

DETECTION PRECOCE DES INFECTIONS BACTERIENNES CHEZ LE CHIOT NOUVEAU-NE

THESE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

WINKLER Mickaël

Né le 21/01/1994 à TOULON (83)

Directrice de thèse : Mme Hanna MILA

JURY

PRESIDENTE :
Mme Annabelle MEYNADIER

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESSEURES :
Mme Hanna MILA
Mme Catherine TRUMEL

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et économie de la santé animale*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DEBREUQUE Maud**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Félipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*

REMERCIEMENTS

AUX MEMBRES DU JURY

A Madame le Professeur Annabelle MEYNADIER

Professeure à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Alimentation animale

Qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse
En témoignage de mon profond respect

A Madame le Docteur Hanna MILA

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Élevage des carnivores domestiques

Qui m'a confié cette étude et guidée tout au long de sa réalisation
Pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son aide
Remerciements très chaleureux

A Madame le Professeur Catherine TRUMEL

Professeure à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Biologie Médicale

Qui a accepté de faire partie du jury de cette thèse
Pour son aide avec les statistiques et ses idées
Sincères remerciements

A L'ÉQUIPE NEOCARE

Qui m'a aidé lors de la réalisation de ce projet,
Pour avoir pris régulièrement des nouvelles
Sincères remerciements

A la Société Centrale Canine et la Société Agria

Qui ont permis réalisation de ce projet grâce au
financement obtenu dans la cadre de l'appel à
projets SCC-Agria
Sincères remerciements

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES FIGURES	11
INTRODUCTION	14
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Mortalité néonatale et causes	17
1. Mortalité néonatale	17
2. Causes de mortalité néonatales.....	18
II. Définition et physiopathologie du sepsis	20
1. Définition du sepsis	20
2. Étiologie.....	22
a. Bactéries responsables.....	22
b. Facteurs de risques extrinsèques	22
c. Facteurs de risque intrinsèques	23
i. Barrières.....	23
ii. Immunité cellulaire.....	24
iii. Immunité humorale	24
3. Pathophysiologie	24
a. Voie de contamination.....	24
b. Activation de la réponse immune au niveau vasculaire.....	25
c. Activation de la réponse immune au niveau cellulaire	25
d. Activation des médiateurs de l'inflammation	25
4. Signes cliniques.....	27
5. Diagnostic.....	27
III. Les biomarqueurs de l'inflammation et du sepsis	28
1. Définition	28
2. Caractéristiques du biomarqueur idéal du sepsis	29
3. Les biomarqueurs étudiés.....	30
a. Les protéines de la phase aigüe.....	30
i. Protéine C-Réactive.....	30
ii. Procalcitonine.....	31
iii. Pentraxine-3	32
iv. Sérum Amyloïde A.....	33
v. Protéine de liaison aux lipopolysaccharides	33
b. Les cytokines et chimiokines.....	34
i. Interleukine-6.....	34
ii. Interleukine-8.....	34
iii. Facteur de nécrose tumorale alpha.....	35
c. Les marqueurs cellulaires	35
i. CD11β.....	35
ii. CD14 et présepsine.....	36
iii. CD163 soluble.....	36
d. Les récepteurs	37
i. Forme soluble du récepteur activateur du plasminogène de l'urokinase : suPAR	37
ii. Récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes : sTREM-1.....	37
e. Les biomarqueurs associés aux modifications vasculaires	38
i. Adrénomédulline et pro-adrénomédulline.....	38
ii. Angiopoïétine.....	38
f. Autres biomarqueurs	39

i.	Formule leucocytaire	39
ii.	Lactate	40
iii.	Calprotectine	40
iv.	Autres biomarqueurs existants	41
IV.	Conclusion sur la partie bibliographiques et objectifs de l'étude	41
1.	Conclusion	41
ETUDE EXPERIMENTALE		44
I.	Matériels et méthodes.....	44
1.	Les animaux	44
a.	Groupe « témoins »	45
b.	Groupe « décédés »	45
2.	Prélèvements sanguins et conservation des échantillons	46
3.	Dosage de la procalcitonine	46
a.	Principe	47
b.	Protocole	47
4.	Dosage de l'albumine, protéines totales et protéine C-réactive sérique	50
5.	Dosage des immunoglobulines	50
6.	Analyses des données	51
a.	Facteurs de variation et intervalles de références	51
b.	Évaluation des biomarqueurs d'infection bactérienne	51
II.	Résultats	52
1.	Description de la population.....	52
a.	Population générale.....	52
b.	Témoins.....	53
2.	Facteurs de variations des biomarqueurs étudiés	55
a.	Procalcitonine	55
i.	<i>Effet âge</i>	55
ii.	<i>Effet format racial</i>	56
iii.	<i>Effet sexe</i>	57
b.	Protéine C-réactive.....	57
i.	<i>Effet âge</i>	57
ii.	<i>Effet format racial</i>	58
iii.	<i>Effet sexe</i>	59
c.	Protéines totales	59
i.	<i>Effet âge</i>	59
ii.	<i>Effet format racial</i>	60
iii.	<i>Effet sexe</i>	60
d.	Albumine.....	60
i.	<i>Effet âge</i>	61
ii.	<i>Effet format racial</i>	61
iii.	<i>Effet sexe</i>	62
e.	Immunoglobulines G.....	62
i.	<i>Effet format racial</i>	62
ii.	<i>Effet sexe</i>	63
f.	Rapport Albumine/Globuline.....	63
i.	<i>Effet âge</i>	64
ii.	<i>Effet format racial</i>	64
iii.	<i>Effet sexe</i>	65
3.	Intervalles de références.....	66
4.	Identification des biomarqueurs de l'infection bactérienne.....	70
a.	Procalcitonine	70
b.	Protéine C-réactive.....	72
c.	Protéines totales	73
d.	Albumine.....	74

e.	Immunoglobulines G.....	75
f.	Albumine/globulines	75
5.	Valeurs diagnostiques des biomarqueurs étudiés.....	76
III.	Discussion	78
1.	Analyse des résultats.....	78
a.	Intervalles de références chiots et chiens adultes	78
b.	Les biomarqueurs.....	79
2.	Limites de l'étude.....	80
a.	Définition du sepsis.....	80
b.	Population étudiée.....	81
c.	Choix des paramètres étudiés.....	81
3.	Perspectives.....	82
	<i>CONCLUSION.....</i>	83
	<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	85

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1 : Pourcentages de mortalité canine rapportés dans la littérature</u>	17
<u>Tableau 2 : Calcul du score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)(Singer et al. 2016)</u>	20
<u>Tableau 3 : Critères du SIRS chez le chien (Hauptman, Walshaw, Olivier 1997)</u>	21
<u>Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des différents biomarqueurs du sepsis chez l'enfant nouveau-né</u>	42
<u>Tableau 5 : Dilutions de la procalcitonine utilisées pour la préparation du standard dans le cadre du dosage de cette dernière par le test ELISA</u>	47
<u>Tableau 6 : Dilutions des échantillons en fonction du volume disponible dans le cadre du dosage de la procalcitonine sanguine par le test ELISA</u>	48
<u>Tableau 7 : Les valeurs moyennes de score de santé réalisée de manière hebdomadaire entre 0 et 21 jours chez les chiots du groupe témoins (56 chiots)</u>	53
<u>Tableau 8 : Valeurs corrélation de Spearman entre les biomarqueurs étudiés à J2 (Alb/Glob : rapport albumine sur globuline ; Alb : albumine ; Prot T : protéines totales, CRP : protéine C-réactive ; PCT : procalcitonine, n= 56)</u>	55
<u>Tableau 9 : Tableau résumé des intervalles de référence pour les différents biomarqueurs</u>	66-69
<u>Tableau 10 : Résumé de la comparaison entre les chiots témoins (T) et décédés (D) pour les différents paramètres analysés uniquement pour J2 et en utilisant le test de Mann-Whitney</u>	71
<u>Tableau 11 : Valeurs diagnostiques (l'aire sous la courbe (AUC) l'index de Youden (J), le seuil, la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), la valeur prédictive positive et négative (VPP et VPN)) pour chaque paramètre étudié à J2 sur 100 chiots (56 témoins et 44 décédés)</u>	77
<u>Tableau 12: intervalles de références pour les chiots, les chiens adultes et les nourrissons humains pour chacun des paramètres étudiés(Easley et al. 2020; Eschborn, Weitkamp 2019, Cornell University)</u>	78

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Principales causes de mortalité néonatales chez l'espèce canine (Blunden 1983; Nielsen 1998; Gill 2001; Hoskins 2001; Lawler 2008; Tønnessen et al. 2012; Münnich, Küchenmeister 2014).</i>	19
<i>Figure 2 : Physiopathologie du sepsis néonatal et du choc septique. (AEMs : mécanismes effecteurs antimicrobiens ; CV, cardiovasculaire ; DAMPs : motifs moléculaires associés aux dégâts ; DIC : coagulation intravasculaire disséminée ; PRRs : Récepteurs de reconnaissance aux motifs moléculaires ; SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique (d'après Wynn, Wong 2017))</i>	26
<i>Figure 3 : Cinétique des marqueurs de l'inflammation après administration d'endotoxine à des volontaires sains. CRP : protéine C-réactive; IL : interleukine; PCT : procalcitonine; TNF : tumor necrosis factor. (D'après Reinhart et al. 2006)</i>	30
<i>Figure 4 : Diagramme de sélection des chiots témoins</i>	45
<i>Figure 5 : Diagramme de sélection des chiots décédés</i>	46
<i>Figure 6 : Diagramme du protocole expérimental réalisé</i>	49
<i>Figure 7 : Principe de l'ELISA « en sandwich » extrait de la thèse de Charlotte Aggouni, 2016</i>	50
<i>Figure 8 : Répartition des chiots témoins et décédés en fonction de la race (les barres vertes représentent le groupe témoin ; les barres rouges le groupe décédés ; les nombres au-dessous des barres représentent le pourcentage des chiots pour chaque race dans chaque groupe ; n=100)</i>	52
<i>Figure 9 : Répartition des chiots témoins et décédés en fonction du format racial (les barres vertes représentent le groupe témoin ; les barres rouges le groupe décédés ; les nombres à l'intérieur des barres représentent le pourcentage des chiots pour chaque format dans chaque groupe ; n=100)</i>	53
<i>Figure 10 : Répartition des chiots morts en fonction de l'âge de la mort (le chiffre au-dessous des barres représentent le nombre de chiots morts pour chaque âge ; n=4)</i>	54
<i>Figure 11 : Concentration sérique de la procalcitonine chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2 ; en orange-J7 ; en gris-J14 ; en jaune-J21) (* p<0,05 pour J7 vs J21)</i>	56
<i>Figure 12 : Concentration sérique de la procalcitonine chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (L, M et S) (***) (*** p<0,001 pour S vs M et M vs)</i>	57
<i>Figure 13 : Concentration sérique de la CRP chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2, en orange-J7, en gris-J14 et en jaune-J21). (* p<0,05 pour J2 vs J14 et J2 vs J21)</i>	58
<i>Figure 14 : Concentration sérique de la CRP chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (L, M et S) (** p < 0,01 pour S vs L et * p<0,05 pour S vs M)</i>	58

<i>Figure 15 : Concentration sérique des protéines totales chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2, en orange-J7, en gris-J14 et en jaune-J21). (***)$p < 0,001$ pour J2 vs J14, J2 vs J14 et J2 vs J21).</i>	59
<i>Figure 16 : Concentrations sériques de PT chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). (***)$p < 0,001$ pour S vs L)</i>	60
<i>Figure 17 : Concentration sérique d'albumine chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2, en orange-J7, en gris-J14 et en jaune-J21). (***)$p < 0,001$ pour J2 vs J14, J2 vs J14 et J2 vs J21)</i>	61
<i>Figure 18 : Concentrations sériques d'ALB chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). (***)$p < 0,001$ pour L vs S et L vs M)</i>	62
<i>Figure 19 : Concentrations sériques d'IgG chez les 54 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). (*$p < 0,05$ pour L vs S)</i>	63
<i>Figure 20 : Rapport Alb/Gb chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2 ; en orange-J7 ; en gris-J14 ; en jeune-J21) (*$p < 0,05$ pour J7 vs J21)</i>	64
<i>Figure 21 : Rapport Alb/Gb chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). (**$p < 0,05$ pour L vs S)</i>	65
<i>Figure 22 : Rapport Alb/Gb chez les 56 chiots témoins en fonction de leur sexe (F pour Femelle et M. pour Mâle)</i>	65
<i>Figure 23 : Concentration sérique de la procalcitonine en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2,J7,J14 et J21) ; décédés en rouge(n=42 à J2, n=13 à J7 et n=3 à J14, n=0 à J21) ; n=100 ; **$p < 0,01$)</i>	72
<i>Figure 24 : Concentration sérique de la CRP en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2,J7,J14 et J21) ; décédés en rouge(n=38 à J2, n=12 à J7 et n=3 à J14, n=0 à J21) ; n=100 ; **$p < 0,01$)</i>	73
<i>Figure 25 : Concentration sérique des protéines totales en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2,J7,J14 et J21) ; décédés en rouge (n=38 à J2, n=12 à J7, n=3 à J14 et n=0 à J21; n=100 ; **$p < 0,01$)</i>	74
<i>Figure 26 : Concentration sérique d'albumine en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2,J7,J14 et J21) ; décédés en rouge (n=36 à J2, n=15 à J7, n=3 à J14 et n=0 à J21; n=100 ; (***)$p < 0,001$)</i>	75
<i>Figure 27 : Rapport Albumine/Globulines en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert ; décédés en rouge ; n=100 ; **$p < 0,01$)</i>	76
<i>Figure 28 : Courbe ROC pour chaque paramètre étudié</i>	77

INTRODUCTION

La mortalité périnatale dans l'espèce canine se définit comme l'ensemble des décès survenus avant la mise-bas (mortalité fœtale) ou pendant la mise-bas (mortalité), mais également des pertes néonatales précoces de 0 à 7 jours post-partum, et tardives de 7 à 21 voire 28 jours selon les auteurs (mortalité néonatale) (Nielen 1998; Gill 2001; Tønnessen et al. 2012). Le taux moyen de la mortalité périnatale chez le chien est de 20%, avec environ la moitié de décès observés pendant la période néonatale.

La mortalité néonatale est un problème majeur mondiale qui touche la majorité des espèces. Les taux de mortalité néonatale varient entre 8,2% chez l'espèce féline (Fournier et al. 2017) et 5,7% chez l'espèce bovine (Raboison et al. 2013). Chez l'homme, le taux de mortalité néonatale a fortement diminué ces dernières années. En 2003 il était de 3,6% (Yu 2003), et de 1,75% en 2019 (World Bank). Ces taux de mortalité néonatale sont élevés car les nouveau-nés sont plus sensibles que les adultes aux nombreuses adaptations qu'ils subissent dès la mise-bas, comme la régulation de la température corporelle, la régulation de la glycémie ou encore la défense contre des nombreux micro-organismes (Ki et al. 2016).

Chez l'espèce canine, la mortalité néonatale représente entre 9 et 34% des pertes (Meloni, Martino, Grieco 2014), ce qui en fait l'une des espèces domestiques la plus impactée par la mortalité néonatale. Parmi les causes de mortalité néonatale chez cette espèce, la deuxième cause la plus souvent retrouvée est, juste après les dystocies, l'infection bactérienne (Münnich 2008). C'est cette infection bactérienne, au départ localisée, qui peut se développer et induire, à travers une réponse immunitaire disproportionnée, un sepsis conduisant au décès (Wynn, Wong 2017).

Malheureusement, aujourd'hui le diagnostic de ces infections bactériennes se fait de manière tardive, souvent post-mortem en raison de la difficulté à détecter les signes cliniques qui sont non spécifiques, voire absents chez les chiots nouveau-nés (Münnich, Küchenmeister 2014)

Les tests de confirmation disponibles pour les infections bactériennes sont peu performants et peuvent prendre un certain temps comme la culture bactérienne, impliquant un retard dans la prise en charge de l'infection et donc une diminution de l'efficacité du traitement et du taux de survie (Al Jalbout et al. 2019). Chez l'espèce canine, des biomarqueurs, tels que la procalcitonine, ont été étudiés chez des adultes (Floras et al. 2014) mais très peu d'études ont été réalisées chez les nouveau-nés et à l'heure actuelle aucun biomarqueur n'a été identifié pour confirmer un diagnostic d'une infection bactérienne (Kim, Choi 2020).

L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer différents biomarqueurs potentiels utilisés en médecine pédiatrique humaine pour la détection précoce des infections bactériennes durant la période néonatale chez le chien.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Mortalité néonatale et causes

1. Mortalité néonatale

La période néonatale est définie comme la période de vie entre 0 et 21 jours (Indrebø, Trangerud, Moe 2007). Elle comprend deux périodes : la période néonatale précoce de 0 à 7 jours et la période néonatale tardive de 7 à 21 jours (Tønnessen et al. 2012). Parmi tous les cas de décès avant la vente du chiot, le taux de mortalité néonatale varie de 36,2 % (Indrebø, Trangerud, Moe 2007) à 65,3 % (Gill, 2001). Sur les trois semaines incluses dans la période néonatale, la première semaine semble être celle où le taux de mortalité est le plus élevé : entre 29,9 % (Indrebø, Trangerud, Moe 2007) et 57 % (Gill, 2001) selon les études contre 6,3 % (Indrebø, Trangerud, Moe 2007) et 29,3% pour les deux semaines suivantes (Belin 2013) (Tableau 1). Cela peut notamment être expliqué par deux phénomènes : l'adaptation à la vie extra-utérine et la prise colostrale. Cette dernière permet notamment le transfert des anticorps circulants de la mère au chiot, pour une durée variant de 3 à 12 semaines, pour ensuite acquérir son immunité propre. Le colostrum permet également de fournir aux nouveau-nés des nutriments, des hormones, et différents facteurs de croissance (Chappuis 1998).

<i>Références</i>	% de mortalité				Mortalité Totale
	Mort-nés	1 ^{ère} semaine	2-3 ^{ème} semaine	>3 ^{ème} semaine	
	<i>Par rapport aux chiots décédés</i>				<i>Par rapport aux chiots nés</i>
<i>Potkay, Bacher 1977</i>	36,1	48,9	15		17,4
<i>Blunden et al. 1986</i>	8,3	29,3	•		37,7
<i>(Nielen 1998)</i>	31,3	42,4	14,9	11,3	18,2
<i>Gill 2001</i>	34,7	57	8,3		20,2
<i>Indrebø et al. 2007</i>	63,8	29,9	6,3	•	17,1
<i>Lawler et al. 2008</i>	29,9	66,5		•	•
<i>Tønnessen et al. 2012</i>	53,9	46,1	•		8
<i>Mila et al. 2012</i>	35,1	46,5	18,4		23,2
<i>Belin 2013</i>	43,7	27,1	29,2		22,9

Tableau 1 : Pourcentages de mortalité canine rapportés dans la littérature

2. Causes de mortalité néonatales

Les chiots nouveau-nés sont particulièrement vulnérables. Quatre facteurs principaux ont été identifiés : la mauvaise thermorégulation, le risque de déshydratation, le risque d'hypoglycémie et l'immaturation du système immunitaire. Ce sont donc des individus totalement immatures et encore dépendants de leur mère (Indrebø, Trangerud, Moe 2007; Münnich 2008; Münnich, Küchenmeister 2014; Ki et al. 2016).

Les causes de la mortalité intrinsèque sont diverses. On retrouve classiquement les infections bactériennes néonatales dont les principales bactéries sont *Streptococcus*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus* (Münnich, Küchenmeister 2014) ou le syndrome du chiot qui s'estompe (« fading puppy syndrome ») (Blunden 1983). On retrouve également les infections virales, telles que l'hépatite infectieuse canine, l'herpèsvirus canin et le parvovirus canin (Hoskins, 2001) et parasitaires à *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Toxoplasma gondii* (Ki et al. 2016). Enfin il est possible de citer les immunodéficiences primaires (Ki et al. 2016), l'insuffisance pondérale, la prématurité (Grundy 2006; Indrebø, Trangerud, Moe 2007) et les anomalies congénitales diverses (Hoskins, 2001).

Ajoutés à ces causes intrinsèques de mortalité néonatales, il a été également mis en évidence des facteurs de mortalité liés à la mère tels que les infections maternelles avec le parvovirus canin, l'herpèsvirus canin, *Brucella sp.*, *Toxoplasma gondii* et surtout bactériennes à *Escherichia coli* ou *Salmonella* (Ki et al. 2016). Le comportement maternel (léchage excessif, cannibalisme, mauvaise maternisation) (Hoskins, 2001), la dystocie et l'anorexie sont également des facteurs importants de mort précoce chez le chien (Lawler 2008).

Enfin, les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la mortalité néonatale. Les variations de température soudaines coïncident avec une hausse de la mortalité néonatale, notamment en automne ou une journée chaude peut-être suivie d'une nuit froide (Ki et al. 2016) (Figure 1).

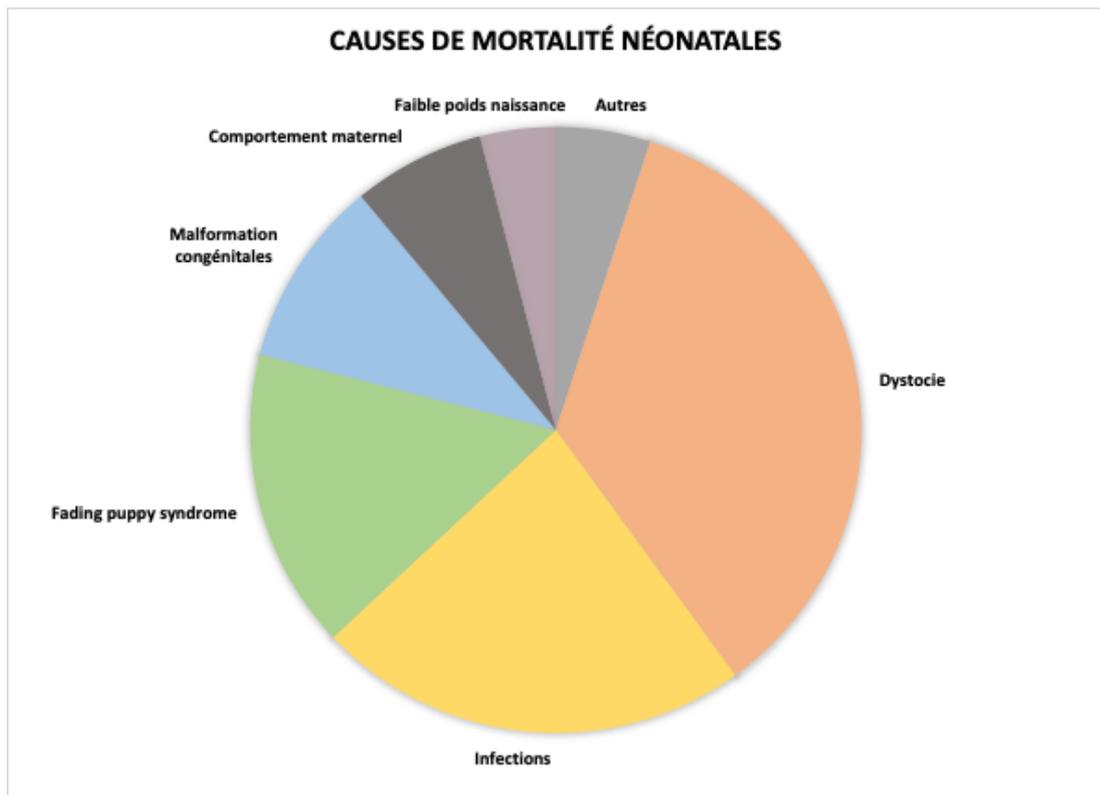


Figure 1 : Principales causes de mortalité néonatale chez l'espèce canine (Blunden 1983; Nielen 1998; Gill 2001; Hoskins 2001; Lawler 2008; Tønnessen et al. 2012; Münnich, Küchenmeister 2014)

Les maladies infectieuses bactériennes ont été identifiées comme la principale cause de mortalité néonatale chez le chien, juste après les dystocies (Nielen 1998; Gill 2001). Les voies d'infections possibles sont multiples : avant, pendant ou après la mise-bas, par voie orale, ombilicale, respiratoire, transplacentaire ou environnementale (Meloni, Martino, Grieco 2014). Ces infections peuvent donner lieu à des sepsis dont l'évolution peut être aigüe ou subaigüe et entraîner la mort des chiots. Les symptômes étant peu spécifiques et l'évolution extrêmement rapide, la prise en charge médicale est assez compliquée et souvent vaine. Dans l'étude de Meloni et al, les auteurs ont montré que 52,9% des chiots sont morts à cause d'une infection bactérienne. De plus, une utilisation déraisonnée des antibiotiques par les éleveurs afin de diminuer le taux de mortalité néonatale serait à l'origine d'une colonisation et d'une sélection bactérienne, pouvant même induire un sepsis chez les chiots (Milani et al. 2012).

Le sepsis ou une infection grave au cours des quatre premières semaines de vie est la cause de mortalité pour plus d'un million de nouveau-nés dans le monde chaque année (Wynn, Wong 2017) ce qui en fait un enjeu majeur en néonatalogie humaine comme canine.

II. Définition et physiopathologie du sepsis

1. Définition du sepsis

La Société Européenne de Soins Intensifs (ESICM – European Society of Intensive Care Medicine) ainsi que la Société des Soins Intensifs (SCCM – Society of Critical Care Medicine) ont, lors d'un troisième consensus international en 2016, redéfini le sepsis et le choc septique. Le sepsis est alors depuis défini comme un syndrome d'anomalies physiologiques, pathologiques et biochimiques, induit par une infection (Singer et al. 2016).

En d'autres termes, le sepsis correspond donc au dysfonctionnement d'un ou plusieurs organes, engageant le pronostic vital du patient, causé par une réponse inadéquate de l'organisme à une infection. La notion d'infection seule n'est pas suffisante pour définir un sepsis, mais doit être corrélé à la clinique du patient. Pour cela, le score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), ou qSOFA (quick Sequential Organ Failure Assessment) est calculé à partir de différents paramètres mesurés tels que la pression partielle en dioxygène, la tension artérielle, les taux de plaquettes, de bilirubine et de créatinine ainsi que le score de Glasgow (Tableau 2). Il est important de noter que cette nouvelle définition du sepsis a été élaborée pour un être humain adulte. Le sepsis est une véritable urgence médicale et est l'une des causes d'hospitalisation en soins intensifs les plus fréquentes actuellement, bien que le taux de mortalité continue de diminuer chaque année dans les pays ayant un revenu élevé. En revanche, dans les pays à moindre revenu, il reste l'une des causes principales de mortalité (Singer et al. 2016; Kim, Choi 2020).

	Score SOFA				
	0	1	2	3	4
PaO2/FiO2	≥400	<400	<300	<200	<100
Plaquettes 10³/mm³	≥150	<150	<100	<50	<20
Bilirubine mg/dL	<1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	>12
Hypotension	PAM ≥70mmHg	PAM < 70mmHg	Dopamine < 5 ou dobutamine (toute dose)	Dopamine > 5 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradrénaline ≤ 0,1	Dopamine > 15 ou adrénaline > 0,1 ou noradrénaline > 0,1
Score de Glasgow	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Créatinine mg/dL Ou diurèse mL/j	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 <500	> 5,0 <200

Tableau 2 : Calcul du score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)(Singer et al. 2016)

Concernant le sepsis néonatal, il n'y a pas de consensus établi sur sa définition. Le sepsis bactérien est défini par Nizet et Klein comme un syndrome caractérisé par des signes

d'infections systémiques et d'une bactériémie (Nizet, Klein 2011). Il est défini par Sharma et al. comme « la présence de bactéries dans les liquides organiques stériles, à savoir le sang, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, péritonéal et pleural » (Sharma et al. 2018). Il est néanmoins classé en deux catégories en fonction de l'âge d'apparition. On retrouve donc le sepsis d'apparition précoce, entre 0 et 3 jours de vie, et le sepsis d'apparition tardive, après 4 jours de vie (Nizet, Klein 2011; Sharma et al. 2018; Gollehon 2019). Il est admis que le sepsis précoce se développerait à partir d'une infection d'origine maternelle par transmission verticale tandis que le sepsis tardif serait d'origine environnementale donc par transmission horizontale (Sharma et al. 2018; Gollehon 2019).

La nouvelle définition du sepsis d'après Singer et al, 2016 montre cependant quelques limites. Tout d'abord, l'utilisation en médecine humaine du score qSOFA pour la détection du sepsis de manière précoce semble avoir une sensibilité assez faible (Williams et al. 2017). Elle est de plus difficilement applicable pour le sepsis néonatal, puisque les réponses immunitaires sont différentes et les manifestations cliniques sont peu spécifiques et variées (Wynn, Wong 2017).

En médecine vétérinaire aucun consensus concernant la définition de sepsis n'a été établi ni pour le chien adulte ni pour le nouveau-né. Le terme sepsis fait référence la réponse inflammatoire systémique à une infection. Son diagnostic nécessite la découverte d'une infection associée à la présence d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique validé par la présence d'au moins deux des quatre critères suivants chez l'espèce canine (Tableau 3).

CRITERES

TEMPERATURE	> 39,2°C ou < 38,1°C
RYTHME CARDIAQUE	> 120 battements par minute
FREQUENCE RESPIRATOIRE	> 20 mouvements par minute
LEUCOCYTES % DE BAND CELLS	>16 000 cellules/mm ³ ou < 6 000 cellules/mm ³ > 3%

Tableau 3 : Critères du SIRS chez le chien (Hauptman, Walshaw, Olivier 1997)

2. Étiologie

Pour mieux comprendre le phénomène du sepsis chez le chiot nouveau-né, des éléments d'étiologie et de physiopathologie du sepsis seront présentés dans les parties suivantes. En absence des informations propres à l'espèce canine dans la littérature, des références bibliographiques de la médecine humaines ont été présentées par la suite.

a. Bactéries responsables

En médecine humaine, les agents infectieux les plus souvent retrouvés lors d'infections et sepsis néonataux sont des bactéries. Parmi ces bactéries, on peut citer les streptocoques du groupe B pour les sepsis précoces, les staphyloques à coagulase négatives comme *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli* pour les sepsis tardifs (B. J. Stoll et al. 2002; Stoll et al. 2005; Nizet, Klein 2011; Gollehon 2019). Mais l'on retrouve également de nombreuses autres bactéries telles que *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* et bien d'autres (Stoll et al. 2005; Bizzarro et al. 2005; Nizet, Klein 2011).

Outre ces bactéries, chez le nouveau-né, il est également possible de retrouver d'autres pathogènes responsables d'infections tels que les adénovirus, les entérovirus, les levures et champignons, les agents d'infection sexuellement transmissibles (Verboon-Maciolet et al. 2005; Gollehon 2019).

D'après une étude de Hornik et al., lors d'un sepsis précoce, 34% des agents infectieux responsables du sepsis étaient des bactéries à gram-positif et 58% des agents infectieux étaient des bactéries à gram-négatif. En revanche lors d'un sepsis tardif, 61% des agents pathogènes était des bactéries à gram-positif et 26% à gram-négatif (Hornik et al. 2012).

