étude cas-témoins

Les expériences ont été réalisées sur les sérums des nouveau-nés prématurés. Cinq patients nouveaux nés prématurés infectés de sexe masculin et cinq témoins dont 2 de sexe masculin et 3 de sexe féminin. Les patients et les témoins ont été recrutés au niveau du service néonatalogie de l'EHS Mère & Enfant de Tlemcen.

Les prélèvements ont été réalisés les matinées entre 09h00 et 12h00. Quatre ml de sang des patients ont été prélevés en utilisant des micro-perfuseurs avec adaptateur pour prélèvement ou des aiguilles épicroâniennes.

Des tubes secs ont été utilisés pour la récolte du sang. Après les avoir remplis jusqu'au trait du volume souhaité, ces derniers ont été étiquetés de façon à ne pas cacher l'intérieur du tube, pour qu'on puisse vérifier l'état des échantillons.

2. Préparation des échantillons :

Les tubes ont été centrifugés après chaque prélèvement à 2500 tours/min pendant 15 minutes, et les sérums aliquotés dans des tubes eppendorfs ont été placés au congélateur à 20°C.

3. Dosage des taux sériques des acides aminés:

Le dosage des acides aminés a été effectué par la technique de chromatographie en phase liquide sur couche mince (CCM).

4. Matériels, produits et réactifs :

Matériels : Une cuve chromatographique, un bécher, une éprouvette, des eppendorfs, des plaques silices, une étuve, des tubes coniques, des micropipettes, des embouts, une pince, un sèche-cheveux, un récipient, du papier joseph, des ciseaux, un crayon, une règle, un cutter, une hotte chimique.

Produits et réactifs :

- ✓ Echantillon solution diluée de mélange à analyser
- ✓ Solution aqueuse de chaque AA
- ✓ L'éluant : un mélange de : **1)** Butanol. **2)** Acide acétique. **3)** Eau distillée.
- ✓ Réactif de révélation: Ninhydrine butanol acide acétique

5. Chromatographie sur couche mince (CCM)

5.1 Généralités et principes de la CCM :

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants (**Deraniehet al., 2013**).

On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre à une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf) :

Rf = hauteur de la tâche / hauteur du front du solvant.

Chaque tâche correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même Rf)(**Coskun, 2016**).

Après la révélation du chromatogramme par la Ninhydrine on obtient des spots colorés.

La Ninhydrine est un colorant spécifique des groupes N-terminaux des AA qui donne une coloration violette et parfois brune après réaction avec les acide aminé (sauf avec la proline : on obtient une couleur jaune). La Ninhydrine réagit avec les AA en donnant le pourpre de ruheman ce qui permet de donner de la couleur et donc observer les différents AA.

Les AA qui se trouvent dans le mélange, (dans notre cas le mélange est le sérum) sont identifiés grâce à des solutions pures d'acides aminés préparées auparavant, et qui vont nous servir comme des étalons de référence, la seule chose qui nous reste à faire est de calculer les Rf des constituants du mélange et les comparer avec ceux des étalons.

5.2 Préparation de la cuve chromatographique :

La cuve chromatographique est un récipient habituellement en verre fermé par un couvercle étanche qui sert d'une part à éviter l'évaporation du solvant (la phase mobile), car la CCM doit être réalisée dans une atmosphère saturée.

En ce qui concerne la préparation de l'éluant, on doit suivre les propositions du mode opératoire. On utilise un solvant contenant : butanol, acide acétique, eau distillée respectivement (70%.18%.12%).

L'éluant est versé dans le fond de la cuve en ajustant le niveau de 5 à 8 mm de hauteur.

Garnir l'intérieur de la cuve d'un papier verticalement imprégné dans l'éluant et plaqué contre la paroi : une ouverture est ménagée dans un filtre pour observer le développement de la chromatographie.

Recouvrir la cuve à l'aide de son couvercle et attendre pour que l'atmosphère de la cuve soit saturée par la vapeur de l'éluant.

5.3 Préparation des plaques CCM :

Réactiver le gel silice dans une étuve à 80°C pendant 1 h. Utiliser une plaque de dimensions (17 cm / 20 cm). Tracer un léger trait au crayon parallèle au bord inférieur à une distance de 1 cm du bas de la plaque (une ligne de dépôt qui servira à repérer les dépôts) sans arracher le matériau ou toucher avec les doigts en particulier là où la migration va se produire pour ne pas abîmer la surface de la plaque ce qui fausserait l'analyse.

Sur ce trait, tracer 14 petits points ou seront disposés les 14 dépôts dont l'espace entre chacun d'entre eux est de 1,2 cm, sans oublier de laisser 1 cm de chaque côté de la plaque.

Tracer un autre trait de repère à 1cm au-dessous du bord supérieur de la plaque là où l'éluant doit arriver.

Une fois l'éluant atteint le trait supérieur, il faut retirer la plaque et la sécher sous une hotte à l'aide d'un sèche-cheveux en mettant un masque et des gants.

5.4 Manipulation des échantillons :

Retirer les sérums du congélateur pour préparer les dilutions. Pour chaque échantillon on prend une quantité de 25 μ l à partir d'un sérum pur et la verser dans un eppendorf étiqueté contenant 75 μ l d'eau distillée. Agiter les eppendorfs à l'aide d'un agitateur vortex afin d'homogénéiser le mélange.

A l'aide d'une micropipette réglable on prélève 2 μ l de notre échantillon, puis on fait les dépôts sur nos points repères puis on répète l'opération 2 fois, il faut s'assurer que le diamètre des dépôts ne dépasse pas 2 mm.

Plonger le bord inférieur de la plaque verticalement dans le solvant de migration dans la cuve (la ligne de dépôts ne doit pas être trempée dans l'éluant). Remettre le couvercle et refermer immédiatement la cuve.

Laisser le fond de la phase mobile progresser et la migration des composés s'effectuer.

Ressortir doucement la plaque avec une pince lorsque l'éluant arrive à 1 cm du bord supérieur de la plaque.

Sécher la plaque sous hotte avec un sèche- cheveux pour évaporer entièrement l'éluant.

5.5 Révélation :

Après la migration les tâches correspondant à chaque constituant doivent être révélées :

- Plonger les plaques dans la Ninhydrine en position horizontale pendant 10 min.
- Évaporer la solution de révélation avec le sèche- cheveux et placer la plaque dans une étuve à 80°C jusqu'à l'apparition des taches colorées (10min).

Quantification des différents AA :

Une analyse de chaque plaque CCM scanné par un logiciel de traitement d'image (Image J, SPSS) a été effectuée afin de quantifier l'intensité de chaque tâche correspondant aux deux AA analysés.

Etude statistique : L'analyse des données a été réalisée à l'aide du test non paramétrique de Mann Whitney U. Où les valeurs sont exprimées en tant que moyenne. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme significative.