Les bactéries à gram-positif les plus souvent retrouvées sont *Streptococcus du groupe B*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp*, tandis que les bactéries à gram-négatif les plus souvent observées sont *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Enterobacter spp* (Stoll et al. 2011)

b. Facteurs de risques extrinsèques

En médecine humaine, le premier facteur de risque extrinsèque est l'infection maternelle, notamment aux streptocoques du groupe B (Benitz, Gould, Druzin 1999) transmise possiblement par voie hématogène en période péri-partum, ou en période post-partum immédiat, mais aussi une chorioamnionite ou une rupture prolongée des membranes

maternelles (Ng 2004 ; Wynn, Wong 2017 ; Kim, Choi 2020). Le temps entre la mise-bas et la rupture des membranes représente également un facteur de risque (Barbara J. Stoll et al. 2002).

Une contamination par l'environnement est également possible tout au long de la période post-partum. Les actes médicaux traumatisant les barrières physiques du nouveau-né sont également à prendre en compte. Parmi ces actes, on peut citer la pose de cathéters centraux, la pose de sonde endotrachéale, l'assistance respiratoire et la ventilation mécanique prolongée, à mettre en lien avec les nouveau-nés prématurés présentant des facteurs de risque intrinsèques plus importants (B. J. Stoll et al. 2002; Klinger et al. 2009; Sharma et al. 2018).

c. Facteurs de risque intrinsèques

Les facteurs de risques intrinsèques sont en médecine humaine la prématurité, un faible poids de naissance, le sexe masculin (Nizet, Klein 2011).

Quatre grands facteurs déterminent l'issue d'une infection : l'agent pathogène lui-même, la charge en pathogène, le site d'infection et la réponse de l'hôte à cette infection. La réponse de l'hôte dépend de son système de défense que sont les barrières physicochimiques, l'immunité cellulaire et l'immunité humorale (Wynn, Wong 2017; Gollehon 2019).

i. Barrières

La peau et les muqueuses constituent les premières défenses physiques de l'hôte contre les agents pathogènes. Mais la barrière physique est insuffisante, et une défense immunitaire efficace est indispensable pour éviter le développement de toute infection (Wynn, Wong 2017).

La peau est constituée de différentes couches. La première étant la couche cornée et permettant de prévenir l'invasion par des agents pathogènes mais également de maintenir une température corporelle et une hydratation correcte (Rutter 2000). Chez le nouveau-né, cette couche est incomplète et immature, particulièrement chez les nouveau-nés prématurés (Kalia et al. 1998). La peau est ensuite rapidement colonisée par de nombreux micro-organismes qui feront partie de la flore commensale cutané. Toute rupture cutanée augmente la probabilité de développement d'une infection (Wynn, Wong 2017).

Les muqueuses, notamment respiratoires, peuvent également être une source d'infection et de colonisation bactérienne lorsqu'il y a une altération du mucus, un déficit en surfactant mais également lors de manœuvres médicales telles que la ventilation mécanique ou l'intubation (Barbara J. Stoll et al. 2002; Klinger et al. 2009).

Les barrières physico-chimiques sont donc moins fonctionnelles chez le nouveau-né, les défenses ne sont pas totalement matures, l'infection par divers agents pathogène est donc plus aisée augmentant ainsi le risque de développement d'un sepsis.

ii. Immunité cellulaire

Les neutrophiles sont des cellules essentielles pour juguler l'infection bactérienne. Les cellules endothéliales produisent les cytokines et chimiokines qui permettent le recrutement des neutrophiles au lieu d'infection. Les neutrophiles des nouveau-nés sont moins performants que ceux des adultes au niveau de leur marginalisation et diapédèse dû à une plus faible capacité de déformation, et leur phagocytose est moins efficace (Koenig, Yoder 2004; Maródi 2006). De plus, la chimiotaxie cellulaire chez les nouveau-né est moins performante que chez l'adulte, permettant le développement plus aisé d'un sepsis (Sullivan et al. 2002).

Les nouveau-nés présentent également des déficiences concernant les autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire telles que les cellules T, les cellules NK et monocytes qui peuvent être moins nombreuses ou immatures donc moins fonctionnelles que chez des adultes (Wynn, Wong 2017).

iii. Immunité humorale

Les immunoglobulines G sont acquises par voie transplacentaire en fin de gestation, impliquant que pour les nouveau-nés prématurés, ayant eu une gestation de plus courte durée, le transfert est incomplet et ceux-ci possèdent moins d'immunoglobulines G que les non-prématurés et présentent donc un risque plus important de développer une infection (Malek, Sager, Schneider 1994). Les immunoglobulines M, E et également G peuvent être synthétisés *in-utero* mais en faible quantité. Les immunoglobulines A quant à elles peuvent être transmises par l'allaitement (Gollehon 2019).

Les protéines du complément, qui jouent un rôle dans l'opsonisation et la phagocytose, sont produites dès la sixième semaine de gestation mais la maturité totale n'est atteinte qu'à partir de six à dix mois de vie. Cela implique que chez les nouveau-nés, l'opsonisation est réduite, augmentant ainsi le risque d'infection (Gollehon 2019; Wynn, Wong 2017).

3. Pathophysiologie

a. Voie de contamination

Le fœtus est protégé *in-utero* par différentes barrières : le chorion, l'amnios et le placenta. La plupart des infections ont lieu en période post-partum, après la rupture de ces membranes, bien que certains pathogènes puissent les traverser *in-utero* (Wynn, Wong 2017).

Une fois les micro-organismes dans le système vasculaire, ceux-ci peuvent se développer à partir de n'importe quel foyer. Des mécanismes immunitaires innés et adaptatifs sont alors activés pour éliminer le pathogène par différentes voies tels que les système cellulaire monocytes et macrophages, l'opsonisation, le complément, etc. (Gollehon, 2019).

b. Activation de la réponse immune au niveau vasculaire

La propagation de l'agent pathogène par le sang va entraîner une activation des cellules endothéliales et induire l'augmentation de l'expression des récepteurs pro-inflammatoires à leur surface permettant l'adhésion des cellules à la paroi endothéliale, un recrutement des leucocytes, et l'activation de la coagulation. Les cellules endothéliales ainsi que les macrophages environnants vont également produire des chimiokines permettant le recrutement des cellules leucocytaires (Wynn, Wong, 2017).

c. Activation de la réponse immune au niveau cellulaire

Lorsqu'un pathogène rompt une barrière, le système immunitaire inné se met en place. Des cellules dites sentinelles, dont les monocytes et macrophages reconnaissent le pathogène en question et amorcent la réponse immunitaire correspondante. Ces cellules expriment à leur surface et produisent des nombreuses molécules, notamment des récepteurs permettant la reconnaissance des pathogènes, mais permettant aussi l'adhésion, la phagocytose, la migration et l'activation d'autres cellules du système immunitaire (Wynn, Wong, 2017).

d. Activation des médiateurs de l'inflammation

Parmi les molécules exprimées à la surface des cellules et en intracellulaire, on retrouve les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) qui détectent les motifs moléculaires associées aux agents pathogènes (PAMPs) et les motifs moléculaires associées aux dégâts (DAMPs) (Figure 2). Cette reconnaissance entraîne une cascade de signalisation conduisant à la production de chimiokines, cytokines et autres mécanismes antimicrobiens. Dans le cas du sepsis, il y a libération de ces médiateurs de l'inflammation tels que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6),

l'interleukine- 8 (IL-8), l'interleukine-12 (IL-12), l'interleukine-18 (IL-18), l'interféron- γ (IFN- γ) et la protéine chimio-attractante monocyttaire 1 (MCP-1), puis dans un second temps, la production de protéines de la phase aigüe augmente. Ainsi les niveaux de protéine C-réactive (CRP), de procalcitonine (PCT), de sérum amyloïde A (SAA), de calprotectine, de proadrénomédulline et de pentraxine-3 (PXT-3) augmentent. D'autres molécules impliquées dans l'inflammation peuvent voir leur niveau fluctuer en cas de sepsis telles que la présepsine, le récepteur soluble de déclenchement exprimé sur la cellule myéloïde 1 (sTREM-1), le récepteur soluble de l'activateur de l'urokinase plasminogène (suPAR), le récepteur d'immunoglobuline CD64, et bien d'autres. (Ng 2004; Levy 2007; Wynn, Wong 2017; Kim, Choi 2020).

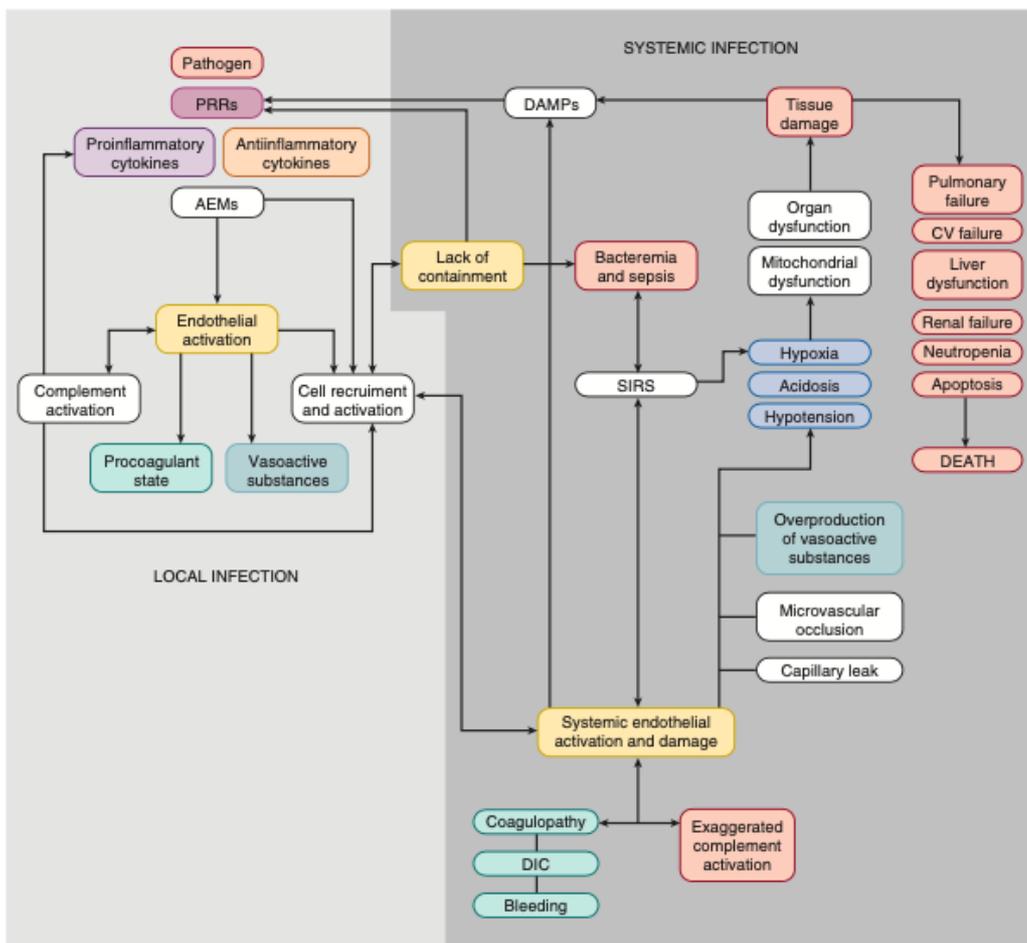


Figure 2 : Physiopathologie du sepsis néonatal et du choc septique. (AEMs : mécanismes effecteurs antimicrobiens ; CV, cardiovasculaire ; DAMPs : motifs moléculaires associés aux dégâts ; DIC : coagulation intravasculaire disséminée ; PRRs : Récepteurs de reconnaissance aux motifs moléculaires ; SIRS : syndrome de réponse inflammatoire systémique (d'après Wynn, Wong 2017))

4. Signes cliniques

Chez les bébés nouveau-nés, les signes cliniques associées au sepsis néonatal sont très divers et assez peu spécifiques. En effet, on peut retrouver une dysorexie, des atteintes respiratoires telle qu'une détresse respiratoire, une pneumonie, une apnée, mais également des atteintes du système circulatoire tel qu'un temps de remplissage capillaire anormal, une mauvaise irrigation des extrémités, des variations importantes de température (Sharma et al. 2018). En effet, le sepsis peut entraîner un choc hypovolémique, cardiogénique et distributif responsables des troubles hémodynamiques (Wynn, Wong 2017).

Une des premières conséquences possibles d'un sepsis est la mise en place d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) (Gollehon, 2019) pouvant conduire à un syndrome de défaillance multi-organique (MODs). Une autre conséquence possible est la méningite (Nizet, Klein 2011). Le sepsis peut également avoir un impact rénal et induire une insuffisance rénale aigüe (Mathur, Agarwal, Maria 2006). Enfin suite à un sepsis, le risque d'infection ultérieure est très augmenté (Wynn, Wong 2017).

Le décès prématuré arrive dans 3 à 50% des cas pour les sepsis précoces et de 2 à 40% des cas pour les tardifs. De plus, de manière générale, le sepsis précoce apparaît de manière aigüe et foudroyante, tandis que le sepsis tardif se met en place plus lentement et les manifestations cliniques sont plus tardives, assombrissant le pronostic si un diagnostic n'est pas posé précocement (Nizet, Klein 2011; Sharma et al. 2018).

5. Diagnostic

Le diagnostic précoce du sepsis chez un enfant est un enjeu majeur. En effet, un diagnostic et une prise en charge précoce permet de diminuer fortement le taux de mortalité (Al Jalbout et al. 2019). Cependant, en raison de sa définition et de sa physiopathologie complexe, il n'est pas aisé. Il n'existe à l'heure actuelle aucun test permettant un diagnostic de certitude, mais de nombreuses analyses de laboratoire permettent d'apporter des informations complémentaires à la clinique du patient, en faveur ou non d'un sepsis (Srinivasan, Harris 2012; Gollehon 2019).

Les différents examens complémentaires sont :

- les cultures bactériennes : cultures aérobie, anaérobie, hémocultures, urines, permettant de préciser la présence et la nature de l'infection.

- les numérations sanguines : les taux de neutrophiles et de thrombocytes permettent également d'apporter des informations supplémentaires mais sont peu sensibles et spécifiques. Le rapport neutrophiles immatures/neutrophiles totaux donne une meilleure sensibilité.

- les biomarqueurs moléculaires : il existe de nombreux biomarqueurs plus ou moins spécifiques des inflammations, infections et sepsis (Benitz 2010; Gollehon 2019).

Ces tests de laboratoire présentent des nombreuses limites, dont une précision limitée, avec une faible valeur prédictive positive concernant le sepsis néonatal (Benitz 2010; Bedford Russell, Kumar 2015; Wynn 2016) et leur utilité dépendra principalement de l'état clinique du nouveau-né (Chiesa et al. 2004; Kim, Choi 2020). Parmi les différents limites de ces examens complémentaires on retrouve : temps allongé pour obtenir le résultat, notamment pour la culture bactérienne (Biron, Ayala, Lomas-Neira 2015; Al Jalbout et al. 2019) ; volume d'échantillon trop important à prélever sur un nouveau-né ; résultat faux négatif dû à une bactériémie intermittente ou une faible densité bactérienne (Wynn, Wong 2017). De plus, les signes cliniques n'étant pas spécifiques et similaires lors d'infections virales ou bactériennes, la nécessité de trouver un ou des biomarqueurs fiables pour le diagnostic précoce du sepsis est primordiale (Chalupa et al. 2011).

III. Les biomarqueurs de l'inflammation et du sepsis

1. Définition

Un biomarqueur est défini comme un marqueur biologique qui permet par la mesure de son taux d'objectiver un processus ou un état biologique physiologique, pathologique ou d'origine iatrogène (Biomarkers Definitions Working Group. 2001). Il doit permettre un diagnostic, une décision de prise en charge thérapeutique, un suivi ou un pronostic (Atalla et al. 2018).

Parmi la centaine de molécules suggérées par divers auteurs, les plus étudiés chez les enfants nouveau-nés sont la protéine-C réactive, la procalcitonine, la présepsine, la forme soluble du récepteur activateur du plasminogène de l'urokinase (sUPAR), l'adrénomédulline (ADM) et pro-adrénomédulline (pro-ADM), le récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes (sTREM-1), le taux de neutrophiles et lymphocytes. Mais aussi diverses interleukines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-18), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interféron-gamma (IFN- γ), le CD14 soluble (sCD14), la protéine high mobility group box 1, le peptide cérébral natriurétique (BNP), le peptide natriurétique pro-auriculaire, le taux d'éosinophiles et la pro-vasopressine, le cortisol, la protéine de liaison à l'héparine (HBP),

microARN et bien d'autres (Chalupa et al. 2011 ; Biron et al. 2015 ; Atalla et al. 2018 ; Sharma et al. 2018 ; Gollehon 2019).

De nombreux biomarqueurs ont donc été étudiés pour le diagnostic précoce du sepsis mais en raison de sa définition complexe, des différences individuelles et des signes non spécifiques, il reste difficile de trouver le biomarqueur idéal répondant à tous les critères (Sharma et al. 2018; Al Jalbout et al. 2019; Kim, Choi 2020).

Afin d'obtenir de meilleurs résultats, Biron et al. proposent une normalisation des méthodes de dosage ainsi qu'une confrontation plus importante à la clinique du patient, et une collaboration étroite entre les différents acteurs que sont les chercheurs et les industries (Biron, Ayala, Lomas-Neira 2015).

Un bon biomarqueur du sepsis doit permettre d'avoir un diagnostic précis dans un temps réduit, tout en permettant de différencier une cause infectieuse d'une cause non infectieuse, et permettre un suivi de l'efficacité thérapeutique (Atalla et al. 2018).

2. Caractéristiques du biomarqueur idéal du sepsis

D'après l'étude de Sharma et al. un biomarqueur idéal du sepsis doit remplir tous les critères suivants (Sharma et al. 2018):

- Avoir un temps de demi-vie court avec une augmentation rapide au début du sepsis puis diminuer (Figure 2)
- Avoir une sensibilité, une spécificité, une valeur prédictive positive et négative élevées (respectivement $\approx 100\%$, $>85\%$, $\approx 100\%$ et $>85\%$) donc être fiable et précis
- Distinguer/Diagnostiquer l'étiologie du sepsis
- Ne pas être influencé par les comorbidités
- Permettre aux cliniciens d'initier un traitement
- Permettre aux cliniciens de savoir quand commencer et arrêter les antibiotiques
- Avoir une valeur standardisée
- Prédire avec précision la gravité du sepsis
- Pouvoir aider à établir un pronostic
- Avoir un test facilement réalisable en routine
- Avoir une méthode de mesure facilement disponible et rentable, avec un délai de résultat court
- Avoir des résultats similaires entre les différents laboratoires
- Nécessitant une faible quantité d'échantillon à analyser

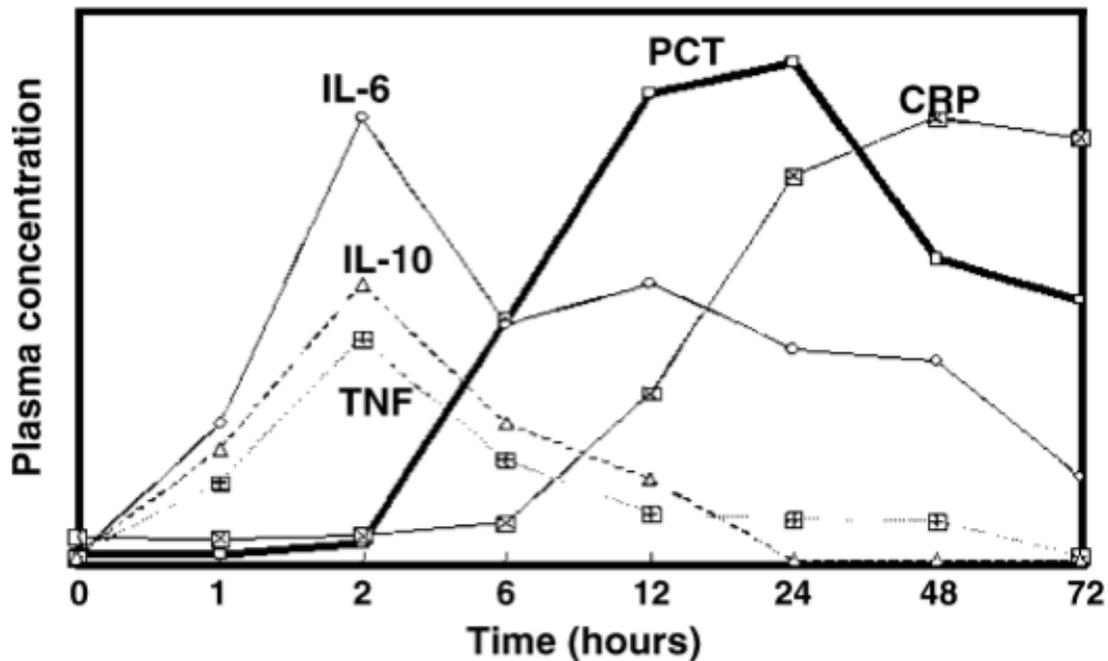


Figure 3 : Cinétique des marqueurs de l'inflammation après administration d'endotoxine à des volontaires sains. CRP : protéine C-réactive; IL : interleukine; PCT : procalcitonine; TNF : tumor necrosis factor. (D'après Reinhart et al. 2006)

3. Les biomarqueurs étudiés

a. Les protéines de la phase aigüe

i. Protéine C-Réactive

La protéine C-réactive (CRP) est une protéine pentamérique de la phase aigüe, non spécifique, associée à l'inflammation, l'infection et aux lésions tissulaires (Biron, Ayala, Lomas-Neira 2015; Sharma et al. 2018). La CRP est l'un des biomarqueurs les plus fréquemment utilisés car considéré comme l'un des plus sensibles et spécifiques pour diagnostiquer une infection bactérienne mais également le plus facilement disponible en routine, notamment dans le dépistage précoce du sepsis chez le nouveau-né (Atalla et al. 2018).

La production de CRP se fait au niveau des hépatocytes via la stimulation de certaines cytokines telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) principalement et son temps de demi-vie est de 18 à 24h (Kolb-Bachofen 1991; Jaye, Waites 1997; Sharma et al. 2018).

Les valeurs usuelles de protéine C-réactive chez le nouveau-né sain que l'on retrouve dans la littérature sont comprises entre 0 et 5 mg/mL, voir 10 mg/mL selon les auteurs (Gutteberg, Haneberg, Jørgensen 1984; Forest et al. 1986; Franz, Steinbach, et al. 1999; Franz, Kron, et al. 1999; Chiesa et al. 2003; 2004).

Sa concentration augmente dans les 4 à 6 heures suivant le début de l'infection et dépasse le seuil physiologique au bout de 24 heures (Figure 3). Le pic se situe entre 2 et 3 jours post-infection et le taux reste élevé jusqu'à résolution complète de l'inflammation (Gollehon 2019; Kim, Choi 2020). Dû à sa cinétique, la sensibilité et la spécificité de CRP varient donc respectivement de 30 et 83% au début de l'infection à 80 et 100% 24 à 48h après (Hedegaard, Wisborg, Hvas 2015; Sharma et al. 2018). Une méthode dite de mesure en série entre 24 et 48h permettant d'améliorer la sensibilité dans le diagnostic du sepsis néonatal a donc été proposée en pédiatrie humaine (Hofer et al. 2012). En effet, une valeur normale de CRP mesurée en série permet d'exclure un sepsis néonatal avec une valeur prédictive négative de 99% (Benitz 2010). Cette méthode permet également un suivi de la réponse thérapeutique.

Malgré son utilisation répandue, la CRP ne permet pas toujours de distinguer les infections bactériennes des infections virales et fongiques (Chalupa et al. 2011). Selon les recommandations, la concentration de CRP circulante ne doit pas être le seul indicateur du sepsis néonatal mais doit être couplé à l'évaluation clinique ou à d'autres biomarqueurs (Gollehon 2019).

ii. Procalcitonine

La procalcitonine (PCT), précurseur de la calcitonine, est une protéine de la phase aigüe. La production se fait dans les cellules C de la glande thyroïde sous l'influence des motifs moléculaires associées aux agents pathogènes (PAMP) et des motifs moléculaires associées aux dégâts (DAMP) et son temps de demi-vie est de 24 à 30h (Russwurm et al. 1999; Maruna, Nedelníková, Gürlich 2000; Sridharan, Chamberlain 2013; Sharma et al. 2018). La valeur usuelle de PCT chez les individus sains sont inférieures à 1 ng/mL (Sridharan, Chamberlain 2013). Dans les 2 à 4 heures suivant l'infection, la concentration en PCT commence à augmenter pour atteindre un maximum entre 6 et 8 heures (Figure 3). Le niveau est maintenu élevé dans les 24 heures suivantes (Sharma et al. 2018). Cette augmentation précoce et significative en fait un potentiel bon marqueur pour le diagnostic d'un sepsis. En effet, les concentrations sériques en PCT sont significativement plus élevés lors d'une infection bactérienne en comparaison avec une infection virale ou un patient exempt de toute infection

(Assicot et al. 1993 , Attala et al. 2018). De plus, la PCT peut être utilisée chez des enfants prématurés : l'âge gestationnel, lorsqu'il est supérieur à 32 semaines, n'a pas d'influence sur ses concentrations (Hahn et al. 2015). Contrairement à d'autres biomarqueurs tels que les chimiokines (IL6, TNF α), la procalcitonine conserve une concentration dans le sérum importante, ce qui facilite sa détection et son suivi (Chiesa et al. 1998; Whicher, Bienvenu, Monneret 2001). En revanche, les données disponibles dans la littérature sur les valeurs prédictives de la PCT dans le cadre du diagnostic du sepsis néonatal sont controversées. Une étude a montré que la PCT, avait une sensibilité de 92%, une spécificité de 97%, avec une valeur prédictive positive de 94% et une valeur prédictive négative de 96% (Chiesa et al. 1998). On retrouve dans une autre étude une valeur prédictive négative de 98% et une valeur prédictive positive de seulement 17% (Riedel et al. 2011). En effet, les concentrations en PCT au début de l'infection n'étant pas fiables, une mesure en série serait conseillée pour augmenter la précision du test (Sridharan, Chamberlain 2013; de Azevedo et al. 2015).

Actuellement, la PCT est considérée comme un des meilleurs biomarqueurs pour le diagnostic précoce du sepsis (Wacker et al. 2013). La PCT permet un diagnostic et un pronostic du sepsis plus précis que les autres biomarqueurs, avec une sensibilité et une spécificité plus élevée que notamment TN α , IL-2,6,8,10 (Atalla et al. 2018, Kim, Choi 2020). En revanche dans certains cas de sepsis, elle n'est pas détectable (en cas de prélèvement réalisé précocement) et *a contrario* dans certaines conditions et syndromes exempts de sepsis, une augmentation de sa concentration peut avoir lieu (Wacker et al. 2013).

La PCT, comme la CRP doit s'inscrire dans un tableau clinique et peut être utilisée en combinaison avec d'autres biomarqueurs complémentaires. Elle ne peut et ne doit être utilisée comme seul marqueur du sepsis (Gollehon 2019).

iii. Pentraxine-3

Le pentraxine-3 (PTX-3) est une glycoprotéine soluble de la phase aigüe appartenant aux pentraxines dites « longues ». Elle a un rôle de récepteur de reconnaissance des motifs moléculaires (Sharma et al. 2018). Elle est sécrétée par de nombreuses cellules telles que les monocytes, macrophages, et cellules endothéliales après stimulation par les lipopolysaccharides ou les cytokines inflammatoires. Elle permet entre autres, de contrôler l'activité du complément et la reconnaissance des pathogènes (Porte et al. 2019). La valeur seuil de PTX-3 retenue dans l'étude d'Hamed et al. pour le diagnostic du sepsis est de 5,0 ng/mL (Hamed et al. 2017).

En cas du sepsis néonatal, la valeur de ce biomarqueur augmente au-delà de 5,6 µg/mL (Fahmey, Mostafa 2019). La sensibilité de ce test varie de 92 à 98%, la spécificité varie de 64 à 79 %, la valeur prédictive négative varie de 89 à 94% et la valeur prédictive positive de 59 à 92% (Hamed et al. 2017). De plus, la concertation du PXT-3 est fortement corrélé au score SOFA.

Lee et al ont montré que le PXT-3 était également un marqueur pronostic intéressant pour le sepsis (Lee et al. 2015) mais qu'il pouvait être amélioré en utilisant conjointement d'autres biomarqueurs (Kim, Choi 2020).

iv. Sérum Amyloïde A

Le sérum amyloïde A (SAA) est une protéine de la phase aigüe produite principalement dans les hépatocytes, mais également dans les cellules endothéliales et les cellules immunitaires telles que les monocytes (Sharma et al. 2018). Sa production est régulée par les cytokines de l'inflammation comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α (Yuan et al. 2013). Elle joue un rôle notamment dans la production d'IL-8. La valeur seuil retenue par Arnon et al. est de 10 µg/mL (Arnon et al. 2005)

La concentration de SAA augmente rapidement lors du sepsis néonatal puis diminue progressivement, ce qui en fait un biomarqueur intéressant pour le diagnostic précoce. Ainsi pour le diagnostic du sepsis, d'après les études d'Arnon et al. la sensibilité varie de 95 à 100%, la spécificité est de 95%, la valeur prédictive négative varie de 97 à 100% et la valeur prédictive positive est de 85%. Le SSA est un biomarqueur plus précoce et avec une meilleure précision diagnostique que la CRP (Arnon et al. 2004; 2005; 2007).

v. Protéine de liaison aux lipopolysaccharides

La protéine de liaison aux lipopolysaccharides (LBP) est une protéine soluble produite par les hépatocytes et myocytes et jouant notamment un rôle dans la reconnaissance d'endotoxine lors d'une infection par des bactéries (Behrendt et al. 2004). La valeur seuil retenue par Berner et al est de 7,8 g/mL chez le nouveau-né.

L'augmentation de la LBP a lieu dans les 6 à 8 heures suivant l'infection et persiste plus de 24 heures (Figure3) (Berner et al. 2002; Sharma et al. 2018). Pavcnik-Arnol et al. ont montré que pour le diagnostic du sepsis chez les nouveau-nés de moins de 48h de vie, la LBP valait la CRP mais lorsque le nouveau-né a plus de 48h de vie, alors c'est un biomarqueur plus précis que la CRP et similaire à la PCT (Pavcnik-Arnol, Hojker, Derganc 2007).

La LBP est donc un biomarqueur précoce du sepsis néonatal qui, selon l'âge du patient, peut-être plus efficace et précis que la PCT ou la CRP.

b. Les cytokines et chimiokines

i. Interleukine-6

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine de la phase aigüe produite par les lymphocytes, les monocytes, et d'autres cellules telles que les cellules endothéliales et fibroblastes. Une fois produite, l'IL-6 induit la production d'autres protéines de la phase aigüe, notamment au niveau des hépatocytes, stimulant la production de la CRP (Kishimoto 1989; Hodge et al. 2004).

La valeur maximale usuelle d'IL-6 pour les individus sains est de 130 pg/mL (Raynor et al. 2012). Sa concentration augmente très rapidement dès le début de l'infection, bien avant l'augmentation de CRP, mais son temps de demi-vie est court, environ 6 heures. Son niveau se normalise dans les 24 heures suivant l'initiation du traitement thérapeutique (Küster et al. 1998; Raynor et al. 2012; Sharma et al. 2018). Comme dit précédemment, l'utilisation de l'IL-6 comme biomarqueur très précoce du sepsis présente une sensibilité et une valeur prédictive négative supérieures à celles de la CRP (Berner et al. 1998; Ng, Lam 2006).

L'IL-6 est un biomarqueur intéressant pour la détection précoce du sepsis néonatal, mais elle présente plusieurs limites notamment lors d'inflammation non septiques tels qu'une chirurgie ou infection virale (Berner et al. 1998; Biron, Ayala, Lomas-Neira 2015). De plus, une influence de l'âge gestationnel sur la concentration d'IL-6 au cours des premières heures de vie a été démontré (Gollehon 2019). Son utilisation en combinaison avec d'autres biomarqueurs tels que la CRP ou le TNF- α permettrait d'augmenter sa sensibilité et sa valeur prédictive négative pour le diagnostic du sepsis néonatal précoce (Hou et al. 2015).

ii. Interleukine-8

L'interleukine 8 (IL-8) est une cytokine pro-inflammatoire de la phase aigüe, produite par les monocytes, les macrophages ainsi que les cellules endothéliales (Reinsberg et al. 2000; Franz et al. 2004; Sharma et al. 2018).

La valeur d'IL-8 maximale pour un individu sain est fixée à 60 pg/mL (Boskabadi et al. 2013). La concentration en IL-8 augmente rapidement entre 2 et 4 heures après le début de l'infection, son temps de demi-vie est supérieur à l'IL-6 (Resch, Gusenleitner, Müller 2003; Bishara 2012). Son utilisation comme biomarqueur dans le diagnostic du sepsis néonatal est controversé : plusieurs études montrent une sensibilité de 78 à 91% et une spécificité de 76 à

100% (Ng, Lam 2006 ; Mishra et al. 2006 ; Bishara 2012 Zhou et al. 2015), en revanche, une autre montre une sensibilité de 95% mais une spécificité de 10% (Boskabadi et al. 2013).

Au final, et comme pour l'IL-6, c'est un biomarqueur intéressant pour la détection précoce du sepsis néonatal dans la mesure où sa concentration augmente bien avant celles des autres biomarqueurs déjà vus. Les limites d'utilisation de l'IL-8 dans ce contexte reste sa diminution rapide dès le début du traitement (Mehr, Doyle 2000). Associé à ces biomarqueurs, tels que la CRP, elle permettrait d'avoir une sensibilité et une spécificité augmentée (Ng, Lam 2006).

iii. Facteur de nécrose tumorale alpha

Le Facteur de Nécrose Tumorale alpha (TNF- α) est une chimiokine pro-inflammatoire de la phase aigüe. Elle est produite au niveau des phagocytes activés et son temps de demi-vie est court (Mishra et al. 2006; Sharma et al. 2018). La valeur limite de la concentration en TNF- α chez les patients sains est de 12 pg/mL (Silveira, Procianoy 1999). De plus, la concentration de ce biomarqueurs ne dépend pas de l'âge gestationnel du nouveau-né (Ng, Lam 2006).

La concentration de TNF- α est supérieure chez les nouveau-nés présentant un sepsis (Ng et al. 1997; Berner et al. 1998). En effet, une augmentation de sa concentration est observée dans les 2 à 4 heures post-infection. Une méta-analyse a mis en évidence une sensibilité de 66% et une spécificité de 76% du TNF- α dans le diagnostic du sepsis néonatal précoce contre une sensibilité de 68% et une spécificité de 89% pour le sepsis néonatal tardif (Lv et al. 2014).

Toutefois, selon le type de test utilisé, il est possible de retrouver des écarts importants entre les résultats (Whiteside 1994; Chiesa et al. 2004). Afin l'association du TNF- α avec l'IL-6 permet d'augmenter sa sensibilité et sa spécificité pour le diagnostic du sepsis néonatal, avec des valeurs allant respectivement de 60 à 98,5% selon les auteurs et une spécificité de 100% (Silveira, Procianoy 1999; de Bont et al. 1993).

c. Les marqueurs cellulaires

i. CD11 β

Le CD11 β est une sous-unité de la protéine d'adhésions β 2-intégrine, exprimé à la surface des neutrophiles inactifs. Elle joue notamment un rôle dans l'adhésions cellulaire, et la phagocytose (Sharma et al. 2018).

La concentration de CD11 β augmente dans les 5 minutes suivant le début de l'infection, donc ayant un intérêt pour le diagnostic précoce du sepsis (Lam, Ng 2007). La valeur seuil retenue pour ce biomarqueur est de 150 UFR (Unité de Fluorescence Relative) (Nupponen et

al. 2001). Des études ont démontré que pour le diagnostic précoce du sepsis néonatal, CD11 β avait une sensibilité variant de 75 à 100%, une spécificité de 100% une valeur prédictive positive de 99% et une valeur prédictive négative variant de 86 à de 100% (Weirich et al. 1998; Nupponen et al. 2001; Adib et al. 2007).

Le CD11 β semble donc être un très bon biomarqueur pour le diagnostic précoce du sepsis néonatales mais ses principales limites sont un manque d'équipement dans la pratique courante et un coût élevé (Sharma et al. 2018).

ii. CD14 et présepsine

Le CD14 est une glycoprotéine membranaire, retrouvée à la surface des monocytes et macrophages. Lorsqu'un agent infectieux entre en contact avec les cellules de l'immunité, une partie du CD14 est clivée et sécrétée, produisant ainsi la présepsine (PSEP) ou CD14 soluble (sCD14) (Kim, Choi 2020).

La concentration de présepsine augmente de manière significative et plus précocement que ceux de l'IL-6 et de la PCT lors d'une infection, ce qui en fait un bon marqueur précoce du sepsis (Kweon et al. 2014; Romualdo et al. 2014). La valeur seuil retenue est de 305 à 672 ng/L (van Maldeghem, Nusman, Visser 2019). Une méta-analyse a mis en évidence une sensibilité variant de 62,2% à 94,7%, une spécificité variant de 53,7 à 85,7%, une valeur prédictive négative variant de 63% à 95% et une valeur prédictive positive variant de 31,3% à 90% (Yang et al. 2018).

Toutefois, une autre étude a mis en évidence que la présepsine était un meilleur biomarqueur que la PCT concernant le pronostic et le suivi thérapeutique (Yu et al. 2017).

Les études concernant la présepsine donnent des résultats assez vastes concernant sa valeur diagnostique. En revanche elle reste un biomarqueur intéressant pour la valeur pronostique.

iii. CD163 soluble

Le CD163 soluble est un récepteur exprimé à la surface des cellules immunitaires telles que les macrophages (Sharma et al. 2018). Il joue un rôle, notamment dans la réduction des dommages oxydatifs. Il fixe les bactéries et induit une production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , 6, 10 et le TNF- α (Fabriek, Dijkstra, van den Berg 2005). La valeur seuil retenue par Prashant et al. est de 896,78 ng/mL (Prashant et al. 2013).

D'après l'étude de Prashant et al. pour le diagnostic de l'infection bactérienne, CD163 soluble a une sensibilité de 100% et une spécificité de 88% (Prashant et al. 2013).

C'est donc un biomarqueur intéressant pour la détection précoce du sepsis néonatale puisque sa concentration augmente avant ceux des autres biomarqueurs et possède une sensibilité et une spécificité importante.

d. Les récepteurs

i. Forme soluble du récepteur activateur du plasminogène de l'urokinase : suPAR

La forme soluble du récepteur activateur du plasminogène de l'urokinase (suPAR) est une molécule dont la forme non-soluble est exprimée à la surface des cellules immunitaires et endothéliales telles que les neutrophiles, monocytes et macrophages (Donadello et al. 2012). Elle joue notamment un rôle dans l'adhésion, la prolifération cellulaire mais aussi l'angiogénèse et est libérée lors d'une inflammation (Khater et al. 2016; Sharma et al. 2018). Des études ont mis en évidence que la valeur seuil était comprise entre 4,37 et 5,5 ng/mL (Donadello et al. 2012; Khater et al. 2016).

Le taux de suPAR chez les nouveau-nés présentant un sepsis est significativement plus important que chez des nouveau-nés sains (Siahanidou et al. 2014) . Les études de Donadello et al. ainsi que de Kather et al. ont montré, pour le diagnostic du sepsis, une sensibilité variant de 75 et 97,5% et une spécificité variant de 72 à 90%, une valeur prédictive positive de 80% et une valeur prédictive négative de 100% (Donadello et al. 2012; Khater et al. 2016).

Le suPAR paraît être un bon biomarqueur pour le diagnostic du sepsis sans être meilleur que la CRP ou la procalcitonine mais combinées à d'autres biomarqueurs, elle pourrait apporter un plus (Donadello et al. 2012).

Le suPAR est également utile pour l'évaluation pronostique et le suivi thérapeutique du sepsis, associée notamment à d'autres biomarqueurs (Khater et al. 2016).

ii. Récepteur de déclenchement exprimé sur les cellules myéloïdes : sTREM-1

La forme soluble du récepteur de déclenchement de type-1 exprimé sur les cellules myéloïdes (sTREM-1) est une molécule retrouvée à la surface des cellules inflammatoires telles que les monocytes et neutrophiles. Elle joue un rôle notamment dans la production de cytokines

pro-inflammatoires (Blebarski et al. 2003). Adly et al. ont retenu une valeur seuil de 310 pg/mL (Adly et al. 2014).

Le taux de sTREM-1 augmente de manière significative lors du sepsis (Saldir et al. 2015), et son utilité en tant que biomarqueur dans le diagnostic du sepsis montre une sensibilité et une spécificité de 100% (Adly et al. 2014)

Différentes études ont montré l'intérêt d'utiliser le sTREM-1 comme biomarqueur dans le diagnostic du sepsis (Kim, Choi 2020) mais selon Pontrelli et al. les données concernant les nouveau-nés sont pour l'instant insuffisantes pour en faire un biomarqueur fiable dans le diagnostic du sepsis néonatal (Pontrelli et al. 2017).

e. Les biomarqueurs associés aux modifications vasculaires

i. Adrénomédulline et pro-adrénomédulline

L'adrénomédulline (ADM) est une protéine synthétisée principalement dans les cellules endothéliales et les muscles lisses. Elle joue un rôle important dans la vasodilatation lors d'une inflammation ou d'un sepsis (Kim, Choi 2020).

Une fois sécrétée, son temps de demi-vie est très court, il est donc difficile de la détecter c'est pourquoi il est préférable d'utiliser la pro-adrénomédulline qui est plus stable et dont les niveaux sont corrélés à ceux de l'adrénomédulline (Viaggi et al. 2018; Önal et al. 2018).

La pro-adrénomédulline a d'abord été étudiée en tant que biomarqueur pronostique (Christ-Crain et al. 2008). Dans l'étude de Viaggi et al. la mesure de la pro-adrénomédulline a permis de prédire 24h avant le dysfonctionnement des organes (Viaggi et al. 2018) ce qui pourrait avoir un intérêt dans le diagnostic précoce du sepsis.

L'intérêt principal de la pro-adrénomédulline est une utilisation en association avec d'autres biomarqueurs diagnostic pour en augmenter la précision.

ii. Angiopoïétine

Les angiopoïétines (AGP) sont des facteurs de croissance produits par les cellules endothéliales notamment dans un contexte d'inflammation (Kim, Choi 2020). L'angiopoïétine 1 et 2 ont une fonction anti-inflammatoire. Il a été remarqué que l'angiopoïétine 2 pouvait antagoniser l'angiopoïétine 1 dans un processus de sepsis (Parikh 2017; Leligdowicz et al. 2018).

L'augmentation de la concentration d'angiopoïétine 2 et du ratio d'angiopoïétine 2 sur d'angiopoïétine 1 a été décrit lors du sepsis, et pourrait donc servir de biomarqueur (Seol et al. 2020).

Le rapport angiopoïétine 2 sur d'angiopoïétine 1 a également été étudié par Fang et al. comme biomarqueur pronostic du sepsis (Fang et al. 2015). Mankhambo et al. ont ainsi démontré qu'une diminution de la concentration d'angiopoïétine 1 et une augmentation d'angiopoïétine 2 était de mauvais pronostic concernant le sepsis néonatal (Mankhambo et al. 2010). De plus, Orfanos et al. ont montré que la concentration d'angiopoïétine 2 était étroitement lié au taux de TNF- α et d'IL-6 (Orfanos et al. 2007).

Les premières études sur les angiopoïétines semblent prometteuses mais nécessitent de plus importantes études afin de pouvoir les utiliser en tant que biomarqueur fiable du sepsis (Sharma et al. 2018; Kim, Choi 2020).

f. Autres biomarqueurs

i. Formule leucocytaire

Les leucocytes sont des cellules du système immunitaire participant dans la lutte contre les infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires. Sous le terme leucocytes on retrouve les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les lymphocytes et les monocytes. Elles sont produites dans la moelle osseuse (Blumenreich 1990).

Lors d'une infection, la concentration des différents leucocytes varient en fonction de l'agent pathogène. La numération leucocytaire a été utilisée comme biomarqueur dans le diagnostic du sepsis. La valeur limite de 5000 à 7500 leucocytes/mm³, autrement dit, la leucopénie a montré une sensibilité de 29% et une spécificité de 91% pour le diagnostic du sepsis néonatal (Gerdes 1991). En revanche, l'âge gestationnel est à prendre en compte lors de son utilisation comme outils diagnostique puisqu'il a été démontré que cette valeur diminuée avec la prématurité du nourrisson (Schmutz et al. 2008; Hornik et al. 2012). Une autre étude a montré que la valeur usuelle chez un nouveau-né sain du rapport neutrophiles immatures sur neutrophiles totaux était de 0,16 durant les 24 heures post-naissance puis diminuait. La valeur de 0,2 a été utilisé comme valeur maximale de référence pour exclure un sepsis (Manroe et al. 1979).

Deux paramètres permettent le diagnostic du sepsis néonatal de manière un peu plus fiable : le nombre absolu de neutrophile et le rapport de neutrophiles immatures sur neutrophiles totaux. En effet, la valeur prédictive négative des deux paramètres était suffisante pour exclure

un sepsis néonatal (Polin, Committee on Fetus and Newborn 2012). Une faible numération leucocytaire, un nombre absolu de neutrophile bas et un rapport neutrophile immature sur neutrophile totaux élevé ont une spécificité et une valeur prédictive élevées mais une sensibilité plutôt faible (Hornik et al. 2012). Utilisé en association avec l'hémoculture, deux rapports neutrophiles immatures sur neutrophiles totaux ont une valeur prédictive négative de 100% (Murphy, Weiner 2012).

Ces paramètres présentent des limites importantes dans le diagnostic du sepsis néonatal et la variation interindividuelle reste à prendre en compte (Chiesa et al. 2004).

ii. Lactate

Le lactate est une molécule intervenant dans le métabolisme du glucose. Elle est produite dans la plupart des tissus, mais spécifiquement dans les cellules musculaires, sous forme de deux isomères avec une majorité de L-lactate. La valeur seuil de lactate varie selon les études mais l'on retrouve une valeur entre 2 et 2,5mmol/L (Kruse, Grunnet, Barfod 2011).

La concentration de lactate augmente de manière significative dans un contexte de sepsis mais également de tout stress physiologique entraînant une hypoperfusion tissulaire tel qu'un traumatisme, choc, ischémie, tumeur, et bien d'autres (Andersen et al. 2013; Al Jalbout et al. 2019). Certains auteurs ont mis en évidence l'utilité de la mesure des lactates dans le pronostic (Shapiro et al. 2005) mais également dans le suivi thérapeutique en utilisant des mesures en séries (Andersen et al. 2013).

La mesure de la concentration de lactate n'est donc pas un biomarqueur optimal pour le diagnostic du sepsis mais il reste néanmoins intéressant de l'utiliser en série chez les patients dont on suspecte un sepsis pour suivre l'évolution du traitement (Biron, Ayala, Lomas-Neira 2015).

iii. Calprotectine

La calprotectine est une protéine de liaison produite par différentes cellules, notamment les cellules myéloïdes. Elle est libérée après activation par des récepteurs membranaires de l'inflammation (Kim, Choi 2020). Elle joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la régulation du calcium, la migration cellulaire, etc. La valeur usuelle de calprotectine chez un adulte sain est inférieure à 1µg/mL (Shabani et al. 2018)

Le taux de calprotectine augmente lorsqu'une maladie inflammatoire ou qu'une infection bactérienne se fait en place ce qui pourrait en faire un biomarqueur diagnostic

intéressant notamment pour le sepsis (Larsson et al. 2020). Une étude de Gao et al. a mis en évidence une sensibilité de 83,1% et une spécificité de 88,5% pour le diagnostic du sepsis avec ce biomarqueur (Gao et al. 2015). Une autre étude a également montré que l'utilisation de calprotectine pour le diagnostic du sepsis était préférable à la procalcitonine et à la protéine C-réactive car elle donnait de meilleurs résultats (Bartáková et al. 2019).

La calprotectine reste donc un biomarqueur potentiellement intéressant pour le diagnostic précoce du sepsis mais peu d'études ont été réalisées pour le moment.

iv. Autres biomarqueurs existants

De nombreux autres biomarqueurs ont été étudiés pour le diagnostic du sepsis néonatal et ne seront que cités ici. On retrouve donc l'interleukine-1 β , l'interleukine-4, 5, 10, l'interféron- γ , les micro-arn, les endocans, la protéine inhibitrice inter-alpha, la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), l'E-sélectine, la L-sélectine, la fibronectine, l'haptoglobine, etc (Pierrakos, Vincent 2010; Sharma et al. 2018).

Il n'existe donc pas de biomarqueur idéal pour le diagnostic du sepsis néonatal mais différentes combinaisons entre biomarqueurs permettent de se rapprocher du biomarqueur idéal.

IV. Conclusion sur la partie bibliographiques et objectifs de l'étude

1. Conclusion

<i>Biomarqueurs</i>	Type de prélèvement	Utilisable en clinique	Valeur seuil	Pic de concentration observée après (h)	Spécificité (%)	Sensibilité (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>CRP</i>	Sérum	Oui	5-10 mg/mL	4 à 6	83 à 100	30 à 80	5 à 6	99
<i>PCT</i>	Sérum	Oui	1 ng/mL	6 à 8	97	92	17 à 94	96 à 98
<i>PTX-3</i>	Sérum	Oui	5,6 µg/mL	-	64 à 79	92 à 98	59 – 92	89 – 94
<i>SAA</i>	Sérum	Oui	10 µg/mL	2 - 4	95	95 à 100	85	97 à 100
<i>LBP</i>	Sérum	Oui	7,8 g/mL	6 - 8	-	-	-	-
<i>IL-6</i>	Sérum	Oui	130 pg/mL	2 – 4	95	72	58	93
<i>IL-8</i>	Sérum	Oui	60 pg/mL	2 - 4	10 à 100	78 à 95	55	91
<i>TNF-α</i>	Sérum	Oui	12 pg/mL	2 – 4	76 - 89	66 - 68	-	-
<i>CD11β</i>	-	Non	150 UFR	0 - 1	100	75 à 100	99	86 à 100
<i>sCD14</i>	-	Non	305 à 672 ng/L	0 - 2	53 à 86	62 à 95	31 à 90	63 à 95
<i>sCD163</i>	-	Non	896,78 ng/mL	0 - 2	88	100	-	-
<i>suPAR</i>	-	Non	4,37 et 5,5 ng/mL	0 - 1	72 à 90	75 à 98	80	100
<i>sTREM-1</i>	-	Non	310 pg/m	0 – 1	100	100	-	-
<i>Leucocytes (Lc)</i>	Sang	Oui	50 à 75 10 ³ Lc/mm ³	-	91	29	-	-
<i>Lactates</i>	Sang	Oui	2 et 2,5 mmol/L					
<i>Calprotectine</i>	Sang	Oui	1 µg/mL		88	83		

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques des différents biomarqueurs du sepsis chez l'enfant nouveau né

Cette étude bibliographique a permis d'identifier que la PCT et la CRP sont des bons marqueurs du sepsis chez les enfants nouveau-nés, avec d'excellentes valeurs diagnostiques et une accessibilité pour un praticien pour le deuxième.

2. Objectifs

Malgré le fait que le sepsis néonatal soit un problème majeur en élevage canin, aucun des marqueurs cités n'a été évalué dans le cadre du diagnostic du sepsis chez le chiot nouveau-né. L'objectif de notre étude est donc de :

- Établir des valeurs de références des différents biomarqueurs de santé chez les chiots nouveau-nés sur une population saine.
- Évaluer l'intérêt de ces différents biomarqueurs dans le diagnostic du sepsis chez le chiot nouveau-né, en comparant les valeurs obtenues entre le groupe de chiots sains et le groupe de chiots morts post-prélèvement dû à une infection bactérienne.

ETUDE EXPÉRIMENTALE

En absence de définition officielle pour le chiot nouveau-né, par la suite de cette étude l'utilisation du terme de sepsis fera référence par abus de langage à la présence d'une infection bactérienne généralisée et conduisant à la mort du l'animal.

I. Matériels et méthodes

1. Les animaux

L'ensemble des animaux faisant parti de cette étude proviennent du même élevage canin avec les mêmes conditions d'élevage pour l'ensemble de la population étudié. Tous les chiots nés dans cet élevage ont été suivis régulièrement en effectuant des prises de sang, des prises de poids et des examens cliniques au 2ème, 7ème, 14ème et 21ème jour de vie en 2012 et 2013. Les examens cliniques réalisés uniquement en 2013 ont permis de scorer les chiots sur 16 points. Huit paramètres ont été évalués et notés de 0 à 2 (2 signifiant qu'aucune anomalie n'a été détectée) : l'auscultation du thorax, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, la palpation abdominale, la présence d'écoulement nasal, la présence d'écoulement oculaire, la présence de diarrhée. La somme des notes donne donc un score allant de 0 (mauvais état de santé) à 16 (parfait état de santé).

En fonction de la race, les chiots ont été classés en 3 formats distincts :

- L : correspondant aux chiens de grande taille dont le poids adulte est supérieur à 25kg. Ce format comprend donc les races suivantes : Berger Allemand, Boxer, Golden Retriever et Labrador Retriever.

- S : correspondant aux chiens de petite taille dont le poids adulte est inférieur à 15kg. Ce format inclut donc les races suivantes : Bichon Frisé, Bichon Maltais, Caniche, Lhasa Apso, Shih-Tzu, White Highland White Terrier (Westie).

- M : correspondant aux chiens de taille moyenne dont le poids adulte est compris entre 15 et 25kg. Ce format inclue une seule race : Cocker.

Au final, dans notre étude ont été inclus 56 chiots sains qui ont survécus jusqu'à 21ème jour (« Témoins »), et 44 chiots qui sont décédés entre 0 et 21 jours (« Décédés »), issus de 56 portées différentes et nés de 56 chiennes différentes, de 14 races différentes.

a. Groupe « témoins »

Les chiots témoins ont été sélectionnés sur l'année 2013 uniquement, de manière aléatoire au sein des portées ne comptant aucun décès dans les vingt et un premiers jours. Au total les prélèvements sanguins de 73 chiots ont donc été sélectionnés mais pour diverses raisons comme la quantité de sérum disponible, la perte d'échantillon lors des différentes analyses ou le manque d'un résultat, l'étude se portera uniquement sur 56 chiots (Figure 4).

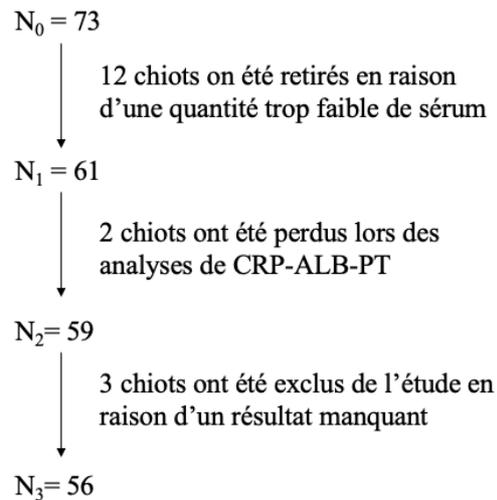


Figure 4 : diagramme de sélection des chiots témoins

b. Groupe « décédés »

Les chiots décédés entre 0 et 21 jours ont été autopsiés dans les 8 heures suivant la mort, 12 organes ont été prélevés pour les analyses histopathologiques et une bactériologie sur prélèvement de rate a été effectué. Uniquement les chiots avec une infection bactérienne confirmée en examen post-mortem ou les chiots avec une culture pure de la rate ont été inclus. Au total, 72 chiots sont décédés avec des signes d'infection bactérienne en 2012 et 2013 dans cette étude, mais pour 26 d'entre eux, aucun échantillon de sérum n'était disponible (décès avant J2), et sur les 46 restants, 2 ont été mal identifiés et 3 contenaient assez de sérum seulement pour l'analyse de la procalcitonine. Au final, les prélèvements étaient disponibles pour 44 chiots morts (Figure 5).

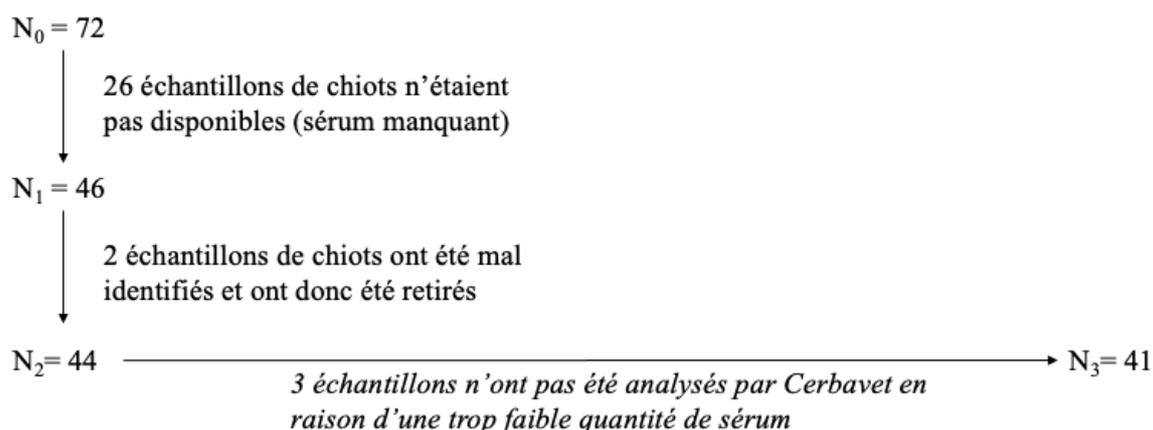


Figure 5 : diagramme de sélection des chiots décédés

2. Prélèvements sanguins et conservation des échantillons

Des prélèvements sanguins (environ 1ml/chiot) ont été réalisés à la veine jugulaire sur tous les chiots vivants à J2, J7, J1 et J21. Environ 30 minutes après les prises de sang sur des tubes secs, les prélèvements ont été centrifugés à 1000 x g pendant 30 minutes et le sérum congelé à -20°C jusqu'à analyse. Ces échantillons ont été utilisés (et donc décongelés) une seule fois auparavant (en 2013 dans l'étude de GONNIER et ROSSIG). Entre 50 et 250 µl de sérum a été disponible pour l'ensemble des analyses.

Pour réaliser des analyses dans le cadre de cette thèse, tous les échantillons ont été décongelés et aliquotés en deux échantillons distincts, puis recongelés à -20°C afin d'avoir un répliquât pour réaliser des analyses dans deux laboratoires en parallèle.

3. Dosage de la procalcitonine

Le dosage de la concentration de procalcitonine sérique a été effectué à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse à l'aide d'un Kit ELISA spécifique pour l'espèce canine (Procalcitonin Canine ELISA, BioVendor®, Brno, Czech Republic) et validé par Battaglia et al. (Battaglia et al. 2020). Le principe de la méthode sera présenté ci-dessous (Figure 6). Les dosages ont été réalisés en duplicata pour tous les échantillons lors que la quantité de sérum disponible le permettait afin de vérifier la fiabilité des valeurs obtenues sur la même plaque ELISA et calculer la moyenne des deux valeurs.

a. Principe

La technique ELISA ou Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay est un test immunologique permettant de détecter et/ou doser la présence de protéines dans un échantillon. Elle est basée sur la réaction spécifique d'antigène-anticorps. Son avantage principal est sa grande sensibilité et spécificité. Il existe différents test ELISA dits « directs », « indirects », « en sandwich » ou « compétitif »

Dans notre étude, nous avons réalisé la méthode « en sandwich ». Les 96 puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps spécifique de l'antigène étudié (ici la procalcitonine canine). L'échantillon à analyser est alors déposé dans les puits, puis après lavage un deuxième anticorps couplé avec une enzyme de détection est ajouté, fixant les antigènes présents. Enfin une réaction colorimétrique est initiée après élimination des anticorps non fixé, permettant de mesurer la quantité d'antigènes fixés par spectrophotométrie.

b. Protocole

- Préparation du standard et des échantillons et dépôts

Le standard est constitué de procalcitonine canine dont la concentration est connue. Les dilutions sont réalisées en cascade en suivant le protocole dans le tableau 5.

Solution	Volume de standard	Volume de tampon de dilution (µL)	Concentration (pg/mL)
S0	Stock	-	800
S1	250 µL de S0	250	400
S2	250 µL de S1	250	200
S3	250 µL de S2	250	100
S4	250 µL de S3	250	50
S5	250 µL de S4	250	25
S6	250 µL de S5	250	12,5

Tableau 5 : Dilutions de la procalcitonine utilisées pour la préparation du standard dans le cadre du dosage de cette dernière par le test ELISA

Les échantillons analysés par ELISA ont été décongelé et homogénéisés. Le sérum est dilué dans le tampon de dilution par un facteur 5 (en fonction de la quantité disponible de sérum ;) ou 10 si la concentration était trop importante pour être lue, en suivant le protocole présenté dans le Tableau 6:

Volume de sérum (μL)	Volume de tampon de dilution (μL)	Dilution finale
45	180	5
40	140	
25	100	
22,5	50	
22	199	10

Tableau 6 : Dilutions des échantillons en fonction du volume disponible dans le cadre du dosage de la procalcitonine sanguine par le test ELISA

Un volume de 100 μL des standards et des échantillons dilués sont déposés dans les puits et sont incubés 1 heure à température ambiante (25°C) sur un agitateur orbital de microplaques à 300 rotations par minutes (rpm)

- Lavages

La plaque a été vidée et lavée 3 fois à l'aide de 350 μL de solution de lavage par puits.

- Anticorps biotinylés

Un volume de 100 μL d'une solution d'anticorps biotinylés a été déposée dans chaque puit. La plaque est ensuite mise à incubée 1 heure à température ambiante (25°C) sur un agitateur orbital de microplaques à 300 rpm.

- Lavages

La plaque a été vidée et lavée 3 fois à l'aide de 350 μL de solution de lavage par puits.

- Conjugué de streptavidine-HRP (peroxydase de raifort)

Un volume de 100 μL d'une solution de conjugué de streptavidine-HRP a été déposé dans chacun des puits. La plaque a été mise en incubation 30 minutes à température ambiante (25°C) sur un agitateur orbital de microplaques à 300 rpm.

- Lavages

La plaque a été vidée et lavée 3 fois à l'aide de 350 μL de solution de lavage par puits.

- Substrat

Un volume de 100µL de solution substrat a été déposé dans chaque puit. La plaque a été incubée 15 minutes à température ambiante (25°C) à l'abri de la lumière.