1. Résultats et interprétation

Échantillons	Les valeurs de CTCF de glutamine	Les valeurs de CTCF de thréonine
Témoin1	12259,472	12183,016
Témoin2	17066,144	10185,44
Témoin3	12118,296	9992,04
Témoin4	13978,176	10027,04
Témoin5	15947,784	9047,5
Patient1	20610,528	12525,12
Patient2	19309,872	12371,824
Patient3	22306,44	12283,352
Patient4	22043,032	12325,648
Patient5	18534,144	13036,44

Tableau 1 : Représente les valeurs de CTCF de glutamine et thréonine chez les nouveau-nés atteints de la septicémie par rapport au sujet sains

	Taux des CTCF de thréonine	Taux des CTCF de glutamine
N	5	5
Moyenne	10287,0072	14273,9744
Médiane	10027,04	13978,176
Ecart type	1029,18725	1969,29
Variance	1059226,39	3878103,1

Tableau 2 : statistiques descriptive des taux des CTCF des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés non infectés

	Taux des CTCF de thréonine	Taux des CTCF de glutamine
N	5	5
Moyenne	12508,4768	20560,8032
Médiane	12371,824	20610,528
Ecart type	276,33446	1477,7618
Variance	76360,734	2183779,8

Tableau 3 : statistiques descriptive des taux des CTCF des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés infectés

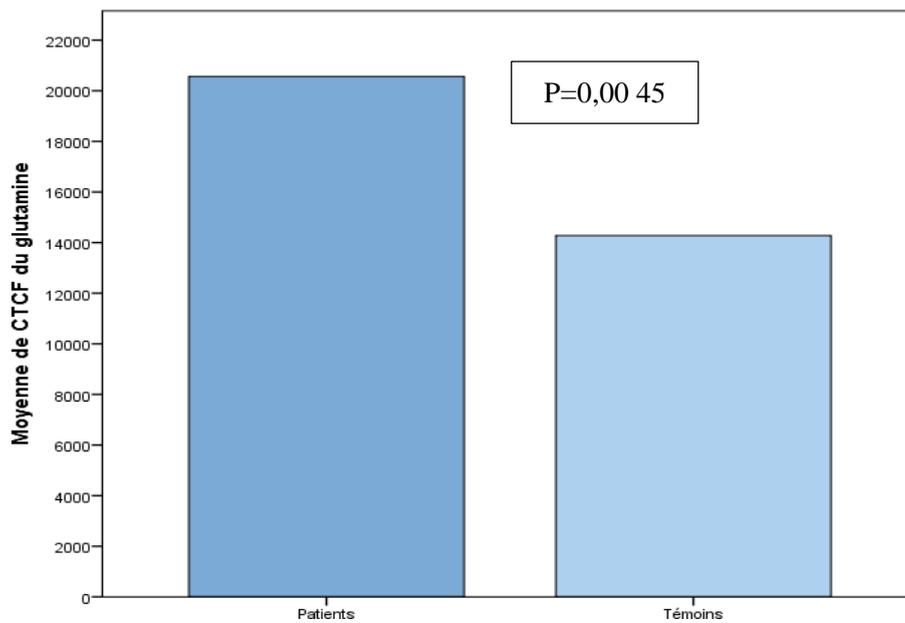


Figure 5: Moyenne des taux de CTCF de glutamine chez les patients et des témoins

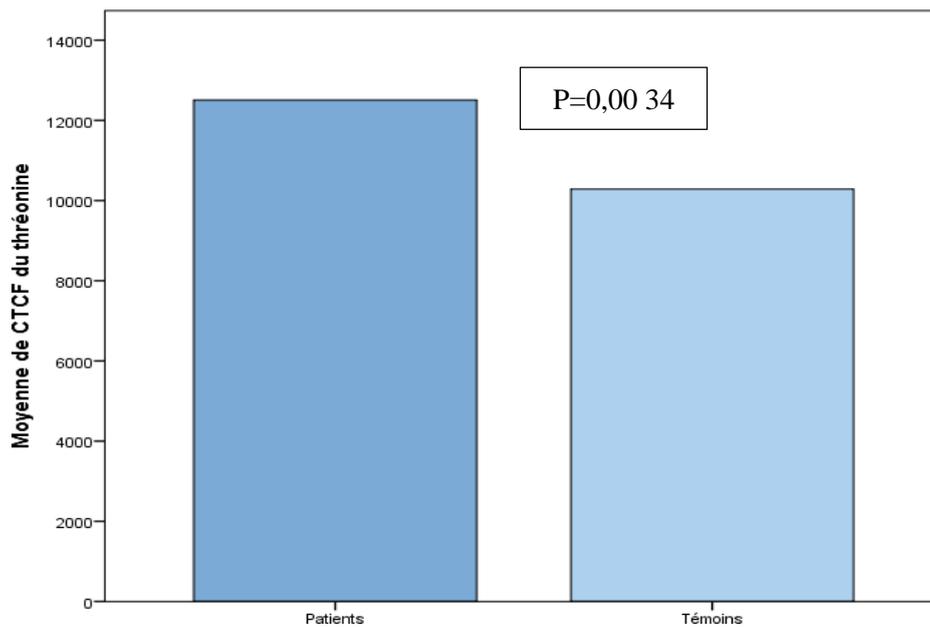


Figure 6: Moyenne des taux de CTCF de thréonine chez les patients et des témoins

Échantillons	La protéine totale	Concentration de thréonine	Concentration de glutamine
Témoin 1	54,51	8,688	7,756
Témoin 2	46,76	7,328	6,569
Témoin 3	49,94	9,189	7,498
Témoin 4	79,13	14,68	10,777
Témoin 5	56,58	4,856	4,245
Patient 1	264,09	46,129	44,084
Patient 2	41,5	8,197	5,979
Patient 3	44,43	8,608	6,83
Patient 4	60,45	8,866	8,765
Patient 5	51,19	8,842	7,513

Tableau 4 : Représente les concentrations de la glutamine et la thréonine chez nouveau-nés prématurés non infecté et infecté par la septicémie.

	Concentration de protéine totale	Concentration de thréonine	Concentration de glutamine
N	5	5	5
Moyenne	92,134	8,9482	7,369
Médiane	44,43	8,688	7,498
Ecart type	96,809	3,23574934	2,10619325
Variance	9372,156	10,4700738	4,43605

Tableau 5 : statistiques descriptive des concentrations des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés non infectés

	Concentration de protéine totale	Concentration de thréonine	Concentration de glutamine
N	5	5	5
Moyenne	57,384	16,1284	14,6342
Médiane	49,94	8,842	7,513
Ecart type	12,748	15,0022238	14,7530861
Variance	162,518	225,06672	217,653549

Tableau 6 : statistiques descriptive des concentrations des résultats de CCM de la glutamine et la thréonine chez les nouveau-nés infectés

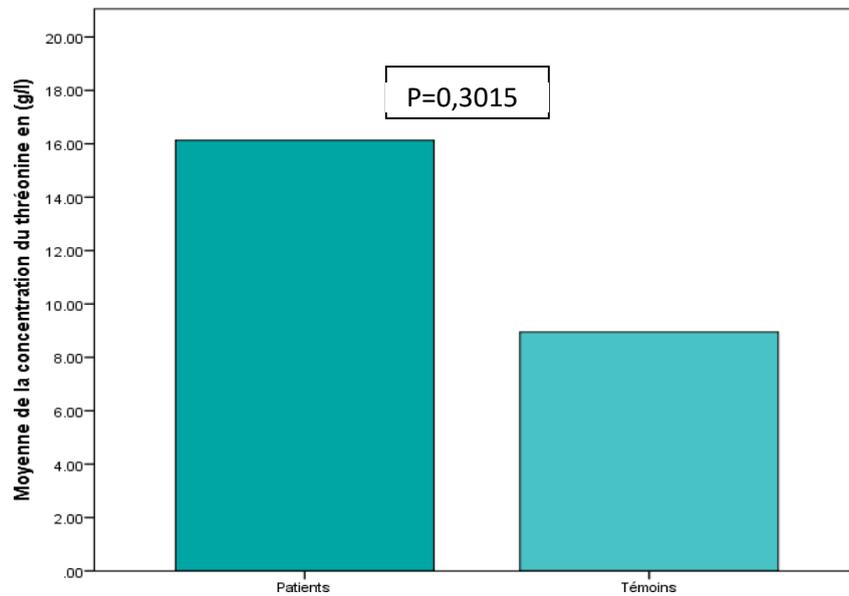


Figure 5 : Moyenne de la concentration de la thréonine des patients et des témoins