- Arrêt de la réaction

Un volume de 100µL de solution stop a été déposé dans chacun des puits.

- Lecture

La lecture de l'absorbance a été réalisée immédiatement après arrêt de la réaction, à l'aide d'un spectrophotomètre avec laser à une longueur d'onde de 450 nm.

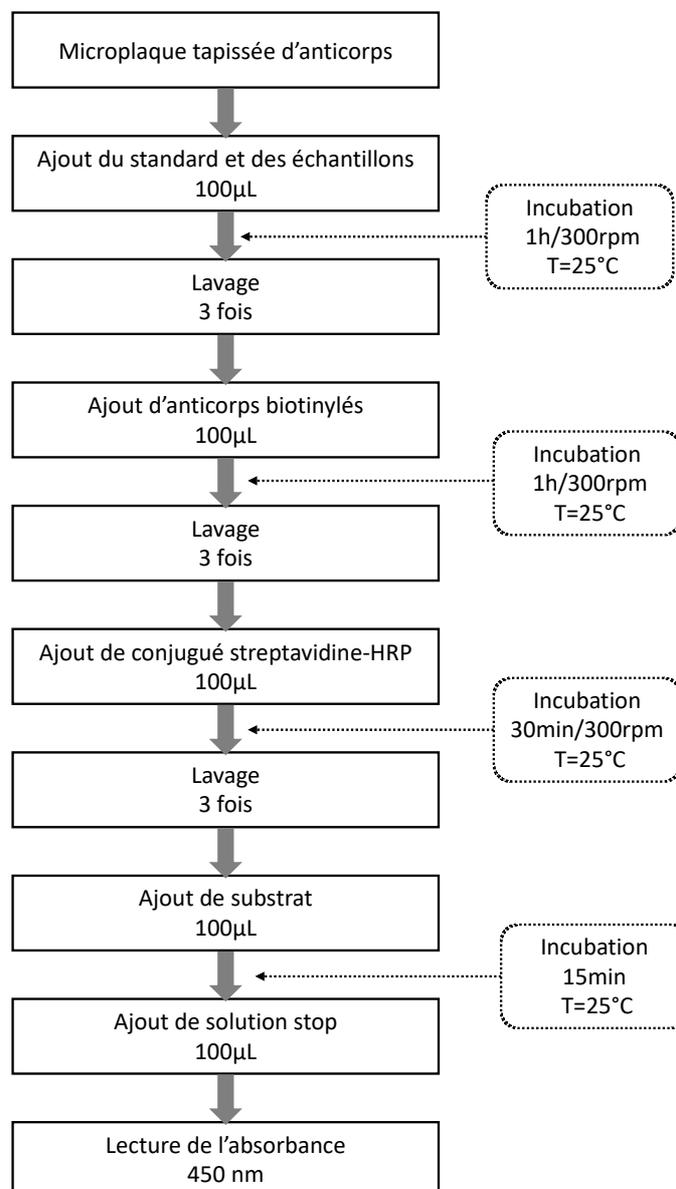


Figure 6 : Diagramme du protocole expérimental réalisé

Les dosages ont été réalisés sur une semaine, et ont inclus différentes plaques. Les coefficients de variation intra-plaque et inter-plaques sont respectivement de 3,7 – 4,6% et 6,7 – 7,5%.

4. Dosage de l'albumine, protéines totales et protéine C-réactive sérique

Le dosage de l'albumine sérique, les protéines totales sériques et la protéine C-réactive sérique a été effectué par le laboratoire d'analyse médicale Cerbavet® (91300 Massy, France).

La CRP et les protéines totales ont été dosées par un automate Dimensions (Siemens®, Munich, Allemagne) l'albumine a été dosée par colorimétrie au vert de bromocresol dans un autre automate (Randox®, Londres, Royaume Uni).

5. Dosage des immunoglobulines

Les immunoglobulines G (IgG) ont été dosées dans le cadre d'une étude ultérieure sur l'étude de la qualité immunologique et énergétique du colostrum de la chienne et l'impact sur la santé du chiot (Aggouni 2016). Le protocole utilisé est celui d'un test ELISA dit « en sandwich » (Figure 7) et le kit qui a été utilisé est le « Dog IgG ELISA Quantification Set » (Référence n° E40-118, Bethyl Lab, Montgomery, USA).

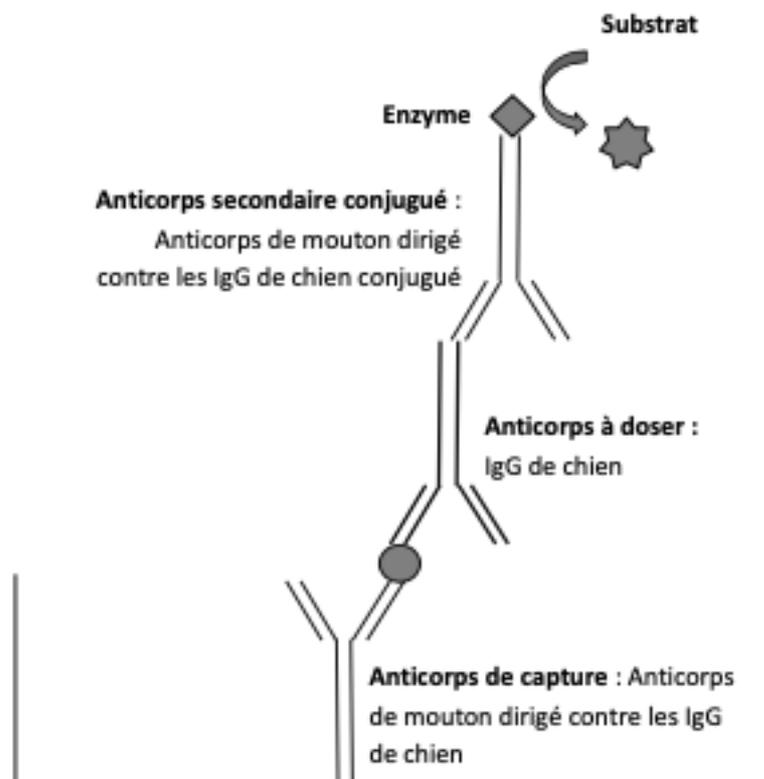


Figure 7 : Principe de l'ELISA « en sandwich » extrait de la thèse de Charlotte Aggouni, 2016

6. Analyses des données

Les analyses des données ont été réalisées en deux étapes. Tout d'abord, les intervalles de références ont été calculés pour l'ensemble de biomarqueurs étudiés : la PCT, la CRP, l'albumine, les protéines totales, les immunoglobulines G et le rapport Albumine/Globulines. Par la suite, une évaluation de ces biomarqueurs pour détecter les chiots à risque d'infection bactérienne a été réalisée. Les résultats obtenus sont donnés sous forme de moyenne \pm écart-type. Les graphiques sont présentés sous forme de boîtes à moustaches. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Tanagra® et Microsoft Excel®. Deux valeurs sont significativement différentes si $p < 0,05$.

a. Facteurs de variation et intervalles de références

Ces analyses ont été réalisées uniquement sur les chiots du groupe témoins ($n=56$). Les effets des différents facteurs de variation comme le format racial (S/M/L), le sexe (F/M) et l'âge des chiots (J2/J7/J14/J21) pour chaque biomarqueur ont été testés avec des modèles linéaires généraux. Un post-hoc test (tests DSH - différence significative honnête) a été réalisé par la suite pour identifier les différences statistiques entre les différentes modalités.

Pour les calculs d'intervalles de référence, les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant la technique de Greffé et al (2011).

b. Évaluation des biomarqueurs d'infection bactérienne

Des modèles de régression linéaires généraux ont été utilisés pour évaluer les associations entre les différents biomarqueurs et la mortalité néonatale dans notre étude (décédés/témoins) avec l'âge, le format racial et le sexe du chiot inclus dans le modèle. Ces analyses ont été réalisées donc sur l'ensemble des chiots ($n=100$). Par la suite, un test de Mann-Whitney a été réalisé pour identifier les différences statistiques entre les chiots témoins et les chiots décédés.

Pour évaluer la valeur pronostique des différents biomarqueurs, une courbe ROC (Receiver Operating Characteristic) a été tracée pour les échantillons prélevés à J2 puis l'aire sous la courbe ROC (AUC) a été calculée. Les AUC $> 0,7$ ont été considérés comme des bons marqueurs de santé.

II. Résultats

1. Description de la population

a. Population générale

La population étudiée se compose de 100 chiots, dont 56% de chiots témoins et 44% de chiots décédés. La sex-ratio pour les deux populations confondues était de 1,04 et de 1 pour le groupe témoins.

Les chiots provenaient de 14 races différentes avec majoritairement des Golden Retriever (18% de la population), Labrador Retriever (16%), Cocker (15%), Lhasa Apso (11%) et West Highland White Terrier (10%). La répartition des différentes races était comparable entre le groupe témoins et le groupe décédés (Figure 8).

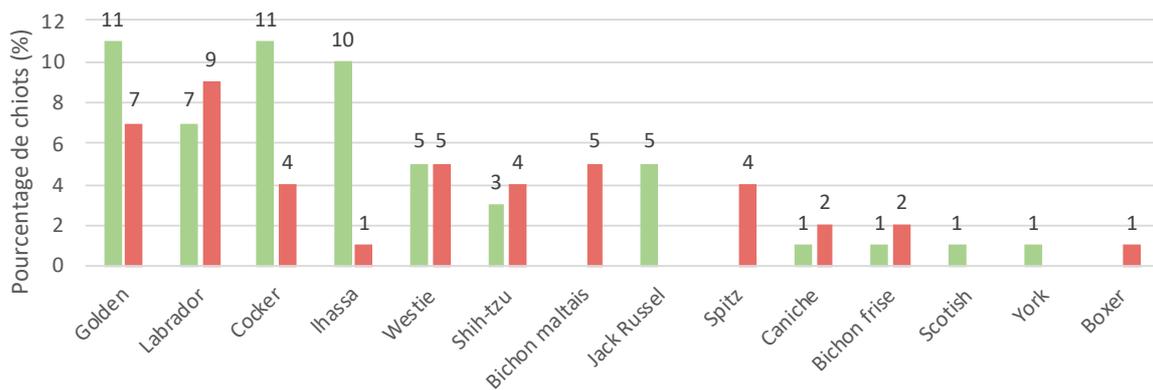


Figure 8 : Répartition des chiots témoins et décédés en fonction de la race (les barres vertes représentent le groupe témoin ; les barres rouges le groupe décédés ; les nombres au-dessous des barres représentent le pourcentage des chiots pour chaque race dans chaque groupe ; $n=100$)

Parmi les 100 chiots, 50% provenaient de races de petite taille (S), 15% de taille moyenne (M) et 35% de grande taille (L). La répartition de format racial était également comparable entre les deux groupes étudiés à l'exception du format moyen constitué uniquement des chiots de race Cocker (Figure 9).

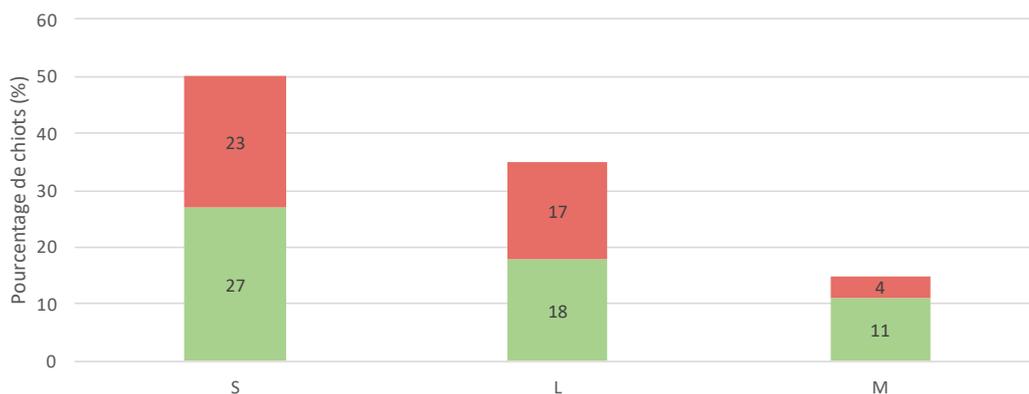


Figure 9 : Répartition des chiots témoins et décédés en fonction du format racial (les barres vertes représentent le groupe témoin ; les barres rouges le groupe décédés ; les nombres à l'intérieur des barres représentent le pourcentage des chiots pour chaque format dans chaque groupe ; n=100)

b. Témoins

Les 56 chiots sélectionnés représentent 28 portées soit en moyenne 2 chiots par portée. La moyenne de score de santé pour les chiots de groupe témoins variait selon l'âge entre 15,5 et 15,8 sur 16 points (Tableau 7), ce qui correspondait à un très bon état général des animaux dans ce groupe.

Âge	Témoins
	Moyenne \pm écart-type
Jour 2	15,8 \pm 0,4
Jour 7	15,5 \pm 0,7
Jour 14	15,5 \pm 0,7
Jour 21	15,6 \pm 0,6

Tableau 7 : Les valeurs moyennes de score de santé réalisée de manière hebdomadaire entre 0 et 21 jours chez les chiots du groupe témoins (56 chiots)

c. Décédés

Parmi les chiots décédés, 52% (23/44) des décès sont survenus avant l'âge de 4 jours, et 66% (29/44) avant l'âge de 7 jours (Figure 10).

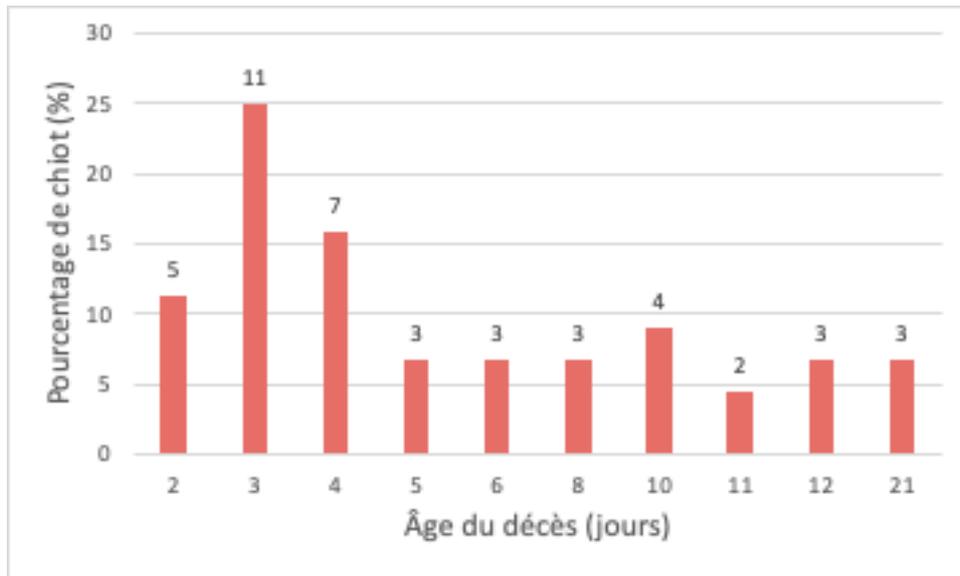


Figure 10 : Répartition des chiots morts en fonction de l'âge de la mort (le chiffre au-dessous des barres représentent le nombre de chiots morts pour chaque âge ; n=44)

Les scores de santé hebdomadiers avant le décès n'ont pas pu être calculés car les données pour 2012 étaient manquantes. La majorité des chiots sont morts avec un diagnostic *post-mortem*, basé sur le résultat de l'autopsie, l'histopathologie et la bactériologie de la rate, en faveur d'une infection bactérienne (90%). Les 10% de chiots restants sont morts pour une raison non-indéterminée mais avec un résultat de la culture microbiologique positive au niveau de la rate.

Parmi les lésions que l'on retrouve en majorité, 20,5% des chiots présentent des lésions respiratoires et 20,5% des lésions digestives, 15,4% présentent une atteinte des autres systèmes. Quelques chiots présentent des lésions mixtes.

Parmi les 44 chiots décédés, 11% présentaient une culture bactériologique négative et 89% positive. Parmi les cultures positives, 67% étaient pures, et 33% étaient mixtes. Les bactéries isolées le plus représentées sont *Escherichia coli* (49% des chiots), *Streptococcus spp* (36% des chiots) et *Enterococcus* (20% des chiots). On retrouve également mais plus rarement *Staphylococcus spp*, *Pasteurella multocida*, *Proteus spp*, *Enterobacter spp* et *Klebsiella spp*.

2. Facteurs de variations des biomarqueurs étudiés

Cette partie de résultats porte uniquement sur les chiots du groupe témoins (224 prélèvements issus de 56 chiots). Dans cette partie, l'effet des différents facteurs de variation, comme l'âge du chiot, son format racial et son sexe ont été étudiés sur les biomarqueurs investigués dans cette étude.

Parmi tous les biomarqueurs, certains d'entre eux étaient corrélés (Tableau 8). En effet, une corrélation importante a été observée à J2 entre la concentration d'IgG et le rapport Albumine/Globulines ($r=0,77$) ; la concentration des protéines totales et albumine ($r=0,73$) ou encore la concentration d'albumine et le rapport Albumine/Globulines ($r=0,62$).

Corrélation	Alb/Gb	Alb	PT	IgG	CRP	PCT
Alb/Gb	1,00	0,62	-0,02	0,77	0,03	0,32
Alb		1,00	0,73	0,35	0,08	0,17
PT			1,00	-0,19	0,04	-0,10
IgG				1,00	0,03	0,25
CRP					1,00	0,29
PCT						1,00

Tableau 8 : Valeurs corrélation de Spearman entre les biomarqueurs étudiés à J2 (Alb/Gb : rapport albumine sur globuline ; Alb : albumine ; PT : protéines totales, CRP : protéine C-réactive ; PCT : procalcitonine, n= 56)

a. Procalcitonine

La moyenne totale de PCT sérique chez les 56 chiots de tout âge confondu était de $0,82 \pm 0,59$ ng/mL. Après les analyses statistiques multivariées, la concentration de la PCT variait significativement selon l'âge du chiot ($p=0,023$), son format racial ($p<0,001$) et son sexe ($p=0,046$).

i. Effet âge

La concentration de la PCT était de $0,80 \pm 0,69$ ng/mL à J2 ; $0,98 \pm 0,65$ ng/mL à J7 ; $0,82 \pm 0,52$ ng/mL à J14 et $0,67 \pm 0,44$ ng/mL à J21 (Figure 11). Cette concentration était significativement plus élevée à J7 par rapport à J21 ($p=0,011$).

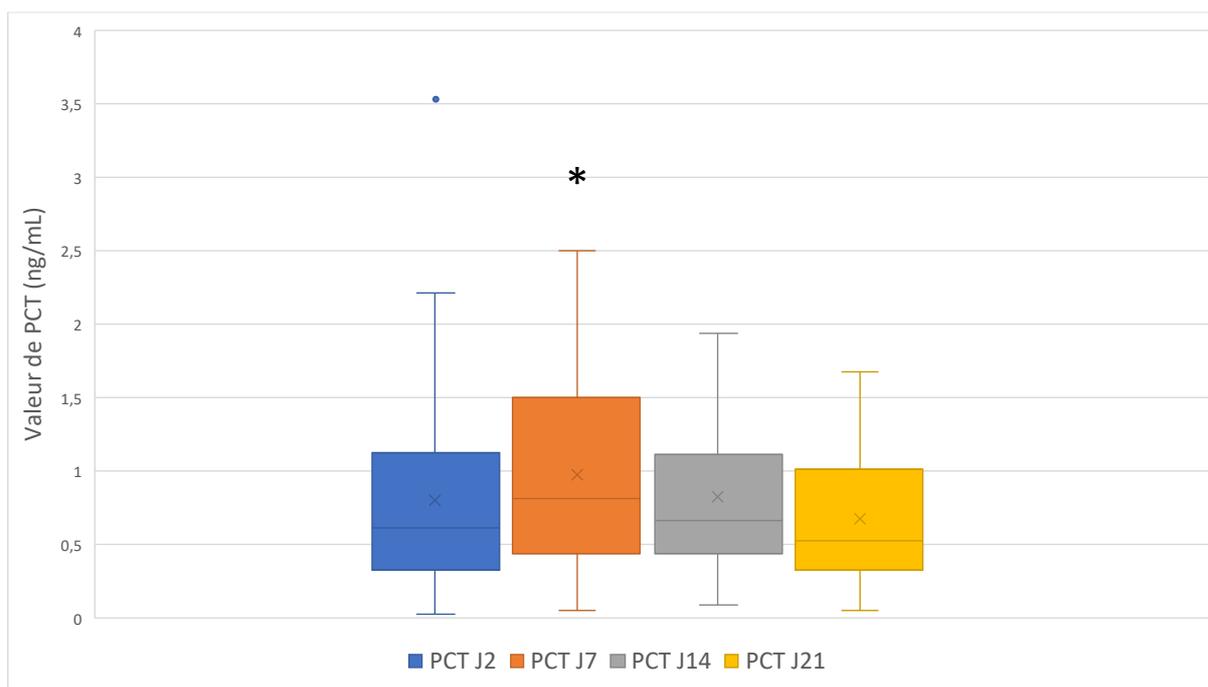


Figure 11 : Concentration sérique de la procalcitonine chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2 ; en orange-J7 ; en gris-J14 ; en jaune-J21) ($p < 0,05$ pour J7 vs J21)*

ii. Effet format racial

La concentration de la procalcitonine était de $0,77 \pm 0,56$ ng/mL pour les chiots de format S, $1,33 \pm 0,65$ ng/mL pour les M et $0,58 \pm 0,38$ ng/mL pour les L (Figure 12). Les valeurs de procalcitonine sont significativement différentes entre les formats racial L et M ($p < 0,001$) et M et S ($p < 0,001$). En revanche, seulement une tendance a été observée entre les concentrations de procalcitonine des formats L et S ($p=0,052$).

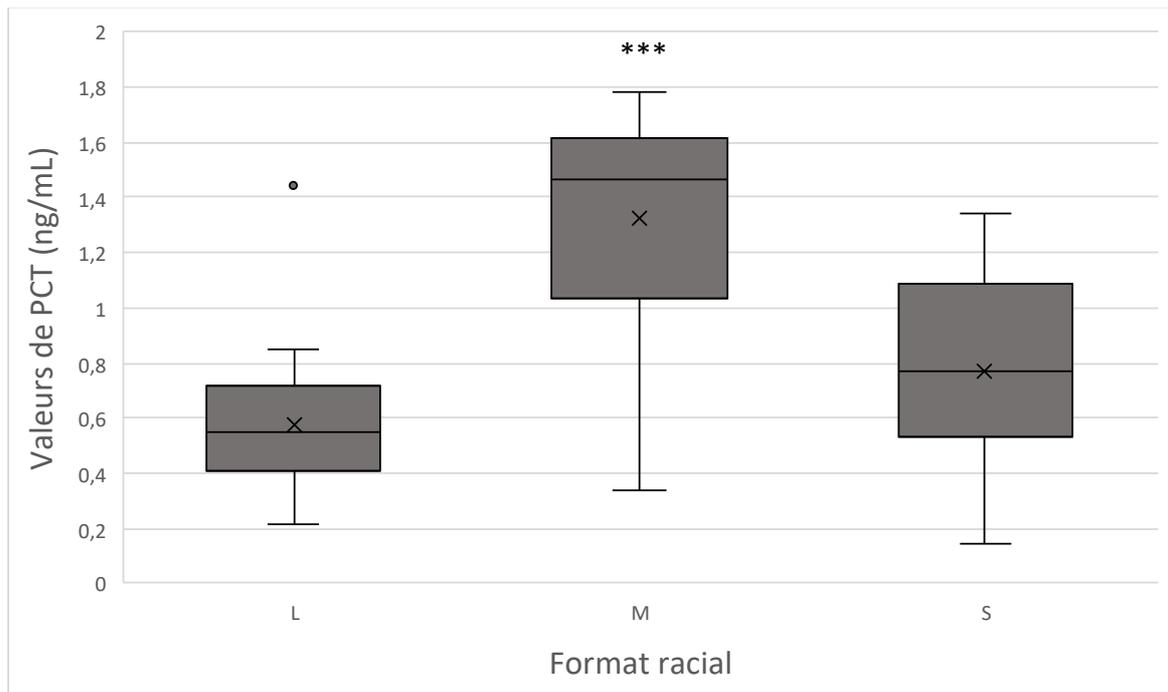


Figure 12 : Concentration sérique de la procalcitonine chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (L, M et S) (***) $p < 0,001$ pour S vs M et M vs L)

iii. Effet sexe

L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif du sexe sur la concentration de la procalcitonine. Cette concentration chez les chiots mâles était en moyenne de $0,82 \pm 0,42$ ng/mL versus $0,82 \pm 0,44$ ng/mL chez les femelles.

b. Protéine C-réactive

La moyenne totale de CRP sérique chez les 56 chiots de tout âge confondu était de $20,8 \pm 32,2$ mg/dL. Après les analyses statistiques multivariées, la concentration de la CRP variait significativement selon l'âge du chiot ($p = 0,016$) et son format racial ($p = 0,001$).

i. Effet âge

La concentration de CRP était de $32,3 \pm 50,4$ mg/dL à J2; $19,2 \pm 23,1$ mg/dL à J7 ; $15,6 \pm 21,0$ mg/dL à J14 et $16,2 \pm 22,3$ mg/dL à J21 (Figure 13). Cette concentration était significativement plus élevée à J2 par rapport à J14 ($p = 0,026$) et à J2 par rapport à J21 ($p = 0,031$).

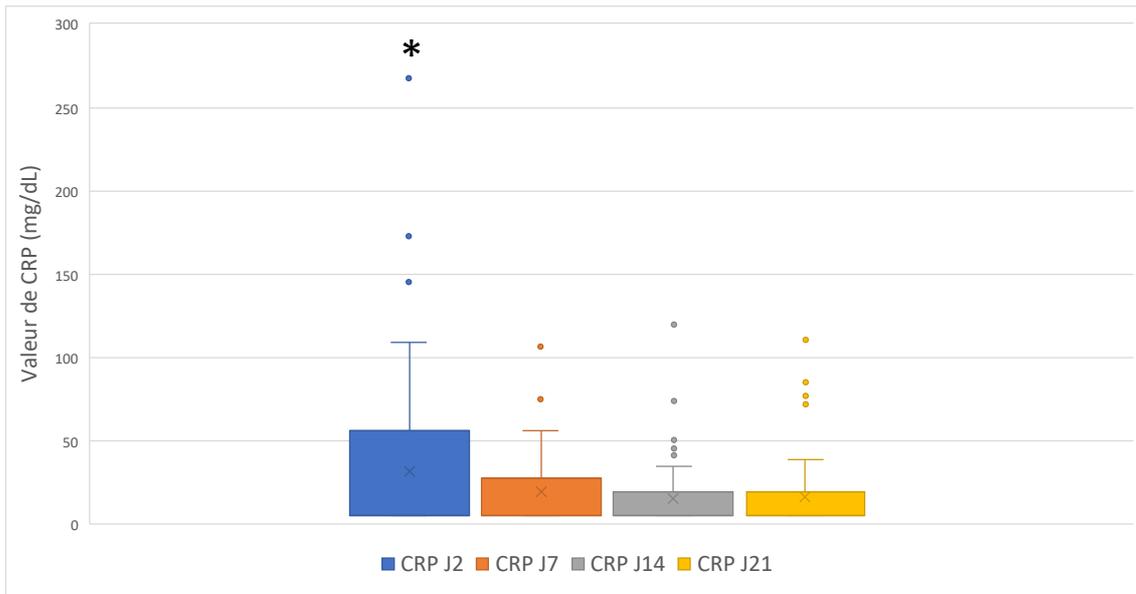
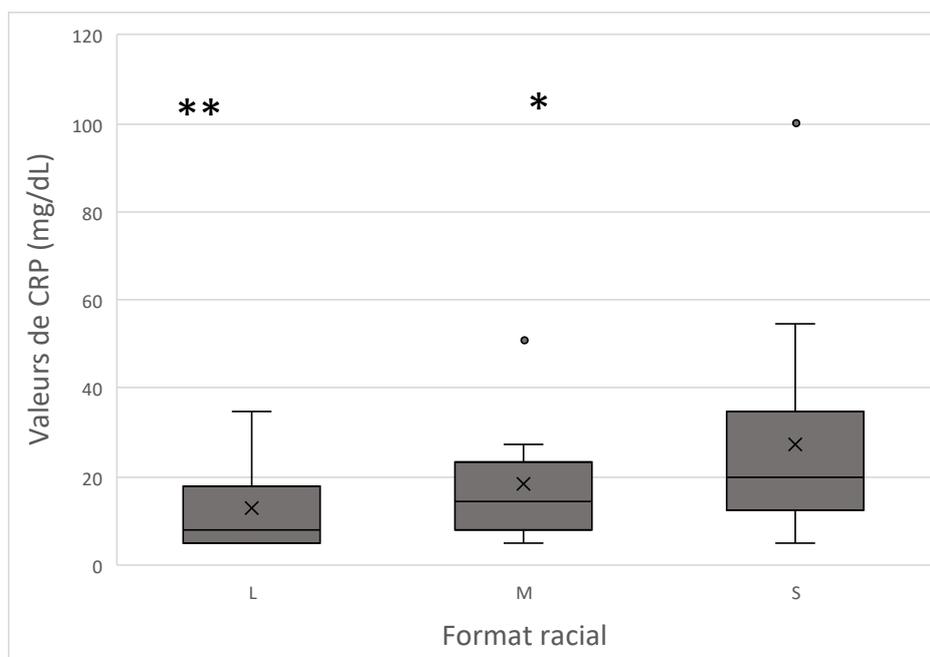


Figure 13 : Concentration sérique de la CRP chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2, en orange-J7, en gris-J14 et en jaune-J21) ($p < 0,05$ pour J2 vs J14 et J2 vs J21)*

ii. Effet format racial

La concentration de la CRP était de $27,4 \pm 39,2$ mg/dL pour les chiots de format S, $18,1 \pm 25,1$ mg/dL pour les M et $12,7 \pm 10,3$ mg/dL pour les L (Figure 14). Les valeurs de CRP sont significativement différentes entre les formats racial S et L ($p = 0,002$) et entre S et M ($p = 0,037$).



*Figure 14 : Concentration sérique de la CRP chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (L, M et S) (** $p < 0,01$ pour S vs L et * $p < 0,05$ pour S vs M)*

iii. Effet sexe

L'analyse de variance ne montre aucune différence significative entre les mâles et les femelles pour les valeurs de protéine C-réactive.

c. Protéines totales

La moyenne totale de protéines totales (PT) sérique chez les 56 chiots de tout âge confondu est de $36,0 \pm 7,3$ g/L. D'après les analyses statistiques multivariées, la concentration des protéines totales variait significativement selon l'âge du chiot ($p < 0,001$) et son format racial ($p < 0,001$).

i. Effet âge

La concentration en PT était de $42,2 \pm 6,5$ g/L à J2 ; $33,7 \pm 7,1$ g/L à J7 ; $33,4 \pm 5,7$ g/L à J14 et $34,8 \pm 6,0$ g/L à J21 (Figure 15). Cette concentration était significativement plus élevée à J2 par rapport à J7, J14 et J21 ($p < 0,001$).