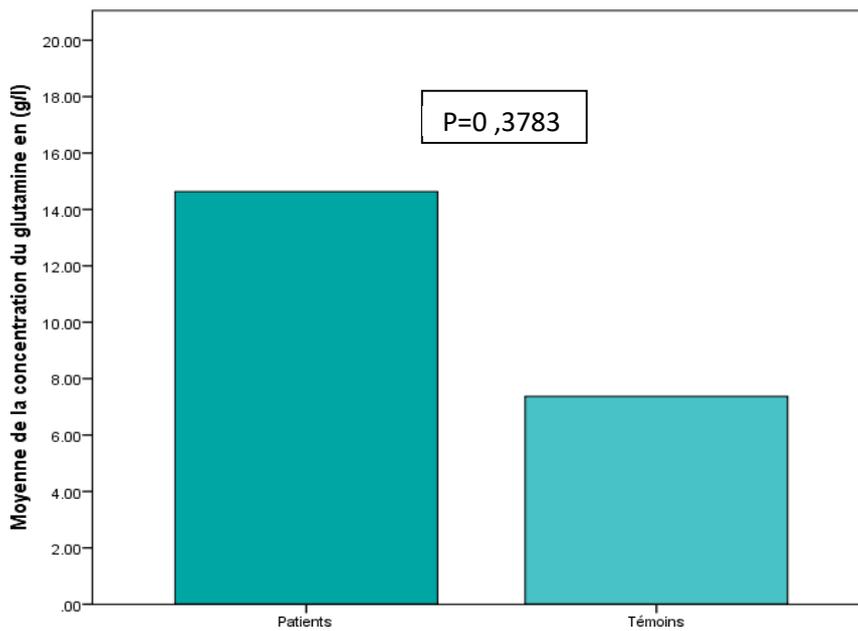


Figure 6 : Moyenne de la concentration de la glutamine des patients et des témoins

1.1 Résultats

La moyenne de CTCF de la glutamine (20560,8032 ; $p=0,0045$) et de la thréonine (12508,4768 ; $p=0,0034$) est augmentées significativement chez les sujets infectés par rapport à la moyenne de CTCF de la glutamine (14273,9744) et de la thréonine (10287,0072) des sujets sains.

La moyenne de concentration de la glutamine (14,6342g/l) et la moyenne de concentration de la thréonine (16,1284g/l) chez les nouveau-nés prématurés infectés sont non significativement élevés par rapport à la moyenne de concentration de la glutamine (7,369g/l) et de la thréonine (8,9482g/l) chez les nouveau-nés prématurés non infectés avec une valeur de $P=0,3783$ pour la concentration de la glutamine et une valeur de $P=0,3015$ pour la concentration de la thréonine.

1.2. Discussion

Les résultats présentés dans la figure montrent une valeur de concentration sérique de glutamine chez les patients est nettement plus élevée que celle qu'on nous avons observée chez les témoins, cet acide aminé est considéré comme semi-essentiel chez les nouveau-nés prématurés.

L'augmentation des concentrations sériques de la glutamine observée chez les nouveau-nés prématurés atteints de la septicémie suggère utilisation accrue de cet acide aminé au cours de l'inflammation.

On a fait des recherches exigeance sur le rôle de glutamine dans la réponse immunitaire chez les nouveau-nés prématuré mais on n'a pas trouvé. Par contre, il y'a des études chez les adultes, montre la glutamine en tant que nutriment essentiel, il est nécessaire au cours d'un processus catabolique afin de manifester des réponses tissulaires réponse optimale des tissus au catabolisme, à l'inflammation et à l'infection (**Douglas et Judith, 1998**).

Les cellules du système immunitaires utilisent la glutamine à des taux élevés dans des conditions cataboliques comme la septicémie, pour assurer leur fonctionnement et leur reprogrammation métabolique (**Cruzatet al., 2018**).

Il y'a plusieurs études menées pour étudié la supplémentation de la glutamine chez les nouveau-nés prématurés ne fournissent pas de preuves que la supplémentation en glutamine confère des avantages importants pour les nourrissons prématurés (**Moe-Byrne, 2016**).

La concentration sérique de thréonine observée chez les patients est supérieure par rapport au celle observé chez les témoins. La thréonine est considérée comme l'acide aminé le plus important pour l'entretien de la muqueuse intestinale car elle est utilisée dans la synthèse de la mucine qui

recouvre la surface de la muqueuse, le mucus qui est un aspect important de la défense en particulier chez les prématurés qui sont vulnérables aux infections pendant les premières semaines de vie.

Malgré les recherches exigence qu'on a faite on n'a pas trouvé des études comparables à notre étude qui est sur le taux de la thréonine chez les nouveaux nés prématurés infectés. Mais on a trouvé des études sur le rôle de la thréonine chez les prématurés infectés.

Les implications de la thréonine pour la santé intestinale et les besoins nutritionnels ont été soulignées dans plusieurs études récentes. Dans des conditions pathologiques, telles que la septicémie, les besoins en thréonine peuvent être accrus pour maintenir la morphologie et la physiologie intestinales et pour la synthèse des protéines de l'intestin grêle (**Faure et al. 2007**).

Ainsi, dans des conditions d'inflammation, la disponibilité de la thréonine peut devenir limitée pour la synthèse des mucines intestinales, ce qui entraîne une altération de la fonction de barrière intestinale. Par conséquent, une augmentation de l'apport alimentaire en thréonine et autres acides aminés peut favoriser la synthèse des mucines et rééquilibrer le microbiote intestinal pour favoriser la protection intestinale et la guérison des muqueuses (**Faure et al. 2006**).

Conclusion

La glutamine et la thréonine, des acides aminés semi-essentiels pour les nouveaux nés prématurés, jouent un rôle important dans la lutte contre les infections par leur interaction dans la réponse immunitaire, la glutamine participe dans le contrôle de l'immunité et de l'inflammation dans les cellules immunitaires innées et adaptatives et la thréonine participe dans la synthèse des glycoprotéines intestinales pour maintenir une fonction de barrière intestinale adéquate pour assurer la défense immunitaire. Il serait opportun de compléter notre étude par d'autres méthodes et avec un échantillon plus large issu de différentes régions.

1. A. C. Palmer, "Nutritionally mediated programming of the developing immune system," *Advances in Nutrition*, vol. 2, no. 5, pp. 377–395, 2011.
2. Agostini F, Biolo G. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. Effect of physical activity on glutamine metabolism. 2010 Jan;13(1):58-64.
3. Amélie Collins, Jörn-Hendrik Weitkamp, James L Wynn, Why are preterm newborns at increased risk of infection? 2018;103:F391–F394.
4. Ananth, C. V., & Vintzileos, A. M. (2006). Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 19(12), 773–782.
5. Anemone van den Berg; Ruurd M van Elburg; Jos WR Twisk; Willem PF Fetter (2004). Glutamine-enriched enteral nutrition in very low birth weight infants. Design of a double-blind randomised controlled trial. , 4(1), 17–0.
6. Ando K, Hasegawa K, Shindo K, Furusawa T, Fujino T, Kikugawa K, et al. Human lactoferrin activates NF- κ B through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS Journal* 2010;277:2051–66.
7. Anja von Laer , Micheline Ahou N'Guessan , Fidèle Sounan Touré , Kathrin Nowak , Karin Groeschner , Ralf Ignatius , Johannes Friesen , Sara Tomczyk , Fabian H. Leendertz , Tim Eckmanns , Chantal Akoua-Koffi. Implementation of Automated Blood Culture With Quality Assurance in a Resource-Limited Setting. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8: 627513.
8. Aparna Patra , Hong Huang , John A. Bauer , et Peter J. Giannone. Neurological consequences of systemic inflammation in the premature neonate. *Neural Regen Res*. 2017 Jun; 12(6): 890–896.
9. Arboleya S, Solís G, Fernández N, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: a target for intervention? *Gut Microbes* 2012; 3:583–8.
10. Arcangela Lattari Balest , MD, University of Pittsburgh, School of Medicine. (2021). *Le Manuel MSD*.
11. Arnon S, Litmanovitz I. Diagnostic tests in neonatal sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 ; 21 : 223–7.
12. Ashish Arunkumar Sharma a, b , Roger Jen a, b , Alison Butler a , Pascal M. Lavoie a, b, c, The developing human preterm neonatal immune system: A case for more research in this area, 2012, *Clinical Immunology* (2012) 145, 61–68.
13. Asano M, Komiyama K. Polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of Oral Science* 2011;53:147–56.