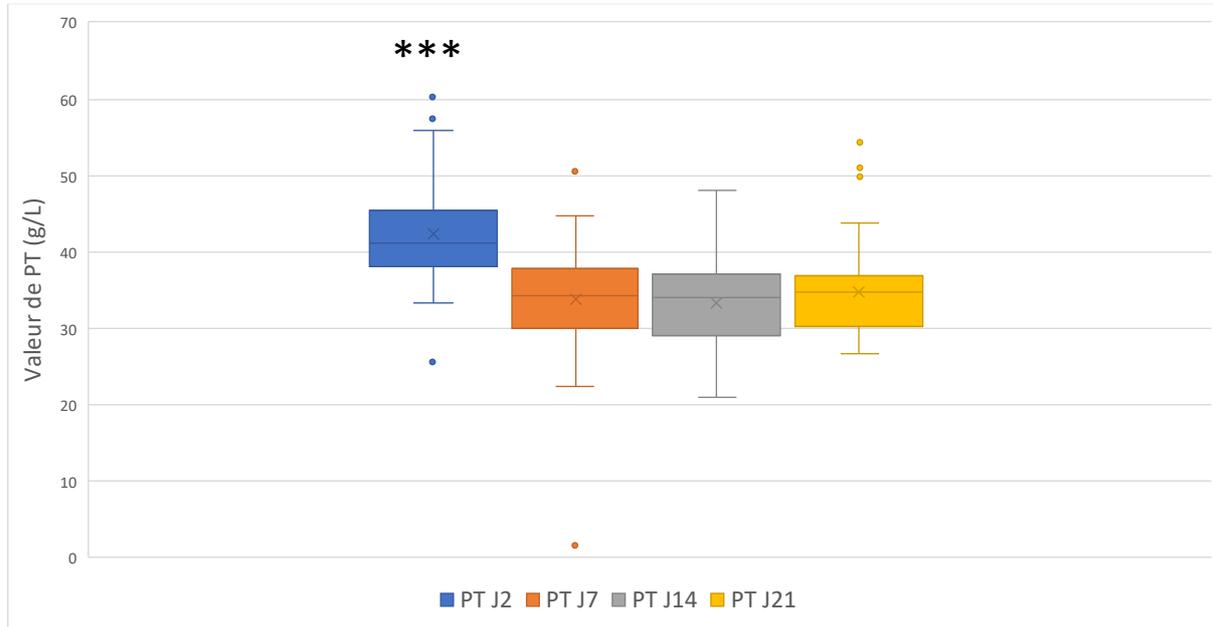
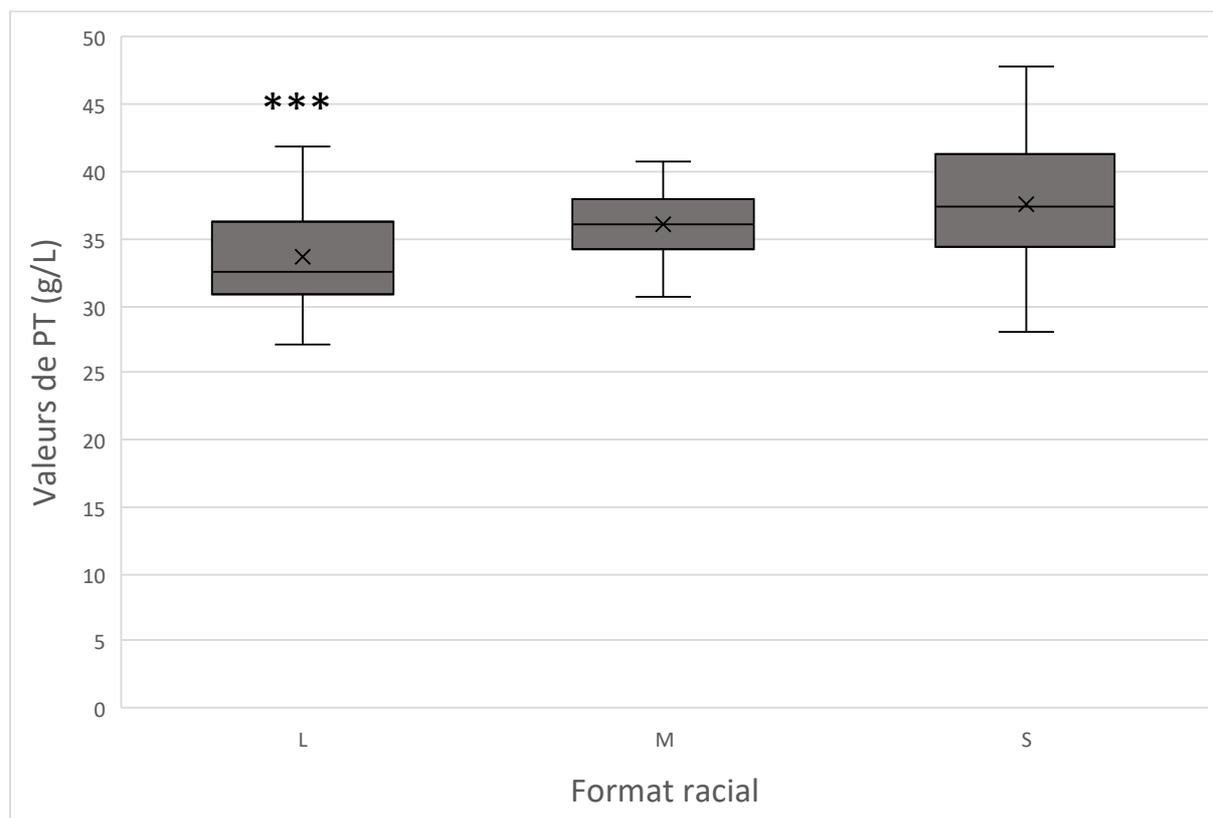


Figure 15 : Concentration sérique des protéines totales chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2, en orange-J7, en gris-J14 et en jaune-J21). (*) $p < 0,001$ pour J2 vs J14, J2 vs J14 et J2 vs J21)**

ii. Effet format racial

La concentration en PT était de $37,6 \pm 6,3$ g/L pour les chiots de format S, $36,0 \pm 5,5$ g/L pour les M et $33,6 \pm 6,3$ g/L pour les L (Figure 16). Les valeurs de PT sont significativement différentes entre les formats racial L et S ($p < 0,001$).



*Figure 16 : Concentrations sériques de PT chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). (***) $p < 0,001$ pour S vs L)*

iii. Effet sexe

L'analyse de variance ne montre aucune différence significative entre les mâles et les femelles pour les valeurs de protéines totales.

d. Albumine

La moyenne totale d'albumine (ALB) sérique chez les 56 chiots de tout âge confondu était de $19,6 \pm 3,8$ g/L. D'après les analyses statistiques multivariées, la concentration en albumine variait significativement selon l'âge du chiot ($p < 0,001$) et son format racial ($p < 0,001$).

i. Effet âge

La concentration en albumine était de $22,9 \pm 3,8$ g/L à J2; $19,0 \pm 3,1$ g/L à J7 ; $17,9 \pm 3,0$ g/L à J14 ; et $18,5 \pm 3,0$ g/L à J21 (Figure 17). Cette concentration était significativement plus élevée à J2 qu'à J7, J14 et J21 ($p < 0,001$)

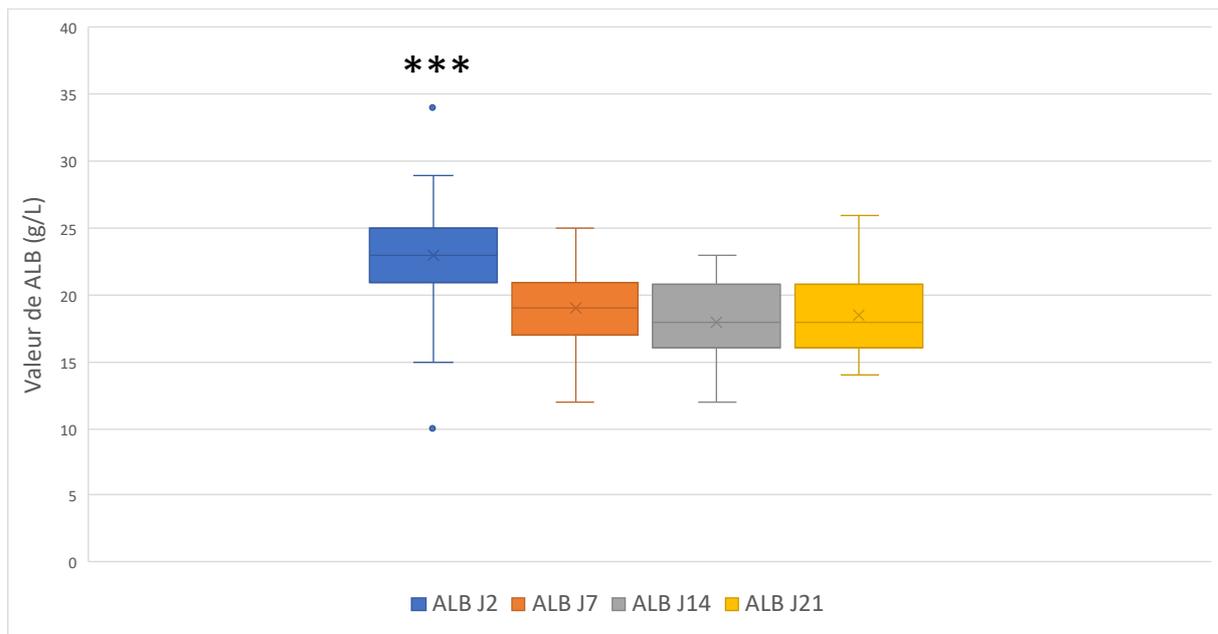
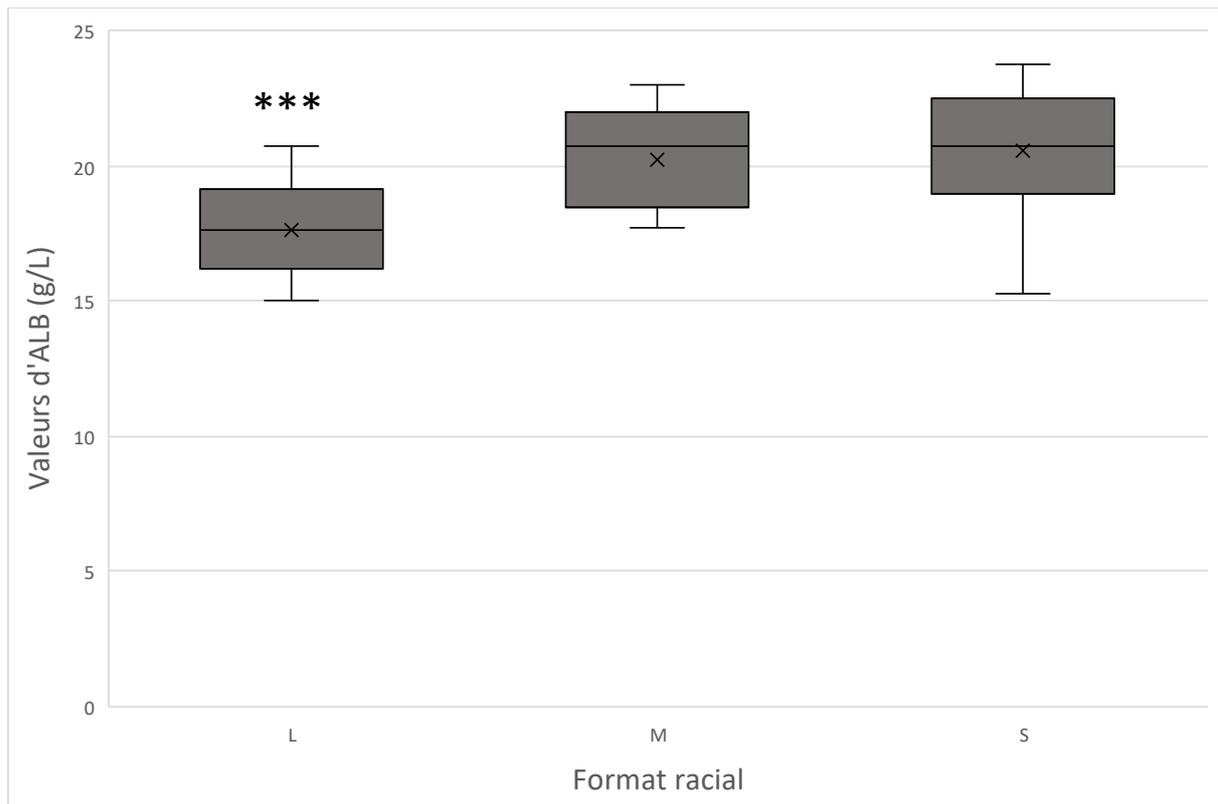


Figure 17 : Concentration sérique d'albumine chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2, en orange-J7, en gris-J14 et en jaune-J21). (***) $p < 0,001$ pour J2 vs J14, J2 vs J14 et J2 vs J21)

ii. Effet format racial

La concentration en albumine était de $20,6 \pm 2,1$ g/L pour les chiots de format S, $20,3 \pm 1,8$ g/L pour les M et $17,7 \pm 1,7$ g/L pour les L (Figure 18). Les valeurs d'albumine sont significativement différentes entre les formats racial L et M et S et L ($p < 0,001$).



*Figure 18 : Concentrations d'ALB sériques chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). (***) $p < 0,001$ pour L vs S et L vs M)*

iii. Effet sexe

L'analyse de variance ne montre aucune différence significative entre les mâles et les femelles pour les valeurs d'albumine.

e. Immunoglobulines G

La moyenne d'IgG sérique chez les 52 chiots à J2 (4 chiots ont été exclus car la valeur d'IgG était anormalement élevée) était de $3,9 \pm 2,6$ g/L. Après les analyses statistiques multivariées, la concentration d'IgG variait significativement selon le format racial du chiot ($p = 0,014$), mais pas son sexe ($p = 0,387$).

i. Effet format racial

La concentration en IgG était de $4,9 \pm 2,5$ g/L pour les chiots de format S, $3,1 \pm 2,7$ g/L pour les M et $2,8 \pm 2,2$ g/L pour les L (Figure 19). Les valeurs d'IgG sont significativement différentes entre les formats racial S et L ($p = 0,011$).

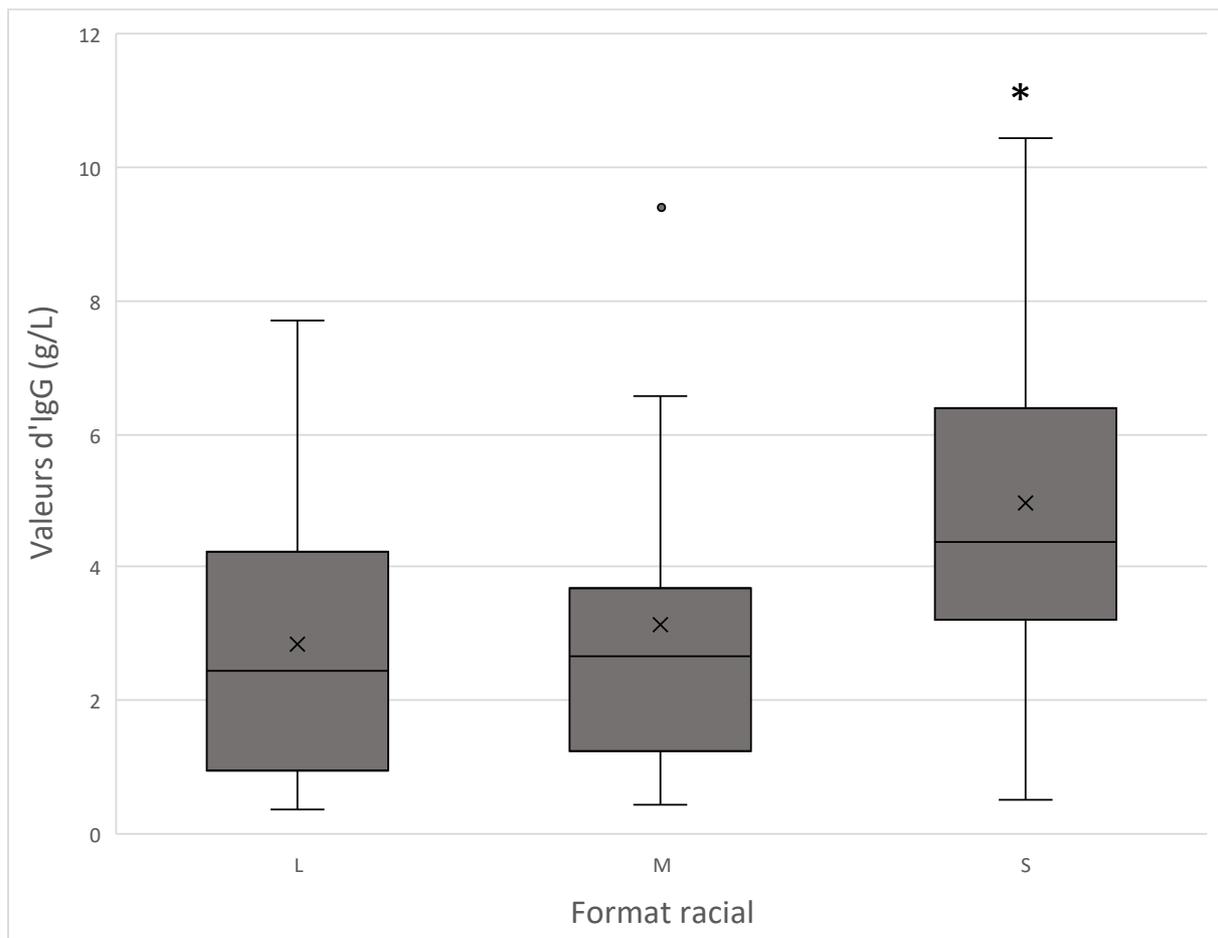


Figure 19 : Concentrations sériques d'IgG chez les 52 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). ($p < 0,05$ pour L vs S)*

ii. Effet sexe

L'analyse de variance ne montre aucune différence significative entre les mâles et les femelles pour les valeurs d'immunoglobulines G.

f. Rapport Albumine/Globuline

La moyenne totale du rapport Albumine/Globuline (Alb/Gb) chez les 56 chiots de tout âge confondu était de $1,3 \pm 0,2$. Après les analyses statistiques multivariées, le rapport Alb/Gb variait significativement selon l'âge du chiot ($p = 0,012$), son format racial ($p = 0,001$) et son sexe ($p = 0,024$).

i. Effet âge

Le rapport Alb/Gb était de $1,3 \pm 0,3$ à J2 ; $1,3 \pm 0,2$ à J7 ; $1,2 \pm 0,2$ à J14 et $1,2 \pm 0,2$ à J21 (Figure 20). Ce rapport était significativement plus élevé à J7 qu'à J21 ($p = 0,042$). En revanche, seulement une tendance a été observée entre le rapport J2 et à J21 ($p = 0,057$).

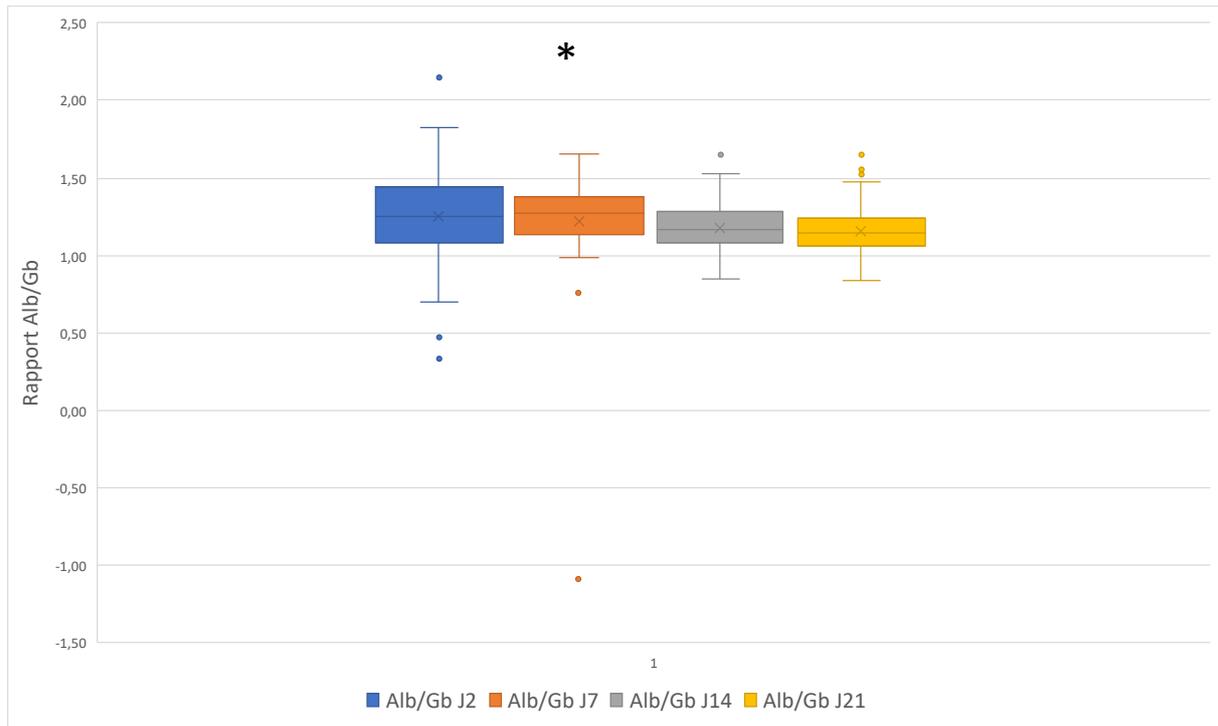
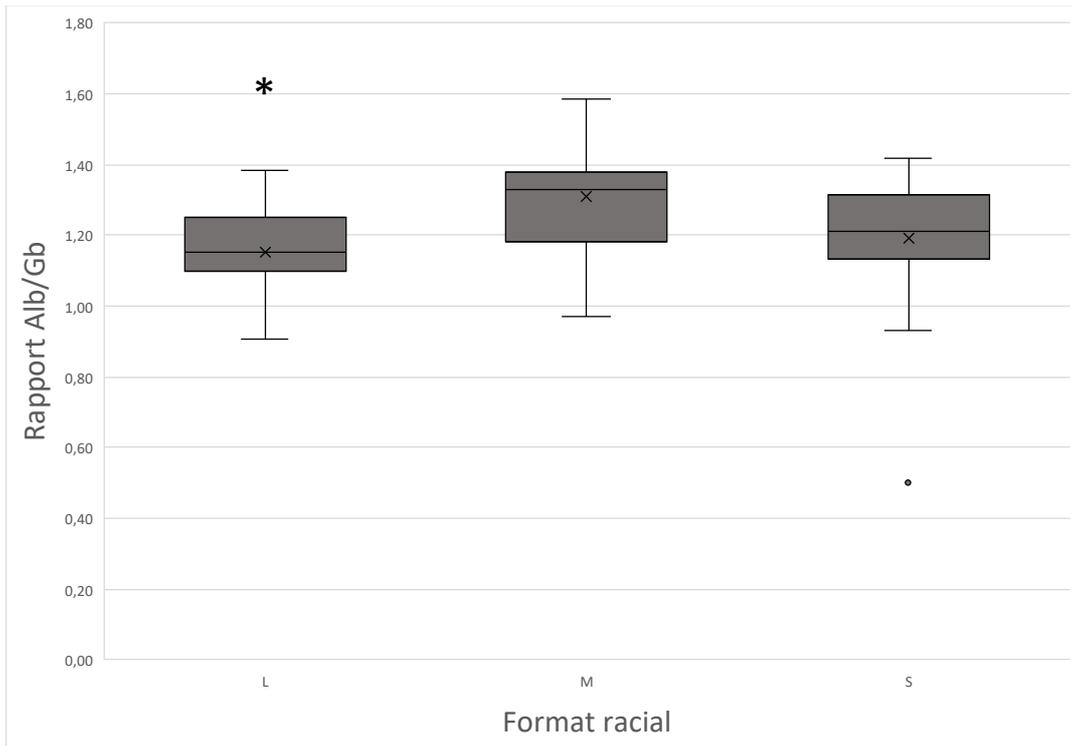


Figure 20 : Rapport Alb/Gb chez les 56 chiots témoins en fonction de leur âge (en bleu-J2 ; en orange-J7 ; en gris-J14 ; en jeune-J21) (* $p < 0,05$ pour J7 vs J21)

ii. Effet format racial

Le rapport albumine/globuline était de $1,19 \pm 0,18$ pour les chiots de format S, $1,31 \pm 0,18$ pour les M et $1,15 \pm 0,13$ pour les L (Figure 21). Les valeurs d'Alb/Gb sont significativement différentes entre les formats L et M ($p < 0,001$). En revanche, seulement une tendance a été observée entre les formats M et S ($p = 0,053$).



*Figure 21 : Rapport Alb/Gb chez les 56 chiots témoins en fonction de leur format racial (S, M et L). (** $p < 0,05$ pour L vs S)*

iii. Effet sexe

L'analyse de la variance montre un effet sexe significatif ($p < 0,05$). Le rapport d'albumine/globuline était de $1,17 \pm 0,15$ chez les mâles et $1,23 \pm 0,19$ chez les femelles (Figure 22)

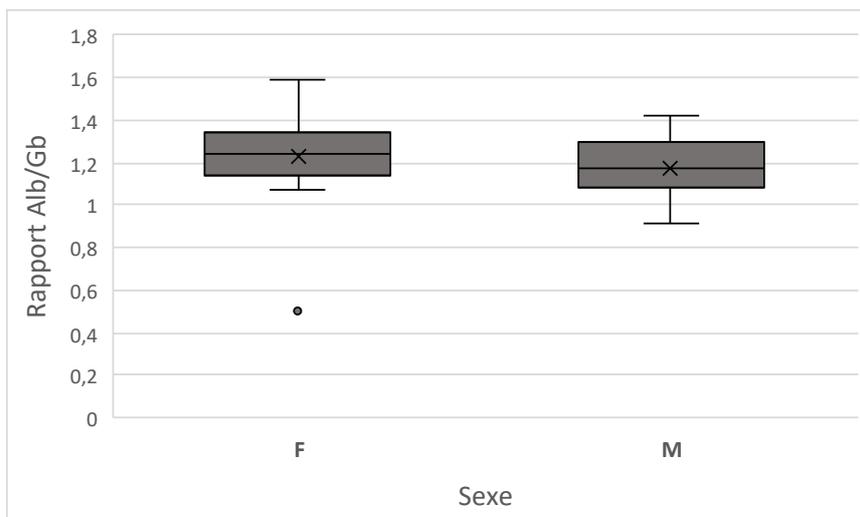


Figure 22 : Rapport Alb/Gb chez les 56 chiots témoins en fonction de leur sexe (F pour Femelle et M. pour Mâle)

3. Intervalles de références

Suite aux analyses réalisées, les intervalles de références ont été obtenus pour l'ensemble des biomarqueurs (Tableau 9).

	Âge	Format	n	Médiane (min-max)	2,5% (IC)	97,5% (IC)
Procalcitonine (ng/mL)	2	L+M+S	56	0.61 (0.02-3.53)	0.03 (0.01-0.08)	2.80 (2.17-3.50) ¹
		L	18	0.33 (0.02-1.38)		
		M	11	1.26 (0.25-3.53)		
		S	27	0.71 (0.02-2.22)		
	7	L+M+S	56	0.81 (0.04-2.51)	0.08 (0.04-0.15)	2.76 (2.27-3.25)
		L	18	0.62 (0.22-1.51)		
		M	11	1.51 (0.49-2.51)		
		S	27	0.92 (0.04-2.40)		
	14	L+M+S	56	0.67 (0.08-1.94)	0.09 (0.05-0.16)	2.24 (1.84-2.68)
		L	18	0.55 (0.13-1.67)		
		M	11	1.63 (0.30-1.94)		
		S	27	0.67 (0.08-1.11)		
	21	L+M+S	56	0.53 (0.05-1.68)	0.05 (0.05-0.18)	1.67 (1.47-1.68)
		L	18	0.53 (0.05-1.68)		
		M	11	0.97 (0.23-1.68)		
		S	27	0.41 (0.05-1.25)		

	Âge	Format	n	Médiane (min-max)	2,5% (IC)	97,5% (IC)
CRP (mg/dL)	2	L+M+S	56	<5 (<5-268)	-	-
		L	18	<5 (<5-72)		
		M	11	<5 (<5-109)		
		S	27	<5 (<5-77)		
	7	L+M+S	56	<5 (<5-108)	-	-
		L	18	<5 (<5-108)		
		M	11	<5 (<5-27)		
		S	27	9 (9-120)		
	14	L+M+S	56	<5 (<5-120)	-	-
		L	18	<5 (<5-42)		
		M	11	<5 (<5-1<5)		
		S	27	18 (<5-106)		
	21	L+M+S	56	5 (5-110)	-	-
		L	18	5 (5-110)		
		M	11	20 (5-85)		
		S	27	10 (5-268)		
	Âge	Format	n	Médiane (min-max)	2,5% (IC)	97,5% (IC)
IgG	2	L+M+S	56	3.58 (0.35-25.78)	0.41 (0.28-0.67)	20.75 (14.5-27.13)
IgG -4 (g/L)	2	L+M+S	52 ^s	3.38 (0.35-10.45)	0.26 (?-0.55)	10.26 (8.75-11.95)
		L	16	2.44 (0.35-7.71)		
		M	11	2.64 (0.45-9.42)		
		S	25	4.38 (0.51-10.45)		

	Âge	Format	n	Médiane (min-max)	2,5% (IC)	97,5% (IC)
Protéines Totales (g/L)	2	L+M+S	56	41.2 (25.6-60.2)	28.9 (25.6-34.7)	59.0 (55.0-60.2)
		L	18	39.2 (25.6-55.9)		
		M	11	40.2 (33.3-42.5)		
		S	27	42.9 (34.7-60.2)		
	7	L+M+S	55*	34.5 (22.3-50.5)	22.8 (20.8-24.9)	45.7 (43.5-47.8)
		L	18	31.1 (22.3-41.9)		
		M	11	35.0 (29.1-40.4)		
		S	26*	36.0 (22.3-50.5)		
	14	L+M+S	56	34.1 (20.9-48.0)	21.9 (19.8-23.9)	44.9 (42.5-47.2)
		L	18	30.4 (25.0-40.2)		
		M	11	34.0 (23.6-48.0)		
		S	27	36.3 (20.9-44.2)		
	21	L+M+S	56	34.8 (26.6-54.3)	25.9 (25.0-27.0)	49.3 (45.5-53.3)
		L	18	30.9 (26.6-36.8)		
		M	11	35.4 (27.8-54.3)		
		S	27	36.4 (26.6-50.9)		
	Âge	Format	n	Médiane (min-max)	2,5% (IC)	97,5% (IC)
Albumine (g/L)	2	L+M+S	56	23.0 (10.0-34.0)	12.1 (10.0-16.9)	31.9 (28.0-34.0)
		L	18	22.0 (10.0-27.0)		
		M	11	24.0 (17.0-29.0)		
		S	27	24.0 (18.0-34.0)		
	7	L+M+S	56	19.0 (12.0-25.0)	12.1 (10.4-13.4)	24.9 (23.0-25.8)
		L	18	17.5 (12.0-21.0)		
		M	11	19.0 (15.0-25.0)		
		S	27	20.0 (13.0-25.0)		
	14	L+M+S	56	18.0 (12.0-23.0)	12.4 (12.0-13.0)	23.0 (22.0-23.0)
		L	18	16.0 (13.0-21.0)		

		M	11	19.0 (13.0-23.0)					
		S	27	19.9 (12.0-23.0)					
	21	L+M+S	56	18.0 (14.0-26.0)			13.3 (12.5-14.0)	25.2 (23.7-26.8)	
		L	18	17.0 (14.0-20.0)					
		M	11	20.0 (15.0-26.0)					
		S	27	20.0 (15.0-26.0)					
		Âge	Format	n			Médiane (min-max)	2,5% (IC)	97,5% (IC)
	Alb/Gb	2	L+M+S	56			1.25 (0.33-2.15)	0.59 (0.43-0.73)	1.86 (1.75-1.97)
			L	18			1.23 (0.33-1.82)		
			M	11			1.51 (0.78-2.15)		
S			27	1.18 (0.85-1.62)					
7		L+M+S	56	1.27 (0.75-1.66)	0.90 (0.83-0.97)	1.62 (1.55-1.69)			
		L	18	1.21 (0.75-1.60)					
		M	11	1.36 (1.36-1.66)					
		S	27	1.28 (0.98-1.62)					
14		L+M+S	56	1.16 (0.85-1.65)	0.85 (0.78-0.91)	1.50 (1.45-1.57)			
		L	18	1.11 (0.85-1.29)					
		M	11	1.23 (0.92-1.47)					
		S	27	1.22 (0.87-1.65)					
21		L+M+S	56	1.14 (0.83-1.65)	0.88 (1.84-0.92)	1.53 (1.44-1.63)			
		L	18	1.08 (0.98-1.27)					
		M	11	1.18 (0.92-1.48)					
		S	27	1.16 (0.83-1.65)					

Tableau 9 : Tableau résumé des intervalles de référence pour les différents biomarqueurs

4. Identification des biomarqueurs de l'infection bactérienne

Cette partie des résultats porte sur l'ensemble des chiots (groupe témoins et groupe décédés ; 285 prélèvements issus de 100 chiots). Des modèles multivariés incluant l'effet l'âge, format racial, sexe et l'état de santé du chiot (témoins vs décédés), on était utilisés dans cette partie de l'étude.