14. A.S. Ismail and L.V. Hooper: Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol* 289, G779-G784 (2005).
15. A.T. Blikslager, A.J. Moeser, J.L. Gookin, S.L. Jones and J. Odle: Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 87, 545-564 (2007)
16. Babu, R., Eaton, S., Drake, D. P., Spitz, L., & Pierro, A. (2001). Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *Journal of Pediatric Surgery*, 36(2), 282–286.
17. Baker CJ, Barrett FF. Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *J Pediatr.*
18. Baker CJ, Barrett FF, Gordon RC, Yow MD. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *J Pediatr.* 1973;82(4):724 –729
19. Baker CJ. Early onset group B streptococcal disease. *J Pediatr.* 1978;93(1):124 –125
20. Bauer J, Hentschel R, Linderkamp O. Effect of sepsis syndrome on neonatal oxygen consumption and energy expenditure. *Pédiatrie.* 2002 décembre ; 110 (6):e69.
21. Béclard R, Cloquet H, Cloquet J, Orfilia M. 1834 Nouveau Dictionnaire de Médecine, Chirurgie, Pharmacie, Chimie, Histoire Naturelle. Paris, Deville Cavellin.
22. Behjati S, Prentice P, Rennie J. Managing the risk of group B streptococcal sepsis in healthy term newborns. *Acta Paediatr.* 2012 ; 101 :128–31.
23. Belachew, A., & Tewabe, T. (2020). Neonatal sepsis and its association with birth weight and gestational age among admitted neonates in Ethiopia: systematic review and meta-analysis. *BMC Pediatrics*, 20(1).
24. Bengmark S, Jeppsson B. Gastrointestinal surface protection and mucosa reconditioning. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1995;19:410 –5.
25. Berrington, J. E., Barge, D., Fenton, A. C., Cant, A. J., and Spickett, G. P. (2005). Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 289–292.
26. Bertolo RFP, Chen CZL, Law G, Pencharz PB, Ball RO (1998) Threonine requirement of neonatal piglets receiving total parenteral nutrition is considerably lower than that of piglets receiving an identical diet intragastrically. *J Nutr* 128:1752–1759
27. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE. Estimations nationales, régionales et mondiales des taux de naissances prématurées en 2010 avec tendances temporelles depuis 1990 pour certains pays : analyse systématique et implications. *Lancette.* 2012 ; 379 :2162–2172.

28. Boettiger, M., Tyer-Viola, L., & Hagan, J. (2017). *Nurses' Early Recognition of Neonatal Sepsis*. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 46(6), 834–845.
29. Bojsen A, Buesa J, Montava R, Kvistgaard AS, Kongsbak MB, Petersen TE, et al. Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Science* 2007;90:66–74.
30. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine* 2003;21:3382–8.
31. Branzk N., Lubojemska A., Hardison SE, Wang Q., Gutierrez MG, Brown GD, Papayannopoulos V. Neutrophils sense the size of microbes and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* 2014 ; 15 :1017–1025.
32. Brissette MJ, Lepage S, Lamonde AS, Sirois I, Groleau J, Laurin LP, et al. MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming. *PLoS One* 2012;7:e36368.
33. Brown J, Meader N, Cleminson J, McGuire W. C-reactive protein for diagnosing late-onset infection in newborn infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019, Issue 1. Art. No.: CD012126.
34. Cantey JB & Baird SD Ending the Culture of Culture-Negative Sepsis in the Neonatal Icu. *Pediatrics* 140 (2017).
35. Carr EL, Kelman A, Wu GS, Gopaul R, Senkevitch E, Aghvanyan A, et al. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J Immunol.* 15 juill 2010; 185(2):1037- 44.
36. Carr R. Neutrophil production and function in newborn infants. *Br J Haematol* 2000;110:18–28.
37. Celik IH, Demirel FG, Uras N, et al. What are the cut-off levels for IL-6 and CRP in neonatal sepsis? *J Clin Lab Anal* 2010;24:407–412.
38. Cernada M, Serna E, Bauerl C, Collado MC, Perez-Martinez G, Vento M. Genome-wide expression profiles in very low birth weight infants with neonatal sepsis. *Pediatrics* (2014) 133:e1203–11. doi:10.1542/peds.2013-2552.
39. Chatterton DEW, Rasmussen JT, Heegaard CW, Sorensen ES, Petersen TE. In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: research on biological functions. *Trends in Food Science & Technology* 2004;15:373–83.
40. Clémence Richetta and Mathias Faure. Autophagy in antiviral innate immunity. *Cellular Microbiology* (2012), 15, 368–376.
41. Collado MC, Cernada M, Bauerl C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 2012;3:352–65.
42. Collado MC, Cernada M, Neu J, et al. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatr Res* 2015; 77:726–31.

43. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, and Deleage G. NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci 25: 147–150, 2000.
44. Committee on Infectious Diseases, Committee on Fetus and 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.
45. Conti, M. G., Angelidou, A., Diray-Arce, J., Smolen, K., Lasky-Su, J., De Curtis, M., & Levy, O. (2019). Immunometabolic approaches to prevent, detect, and treat neonatal sepsis. Pediatric Research. doi:10.1038/s41390-019-0647-6
46. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Filaninno A, De Giorgi E, Schettini F, et al. Early and late infections in newborns: where do we stand? A review. *Pediatr Neonat*. 2016; 57(4):265–273. 66. Satar M, O' zlu' F. Neonatal sepsis: a continuing disease burden. *Turk J Pediatr*. 2012; 54(5):449–457
47. Coskun, O. (2016). Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. Northern Clinics of Istanbul
48. Costello A, Francis V, Byrne A, Puddephatt P. State of the world's newborns: a report from saving newborn lives. Washington, DC: Save the Children and Women and Children First; 2001.
49. Cotten CM Adverse Consequences of Neonatal Antibiotic Exposure. *Current opinion in pediatrics* 28, 141–149 (2016).
50. Cotten CM, Taylor S, Stoll B, Goldberg RN, Hansen NI, Sánchez PJ, et al. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics*. 2009;123:58 66. 27.
51. Cruzat, V., MacedoRogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., &Newsholme, P. (2018). *Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. Nutrients, 10(11), 1564.*
52. Cruzat V.F., Pantaleao L.C., Donato J., Jr., de Bittencourt P.I.H., Jr., Tirapegui J. Oral supplementations with free and dipeptide forms of l-glutamine in endotoxemic mice: Effects on muscle glutamine-glutathione axis and heat shock proteins. *J. Nutr. Biochem*. 2014;25:345–352.
53. Csaicsich D, Russo-Schlaff N, Messerschmidt A. Renal failure, comorbidity and mortality in premature infant. *Wien Klin Wochenschr*. 2008 ; 120 (5-16):153–157.
54. Curi R., Newsholme P., Marzuca-Nassr GN, Takahashi HK, Hirabara SM, Cruzat V., Krause M., de Bittencourt PIH, Jr. Principles of metabolism regulation yesterday and today. *Biochimie. J*. 2016 ; 473 :1845–1857.
55. Currie, A. J., Curtis, S., Strunk, T., Riley, K., Liyanage, K., Prescott, S., et al. (2011). Preterm infants have deficient monocyte and lymphocyte cytokine responses to group B streptococcus. *Infect. Immun*. 79, 1588–1596.

56. Curi R., Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J., Pithon-Curi TC Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity *Biochimiecellulaire. Fonct.* 2005 ; 23 : 77–84.
57. Curran CS, Demick KP, Mansfield JM. Lactoferrin activates macrophages via TLR4-dependent and -independent signaling pathways. *Cellular Immunology* 2006;242:23–30.
58. Delaney RM, Frazer LC, Lane M, Bauserman MS. The immune system. In: Jnah AJ, Trembath AN, eds. *Fetal and Neonatal Physiology for the Advanced Practice Nurse*. New York, NY: Springer Publishing Company; 2019:267-306.
59. Dereck E.W. Chattertona,*, Duc Ninh Nguyena, Stine Brandt Bering b, Per Torp Sangild 1357-2725/\$ – see front matter 2013
60. Despond, Olivier MD; Proulx, François MD; Carcillo, Joseph A. MD; Lacroix, Jacques MD. Pediatric sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Current Opinion in Pediatrics*: June 2001;13(3): 247-253.
61. Deranieh, R. M., Joshi, A. S., & Greenberg, M. L. (2013). Thin-Layer Chromatography of Phospholipids. *Membrane Biogenesis*, 21–27.
62. Dinauer MC: Regulation of neutrophil function by RacGTPases. *Curr Opin Hematol* 10:8-15, 2003
63. Dominguez-Melendez V, Silvestre-Santana O, Moreno-Fierros L, Aguiniga-Sanchez I, Martinez L, Marroquin-Segura R, et al. Sodium caseinate induces mouse granulopoiesis. *Inflammation Research* 2012;61:367–73.
64. Douglas W Wilmore; Judith K Shabert (1998). Role of glutamine in immunologic responses. , 14 (7-8), 618–626.
65. Du Pont-Thibodeau, G., Joyal, J.-S., & Lacroix, J. Management of neonatal sepsis in term newborns. *F1000Prime Reports*, 2014; 6: 67.
66. D.W. Clapp, “Developmental regulation of the immune system,” *Seminars in Perinatology*, vol. 30, no. 2, pp. 69–72, 2006.
67. E. A. Futata, A. E. Fusaro, C. A. De Brito, and M. N. Sato, “The neonatal immune system: immunomodulation of infections in early life,” *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 10, no. 3, pp. 289–298, 2012.
68. Echols, N., Harrison, P., Balasubramanian, S., Luscombe, N.M., Bertone, P., Zhang, Z., and Gerstein, M. (2002). Comprehensive analysis of amino acid and nucleotide composition in eukaryotic genomes, comparing genes and pseudogenes. *Nucleic Acids Res.* 30, 2515–2523.
69. Enrique Segura-Cervantes, Javier Mancilla-Ramírez, Jorge González-Canudas, Erika Alba, René Santillán-Ballesteros, Deneb Morales-Barquet, Gabriela Sandoval-Plata, and Norma Galindo-Sevilla. *Inflammatory Response in Preterm and Very Preterm Newborns with Sepsis*, Volu 2016, Article ID 6740827, 8 pages, 2016.
70. Faure M, Chone´ F, Mettraux C, Godin JP, Be´chereau F, Vuichoud J, Pepet I, Breuille´ D, Obled C (2007) Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. *J Nutr* 137:1802–1807

71. Faure M, Mettraux C, Moennoz D, Godin J, Vuichoud J, Rochat F, Breuille D, Obléd C, Corthe'sy-Theulaz I (2006) Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. *J Nutr* 136:1558–1564
72. Fernanda Rodrigues Helmo, Eduardo Arthur RodovalhoAlves, RenataAlves de Andrade Moreira, Viviane Oliveira Severino, Laura Penna Rocha, Maria LuízaGonçalves dos Reis Monteiro, Marlene Antônia dos Reis, Renata Margarida Etchebehere, Juliana Reis Machado & Rosana Rosa Miranda Corrêa (2017): Intrauterine infection, immune system and premature birth, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, DOI: 10.1080/14767058.2017.131131.
73. Fietta, A., Sacchi, F., Bersani, C., GialdroniGrassi, G., Stronati, M., Gancia, P., et al. (1987). Complement-dependent bactericidal activity for *E. coli* K12 in serum of preterm newborn infants. *ActaPaediatr. Scand.* 76, 37–41.
74. Figueras-Aloy J, Gomez-Lopez L, Rodriguez-Miguel JM, et al. Serum soluble ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and P-selectin levels as markers of infection and their relation to clinical severity in neonatal sepsis. *Am J Perinatol.* 2007 Jun;24(6):331–338.
75. Fourrier F. Severe sepsis, coagulation, and fibrinolysis: dead end or one way? *Critical care medicine* 2012;40:2704-8.
76. Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, Walker WA. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *PediatrRes* 2001; 49:589–593.
77. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word ‘‘sepsis.’’ *Intensive Care Med* 2006;32:2077.
78. Gessler P, Luders R, König S, Haas N, Lasch P, Kachel W. Neonatal neutropenia in low birthweight premature infants. *Am J Perinatol* 1995;12:34–38.
79. Gustafson CE, Higbee D, Yeckes AR, et al. Limited expression of APRIL and its receptors prior to intestinal IgA plasma cell development during human infancy. *MucosalImmunol* 2014; 7:467–77.
80. Greenberg RG, Chowdhury D, Hansen NI, Smith PB, Stoll BJ, Sánchez PJ, et al. Prolonged duration of early antibiotic therapy in extremely premature infants. *Pediatr Res.* 2019;85:994---1000.
81. Hannah Blencowe, Simon Cousens, Doris Chou, Mikkel Oestergaard, Lale Say, Ann-Beth Molle, Mary Kinney, Joy Lawn. Born Too Soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reproductive Health*, 10, S2(2013), 55k, 1033-33
82. Harris MC, D'Angio CT, Gallagher PR. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pédiatre.* 2005 ; 147 (4):462–468.
83. Higgins RD, Saade G, Polin RA, et al. Evaluation and management of women and newborns with a maternal diagnosis of chorioamnionitis: summary of a workshop. *Obstet Gynecol* 2016; 127: 426–36.