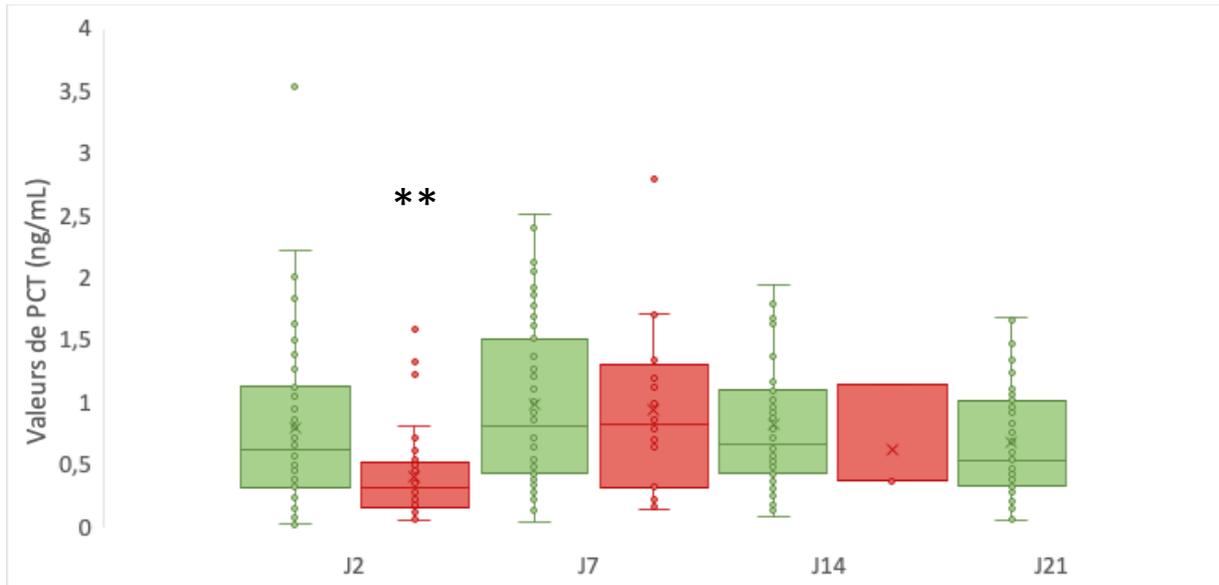
Cependant, au vu du faible nombre d'échantillons disponibles pour la population de chiots décédés, les comparaisons deux à deux n'ont été réalisées qu'à J2 et J7, sauf pour les IgG, réalisées uniquement à J2.

a. Procalcitonine

D'après les analyses multivariées, la concentration de la procalcitonine variait significativement entre les chiots témoins et les chiots décédés ($p=0,025$) (Tableau 10). La concentration moyenne de procalcitonine sérique chez les chiots du groupe décédés de tout âge confondu était de $0,55 \pm 0,52$ ng/mL versus $0,82 \pm 0,59$ ng/mL chez les chiots témoins. Cette différence était particulièrement observée à J2 avec la concentration moyenne de $0,40 \pm 0,34$ ng/mL chez les décédés versus $0,8 \pm 0,7$ ng/mL chez les témoins ($p<0,001$; Figure 23). Aucune interaction entre le format racial et l'état de santé n'a été observée dans notre étude.

Variables à J2	T vs D	n	Médiane (min-max)
Procalcitonine	T	56	0.61 (0.02-3.53)
	D	42	0.31 (0.06-1.58)
	M&W P = 0.0013		
CRP	T	56	<5 (5-268)
	D	38	<5 (5-62)
	M&W P = 0.0014		
IgG	T	56	3.58 (0.35-25.78)
	D	35	1.69 (0.29-10.38)
	M&W P = 0.047 (0.124 vs Témoins-4)		
Protéines Totales	T	56	41.2 (25.6-60.2)
	D	38	43.1 (29.6-58.2)
	M&W P = 0.474		
Albumine	T	56	23.0 (10.0-34.0)
	D	36	24.5 (15.0-35.0)
	M&W P = 0.044		
Alb/Gb	T	56	1.25 (0.33-2.15)
	D	36	1.51 (0.33-2.20)
	M&W P = 0.006		

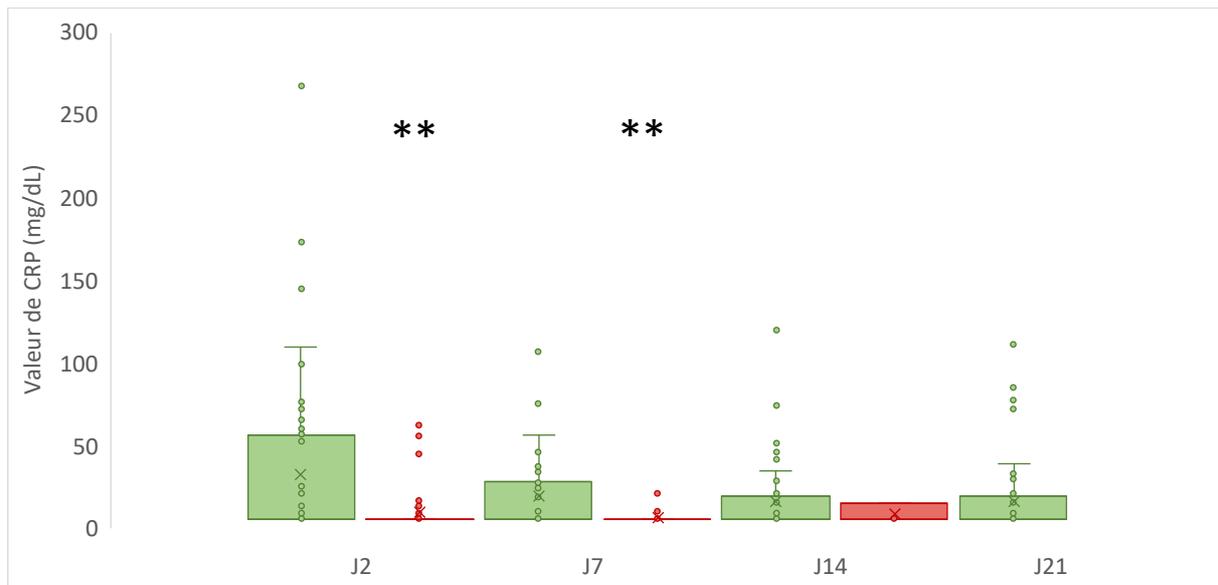
Tableau 10 : Résumé de la comparaison entre les chiots témoins (T) et décédés (D) pour les différents paramètres analysés uniquement pour J2 et en utilisant le test de Mann-Whitney



*Figure 23 : Concentration sérique de la procalcitonine en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2, J7, J14 et J21) ; décédés en rouge (n=42 à J2, n=13 à J7 et n=3 à J14, n=0 à J21) ; n=100 ; ** p<0,01)*

b. Protéine C-réactive

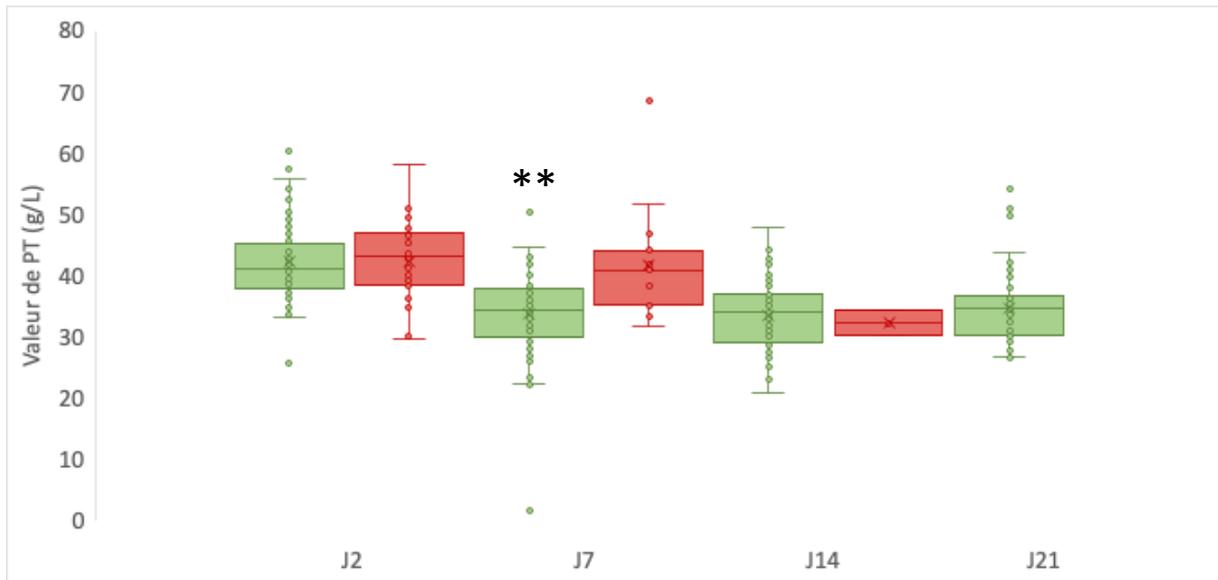
D'après les analyses multivariées, la concentration de la CRP variait significativement entre les chiots du groupe témoins et les chiots décédés ($p < 0,001$) (Tableau 10). La concentration moyenne totale de procalcitonine sérique chez les chiots du groupe décédés de tout âge confondu était de $8,6 \pm 11,5$ mg/dL versus $20,8 \pm 32,2$ mg/dL chez les chiots témoins. Les chiots décédés présentaient une concentration en CRP statistiquement plus faible que les chiots témoins quel qu'était leur âge ou leur format racial ($p < 0,01$; Figure 24).



*Figure 24 : Concentration sérique de la CRP en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2, J7, J14 et J21) ; décédés en rouge (n=38 à J2, n=12 à J7 et n=3 à J14, n=0 à J21) ; n=100 ; ** p<0,01)*

c. Protéines totales

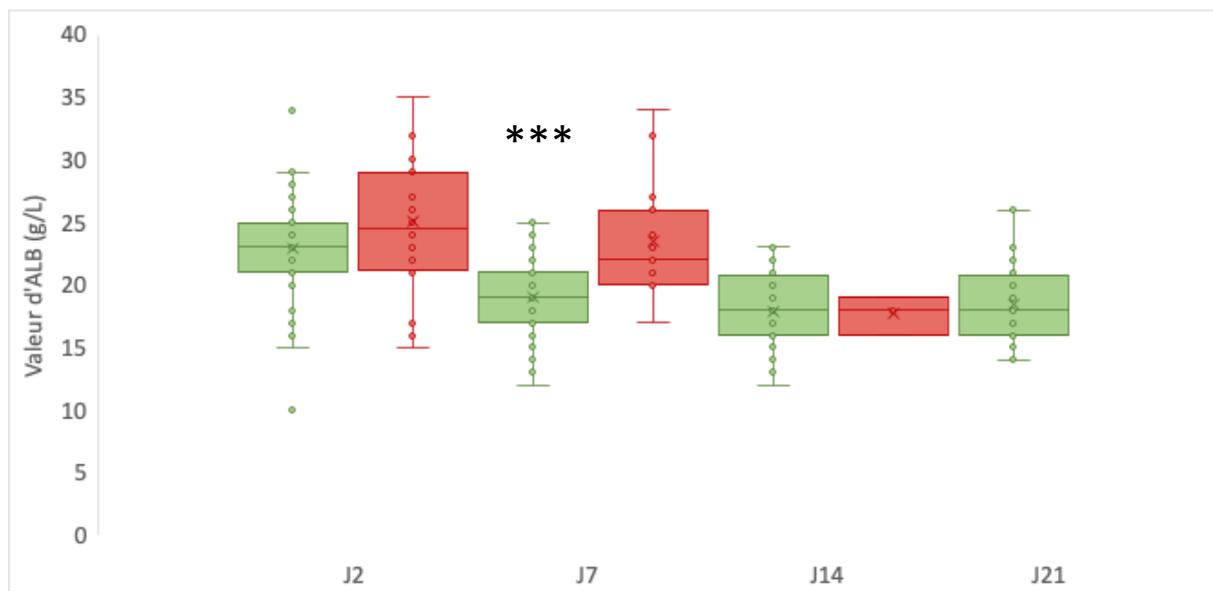
D'après les analyses multivariées, la concentration des protéines totales variait significativement entre les chiots témoins et les chiots décédés ($p < 0,006$) (Tableau 10). La concentration moyenne des protéines totales sérique chez les chiots du groupe décédés de tout âge confondu était de $41,7 \pm 7,2$ g/L versus $36,0 \pm 7,3$ g/L chez les chiots témoins. Cette augmentation chez les chiots décédés versus témoins était particulièrement observée à J7 avec la concentration moyenne de respectivement $41,7 \pm 9,1$ g/L et $33,7 \pm 7,1$ g/L ($p < 0,01$; Figure 25). Aucune interaction entre le format racial et l'état de santé n'a été observée dans notre étude.



*Figure 25 : Concentration sérique des protéines totales en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2,J7,J14 et J21) ; décédés en rouge (n=38 à J2, n=12 à J7, n=3 à J14 et n=0 à J21; n=100 ; ** p<0,01)*

d. Albumine

D'après les analyses multivariées, la concentration en albumine variait significativement entre les chiots témoins et les chiots décédés ($p < 0,001$) (Tableau 10). La concentration moyenne de l'albumine sérique chez les chiots du groupe décédés de tout âge confondu était de $24,2 \pm 5,0$ g/L versus $19,6 \pm 3,8$ g/L chez les chiots témoins. Cette augmentation chez les chiots décédés versus témoins était particulièrement observée à J7 avec la concentration moyenne de respectivement $23,5 \pm 4,6$ g/L et $19,0 \pm 3,1$ g/L ($p < 0,001$; Figure 26). Aucune interaction entre le format racial et l'état de santé n'a été observée dans notre étude.



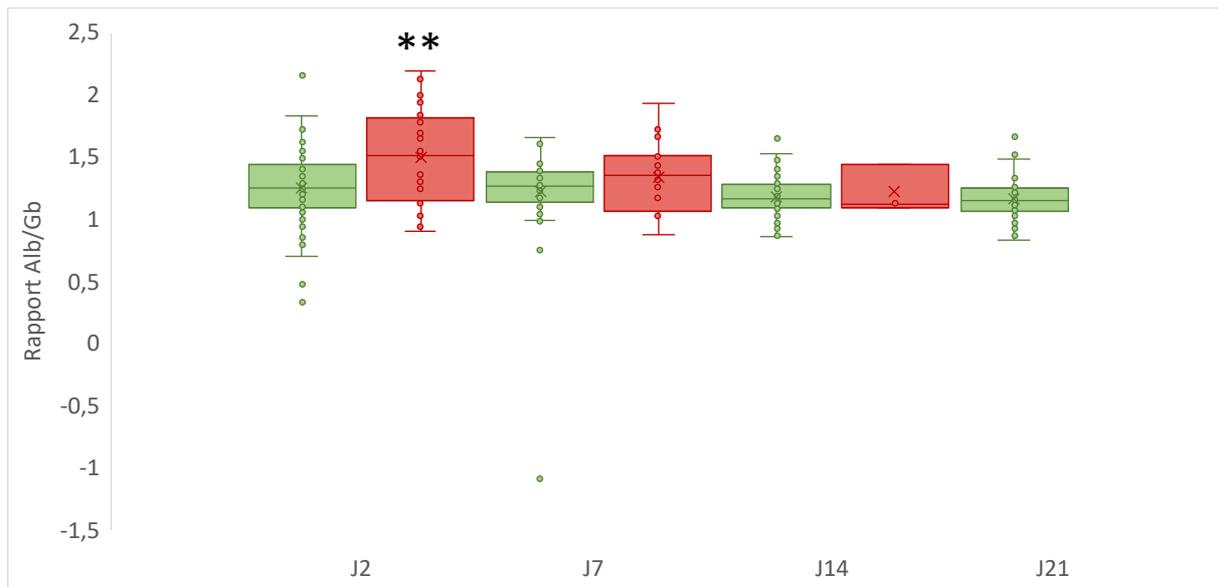
*Figure 26 : Concentration sérique d'albumine en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert (n=56 à J2,J7,J14 et J21) ; décédés en rouge (n=36 à J2, n=15 à J7, n=3 à J14 et n=0 à J21; n=100 ; *** p<0,001)*

e. Immunoglobulines G

D'après les analyses multivariées, le taux d'IgG ne variait pas significativement entre les chiots du groupe témoins et les chiots décédés ($p = 0,124$) (Tableau 10). Le taux moyen d'IgG sérique chez les chiots du groupe décédés à J2 était de $3,4 \pm 3,5$ g/L versus $3,9 \pm 2,6$ g/L chez les chiots témoins. Aucune interaction entre le format racial et l'état de santé n'a été observée dans notre étude.

f. Albumine/globulines

D'après les analyses multivariées, le rapport Alb/Gb variait significativement entre les chiots du groupe témoins et les chiots décédés ($p < 0,001$) (Tableau 10). Le rapport Alb/Gb chez les chiots du groupe décédés de tout âge confondu était de $1,4 \pm 0,4$ versus $1,3 \pm 0,2$ chez les chiots témoins. Cette augmentation chez les chiots décédés versus témoins était particulièrement observée à J2 avec le rapport Alb/Gb respectivement de $1,5 \pm 0,4$ et $1,3 \pm 0,3$ ($p < 0,01$; Figure 27). Aucune interaction entre le format racial et l'état de santé n'a été observée dans notre étude.



*Figure 27 : Rapport Albumine/Globulines en fonction de l'âge et du statut de santé des chiots (témoins en vert ; décédés en rouge ; n=100 ; ** p<0,01)*

5. Valeurs diagnostiques des biomarqueurs étudiés

Dans cette partie les valeurs diagnostiques de chaque biomarqueurs ont été évaluées, pour les deux groupes de chiots (témoins et décédés) sur les données obtenues à J2.

La spécificité des différents tests variait entre 0 % pour les CRP et 95% pour la ALB (Tableau 11). Tandis que la sensibilité variait entre 17 % pour les IgG et 100% pour la PCT. Le meilleur compromis pour les deux valeurs était observé pour la procalcitonine (Spé=4% et Se=100%, VPP = 44% et VPN = 100%) ainsi que l'albumine (Spé=95%, Se=33%, VPP = 80% et VPN = 69%). A J2, lorsque la valeur seuil de 0,06ng/mL pour la procalcitonine est dépassée, le risque de mortalité par une infection bactérienne est de 0%. De même, à J2, lorsque la valeur seuil de 0,29g/L d'albumine est dépassée, le risque de mortalité est de 80%.

Une courbe ROC a été générée pour tous les biomarqueurs (Figure 28) puis l'aire sous la courbe (AUC) a été calculée pour chacun d'entre eux (Tableau 11). Parmi tous les biomarqueurs, la procalcitonine a obtenu l'AUC la plus élevée (0,69). Cependant, aucun des biomarqueurs étudiés présentait une AUC > 0,7. De même, pour l'index de Youden (J), aucun des biomarqueurs étudiés ne présentait un J > 0,5.

Aucun des biomarqueurs testés n'a de bonne valeur diagnostique pour la détection précoce des infections bactériennes chez les chiots nouveau-nés.

	AUC	J	Seuil	Se	Spé	VPP	VPN
Alb/Gb J2	0,67	0,36	1,49	0,56	0,38	0,65	0,74
Alb J2	0,62	0,28	29 g/L	0,33	0,95	0,80	0,69
PT J2	0,54	0,22	44 g/L	0,47	0,75	0,56	0,68
IgG	0,64	0,05	8,54 g/L	0,17	0,88	0,46	0,63
CRP J2	0,66	0,00	5 mg/dL	1,00	0,00	0,40	NA
PCT J2	0,69	0,04	0,06 ng/mL	1,00	0,04	0,44	1,00

Tableau 11 : Valeurs diagnostiques (l'aire sous la courbe (AUC) l'index de Youden (J), le seuil, la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), la valeur prédictive positive et négative (VPP et VPN)) pour chaque paramètre étudié à J2 sur 100 chiots (56 témoins et 44 décédés).

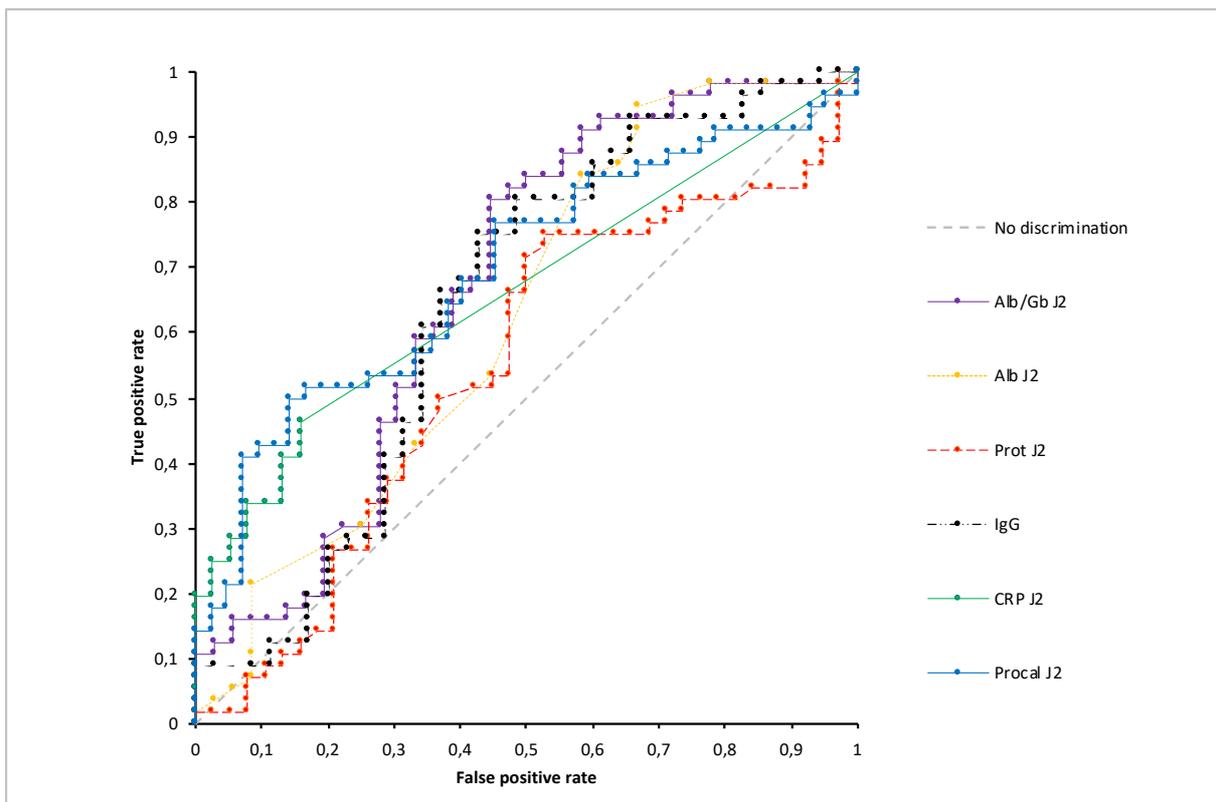


Figure 28 : Courbe ROC pour chaque paramètre étudié

III. Discussion

Notre étude avait pour but d'investiguer différents marqueurs sanguins pour la détection précoce de l'infection bactérienne néonatale chez l'espèce canine. En effet, jusqu'à présent très peu de chercheurs se sont penchés sur la question et très peu d'études ont été menées sur le sujet. L'étude de la procalcitonine comme biomarqueur potentiel chez les chiots n'avait pas encore été réalisée chez le chien. Dans un premier temps, l'utilisation d'une population témoin afin d'établir des valeurs de références pour ces biomarqueurs a été réalisée. Puis avec les échantillons de sérum de chiots décédés disponibles, une analyse de ces biomarqueurs a été réalisée afin de savoir si ces biomarqueurs peuvent être utiles dans la détection précoce de l'infection bactérienne néonatale chez l'espèce canine.

1. Analyse des résultats

a. Intervalles de références chiots et chiens adultes

Les intervalles de références calculés chez les chiots et ceux trouvés dans la littérature chez le chien adulte et chez les nourrissons humains sont présentés dans le tableau 12.

	Chiots J2	Chiens Adultes	Nourrissons
Procalcitonine (ng/mL)	0,03 – 2,80	0,058 – 0,091	< 10 - 20
Protéine C réactive (mg/dL)	5 - 227	< 2,5 – 3,0	< 1,0 – 2,0
Protéines totales (g/L)	30,9 – 57,3	54 - 75	28 - 44
Albumine (g/L)	14,9 – 30,1	23 - 31	34 - 50
Immunoglobulines G (g/L)	0,26 – 10,26	3-18	3,9 – 1,7
Albumine/Globulines	0,59 – 1,86	0,9-1,9	-

Tableau 12: intervalles de références pour les chiots, les chiens adultes et les nourrissons humains pour chacun des paramètres étudiés (Easley et al. 2020; Eschborn, Weitkamp 2019, Cornell University).

On observe que le taux de procalcitonine et de protéine C réactive chez les chiots est nettement plus élevée que chez les chiens adultes. Les chiots nouveau-nés sont immatures. Leur système immunitaire et leurs organes le sont également. En termes de physiologie, les chiots pourraient être comparés aux nourrissons prématurés. Eschborn et al ont montré que pour les enfants prématurés, le taux de procalcitonine était plus élevé que les enfants nés à termes.

([Eschborn, Weitkamp 2019](#)). Une augmentation physiologique de protéine C-réactive et de procalcitonine a également lieu quelques jours après la naissance. Ces deux phénomènes pourraient expliquer les valeurs plus élevées de procalcitonine et protéine C-réactive chez les chiots âgés de 2 jours.

Les chiots reçoivent les immunoglobulines de la mère en majorité par le colostrum ; une très faible quantité est transférée par voie placentaire. La production d'anticorps commence après quatre semaines de vie. Entre la naissance et cette quatrième semaine, les anticorps présents dans l'organisme du chiot proviennent uniquement de la mère. C'est pourquoi certains chiots de deux jours semblent plus carencés en immunoglobulines que les chiens adultes ([Aggouni, 2016](#)).

Enfin les valeurs de protéines totales et albumine sont un peu plus basses que celles des chiens adultes.

b. Les biomarqueurs

Les valeurs de procalcitonine et protéine C-réactive chez les chiots décédés sont significativement plus faibles que chez les chiots témoins. Ces résultats ne coïncident pas avec les résultats des différentes études menées sur la procalcitonine chez le chien adulte présentant un sepsis. En effet, la valeur de procalcitonine est significativement plus élevée dans le cas de sepsis : 103,0 pg/mL contre 41,6 pg/mL chez les chiens sains ([Troia, Giunti, Goggs 2018](#)). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. La première concerne l'âge des chiots. En effet, les chiots naissants immatures, on peut supposer que les organes synthétisant ces biomarqueurs (thyroïde, foie) sont trop immatures pour avoir une réponse immunitaire comparable à celle d'un individu adulte, ne permettant pas d'utiliser ces biomarqueurs à cet âge. Une autre hypothèse serait que les chiots atteints de sepsis produisent moins de ces biomarqueurs qui augmentent de manière physiologique quelques jours après la mise-bas.

Les valeurs d'albumine et du rapport albumine/globuline chez les chiots décédés sont significativement plus hautes que chez les chiots sains. Une augmentation du taux d'albumine chez les chiots décédés peut s'expliquer par une déshydratation dû à la pathologie associée. Le rapport albumine/globuline augmenté est corrélé à l'augmentation de l'albuminémie, étant probablement un marqueur du niveau d'hydratation chez le chiot nouveau-né.

Les valeurs de protéines totales et immunoglobulines chez les chiots décédés ne montre aucune différence significative avec les valeurs chez les chiots sains. Ce résultat confirme donc que l'augmentation du rapport albumine/globuline est dû à l'augmentation du taux d'albumine.

En revanche, la seule augmentation du taux d'albumine sans augmentation des protéines totales peut indiquer qu'il ne s'agit pas d'une simple déshydratation, ou qu'elle est associée à une perte d'autres protéines sériques. Les protéines totales et l'albumine sont des marqueurs très peu spécifiques mais ici, l'albumine semble avoir une valeur diagnostique intéressante mais insuffisante.

Les biomarqueurs étudiés ici n'ont pas montré de valeur diagnostique suffisamment intéressante pour être utilisée. En effet, le calcul de l'aire sous la courbe ROC montre que tous les paramètres sont peu informatifs ($0,5 \leq AUC < 0,7$) ainsi que l'index de Youden ($< 0,5$). Ces biomarqueurs ne sont donc pas de bons candidats pour la détection précoce du sepsis chez les chiots âgés de 0 à 21 jours.

Malgré tout, la procalcitonine et la protéine C-réactive sont deux biomarqueurs qui ont déjà montré leur intérêt en médecine humaine. En médecine vétérinaire, leur intérêt chez les chiens adultes a été montré mais chez les chiots en période néonatale, leur utilité ne semble pas avérée. Cependant la valeur de PCT à J2 supérieure 0,06 ng/mL semblait être prédictive de la bonne santé du chiot nouveau-né avec une VPN = 100%. De même pour la valeur d'albumine supérieure à 29 g/L avec une VPP = 80%.