84. Holloway JA, Thornton CA, Diaper ND, Howe DT, Warner JO. Phenotypic analysis of circulating dendritic cells during the second half of human gestation. *PediatrAllergyImmunol* 2009; 20:119–125.
85. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 2000;55:688–97.
86. Hong DK, L.D. (2015). Developmental Immunology and Role of Host Defenses in Fetal and Neonatal Susceptibility to Infection. In *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, V.N. Christopher B Wilson, Yvonne Maldonado, Jack S Remington, Jerome O Klein, ed. (Philadelphia: Elsevier Saunders), pp. 81-188.
87. Hornik, C. P., Fort, P., Clark, R. H., Watt, K., Benjamin, D. K., Smith, P. B., ... Cohen-Wolkowicz, M. (2012). Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *EarlyHumanDevelopment*, 88, S69–S74.
88. Human milk, a concrete risk for infection? M. Lanari¹, P. Sogno Valin¹, F. Natale², M. G. Capretti³ & L. Serral 2012
89. IlkayOzmeralOdabasietAli Bulbul. NeonatalSepsis.SisliEtfalHastan Astuce Bul.2020 ; 54(2) : 142–158.
90. Intestinal Threonine Utilization for Protein and Mucin Synthesis Is Decreased in Formula-Fed Preterm Pigs Patrycja J. Puiman, 3 Mikkel Jensen, 4 Barbara Stoll, 6 Ingrid B. Renes, 3 Adrianus C. J. M. de Bruijn, 3 Kristien Dorst, 3 Henk Schierbeek, 3 Mette Schmidt, 5 Gu`nther Boehm, 3,7 Douglas G. Burrin, 6 Per T. Sangild, 4 and Johannes B. van Goudoever 2010
91. Ismail, A. Q. T., & Gandhi, A. (2014). *Using CRP in neonatal practice. The Journal of Maternal-Fetal&NeonatalMedicine*, 28(1), 3–6.
92. Istemi Han Celik , Morcos Hanna, FuatEmreCanpolatetMohan Pammi , MD.Diagnosis of Neonatal Sepsis: The Past, Present and Future.*PediatrRes*. 2022 Jan; 91(2): 337–350
93. Jacqueline M. Melville and Timothy J. M. Moss, The immune consequences of preterm birth, 2013, May 2013, Vol 7, Article 79.
94. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, et al. Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* 2011; 158:390–6.
95. J.A. Jankowski, R.A. Goodlad and N.A. Wright: Maintenance of normal intestinal mucosa: function, structure, and adaptation. *Gut* 35 (Suppl 1), S1-S4 (1994).
96. Jackson GL, Rawiki P, Sendelbach D, Manning MD, Engle WD. Hospital course and short-term outcomes of term and late preterm neonates following exposure to prolonged rupture of membranes and/or chorioamnionitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:89---90.
97. J.G. Magalhaes, I. Tattoli and S.E. Girardin: The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 19, 106-115 (2007) V. Snoeck, B. Goddeeris and E. Cox: The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* 7, 997-1004 (2005).

98. J. Wynn, T. T. Cornell, H. R. Wong, T. P. Shanley, and D. S. Wheeler, "The host response to sepsis and developmental impact," *Pediatrics*, vol. 125, no. 5, pp. 1031–1041, 2010.
99. J.Y. Wang: Polyamines regulate expression of Ecadherin and play an important role in control of intestinal epithelial barrier function. *Inflammopharmacol* 13, 91-101 (2005)
100. Kapur RYM, Yoder MC, Polin RA: Neonatal–Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant (ed 7). St. Louis, MO, Mosby, 2005.
101. Kaur, K., Chowdhury, S., Greenspan, N. S., and Schreiber, J. R. (2007). Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood* 110, 2948–2954.
102. Kim, F., Polin, R. A., & Hooven, T. A. (2020). Neonatal sepsis. *BMJ*, m3672.
103. Kim M.H., Kim H. The roles of glutamine in the intestine and its implication in intestinal diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:1051.
104. Koert de Waal K, Evans N. Hemodynamics in preterm infants with late-onset sepsis. *J Pediatr.* 2010;156(6):918–922 e1.
105. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, et al. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: lessons from Immune Ontogeny. *Immunity* 2017; 46:350–63.
106. Kollmann, T. R., Levy, O., Montgomery, R. R., & Goriely, S. (2012). Innate Immune Function by Toll-like Receptors: Distinct Responses in Newborns and the Elderly. *Immunity*, 37(5), 771–783.
107. Kothari A, Morgan M & Haake DA Emerging Technologies for Rapid Identification of Bloodstream Pathogens. *Clin Infect Dis* 59, 272–278 (2014).
108. Kuhara T, Yamauchi K, Tamura Y, Okamura H. Oral administration of lactoferrin increases NK cell activity in mice via increased production of IL-18 and type I IFN in the small intestine. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2006;26:489–99.
109. Kuhle S, Male C, Mitchell L. Developmental hemostasis: pro- and anticoagulant systems during childhood. *SeminThrombHemost.* 2003;29(4):329–338.
110. Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF, Lopez S, Petersen TE, Heegaard CW, et al. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *Journal of Dairy Science* 2004;87:4088–96.
111. Lansac J, Marret H, Oury J-F. *Pratique de l'accouchement*. Paris, Elsevier Masson, 2006:345-6.
112. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J LeukocBiol* 2004; 76:909–925.
113. Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by

- bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol* 2004; 173:4627–4634.
114. Li J, Li H, Mao H, et al. Impaired NK cell antiviral cytokine response against influenza virus in small-for-gestational-age neonates. *Cell Mol Immunol* 2013; 10:437–43.
115. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 2008;28:468–76.
116. Linderkamp O, Ruef P, Brenner B, et al. Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. *PediatrRes* 1998;44:946–50.
117. Liu, Y. J., and Banchereau, J. (1997). Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin. Immunol.* 9, 235–240.
118. Lorant DE, Li W, Tabatabaei N, et al. P-selectin expression by endothelial cells is decreased in neonatal rats and human premature infants. *Blood* 1999; 94:600–9.
119. Luce WA, Hoffman TM, Bauer JA. Bench-to-bedside review: Developmental influences on the mechanisms, treatment and outcomes of cardiovascular dysfunction in neonatal versus adult sepsis. *Crit Care.* 2007;11(5):228.
120. Luciano AA, Arbona-Ramirez IM, Ruiz RL-BB, et al. Alterations in regulatory T cell subpopulations seen in preterm infants. *PLoS One.* 2014;9:e95867.
121. Mahallei, M., Rezaee, M. A., Mehramuz, B., Beheshtirooy, S., & Abdinia, B. (2018). Clinical symptoms, laboratory, and microbial patterns of suspected neonatal sepsis cases in a children's referral hospital in northwestern Iran. *Medicine*, 97(25), e10630.
122. Marchant, E.A., Boyce, G.K., Sadarangani, M., and Lavoie, P.M. (2013). Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. *Clinical&developmentalimmunology* 2013, 586076.
123. Marlow, N. (2012). Full term; an artificial concept. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 97(3), F158–F159.
124. Maria L Dias, Karen M O'Connor, Eugene M Dempsey, Ken D'O'Halloran, Fiona B McDonald. Targeting the Toll-like receptor pathway as a therapeutic strategy for neonatal infection. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol.* 2021 Dec 1;321(6):R879-R902.
125. M. D. Hnat, B.M. Mercer, G. Turnau et al., "Perinatal outcomes in women with preterm rupture of membranes between 24 and 32 weeks of gestation and a history of vaginal bleeding," *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, vol. 193, no. 1, pp. 164–168, 2005.
126. Melville, J. M. & Moss, T. J. M. The immune consequences of preterm birth. *Front. Neurosci.* 7, 79 (2013).