2. Limites de l'étude

a. Définition du sepsis

La première limite à cette étude est la définition du sepsis. Le sepsis est étudié depuis de nombreuses années en médecine humaine et de nombreuses définitions ont émergées au fil du temps. Afin d'accorder tous les scientifiques sur ce sujet, plusieurs consensus ont été établis. Le troisième et dernier consensus a été établi en 2016 et bouleverse les anciennes définitions. La difficulté est alors de trouver des articles qui répondent aux nouveaux critères du sepsis.

En pédiatrie humaine, la définition du sepsis telle qu'expliquée dans ce consensus n'est pas idéale, ni adaptée. Plusieurs études ont tenté de définir le sepsis néonatal en utilisant comme base le consensus du sepsis adulte. Pour l'instant, aucun consensus n'a été établi.

Enfin en médecine vétérinaire, et notamment en mortalité néonatale, ces définitions ne peuvent donc pas s'appliquer. Il est impossible de transposer les définitions humaines chez l'espèce canine concernant le sepsis. Il est donc primordial de le définir avec précision, chez le chien mais également et surtout chez le chiot.

Dans cette étude, afin de simplifier le sujet, le sepsis néonatal a été réduit à la définition d'une infection bactérienne systémique. Mais pour améliorer le diagnostic du sepsis, il est nécessaire d'en définir tous les aspects avec rigueur. L'étude du sepsis devrait donc passer dans un premier temps par une définition universelle en fonction de l'espèce et de l'âge pour pouvoir étudier par la suite son diagnostic, son pronostic et son traitement.

b. Population étudiée

La population sélectionnée pour cette étude fait partie d'un seul élevage multiracial. La sélection des échantillons témoins a été réalisée de manière aléatoire, parmi les portées n'ayant connu aucun décès afin d'éviter tout biais de contamination mère-chiot ou chiot-chiot. Parmi ces portées dites saines, deux à trois chiots ont été tirés au sort puis sélectionnés en fonction de la quantité disponible de sérum afin d'éviter tout biais de sélection. La population étudiée était limitée (100 individus, 56 témoins, 44 décédés).

La proportion de mâle et de femelle sélectionnés est équivalente. Seulement 14 races sont représentées dans cette étude avec une majorité de races appartenant à un grand format racial. Le format racial moyen (M) comprends une seule race et est sous-représentée.

Les échantillons ont été prélevés en 2012 et 2013, et ont servis pour une expérimentation antérieure. Nous pouvons donc supposer que l'âge des échantillons, leur conservation et le cycle de congélation-décongélation qu'ils ont subi ont pu induire un biais dans les résultats obtenus. En effet, aucune étude n'a été faite sur la durée de conservation à -20°C aussi longue que celle pour notre étude. Outre cet aspect, tous les échantillons ont été soumis aux mêmes conditions et mêmes traitements sans distinction.

De plus, le laps de temps entre les prélèvements sanguins et le décès était variable dans notre étude (entre 0 et 6 jours). En effet, les prélèvements ont tous été effectués au 2^{ème} jour, 7^{ème} jour, 14^{ème} jour ou 21^{ème} jour de vie. Mais la durée entre deux prélèvements pourrait être non suffisante pour détecter le développement d'une infection bactérienne (létale très rapidement chez les chiots nouveau-nés). On peut alors supposer que certains chiots ont été prélevés trop tôt et d'autres trop tard dans l'infection.

c. Choix des paramètres étudiés

Les paramètres étudiés ont été choisis car ce sont des marqueurs de l'inflammation plus ou moins spécifiques. La procalcitonine a été sélectionnée comme biomarqueur spécifique

potentiel du sepsis néonatal chez l'espèce canine et non encore étudiée en médecine vétérinaire. En effet, dans la littérature en médecine humaine, la procalcitonine est déjà utilisée comme un biomarqueur spécifique du sepsis. La protéine C-réactive est également étudiée et utilisée dans la littérature. Enfin l'albumine, les protéines totales, les immunoglobulines et le rapport albumine/globuline ont été choisies comme biomarqueurs non spécifiques de l'infection bactérienne et leur valeurs usuelles sont connues chez l'espèce canine.

3. Perspectives

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de sélectionner des échantillons plus récents, voire frais et en plus grand nombre. Les chiots dont le sérum serait prélevé pourraient faire l'objet d'un examen clinique complet et approfondi, associé au dosage de différents biomarqueurs. De plus, pour la procalcitonine, il est possible également de doser son niveau urinaire avec le test ELISA utilisé pour doser le taux sérique, ce qui permettrait un prélèvement moins invasif pour les chiots. En revanche ce test ELISA ne permettrait pas une utilisation de ce biomarqueur en routine et d'autres outils diagnostique devraient être investigués pour une utilisation plus facile. Une comparaison entre les niveau urinaire et sérique pourraient être utile.

Enfin il pourrait être intéressant d'étudier d'autres biomarqueurs, étudiés en médecine pédiatrique humaine qui pourraient être plus spécifiques et sensibles que les différents biomarqueurs testés dans cette étude comme par exemple les interleukines (Sharma et al. 2018; Gollehon 2019).

Une bactériologie sur sang serait également envisageable. En effet, de nouvelles techniques permettent une culture bactérienne plus rapide (entre 10 et 11h) voire moins selon les espèces bactériennes mises en culture. La culture a un double avantage : elle est plus précise et elle permet de connaître quelles bactéries sont responsables de l'infection. (BACT ALERT Biomérieux) (McGowan, Foster, Coffin 2000; Menchinelli et al. 2019).

CONCLUSION

Le sepsis néonatal est une problématique actuelle importante dans le monde vétérinaire. Il est à l'origine de nombreuses pertes dans les élevages canins et sa détection reste trop tardive pour pouvoir intervenir de manière efficace.

Le sepsis par sa complexité est encore mal défini en médecine humaine, et notamment en pédiatrie. En médecine vétérinaire, il n'existe actuellement pas de consensus pour sa définition, ce qui rend son diagnostic difficile.

L'utilisation de biomarqueurs afin de détecter précocement les signes de sepsis chez les chiots âgés de 0 à 21 jours est nécessaire. Le défi actuel est de trouver le ou les biomarqueurs idéaux, spécifiques et sensibles, afin d'optimiser la prise en charge des chiots. La recherche de nouveaux biomarqueurs en médecine pédiatrique est constante, et elle laisse à la médecine vétérinaire la possibilité d'étudier les biomarqueurs déjà efficaces en pédiatrie.

La procalcitonine et la protéine C-réactive sont deux biomarqueurs qui ont fait leurs preuves en médecine humaine, aussi bien chez les adultes que chez les nourrissons. Ces deux biomarqueurs ont également été utilisés en médecine canine, chez les adultes, et a donné des résultats prometteurs. Ils n'ont pas donné les mêmes résultats dans cette étude.

En revanche cette étude a permis de déterminer des intervalles de références concernant les valeurs pour les paramètres étudiés et de mettre en évidence la non-efficacité de l'utilisation de procalcitonine et protéine C-réactive comme biomarqueurs du sepsis néonatal chez l'espèce canine. De nouvelles études sont nécessaires pour améliorer la méthode d'identification des chiots à risque d'une infection bactérienne, et notamment des prélèvements de ces deux biomarqueurs en série sont à envisager

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Hanna MILA, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de WINKLER Mickaël intitulée « DETECTION PRECOCE DES INFECTIONS BACTERIENNES CHEZ LE CHIOT NOUVEAU-NE » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 22/11/2021
Enseignant-chercheur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Docteure Hanna MILA

Vu :
Le Directeur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Monsieur Pierre SANS

Vu :
La Présidente du jury
Professeure Annabelle MEYNADIER

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul
Sabatier
Monsieur Jean-Marc BROTO
Par délégation, le Doyen de la faculté de
Médecine de Toulouse-Rangueil
Monsieur Elie SERRANO

M. WINKLER Mickaël
a été admis(e) sur concours en : 2016
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 16/07/2020
a validé son année d'approfondissement le: 15/07/2021
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADIB, Minoo, OSTADI, Vajihah, NAVAEI, Fakhri, SAHEB FOSOUL, Fereshteh, OREIZI, Farzad, SHOKOUHI, Raheleh et BAKHSHIANI, Zahra, 2007. Evaluation of CD11b expression on peripheral blood neutrophils for early detection of neonatal sepsis. In : *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology*. juin 2007. Vol. 6, n° 2, pp. 93-96. DOI 06.02/ijaai.9396.

ADLY, Amira A. M., ISMAIL, Eman A., ANDRAWES, Nevine G. et EL-SAADANY, Marwa A., 2014. Circulating soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) as diagnostic and prognostic marker in neonatal sepsis. In : *Cytokine*. février 2014. Vol. 65, n° 2, pp. 184-191. DOI 10.1016/j.cyto.2013.11.004.

AGGOUNI, Charlotte. *Étude de la qualité immunologique et énergétique du colostrum de la chienne : impact sur la santé du chiot*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 93 p.

AL JALBOUT, Nour, TRONCOSO, Ruben, EVANS, Jared D, ROTHMAN, Richard E et HINSON, Jeremiah S, 2019. Biomarkers and Molecular Diagnostics for Early Detection and Targeted Management of Sepsis and Septic Shock in the Emergency Department. In : *The Journal of Applied Laboratory Medicine*. 1 janvier 2019. Vol. 3, n° 4, pp. 724-729. DOI 10.1373/jalm.2018.027425.

ANDALUZ-OJEDA, David, BOBILLO, Felipe, IGLESIAS, Verónica, ALMANSA, Raquel, RICO, Lucía, GANDÍA, Francisco, RESINO, Salvador, TAMAYO, Eduardo, DE LEJARAZU, Raul Ortiz et BERMEJO-MARTIN, Jesús F., 2012. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. In : *Cytokine*. mars 2012. Vol. 57, n° 3, pp. 332-336. DOI 10.1016/j.cyto.2011.12.002.

ANDERSEN, Lars W., MACKENHAUER, Julie, ROBERTS, Jonathan C., BERG, Katherine M., COCCHI, Michael N. et DONNINO, Michael W., 2013. Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels. In : *Mayo Clinic Proceedings*. octobre 2013. Vol. 88, n° 10, pp. 1127-1140. DOI 10.1016/j.mayocp.2013.06.012.

ARNON, S., LITMANOVITZ, I., REGEV, R. H., BAUER, S., SHAINKIN-KESTENBAUM, R. et DOLFIN, T., 2007. Serum amyloid A: an early and accurate marker of neonatal early-onset sepsis. In : *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*. mai 2007. Vol. 27, n° 5, pp. 297-302. DOI 10.1038/sj.jp.7211682.

ARNON, Shmuel, LITMANOVITZ, Ita, REGEV, Rivka, BAUER, Sofia, LIS, Monica, SHAINKIN-KESTENBAUM, Ruth et DOLFIN, Tzipora, 2005. Serum amyloid A protein is a useful inflammatory marker during late-onset sepsis in preterm infants. In : *Biology of the Neonate*. 2005. Vol. 87, n° 2, pp. 105-110. DOI 10.1159/000081979.

ARNON, Shmuel, LITMANOVITZ, Ita, REGEV, Rivka, LIS, Monica, SHAINKIN-KESTENBAUM, Ruth et DOLFIN, Tzipora, 2004. The prognostic virtue of inflammatory markers during late-onset sepsis in preterm infants. In : *Journal of Perinatal Medicine*. 2004. Vol. 32, n° 2, pp. 176-180. DOI 10.1515/JPM.2004.032.

ASSICOT, M., BOHUON, C., GENDREL, D., RAYMOND, J., CARSIN, H. et GUILBAUD, J., 1993. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. In : *The Lancet*. février 1993. Vol. 341, n° 8844, pp. 515-518. DOI 10.1016/0140-6736(93)90277-N.

ATALLA HA, Abdelaziz AA, RAGAB MA. Biomarkers in sepsis. *Menoufia Med J* 2018;31:1110-5

BARTÁKOVÁ, Eva, ŠTEFAN, Marek, STRÁNÍKOVÁ, Alžběta, POSPÍŠILOVÁ, Lenka, ARIENTOVÁ, Simona, BERAN, Ondřej, BLAHUTOVÁ, Marie, MÁCA, Jan et HOLUB, Michal, 2019. Calprotectin and calgranulin C serum levels in bacterial sepsis. In : *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. mars 2019. Vol. 93, n° 3, pp. 219-226. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.006.

BEDFORD RUSSELL, A. R. et KUMAR, R., 2015. Early onset neonatal sepsis: diagnostic dilemmas and practical management. In : *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. juillet 2015. Vol. 100, n° 4, pp. F350-354. DOI 10.1136/archdischild-2014-306193.

BELIN, Marion, 2013. Croissance et mortalité du chiot en élevage. In : . 2013. pp. 82.

BENITZ, W. E., GOULD, J. B. et DRUZIN, M. L., 1999. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. In : *Pediatrics*. juin 1999. Vol. 103, n° 6, pp. e77. DOI 10.1542/peds.103.6.e77.

BENITZ, William E., 2010. Adjunct Laboratory Tests in the Diagnosis of Early-Onset Neonatal Sepsis. In : *Clinics in Perinatology*. juin 2010. Vol. 37, n° 2, pp. 421-438. DOI 10.1016/j.clp.2009.12.001.

BERNER, R., NIEMEYER, C. M., LEITITIS, J. U., FUNKE, A., SCHWAB, C., RAU, U., RICHTER, K., TAWFEEK, M. S., CLAD, A. et BRANDIS, M., 1998. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. In : *Pediatric Research*. octobre 1998. Vol. 44, n° 4, pp. 469-477. DOI 10.1203/00006450-199810000-00002.

BERNER, Reinhard, FÜRLL, Birgitt, STELTER, Felix, DRÖSE, Jana, MÜLLER, Hans-Peter et SCHÜTT, Christine, 2002. Elevated levels of lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 in plasma in neonatal early-onset sepsis. In : *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. mars 2002. Vol. 9, n° 2, pp. 440-445. DOI 10.1128/cdli.9.2.440-445.2002.

BHANDARI, Vineet, WANG, Chao, RINDER, Christine et RINDER, Henry, 2008. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker. In : *Pediatrics*. janvier 2008. Vol. 121, n° 1, pp. 129-134. DOI 10.1542/peds.2007-1308.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP., 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. In : *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. mars 2001. Vol. 69, n° 3, pp. 89-95. DOI 10.1067/mcp.2001.113989.

BIRON, Bethany M., AYALA, Alfred et LOMAS-NEIRA, Joanne L., 2015. Biomarkers for Sepsis: What is and What Might Be? In : *Biomarker Insights*. janvier 2015. Vol. 10s4, pp. BMI.S29519. DOI 10.4137/BMI.S29519.

BISHARA, Nader, 2012. The Use of Biomarkers for Detection of Early- and Late-Onset Neonatal Sepsis. In : *Hematology, Immunology and Infectious Disease: Neonatology Questions and Controversies* [en ligne]. S.l. : Elsevier. pp. 303-315. [Consulté le 19 août 2021]. ISBN 978-1-4377-2662-6. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437726626000183>.

BIZZARRO, Matthew J., RASKIND, Craig, BALTIMORE, Robert S. et GALLAGHER, Patrick G., 2005. Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928-2003. In : *Pediatrics*. septembre 2005. Vol. 116, n° 3, pp. 595-602. DOI 10.1542/peds.2005-0552.

BLEHARSKI, Joshua R., KIESSLER, Viviane, BUONSANTI, Cecilia, SIELING, Peter A., STENGER, Steffen, COLONNA, Marco et MODLIN, Robert L., 2003. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. In : *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1 avril 2003. Vol. 170, n° 7, pp. 3812-3818. DOI 10.4049/jimmunol.170.7.3812.

BLUMENREICH, Martin S., 1990. The White Blood Cell and Differential Count. In : WALKER, H. Kenneth, HALL, W. Dallas et HURST, J. Willis (éd.), *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* [en ligne]. 3rd. Boston : Butterworths. [Consulté le 19 août 2021]. ISBN 978-0-409-90077-4. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK261/>. NBK261

BLUNDEN, A., 1983. The « fading puppy complex »: an assessment of a paraimmunity inducer as a means of control. In : *Veterinary Record*. 27 août 1983. Vol. 113, n° 9, pp. 201-201. DOI 10.1136/vr.113.9.201.

BOSKABADI, Hassan, MAAMOURI, Gholamali, TAVAKOL AFSHARI, Jalil, MAFINEJAD, Shahin, HOSSEINI, Golkoo, MOSTAFAVI-TOROGHI, Hesam, SABER, Hamidreza, GHAYOUR-MOBARHAN, Majid et FERNS, Gordon, 2013. Evaluation of serum interleukins-6, 8 and 10 levels as diagnostic markers of neonatal infection and possibility of mortality. In : *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. décembre 2013. Vol. 16, n° 12, pp. 1232-1237.

CHALUPA, P., BERAN, O., HERWALD, H., KASPŘÍKOVÁ, N. et HOLUB, M., 2011. Evaluation of potential biomarkers for the discrimination of bacterial and viral infections. In : *Infection*. octobre 2011. Vol. 39, n° 5, pp. 411-417. DOI 10.1007/s15010-011-0126-4.

CHAPPUIS, G., 1998. Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. In : *Vaccine*. août 1998. Vol. 16, n° 14-15, pp. 1468-1472. DOI 10.1016/S0264-410X(98)00110-8.

CHIESA, Claudio, PANERO, Alessandra, OSBORN, John F, SIMONETTI, Antonella F et PACIFICO, Lucia, 2004. Diagnosis of Neonatal Sepsis: A Clinical and Laboratory Challenge. In : *Clinical Chemistry*. 1 février 2004. Vol. 50, n° 2, pp. 279-287. DOI 10.1373/clinchem.2003.025171.

CHIESA, Claudio, PANERO, Alessandra, ROSSI, Naila, STEGAGNO, Michele, DE GIUSTI, Maria, OSBORN, John F. et PACIFICO, Lucia, 1998. Reliability of Procalcitonin Concentrations for the Diagnosis of Sepsis in Critically III Neonates. In : *Clinical Infectious Diseases*. mars 1998. Vol. 26, n° 3, pp. 664-672. DOI 10.1086/514576.

CHIESA, Claudio, PELLEGRINI, Gabriella, PANERO, Alessandra, OSBORN, John F, SIGNORE, Fabrizio, ASSUMMA, Marcello et PACIFICO, Lucia, 2003. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Procalcitonin in the Immediate Postnatal Period: Influence of Illness Severity, Risk Status, Antenatal and Perinatal Complications, and Infection. In : *Clinical Chemistry*. 1 janvier 2003. Vol. 49, n° 1, pp. 60-68. DOI 10.1373/49.1.60.

CHRIST-CRAIN, Mirjam, SCHUETZ, Philipp, HUBER, Andreas R. et MÜLLER, Beat, 2008. Procalcitonin: Importance for the diagnosis of bacterial infections 1. In : *LaboratoriumsMedizin*. 1 novembre 2008. Vol. 32, n° 6. DOI 10.1515/JLM.2008.063et.

DE AZEVEDO, José R.A., TORRES, Orlando J.M., BERALDI, Rafael A., RIBAS, Carmen A.P.M. et MALAFAIA, Osvaldo, 2015. Prognostic evaluation of severe sepsis and septic shock: Procalcitonin clearance vs Δ Sequential Organ Failure Assessment. In : *Journal of Critical Care*. février 2015. Vol. 30, n° 1, pp. 219.e9-219.e12. DOI 10.1016/j.jcrc.2014.08.018.

DE BONT, E. S., MARTENS, A., VAN RAAN, J., SAMSON, G., FETTER, W. P., OKKEN, A. et DE LEIJ, L. H., 1993. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. In : *Pediatric Research*. avril 1993. Vol. 33, n° 4 Pt 1, pp. 380-383. DOI 10.1203/00006450-199304000-00013.

DONADELLO, Katia, SCOLLETTA, Sabino, COVAJES, Cecilia et VINCENT, Jean-Louis, 2012. suPAR as a prognostic biomarker in sepsis. In : *BMC Medicine*. décembre 2012. Vol. 10, n° 1, pp. 2. DOI 10.1186/1741-7015-10-2.

ELAWADY, Sanaa, BOTROS, Shahira K., SOROUR, Ashraf E., GHANY, Eman Abdel, ELBATRAN, Gamal et ALI, Raghdaa, 2014. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker of sepsis in neonates. In : *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*. mars 2014. Vol. 62, n° 3, pp. 644-649. DOI 10.2310/JIM.0000000000000060.

FABRIEK, Babs O., DIJKSTRA, Christine D. et VAN DEN BERG, Timo K., 2005. The macrophage scavenger receptor CD163. In : *Immunobiology*. 2005. Vol. 210, n° 2-4, pp. 153-160. DOI 10.1016/j.imbio.2005.05.010.

FANG, Yingying, LI, Chunsheng, SHAO, Rui, YU, Han, ZHANG, Qing et ZHAO, Lianxing, 2015. Prognostic significance of the angiotensin-2/angiotensin-1 and angiotensin-1/Tie-2 ratios for early sepsis in an emergency department. In : *Critical Care (London, England)*. 14 octobre 2015. Vol. 19, pp. 367. DOI 10.1186/s13054-015-1075-6.

FLORAS, A.N.K., HOLOWAYCHUK, M.K., HODGINS, D.C., MARR, H.S., BIRKENHEUER, A., SHARIF, S., BERSENAS, A.M.E. et BIENZLE, D., 2014. Investigation of a Commercial ELISA for the Detection of Canine Procalcitonin. In : *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mars 2014. Vol. 28, n° 2, pp. 599-602. DOI 10.1111/jvim.12309.

FOREST, Jean-Claude, LARIVIÈRE, François, DOLCÉ, Patrick, MASSON, Michel et NADEAU, Linda, 1986. C-reactive protein as biochemical indicator of bacterial infection in neonates. In : *Clinical Biochemistry*. juin 1986. Vol. 19, n° 3, pp. 192-194. DOI 10.1016/S0009-9120(86)80023-6.

FOURNIER, A., MASSON, M., CORBIÈRE, F., MILA, H., MARIANI, C., GRELLET, A. et CHASTANT-MAILLARD, S., 2017. Epidemiological analysis of reproductive performances and kitten mortality rates in 5,303 purebred queens of 45 different breeds and 28,065 kittens in France. In : *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. avril 2017. Vol. 52 Suppl 2, pp. 153-157. DOI 10.1111/rda.12844.

FRANZ, A. R., SIEBER, S., POHLANDT, F., KRON, M. et STEINBACH, G., 2004. Whole blood interleukin 8 and plasma interleukin 8 levels in newborn infants with suspected bacterial infection. In : *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*. mai 2004. Vol. 93, n° 5, pp. 648-653. DOI 10.1111/j.1651-2227.2004.tb02991.x.

FRANZ, Axel R., KRON, Martina, POHLANDT, Frank et STEINBACH, Gerald, 1999. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, C-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants: In : *The Pediatric Infectious Disease Journal*. août 1999. Vol. 18, n° 8, pp. 666-671. DOI 10.1097/00006454-199908000-00003.

FRANZ, Axel R., STEINBACH, Gerald, KRON, Martina et POHLANDT, Frank, 1999. Reduction of Unnecessary Antibiotic Therapy in Newborn Infants Using Interleukin-8 and C-Reactive Protein as Markers of Bacterial Infections. In : *Pediatrics*. 1 septembre 1999. Vol. 104, n° 3, pp. 447-453. DOI 10.1542/peds.104.3.447.

GAO, Shanglan, YANG, Yan, FU, Yun, GUO, Weidong et LIU, Guowei, 2015. Diagnostic and prognostic value of myeloid-related protein complex 8/14 for sepsis. In : *The American Journal of Emergency Medicine*. septembre 2015. Vol. 33, n° 9, pp. 1278-1282. DOI 10.1016/j.ajem.2015.06.025.

GERDES, J. S., 1991. Clinicopathologic approach to the diagnosis of neonatal sepsis. In : *Clinics in Perinatology*. juin 1991. Vol. 18, n° 2, pp. 361-381.

GILL, Marilyn Ann, 2001. PERINATAL AND LATE NEONATAL MORTALITY IN THE DOG. In : . 2001. pp. 190.

GOLLEHON, Nathan S, 2019. Neonatal sepsis. In : . 2019. pp. 27.

GEFFRÉ A., CONCORDET D., BRAUN J.-P., TRUMEL C. (2011) Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol* 40(1), 107-112

GRUNDY, Sophie A., 2006. Clinically Relevant Physiology of the Neonate. In : *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. mai 2006. Vol. 36, n° 3, pp. 443-459. DOI 10.1016/j.cvsm.2005.12.002.

GUTTEBERG, T. J., HANEBERG, B. et JØRGENSEN, T., 1984. Lactoferrin in relation to acute phase proteins in sera from newborn infants with severe infections. In : *European Journal of Pediatrics*. avril 1984. Vol. 142, n° 1, pp. 37-39. DOI 10.1007/BF00442588.

HAHN, Won-Ho, SONG, Joon-Hwan, PARK, Il-Sung, KIM, Ho, PARK, Suyeon et OH, Myung-Ho, 2015. Reference Intervals of Serum Procalcitonin Are Affected by Postnatal Age in Very Low Birth Weight Infants during the First 60 Days after Birth. In : *Neonatology*. 2015.

Vol. 108, n° 1, pp. 60-64. DOI 10.1159/000381330.

HAMED, Sonja, BEHNES, Michael, PAULY, Dominic, LEPIORZ, Dominic, BARRE, Max, BECHER, Tobias, LANG, Siegfried, AKIN, Ibrahim, BORGGREFE, Martin, BERTSCH, Thomas et HOFFMANN, Ursula, 2017. Diagnostic value of Pentraxin-3 in patients with sepsis and septic shock in accordance with latest sepsis-3 definitions. In : *BMC Infectious Diseases*. décembre 2017. Vol. 17, n° 1, pp. 554. DOI 10.1186/s12879-017-2606-3.

HAUPTMAN, J. G., WALSHAW, R. et OLIVIER, N. B., 1997. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. In : *Veterinary surgery: VS*. octobre 1997. Vol. 26, n° 5, pp. 393-397. DOI 10.1111/j.1532-950x.1997.tb01699.x.

HEDEGAARD, Sofie Sommer, WISBORG, Kirsten et HVAS, Anne-Mette, 2015. Diagnostic utility of biomarkers for neonatal sepsis – a systematic review. In : *Infectious Diseases*. 4 mars 2015. Vol. 47, n° 3, pp. 117-124. DOI 10.3109/00365548.2014.971053.

HODGE, G., HODGE, S., HAN, P. et HASLAM, R., 2004. Multiple leucocyte activation markers to detect neonatal infection. In : *Clinical and Experimental Immunology*. janvier 2004. Vol. 135, n° 1, pp. 125-129. DOI 10.1111/j.1365-2249.2004.02346.x.

HOFER, Nora, ZACHARIAS, Eva, MÜLLER, Wilhelm et RESCH, Bernhard, 2012. An Update on the Use of C-Reactive Protein in Early-Onset Neonatal Sepsis: Current Insights and New Tasks. In : *Neonatology*. 2012. Vol. 102, n° 1, pp. 25-36. DOI 10.1159/000336629.

HORNIK, C. P., FORT, P., CLARK, R. H., WATT, K., BENJAMIN, D. K., SMITH, P. B., MANZONI, P., JACQZ-AIGRAIN, E., KAGUELIDOU, F. et COHEN-WOLKOWIEZ, M., 2012. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. In : *Early Human Development*. mai 2012. Vol. 88 Suppl 2, pp. S69-74. DOI 10.1016/S0378-3782(12)70019-1.

HOSKINS, Johnny D, 2001. Puppy and Kitten Losses. In : . 2001. pp. 5.

HOU, Tieying, HUANG, Dehong, ZENG, Rong, YE, Zhiming et ZHANG, Yu, 2015. Accuracy of serum interleukin (IL)-6 in sepsis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. In : *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015. Vol. 8, n° 9, pp. 15238-15245.

INDREBØ, Astrid, TRANGERUD, Cathrine et MOE, Lars, 2007. Canine neonatal mortality in four large breeds. In : *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2007. pp. 5.

JAYE, David L. et WAITES, Ken B., 1997. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics: In : *The Pediatric Infectious Disease Journal*. août 1997. Vol. 16, n° 8, pp. 735-747. DOI 10.1097/00006454-199708000-00003.

KALIA, Y. N., NONATO, L. B., LUND, C. H. et GUY, R. H., 1998. Development of skin barrier function in premature infants. In : *The Journal of Investigative Dermatology*. août 1998. Vol. 111, n° 2, pp. 320-326. DOI 10.1046/j.1523-1747.1998.00289.x.

KHATER, Walaa S., SALAH-ELDEEN, Noha N., KHATER, Mohamed S. et SALEH, Asghraf N., 2016. Role of suPAR and Lactic Acid in Diagnosing Sepsis and Predicting Mortality in

Elderly Patients. In : *European Journal of Microbiology & Immunology*. 29 septembre 2016. Vol. 6, n° 3, pp. 178-185. DOI 10.1556/1886.2016.00011.

KI, Ogbu, SO, Ochai, MMA, Danladi, MH, Abdullateef, EO, Agwu et JG, Gyengdeng, 2016. A review of Neonatal mortality in Dogs. In : . 2016. Vol. 4, pp. 10.

KIM, Mi-Hee et CHOI, Jung-Hyun, 2020. An Update on Sepsis Biomarkers. In : *Infection & Chemotherapy*. 2020. Vol. 52, n° 1, pp. 1. DOI 10.3947/ic.2020.52.1.1.

KISHIMOTO, T., 1989. The biology of interleukin-6. In : *Blood*. juillet 1989. Vol. 74, n° 1, pp. 1-10.

KLINGER, Gil, LEVY, Itzhak, SIROTA, Lea, BOYKO, Valentina, REICHMAN, Brian et LERNER-GEVA, Liat, 2009. Epidemiology and risk factors for early onset sepsis among very-low-birthweight infants. In : *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. juillet 2009. Vol. 201, n° 1, pp. 38.e1-38.e6. DOI 10.1016/j.ajog.2009.03.006.

KOENIG, Joyce M. et YODER, Mervin C., 2004. Neonatal neutrophils: the good, the bad, and the ugly. In : *Clinics in Perinatology*. mars 2004. Vol. 31, n° 1, pp. 39-51. DOI 10.1016/j.clp.2004.03.013.

KOLB-BACHOFEN, Victoria, 1991. A Review on the Biological Properties of C-Reactive Protein. In : *Immunobiology*. septembre 1991. Vol. 183, n° 1-2, pp. 133-145. DOI 10.1016/S0171-2985(11)80193-2.

KRUSE, Ole, GRUNNET, Niels et BARFOD, Charlotte, 2011. Blood lactate as a predictor for in-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review. In : *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. 2011. Vol. 19, n° 1, pp. 74. DOI 10.1186/1757-7241-19-74.

KÜSTER, H., WEISS, M., WILLEITNER, A. E., DETLEFSEN, S., JEREMIAS, I., ZBOJAN, J., GEIGER, R., LIPOWSKY, G. et SIMBRUNER, G., 1998. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. In : *Lancet (London, England)*. 17 octobre 1998. Vol. 352, n° 9136, pp. 1271-1277. DOI 10.1016/S0140-6736(98)08148-3.

KWEON, Oh Joo, CHOI, Jee-Hye, PARK, Sang Kil et PARK, Ae Ja, 2014. Usefulness of presepsin (sCD14 subtype) measurements as a new marker for the diagnosis and prediction of disease severity of sepsis in the Korean population. In : *Journal of Critical Care*. décembre 2014. Vol. 29, n° 6, pp. 965-970. DOI 10.1016/j.jcrc.2014.06.014.

LAM, Hugh S. et NG, Pak C, 2007. Diagnostic markers for neonatal sepsis. In : *Fetal and Maternal Medicine Review*. février 2007. Vol. 18, n° 1, pp. 53-65. DOI 10.1017/S0965539507001866.

LARSSON, Anders, TYDÉN, Jonas, JOHANSSON, Joakim, LIPCSEY, Miklos, BERGQUIST, Maria, KULTIMA, Kim et MANDIC-HAVELKA, Aleksandra, 2020. Calprotectin is superior to procalcitonin as a sepsis marker and predictor of 30-day mortality in intensive care patients. In : *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. avril 2020. Vol. 80, n° 2, pp. 156-161. DOI 10.1080/00365513.2019.1703216.

LAWLER, D.F., 2008. Neonatal and pediatric care of the puppy and kitten. In : *Theriogenology*. août 2008. Vol. 70, n° 3, pp. 384-392. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.04.019.

LEE, Wan Soo, KANG, Dae Woong, BACK, Jong Hun, KIM, Hyun Lee, CHUNG, Jong Hoon et SHIN, Byung Chul, 2015. Cutoff value of serum procalcitonin as a diagnostic biomarker of infection in end-stage renal disease patients. In : *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2015. Vol. 30, n° 2, pp. 198. DOI 10.3904/kjim.2015.30.2.198.

LELIGDOWICZ, Aleksandra, RICHARD-GREENBLATT, Melissa, WRIGHT, Julie, CROWLEY, Valerie M. et KAIN, Kevin C., 2018. Endothelial Activation: The Ang/Tie Axis in Sepsis. In : *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 9, pp. 838. DOI 10.3389/fimmu.2018.00838.

LEVY, Ofer, 2007. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. In : *Nature Reviews. Immunology*. mai 2007. Vol. 7, n° 5, pp. 379-390. DOI 10.1038/nri2075.

LV, Bokun, HUANG, Jie, YUAN, Haining, HU, Guang et WANG, Jian, 2014. Tumor Necrosis Factor- α as a Diagnostic Marker for Neonatal Sepsis: A Meta-Analysis. In : *The Scientific World Journal*. 2014. Vol. 2014, pp. 1-14. DOI 10.1155/2014/471463.

MALEK, A., SAGER, R. et SCHNEIDER, H., 1994. Maternal-fetal transport of immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy. In : *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*. août 1994. Vol. 32, n° 1, pp. 8-14. DOI 10.1111/j.1600-0897.1994.tb00873.x.

MANKHAMBO, Limangeni A, BANDA, Daniel L, THE IPD STUDY GROUP, JEFFERS, Graham, WHITE, Sarah A, BALMER, Paul, NKHOMA, Standwell, PHIRI, Happy, MOLYNEUX, Elizabeth M, HART, C Anthony, MOLYNEUX, Malcolm E, HEYDERMAN, Robert S et CARROL, Enitan D, 2010. The role of angiogenic factors in predicting clinical outcome in severe bacterial infection in Malawian children. In : *Critical Care*. 2010. Vol. 14, n° 3, pp. R91. DOI 10.1186/cc9025.

MANROE, B. L., WEINBERG, A. G., ROSENFELD, C. R. et BROWNE, R., 1979. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. In : *The Journal of Pediatrics*. juillet 1979. Vol. 95, n° 1, pp. 89-98. DOI 10.1016/s0022-3476(79)80096-7.

MARÓDI, László, 2006. Innate cellular immune responses in newborns. In : *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*. mars 2006. Vol. 118, n° 2-3, pp. 137-144. DOI 10.1016/j.clim.2005.10.012.

MARUNA, P., NEDELNÍKOVÁ, K. et GÜRLICH, R., 2000. Physiology and genetics of procalcitonin. In : *Physiological Research*. 2000. Vol. 49 Suppl 1, pp. S57-61.

MATHUR, N. B., AGARWAL, Himanshu S. et MARIA, Arti, 2006. Acute renal failure in neonatal sepsis. In : *Indian Journal of Pediatrics*. juin 2006. Vol. 73, n° 6, pp. 499-502. DOI 10.1007/BF02759894.

MEHR, S. et DOYLE, L. W., 2000. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. In : *The Pediatric Infectious Disease Journal*. septembre 2000. Vol. 19, n° 9, pp. 879-887. DOI 10.1097/00006454-200009000-00014.

MELONI, Tea, MARTINO, Piera A. et GRIECO, Valeria, 2014. A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs. In : *Veterinaria Italiana*. 31 décembre 2014. n° 50(4), pp. 293-299. DOI 10.12834/VetIt.45.2244.2.

MILA H, CHASTANT-MAILLARD S. Variability of mortality risk factors with age in puppies. Proceedings of Annual Meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Ghent, Belgium; 2015.

MILA, H., GRELLET, A., FEUGIER, A. et CHASTANT-MAILLARD, S., 2015. Differential impact of birth weight and early growth on neonatal mortality in puppies. In : *Journal of Animal Science*. septembre 2015. Vol. 93, n° 9, pp. 4436-4442. DOI 10.2527/jas.2015-8971.

MILANI, C, CORRÒ, M, DRIGO, M et ROTA, A, 2012. Antimicrobial resistance in bacteria from breeding dogs housed in kennels with differing neonatal mortality and use of antibiotics. In : . 2012. pp. 8.

MISHRA, U. K., JACOBS, S. E., DOYLE, L. W. et GARLAND, S. M., 2006. Newer approaches to the diagnosis of early onset neonatal sepsis. In : *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. mai 2006. Vol. 91, n° 3, pp. F208-212. DOI 10.1136/adc.2004.064188.

MÜNNICH, A., 2008. The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. In : *Veterinary Research Communications*. septembre 2008. Vol. 32, n° S1, pp. 81-85. DOI 10.1007/s11259-008-9096-0.

MÜNNICH, A et KÜCHENMEISTER, U, 2014. Causes, Diagnosis and Therapy of Common Diseases in Neonatal Puppies in the First Days of Life: Cornerstones of Practical Approach. In : *Reproduction in Domestic Animals*. juin 2014. Vol. 49, pp. 64-74. DOI 10.1111/rda.12329.

MURPHY, Kara et WEINER, Joel, 2012. Use of leukocyte counts in evaluation of early-onset neonatal sepsis. In : *The Pediatric Infectious Disease Journal*. janvier 2012. Vol. 31, n° 1, pp. 16-19. DOI 10.1097/INF.0b013e31822ffc17.

NG, P. C., 2004. Diagnostic markers of infection in neonates. In : *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. mai 2004. Vol. 89, n° 3, pp. F229-235. DOI 10.1136/adc.2002.023838.

NG, P. C., CHENG, S. H., CHUI, K. M., FOK, T. F., WONG, M. Y., WONG, W., WONG, R. P. et CHEUNG, K. L., 1997. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. In : *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. novembre 1997. Vol. 77, n° 3, pp. F221-227. DOI 10.1136/fn.77.3.f221.

NG, Pak C. et LAM, Hugh S., 2006. Diagnostic markers for neonatal sepsis. In : *Current Opinion in Pediatrics*. avril 2006. Vol. 18, n° 2, pp. 125-131. DOI 10.1097/01.mop.0000193293.87022.4c.

NIELEN, A L J, 1998. Investigation of mortality and pathological changes in a 14-month birth cohort of boxer puppies. In : *The Veterinary Record*. 1998. pp. 5.

NIZET, Victor et KLEIN, Jerome O., 2011. Bacterial Sepsis and Meningitis. In : *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn* [en ligne]. S.l. : Elsevier. pp. 222-275. [Consulté le 4 février 2021]. ISBN 978-1-4160-6400-8. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416064008000067>.

NUPPONEN, I., ANDERSSON, S., JÄRVENPÄÄ, A. L., KAUTIAINEN, H. et REPO, H., 2001. Neutrophil CD11b expression and circulating interleukin-8 as diagnostic markers for early-onset neonatal sepsis. In : *Pediatrics*. juillet 2001. Vol. 108, n° 1, pp. E12. DOI 10.1542/peds.108.1.e12.

ÖNAL, Uğur, VALENZUELA-SÁNCHEZ, Francisco, VANDANA, Kalwaje Eshwara et RELLO, Jordi, 2018. Mid-Regional Pro-Adrenomedullin (MR-proADM) as a Biomarker for Sepsis and Septic Shock: Narrative Review. In : *Healthcare (Basel, Switzerland)*. 3 septembre 2018. Vol. 6, n° 3, pp. E110. DOI 10.3390/healthcare6030110.

OPAL, S. M., SCANNON, P. J., VINCENT, J. L., WHITE, M., CARROLL, S. F., PALARDY, J. E., PAREJO, N. A., PRIBBLE, J. P. et LEMKE, J. H., 1999. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. In : *The Journal of Infectious Diseases*. novembre 1999. Vol. 180, n° 5, pp. 1584-1589. DOI 10.1086/315093.

ORFANOS, Stylianos E., KOTANIDOU, Anastasia, GLYNOS, Constantinos, ATHANASIOU, Chariclea, TSIGKOS, Stelios, DIMOPOULOU, Ioanna, SOTIROPOULOU, Christina, ZAKYNTHINOS, Spyros, ARMAGANIDIS, Apostolos, PAPAPETROPOULOS, Andreas et ROUSSOS, Charis, 2007. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. In : *Critical Care Medicine*. janvier 2007. Vol. 35, n° 1, pp. 199-206. DOI 10.1097/01.CCM.0000251640.77679.D7.

PARIKH, Samir M., 2017. The Angiopoietin-Tie2 Signaling Axis in Systemic Inflammation. In : *Journal of the American Society of Nephrology*. juillet 2017. Vol. 28, n° 7, pp. 1973-1982. DOI 10.1681/ASN.2017010069.

PAVCNIK-ARNOL, Maja, HOJKER, Sergej et DERGANČ, Metka, 2007. Lipopolysaccharide-binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children. In : *Intensive Care Medicine*. juin 2007. Vol. 33, n° 6, pp. 1025-1032. DOI 10.1007/s00134-007-0626-y.

PIERRAKOS, Charalampos et VINCENT, Jean-Louis, 2010. Sepsis biomarkers: a review. In : *Critical Care*. 2010. Vol. 14, n° 1, pp. R15. DOI 10.1186/cc8872.

POLIN, Richard A. et COMMITTEE ON FETUS AND NEWBORN, 2012. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. In : *Pediatrics*. mai 2012. Vol. 129, n° 5, pp. 1006-1015. DOI 10.1542/peds.2012-0541.

PONTRELLI, Giuseppe, DE CRESCENZO, Franco, BUZZETTI, Roberto, JENKNER, Alessandro, BALDUZZI, Sara, CALÒ CARDUCCI, Francesca, AMODIO, Donato, DE

LUCA, Maia, CHIURCHIÙ, Sara, DAVIES, Elin Haf, COPPONI, Giorgia, SIMONETTI, Alessandra, FERRETTI, Elena, DI FRANCO, Valeria, RASI, Virginia, DELLA CORTE, Martina, GRAMATICA, Luca, CIABATTINI, Marco, LIVADIOTTI, Susanna et ROSSI, Paolo, 2017. Accuracy of serum procalcitonin for the diagnosis of sepsis in neonates and children with systemic inflammatory syndrome: a meta-analysis. In : *BMC Infectious Diseases*. décembre 2017. Vol. 17, n° 1, pp. 302. DOI 10.1186/s12879-017-2396-7.

PORTE, Rémi, DAVOUDIAN, Sadaf, ASGARI, Fatemeh, PARENTE, Raffaella, MANTOVANI, Alberto, GARLANDA, Cecilia et BOTTAZZI, Barbara, 2019. The Long Pentraxin PTX3 as a Humoral Innate Immunity Functional Player and Biomarker of Infections and Sepsis. In : *Frontiers in Immunology*. 2019. Vol. 10, pp. 794. DOI 10.3389/fimmu.2019.00794.

PRASHANT, Akila, VISHWANATH, Prashant, KULKARNI, Praveen, SATHYA NARAYANA, Prashanth, GOWDARA, Vijaykumar, NATARAJ, Suma M. et NAGARAJ, Rashmi, 2013. Comparative Assessment of Cytokines and Other Inflammatory Markers for the Early Diagnosis of Neonatal Sepsis—A Case Control Study. In : SCHULZ, Christian (éd.), *PLoS ONE*. 15 juillet 2013. Vol. 8, n° 7, pp. e68426. DOI 10.1371/journal.pone.0068426.

RABOISSON, D., DELOR, F., CAHUZAC, E., GENDRE, C., SANS, P. et ALLAIRE, G., 2013. Perinatal, neonatal, and rearing period mortality of dairy calves and replacement heifers in France. In : *Journal of Dairy Science*. mai 2013. Vol. 96, n° 5, pp. 2913-2924. DOI 10.3168/jds.2012-6010.

RAYNOR, Laura L., SAUCERMAN, Jeffrey J., AKINOLA, Modupeola O., LAKE, Douglas E., MOORMAN, J. Randall et FAIRCHILD, Karen D., 2012. Cytokine screening identifies NICU patients with Gram-negative bacteremia. In : *Pediatric Research*. mars 2012. Vol. 71, n° 3, pp. 261-266. DOI 10.1038/pr.2011.45.

REINHART, K., BAUER, M., RIEDEMANN, N. C. et HARTOG, C. S., 2012. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. In : *Clinical Microbiology Reviews*. 1 octobre 2012. Vol. 25, n° 4, pp. 609-634. DOI 10.1128/CMR.00016-12.

REINHART, Konrad, MEISNER, Michael et BRUNKHORST, Frank M., 2006. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? In : *Critical Care Clinics*. juillet 2006. Vol. 22, n° 3, pp. 503-519, ix- x. DOI 10.1016/j.ccc.2006.03.003.

REINSBERG, J., DEMBINSKI, J., DORN, C., BEHRENDT, D., BARTMANN, P. et VAN DER VEN, H., 2000. Determination of total interleukin-8 in whole blood after cell lysis. In : *Clinical Chemistry*. septembre 2000. Vol. 46, n° 9, pp. 1387-1394.

RESCH, B., GUSENLEITNER, W. et MÜLLER, W. D., 2003. Procalcitonin and interleukin-6 in the diagnosis of early-onset sepsis of the neonate. In : *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*. 2003. Vol. 92, n° 2, pp. 243-245. DOI 10.1111/j.1651-2227.2003.tb00534.x.

RIEDEL, Stefan, MELENDEZ, Johan H., AN, Amanda T., ROSENBAUM, Janet E. et ZENILMAN, Jonathan M., 2011. Procalcitonin as a Marker for the Detection of Bacteremia and Sepsis in the Emergency Department. In : *American Journal of Clinical Pathology*. 1 février 2011. Vol. 135, n° 2, pp. 182-189. DOI 10.1309/AJCP1MFYINQLECV2.

ROMUALDO, Luis García de Guadiana, TORRELLA, Patricia Esteban, GONZÁLEZ, Monserrat Viqueira, SÁNCHEZ, Roberto Jiménez, HOLGADO, Ana Hernando, FREIRE, Alejandro Ortín, ACEBES, Sergio Rebollo et OTÓN, María Dolores Albaladejo, 2014. Diagnostic accuracy of presepsin (soluble CD14 subtype) for prediction of bacteremia in patients with systemic inflammatory response syndrome in the Emergency Department. In : *Clinical Biochemistry*. mai 2014. Vol. 47, n° 7-8, pp. 505-508. DOI 10.1016/j.clinbiochem.2014.02.011.

RUSSWURM, Stefan, WIEDERHOLD, Matthias, OBERHOFFER, Mathias, STONANS, Ilmars, ZIPFEL, Peter F. et REINHART, Konrad, 1999. Molecular Aspects and Natural Source of Procalcitonin. In : *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [en ligne]. 22 janvier 1999. Vol. 37, n° 8. [Consulté le 18 août 2021]. DOI 10.1515/CCLM.1999.119. Disponible à l'adresse : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.1999.119/html>.

RUTTER, N., 2000. Clinical consequences of an immature barrier. In : *Seminars in neonatology: SN*. novembre 2000. Vol. 5, n° 4, pp. 281-287. DOI 10.1053/siny.2000.0014.

SALDIR, Mehmet, TUNC, Turan, CEKMEZ, Ferhat, CETINKAYA, Merih, KALAYCI, Tugce, FIDANCI, Kursat, BABACAN, Oguzhan, ERDEM, Galip, KOCAK, Necmettin, SARI, Erkan, AKGUL, Emin Ozgur et KUL, Mustafa, 2015. Endocan and Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 as Novel Markers for Neonatal Sepsis. In : *Pediatrics and Neonatology*. décembre 2015. Vol. 56, n° 6, pp. 415-421. DOI 10.1016/j.pedneo.2015.03.006.

SCHMUTZ, N., HENRY, E., JOPLING, J. et CHRISTENSEN, R. D., 2008. Expected ranges for blood neutrophil concentrations of neonates: the Manroe and Mouzinho charts revisited. In : *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*. avril 2008. Vol. 28, n° 4, pp. 275-281. DOI 10.1038/sj.jp.7211916.

SEOL, Chang Hwan, YONG, Seung Hyun, SHIN, Ju Hye, LEE, Su Hwan, LEEM, Ah Young, PARK, Moo Suk, KIM, Young Sam et CHUNG, Kyung Soo, 2020. The ratio of plasma angiopoietin-2 to angiopoietin-1 as a prognostic biomarker in patients with sepsis. In : *Cytokine*. mai 2020. Vol. 129, pp. 155029. DOI 10.1016/j.cyto.2020.155029.

SHABANI, Fatemeh, FARASAT, Alireza, MAHDAVI, Majid et GHEIBI, Nematollah, 2018. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. In : *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*. octobre 2018. Vol. 67, n° 10, pp. 801-812. DOI 10.1007/s00011-018-1173-4.

SHAPIRO, Nathan I., HOWELL, Michael D., TALMOR, Daniel, NATHANSON, Larry A., LISBON, Alan, WOLFE, Richard E. et WEISS, J. Woodrow, 2005. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. In : *Annals of Emergency Medicine*. mai 2005. Vol. 45, n° 5, pp. 524-528. DOI 10.1016/j.annemergmed.2004.12.006.

SHARMA, Deepak, FARAHA BAKHSH, Nazanin, SHASTRI, Sweta et SHARMA, Pradeep, 2018. Biomarkers for diagnosis of neonatal sepsis: a literature review. In : *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 18 juin 2018. Vol. 31, n° 12, pp. 1646-1659. DOI 10.1080/14767058.2017.1322060.

SHEFFIELD CHILDREN'S HOSPITAL NHSFT Laboratory Handbook 2015

SIAHANIDOU, Tania, MARGELI, Alexandra, TSIROGIANNI, Chrysanthi, CHARONI, Stavroula, GIANNAKI, Maria, VAVOURAKIS, Eustathios, CHARISIADOU, Athina et PAPASSOTIRIOU, Ioannis, 2014. Clinical value of plasma soluble urokinase-type plasminogen activator receptor levels in term neonates with infection or sepsis: a prospective study. In : *Mediators of Inflammation*. 2014. Vol. 2014, pp. 375702. DOI 10.1155/2014/375702.

SILVEIRA, R. C. et PROCIANOY, R. S., 1999. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta for early diagnosis of neonatal sepsis. In : *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*. juin 1999. Vol. 88, n° 6, pp. 647-650. DOI 10.1080/08035259950169314.

SINGER, Mervyn, DEUTSCHMAN, Clifford S., SEYMOUR, Christopher Warren, SHANKAR-HARI, Manu, ANNANE, Djillali, BAUER, Michael, BELLOMO, Rinaldo, BERNARD, Gordon R., CHICHE, Jean-Daniel, COOPERSMITH, Craig M., HOTCHKISS, Richard S., LEVY, Mitchell M., MARSHALL, John C., MARTIN, Greg S., OPAL, Steven M., RUBENFELD, Gordon D., VAN DER POLL, Tom, VINCENT, Jean-Louis et ANGUS, Derek C., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). In : *JAMA*. 23 février 2016. Vol. 315, n° 8, pp. 801. DOI 10.1001/jama.2016.0287.

SRIDHARAN, Prasanna et CHAMBERLAIN, Ronald S., 2013. The Efficacy of Procalcitonin as a Biomarker in the Management of Sepsis: Slaying Dragons or Tilting at Windmills? In : *Surgical Infections*. décembre 2013. Vol. 14, n° 6, pp. 489-511. DOI 10.1089/sur.2012.028.

SRINIVASAN, Lakshmi et HARRIS, Mary C., 2012. New technologies for the rapid diagnosis of neonatal sepsis. In : *Current Opinion in Pediatrics*. avril 2012. Vol. 24, n° 2, pp. 165-171. DOI 10.1097/MOP.0b013e3283504df3.

STOLL, B. J., HANSEN, N., FANAROFF, A. A., WRIGHT, L. L., CARLO, W. A., EHRENKRANZ, R. A., LEMONS, J. A., DONOVAN, E. F., STARK, A. R., TYSON, J. E., OH, W., BAUER, C. R., KORONES, S. B., SHANKARAN, S., LAPTOOK, A. R., STEVENSON, D. K., PAPILE, L.-A. et POOLE, W. K., 2002. Late-Onset Sepsis in Very Low Birth Weight Neonates: The Experience of the NICHD Neonatal Research Network. In : *PEDIATRICS*. 1 août 2002. Vol. 110, n° 2, pp. 285-291. DOI 10.1542/peds.110.2.285.

STOLL, Barbara J., HANSEN, Nellie, FANAROFF, Avroy A., WRIGHT, Linda L., CARLO, Waldemar A., EHRENKRANZ, Richard A., LEMONS, James A., DONOVAN, Edward F., STARK, Ann R., TYSON, Jon E., OH, William, BAUER, Charles R., KORONES, Sheldon B., SHANKARAN, Seetha, LAPTOOK, Abbot R., STEVENSON, David K., PAPILE, Lu-Ann et POOLE, W. Kenneth, 2002. Changes in Pathogens Causing Early-Onset Sepsis in Very-Low-Birth-Weight Infants. In : *New England Journal of Medicine*. 25 juillet 2002. Vol. 347, n° 4, pp. 240-247. DOI 10.1056/NEJMoa012657.

STOLL, Barbara J., HANSEN, Nellie I., HIGGINS, Rosemary D., FANAROFF, Avroy A., DUARA, Shahnaz, GOLDBERG, Ronald, LAPTOOK, Abbot, WALSH, Michelle, OH, William et HALE, Ellen, 2005. Very Low Birth Weight Preterm Infants With Early Onset Neonatal Sepsis: The Predominance of Gram-Negative Infections Continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. In : *The Pediatric Infectious Disease Journal*. juillet 2005. Vol. 24, n° 7, pp. 635-639. DOI 10.1097/01.inf.0000168749.82105.64.

SULLIVAN, Sandra E., STABA, Susan L., GERSTING, Jason A., HUTSON, Alan D., THERIAQUE, Douglas, CHRISTENSEN, Robert D. et CALHOUN, Darlene A., 2002. Circulating concentrations of chemokines in cord blood, neonates, and adults. In : *Pediatric Research*. mai 2002. Vol. 51, n° 5, pp. 653-657. DOI 10.1203/00006450-200205000-00018.

TØNNESEN, R., BORGE, K. Sverdrup, NØDTVEDT, A. et INDREBØ, A., 2012. Canine perinatal mortality: A cohort study of 224 breeds. In : *Theriogenology*. juin 2012. Vol. 77, n° 9, pp. 1788-1801. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.12.023.

VERBOON-MACIOLEK, Malgorzata A., KREDIET, Tannette G., GERARDS, Leo J., FLEER, Andre et VAN LOON, Ton M., 2005. Clinical and epidemiologic characteristics of viral infections in a neonatal intensive care unit during a 12-year period. In : *The Pediatric Infectious Disease Journal*. octobre 2005. Vol. 24, n° 10, pp. 901-904. DOI 10.1097/01.inf.0000180471.03702.7f.

VIAGGI, Bruno, POOLE, Daniele, TUJJAR, Omar, MARCHIANI, Silvia, OGNIBENE, Agostino et FINAZZI, Stefano, 2018. Mid regional pro-adrenomedullin for the prediction of organ failure in infection. Results from a single centre study. In : SHIMOSAWA, Tatsuo (éd.), *PLOS ONE*. 13 août 2018. Vol. 13, n° 8, pp. e0201491. DOI 10.1371/journal.pone.0201491.

WACKER, Christina, PRKNO, Anna, BRUNKHORST, Frank M et SCHLATTMANN, Peter, 2013. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. In : *The Lancet Infectious Diseases*. mai 2013. Vol. 13, n° 5, pp. 426-435. DOI 10.1016/S1473-3099(12)70323-7.

WEIRICH, E., RABIN, R. L., MALDONADO, Y., BENITZ, W., MODLER, S., HERZENBERG, L. A. et HERZENBERG, L. A., 1998. Neutrophil CD11b expression as a diagnostic marker for early-onset neonatal infection. In : *The Journal of Pediatrics*. mars 1998. Vol. 132, n° 3 Pt 1, pp. 445-451. DOI 10.1016/s0022-3476(98)70018-6.

WHICHER, John, BIENVENU, Jacques et MONNERET, Guillaume, 2001. Procalcitonin as an Acute Phase Marker. In : *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. septembre 2001. Vol. 38, n° 5, pp. 483-493. DOI 10.1177/000456320103800505.

WHITESIDE, T. L., 1994. Cytokine measurements and interpretation of cytokine assays in human disease. In : *Journal of Clinical Immunology*. novembre 1994. Vol. 14, n° 6, pp. 327-339. DOI 10.1007/BF01546317.

WILLIAMS, Julian M., GREENSLADE, Jaimi H., MCKENZIE, Juliet V., CHU, Kevin, BROWN, Anthony F.T. et LIPMAN, Jeffrey, 2017. Systemic Inflammatory Response Syndrome, Quick Sequential Organ Function Assessment, and Organ Dysfunction. In : *Chest*. mars 2017. Vol. 151, n° 3, pp. 586-596. DOI 10.1016/j.chest.2016.10.057.

WYNN, James L., 2016. Defining neonatal sepsis. In : *Current Opinion in Pediatrics*. avril 2016. Vol. 28, n° 2, pp. 135-140. DOI 10.1097/MOP.0000000000000315.

WYNN, James L. et WONG, Hector R., 2017. Pathophysiology of Neonatal Sepsis. In : *Fetal and Neonatal Physiology* [en ligne]. S.l. : Elsevier. pp. 1536-1552.e10. [Consulté le 18 novembre 2020]. ISBN 978-0-323-35214-7. Disponible à l'adresse :

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323352147001529>.

YANG, Ai-Ping, LIU, Jun, YUE, Lei-He, WANG, Hong-Qi, YANG, Wen-Juan et YANG, Guo-Hui, 2016. Neutrophil CD64 combined with PCT, CRP and WBC improves the sensitivity for the early diagnosis of neonatal sepsis. In : *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [en ligne]. 1 janvier 2016. Vol. 54, n° 2. [Consulté le 25 août 2021]. DOI 10.1515/cclm-2015-0277. Disponible à l'adresse : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2015-0277/html>.

YANG, Hyun Suk, HUR, Mina, YI, Ahram, KIM, Hanah, LEE, Seungho et KIM, Soo-Nyung, 2018. Prognostic value of presepsin in adult patients with sepsis: Systematic review and meta-analysis. In : *PloS One*. 2018. Vol. 13, n° 1, pp. e0191486. DOI 10.1371/journal.pone.0191486.

YU, Han, QI, Zhijiang, HANG, Chenchen, FANG, Yingying, SHAO, Rui et LI, Chunsheng, 2017. Evaluating the value of dynamic procalcitonin and presepsin measurements for patients with severe sepsis. In : *The American Journal of Emergency Medicine*. juin 2017. Vol. 35, n° 6, pp. 835-841. DOI 10.1016/j.ajem.2017.01.037.

YU, V.Y.H., 2003. Global, regional and national perinatal and neonatal mortality. In : *Journal of Perinatal Medicine* [en ligne]. 1 janvier 2003. Vol. 31, n° 5. [Consulté le 27 août 2021]. DOI 10.1515/JPM.2003.057. Disponible à l'adresse : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/JPM.2003.057/html>.

YUAN, Haining, HUANG, Jie, LV, Bokun, YAN, Wenying, HU, Guang, WANG, Jian et SHEN, Bairong, 2013. Diagnosis value of the serum amyloid A test in neonatal sepsis: a meta-analysis. In : *BioMed Research International*. 2013. Vol. 2013, pp. 520294. DOI 10.1155/2013/520294.

ZHOU, Min, CHENG, Shupeng, YU, Jialin et LU, Qi, 2015. Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. In : *PloS One*. 2015. Vol. 10, n° 5, pp. e0127170. DOI 10.1371/journal.pone.0127170.

Nom : WINKLER

Prénom : Mickaël

Titre : Détection précoce des infections bactériennes chez le chiot nouveau-né

Résumé : La mortalité néonatale chez l'espèce canine est un enjeu majeur, avec l'un des plus forts taux de mortalité (entre 9 et 34%) parmi les espèces domestiques. Les causes principales de cette mortalité sont les dystocies suivies des infections bactériennes. Le diagnostic de ces infections est souvent post-mortem. Après avoir défini la notion de sepsis et de biomarqueurs nous avons étudiés six paramètres (protéine C-réactive, procalcitonine, protéines totales, albumine, rapport albumine/globulines et immunoglobulines G) chez une population de chiots sains (56 individus) et une population de chiots décédés d'infection bactérienne (44 individus). L'analyse statistique multivariée a permis de mettre en évidence des effets de l'âge des chiots, ainsi que du format racial sur les valeurs de ces paramètres. Aucun des biomarqueurs étudiés n'a une valeur diagnostique suffisante pour permettre le diagnostic précoce des infections bactériennes chez les chiots. Cette étude a permis de calculer des intervalles de références pour chacun des paramètres pour les chiots nouveau-nés.

Mots-clés : sepsis / biomarqueur / néonatale / procalcitonine / chien

Title: Early detection of bacterial infections in the newborn puppy

Summary : Neonatal mortality in the canine species is a major issue, with one of the highest mortality rates (between 9 and 34%) among domestic species. The main causes of this mortality are dystocia followed by bacterial infections. The diagnosis of these infections is often post-mortem. After defining the concept of sepsis and biomarkers, we studied six parameters (C-reactive protein, procalcitonin, total protein, albumin, albumin/globulin ratio and immunoglobulin G) in a population of healthy puppies (56 individuals) and a population of puppies that died of bacterial infection (44 individuals). Multivariate statistical analysis revealed effects of puppy age and breed format on the values of these parameters. None of the biomarkers studied had sufficient diagnostic value for early diagnosis of bacterial infections in puppies. In this study, reference ranges for each of the parameters were calculated for newborn puppies.

Keywords : sepsis / biomarker / neonatal / procalcitonin / dog