127. Menon, R. (2008). Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 87(6), 590–600.
128. Messbarger N & Neemann K. Role of Anaerobic Blood Cultures in Neonatal Bacteremia. *J Pediatric Infect Dis Soc* 7, e65–e69 (2018).
129. Metabolism of threonine in newborn infants Prabhu S. Parimi, Lourdes L. Gruca, and Satish C. Kalhan *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E981–E985, 2005.
130. M. H. Yudin, J. van Schalkwyk, and N. Van Eyk, “No. 233-Antibiotic Therapy in Preterm Premature Rupture of the Membranes,” *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, vol. 39, no. 9, pp. e207–e212, 2017.
131. McEvoy LT, Zakem-Cloud H, Tosi MF. Total cell content of CR3 (CD11b/CD18) and LFA-1 (CD11a/CD18) in neonatal neutrophils: relationship to gestational age. *Blood* 1996; 87:3929–33.
132. McGovern, M., Giannoni, E., Kuester, H., Turner, M. A., van den Hoogen, A., Molloy, E. J. (2020). *Challenges in developing a consensus definition of neonatal sepsis. Pediatric Research.*
133. McGreal EP, Hearne K, and Spiller OB. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. *Immunobiology* 2012; 217:176–86.
134. McKiernan CA, Lieberman SA. Circulatory shock in children: an overview. *Pediatr Rev.* 2005 Dec;26(12):451–460.
135. M. Mantle and A. Allen: Gastrointestinal mucus. In: *Gastrointestinal secretion*. Ed: Davison, JS, Butterworth Co. Ltd., London, UK, pp. 202-229 (1989) J.F. Forstner and G.G. Forstner: *Gastrointestinal mucus. In: Physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd edition. Ed: Johnson, LR, Raven Press, NY, pp. 1255-1283 (1994)
136. Moe-Byrne, T., Brown, J. V., & McGuire, W. (2016). Glutamine supplementation to prevent morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*..
137. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science* 2008;322:1562–5.
138. Moore, T. A., Berger, A. M., & Wilson, M. E. (2012). A New Way of Thinking About Complications of Prematurity. *Biological Research For Nursing*, 16(1), 72–82.
139. Mirpuri J, Raetz M, Sturge CR, et al. Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota. *Gut Microbes* 2014; 5:28
140. M. Zasada, P. Kwinta, W. Durlak, M. Bik-Multanowski, A. Madetko-Talowska, and J. J. Pietrzyk, “Development and maturation of the immune system in preterm neonates: results from a whole genome expression study,” *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 498318, 8 pages, 2014.

141. Narendran V, Visscher MO, Abril I, et al. Biomarkers of epidermal innate immunity in premature and full-term infants. *PediatrRes* 2010;67:382–6.
142. Nelson VL, Nguyen HCB, Garcia-Canaveras JC, Briggs ER, Ho WY, DiSpirito JR, Marinis JM, Hill DA, Lazar MA Ppargamma is a link controlling alternative macrophage activation via glutamine metabolism. *Dév.* 2018 ; 32 :1035–1044.
143. Neonatal Sepsis A Review of Pathophysiology and Current Management Strategies Margaret A. Glaser, MSN, NNP; Lauren M. Hughes, MSN, NNP; Amy Jnah, DNP, NNP-BC; Desi Newberry, DNP, NNP-BC 2020
144. Neu, J. (2001). *Glutamine in the Fetus and Critically Ill LowBirthWeightNeonate: Metabolism and Mechanism of Action. The Journal of Nutrition, 131(9), 2585S–2589S.* Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat RevImmunol* 2007;7:379–90.
145. Newburg DS, Walker WA. Protection of the neonate by the innate immune system of developing gut and of human milk. *Pediatric Research* 2007;61: 2–8.
146. 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. *PediatrRes.* 2007 Jan;61(1):93–98.
147. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* (2016) 352:aaf1098.
148. N.E. Simister, Placental transport of immunoglobulin G, *Vaccine* 21 (2003) 3365–3369.
149. Nonoyama, S., Penix, L. A., Edwards, C. P., Lewis, D. B., Ito, S., Aruffo, A., et al. (1995). Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J. Clin. Invest.* 95, 66–75.
150. Oncel, M. Y., Ozdemir, R., Yurttutan, S., Canpolat, F. E., Erdeve, O., Oguz, S. S., Dilmen, U. (2012). Mean Platelet Volume in Neonatal Sepsis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26(6), 493–496.
151. Optimal Threonine Intake for Preterm Infants Fed on Oral or Parenteral Nutrition J. RIGO, M.D. AND J. SENTERRE, M.D 1979
152. Pelkonen, A. S., Suomalainen, H., Hallman, M., and Turpeinen, M. (1999). Peripheral blood lymphocyte subpopulations in schoolchildren born very preterm. *Arch. Dis. Child. FetalNeonatal Ed.* 81, F188–F193.
153. Penttila IA. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *Journal of Pediatrics* 2010;156:S21–5.
154. Perez, A., Bellon, J. M., Gurbindo, M. D., and Munoz-Fernandez, M. A. (2010). Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide. *Hum. Immunol.* 71, 151–157.
155. Procianoy, R. S., & Silveira, R. de C. (2019). The challenges of neonatal sepsis management. *JPediatr (Rio J)* Mar-Apr 2020; 96Suppl 1:80-86.

156. Quinn, J.-A., Munoz, F. M., Gonik, B., Frau, L., Cutland, C., Mallett-Moore, T., Buttery, J. (2016). Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine*, 34(49), 6047–6056.
157. Raymond SL, Mathias BJ, Murphy TJ, et al. Neutrophil chemotaxis and transcriptomics in term and preterm neonates. *TranslRes* 2017; 190:4–15.
158. Rechavi, E., Lev, A., Lee, Y.N., Simon, A.J., Yinon, Y., Lipitz, S., Amariglio, N., Weisz, B., Notarangelo, L.D., and Somech, R. (2015). Timely and spatially regulated maturation of B and T cell repertoire during human fetal development. *Science translationalmedicine* 7, 276ra225.
159. Richard E. Behrman, Adrienne Stith Butler, Editors, Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. (2007). the National Academies Press, 0-309-65898-5.
160. R.I. Lehrer, T. Ganz: Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr Opin Hematol* 9: 18-22 (2002)
161. R.I. Lehrer, T. Ganz: Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14, 96-102 (2002).
162. Romaine A, Ye D, Ao Z, Fang F, Johnson O, Blake T, et al. Safety of histamine-2 receptor blockers in hospitalized VLBW infants. *Early Hum Dev.* 2016;99:27---30.
163. Roy P, Kumar A, Kaur IR, Faridi MMA. Gender differences in outcomes of low birth weight and preterm neonates: the male disadvantage. *J Trop Pediatr.* 2014; 60(6):480–481.
164. Rozé J-C, Muller J-B, Baraton L. Point sur la grande prématurité en 2007, *Réanimation* 2007;16(5):409.
165. Rusu D, Drouin R, Pouliot Y, Gauthier S, Poubelle PE. A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive IL-1Ra through a NF-kappaB- and MAPK-dependent mechanism. *Journal of Nutrition* 2010;140:382–91.
166. Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, Prusa AR, Hayde M, Herkner K, Pollak A, Spittler A, Forster-Waldl E. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis.* 2007 Jan 15;195(2):296–302
167. Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., ... Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204), 1251086–1251086.
168. Santiago-Osorio E, Mora L, Bautista M, Montesinos JJ, Martinez I, Ramos-Mandujano G, et al. Sodium caseinate induces secretion of macrophage colony-stimulating factor from neutrophils. *Immunobiology* 2010;215:332–9.
169. Schmutz N, Henry E, Jopling J, et al. Expected ranges for blood neutrophil concentrations of neonates: the Manroe and Mouzinho charts revisited. *J Perinatol* 2008;28:275–81.

170. Seale AC, Blencowe H, Manu AA, Nair H, Bahl R, Qazi SA, Zaidi AK, Berkley JA, Cousens SN, Lawn JE., pSBIInvestigator Group. 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 Aug;14(8):731-741
171. Shane, A. L., Sánchez, P. J., & Stoll, B. J. (2017). Neonatal sepsis. *The Lancet*, 390(10104), 1770–1780.
172. Sharma D, Farahbakhsh N, Shastri S & Sharma P. Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Literature Review. *J MaternFetalNeonatal Med* 31, 1646–1659 (2018).
173. Shehab El-Din EMR, El-Sokkary MMA, Bassiouny MR, et al. Epidemiology of neonatal sepsis and implicated pathogens: a study from Egypt. *BioMed research international*.2015.
174. Singh, V.V., Chauhan, S.K., Rai, R., Kumar, A., Singh, S.M., and Rai, G. (2013). Decreased pattern recognition receptor signaling, interferon-signature, and bactericidal/permeabilityincreasing protein gene expression in cord blood of term low birth weight human newborns. *PLoS one* 8, e62845.
175. SJ, Hadler JL, Arnold KE, Martell-Cleary P, Reingold A, Schuchat A. Risk factors for invasive, early-onset *Escherichia coli* infe Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet*. 2017;390(10104):1770-1780.
176. Specific roles of threonine in intestinal mucosal integrity and barrier function State Key Laboratory of Animal Nutrition, China Agricultural University, Beijing, China 100193, 2 Department of Animal Science, Texas A and M University, College station, TX, USA 77843 *Frontiers in Bioscience E3*, 1192-1200, June 1, 2011.
177. SpencerWJ, BinetteA, Ward TL, Davis LD, Blais DR, Harrold J, et al. Alpha-lactalbumin in human milk alters the proteolytic degradation of soluble CD14 by forming a complex. *Pediatric Research* 2010;68:490–3.
178. Stehle, P., & Kuhn, K. S. (2015). Glutamine: An Obligatory Parenteral Nutrition Substrate in Critical Care Therapy. *BioMedResearch International*, 2015, 1–7.
179. Straub J et al. Diagnostic Accuracy of the Roche SeptifastPcr System for the Rapid Detection of Blood Pathogens in Neonatal Sepsis-a Prospective Clinical Trial. *PLoS one* 12, e0187688 (2017) monocyte-macrophage et immunité innée entraînée. *Science* (2014) 345:1251086.
180. Strunk, T., Doherty, D., Richmond, P., Simmer, K., Charles, A., Levy, O., Liyanage, K., Smith, T., Currie, A., and Burgner, D. (2009). Reduced levels of antimicrobial proteins and peptides in human cord blood plasma. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* 94, F230-231.
181. Stuber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* 1996; 183:693–8.
182. T. A. Manuck, M. M. Rice, J. L. Bailit, W. A. Grobman, U. M. Reddy, and R. J. Wapner, “Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a cohort,” *Am J Obstet Gynecol*, vol. 215, no. 1, Article ID e1-103.e14, 2016.
183. Threonine metabolism and embryonic stem cell self-renewal Guohua Chena,c and Jian Wang 2014

184. The gut takes nearly all: threonine kinetics in infants Sophie RD van der Schoor, Darcos L Wattimena, Jan Huijmans, Andras Vermes, and Johannes B van Goudoever 2007
185. 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.
186. Tirapegui J., Cruzat V. Glutamine and skeletal muscle. In: Rajendram R., Preedy V.R., Patel V.B., editors. *Glutamine in Clinical Nutrition*. Springer; New York, NY, USA: 2015. pp. 499–511.
187. TOBIAS STRUNK, ANDREW CURRIE, PETER RICHMOND, KAREN SIMMER, & DAVID BURGNER, Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity, 2011, *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, January 2011; 24(1): 25–31.
188. Tollin, M., Bergsson, G., Kai-Larsen, Y., Lengqvist, J., Sjøvall, J., Griffiths, W., Skuladottir, G.V., Haraldsson, A., Jorvall, H., Gudmundsson, G.H., and Agerberth, B. (2005). Vernixcaseosa as a multi-component defence system based on polypeptides, lipids and their interactions. *Cell Mol Life Sci.* 62, 2390-2399.
189. Tubman, T., Thompson, S., & McGuire, W. (2005). *Glutamine supplementation to prevent morbidity and mortality in preterm infants. The Cochrane Database of Systematic Reviews.*
190. Turner J.R : Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 799-809 (2009)
191. Van Arsdale W. 1886 Sepsis. On the present state of knowledge in bacterial science in its surgical relations." *Ann Surg.* 34321333.
192. Van den Berg, J. P., 6/Westerbeek, E. A. M., van der Klis, F. R. M., Berbers, G. A. M., and van Elburg, R. M. (2011). Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum. Dev.* 87, 67–72.
193. Van der Poll T, Herwald H. The coagulation system and its function in early immune defense. *ThrombHaemost* 2014;112.
194. Van Herk, W., Stocker, M., & van Rossum, A. M. C. (2016). Recognising early onset neonatal sepsis: an essential step in appropriate antimicrobial use. *Journal of Infection*, 72, S77–S82.
195. Viemann D, Dubbel G, Schleifenbaum S, Harms E, Sorg C, Roth J. Expression of toll-like receptors in neonatal sepsis. *PediatrRes* 2005; 58:654–659.
196. Vincent JL, Ramesh MK, Ernest D, LaRosa SP, Pacht J, Aikawa N, Hoste E, Levy H, Hirman J, Levi M, Daga M, Kutsogiannis DJ, Crowther M, Bernard GR, Devriendt J, Puigserver JV, Blanzaco DU, Esmon CT, Parrillo JE, Guzzi L, Henderson SJ, Pothirat C, Mehta P, Fareed J, Talwar D, Tsuruta K, Gorelick KJ, Osawa Y, Kaul I. A randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2b study to evaluate the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin, ART-123, in patients with sepsis and suspected disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med.* 2013 ; 41 :2069–79.
197. Vordenbaumen S, Braukmann A, Petermann K, Scharf A, Bleck E, von Mikecz A, et al. Casein alpha s1 is expressed by human monocytes and upregulates the production of GM-CSF via p38 MAPK. *Journal of Immunology* 2011;186:592–601.

198. Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr* 2010;156(2 Suppl):S3–7.
199. Wang H, Naghavi M, Allen C, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*
200. Walker, J. C., Smolders, M. A., Gemen, E. F., Antonius, T. A., Leuvenink, J., and de Vries, E. (2011). Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand. J. Immunol.* 73, 53–58.
201. Wang J et al. Diagnostic Value of Mean Platelet Volume for Neonatal Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 99, e21649 (2020).
202. Wolf HM, Hauber I, Gulle H, Samstag A, Fischer MB, Ahmad RU, et al. Antiinflammatory properties of human serum IgA: induction of IL-1 receptor antagonist and Fc alpha R (CD89)-mediated down-regulation of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-6 in human monocytes. *Clinical and Experimental Immunology* 1996;105:537–43.
203. Wolf HM, Vogel E, Fischer MB, Rengs H, Schwarz HP, Eibl MM. Inhibition of receptor-dependent and receptor-independent generation of the respiratory burst in human neutrophils and monocytes by human serum IgA. *Pediatric Research* 1994;36:235–43.
204. Wong SH, Francis N, Chahal H, Raza K, Salmon M, Scheel-Toellner D, et al. Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid. *Rheumatology* 2009;48:39–44.
205. Wortham JM, Hansen NI, Schrag SJ, et al. Chorioamnionitis and culture-confirmed, early-onset neonatal infections. *Pediatrics* 2016; 137: e20152323. _Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, Lee WL. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. *Sci Transl Med* 2011; 3: 88ps25
206. Wynn, James L. (2016). Defining neonatal sepsis. *Current Opinion in Pediatrics*, 28(2), 135–140.
207. Wynn, J. L., & Wong, H. R. (2017). Pathophysiology of Neonatal Sepsis. *Fetal and Neonatal Physiology*, 1536–1552.e10.
208. Wynn, J. L., & Wong, H. R. (2010). Pathophysiology and Treatment of Septic Shock in Neonates. *Clinics in Perinatology*, 37(2), 439–479.
209. Yamaguchi M, Yoshida K, Uchida M. Novel functions of bovine milk-derived alpha-lactalbumin: anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by inhibiting cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2009;32:366–71.
210. Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1824:253–62.
211. Zhang JP, Chen C, Yang Y. [Changes and clinical significance of Toll-like receptor 2 and 4 expression in neonatal infections] *Zhonghua ErKeZaZhi*. 2007 Feb;45(2):130–133.