



HAL
open science

Marqueurs de NETs dans les pathologies vasculaires placentaires

Thomas Vidal

► **To cite this version:**

Thomas Vidal. Marqueurs de NETs dans les pathologies vasculaires placentaires. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03064858

HAL Id: dumas-03064858

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03064858v1>

Submitted on 14 Dec 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

U.F.R. DE MÉDECINE

ANNÉE 2020

Thèse n° 3126

DOCTORAT D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Présenté et soutenu publiquement par

Thomas VIDAL

Né le 13 mars 1992 à Mantes-la-Jolie

Le 30 septembre 2020 à Bordeaux

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de
THÈSE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Marqueurs de NETs
dans les pathologies vasculaires placentaires**

Sous la direction de :

Mme le Professeur Chloé JAMES

Mme le Professeur Estibaliz LAZARO

Rapporteur : M. le Professeur Pierre DUFFAU

JURY

M. le Professeur Patrick BLANCO

Mme le Docteur Sylvie COLOMER

M. le Professeur Loïc SENTILHES

M. le Docteur Pierre-Elian CHAGHOURI

Mme le Professeur Chloé JAMES

Mme le Professeur Estibaliz LAZARO

Président

Juge

Juge

Juge

Juge et directrice

Juge et directrice

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Patrick Blanco,

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse et de juger ce travail. Je vous en remercie.

À mes co-directrices,

Madame le Professeur Chloé James et Madame le Professeur Estibaliz Lazaro,

Un grand merci pour m'avoir accordé votre confiance et permis de réaliser ce travail.

J'ai beaucoup apprécié travailler sous votre supervision, toujours efficace et rigoureuse.

Soyez assurées de ma profonde estime.

À Monsieur le Professeur Pierre Duffau,

Un immense merci pour avoir accepté de donner de votre temps pour effectuer le rapport de cette thèse malgré votre indisponibilité pour la soutenance. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

À Madame le Docteur Sylvie Colomer,

Je vous suis très reconnaissant pour l'aide que vous m'avez apporté dans la réalisation de cette thèse. C'est un plaisir de vous compter parmi les membres de ce jury.

À Monsieur le Professeur Loïc Sentilhes,

Merci beaucoup d'avoir accepté de juger ce travail et d'apporter votre expertise médicale.

À Monsieur le Docteur Pierre-Elian Chaghouri,

Merci d'avoir accepté de siéger dans mon jury, qui sera je pense le premier d'une longue série pour toi. Un immense merci pour ton investissement en tant qu'assistant. Je te dois tout ce que je sais sur les corps de Döhle et l'empéripolèse, et bien plus encore.

À toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU de Bordeaux,

Un merci particulier à Flavie qui m'a fait gagner un temps précieux dans mon recueil de données.

À l'équipe du laboratoire du CH Agen-Nérac,

Merci pour le temps accordé à la rédaction de ce travail et pour avoir constitué un superbe public d'entraînement à la soutenance.

À mes co-internes durant ces trois premières années d'internat,

Je suis heureux d'avoir rencontré autant de gens super au cours de ces six semestres et ce fut pour moi un vrai plaisir de travailler avec vous.

À mes amis de Clermont-Ferrand et d'ailleurs,

À la meilleure team de sous-colleurs d'Auvergne : merci Lisa pour ces innombrables heures d'amphi à tes côtés et pour les mémorables soirées sushis/colle ; merci Flo pour les parenthèses vélo à monter des cols (quelles que soient les températures...) et qui m'ont fait un bien fou ; merci Matthou pour notre rencontre improbable dans un caisson acoustique et pour tout ce qu'on a vécu pendant ces années, des soirées ciné-burgers au stage sous les tropiques.

Merci Cindy, mon éternelle co-externe ; je nous revois encore ranger cette pile de bio qui restera dans les annales comme la plus haute que le CHU de Clermont-Ferrand ait connue.

Merci Lætitia et Julien, les amis de toujours. Malgré la distance je suis hyper heureux de nous voir évoluer ensemble dans la vie ; on a fait du chemin depuis le banc des écoles nivernaises !

À ma famille,

Merci pour votre soutien et votre compréhension tout au long de ces années.

À ma grande sœur, pour son exigence et pour avoir été le modèle que j'ai essayé de suivre.

Et mention spéciale à Maman et Papy Guy pour leur œil acéré d'instituteurs sur ce travail.

À Virginie,

Faire ce stage d'initiation aux soins infirmiers a été la meilleure décision de ma vie. Tu sais déjà tout ce que je te dois pour cette thèse (ton expertise méthodologico-statistique m'a épargné plusieurs nuits blanches, sans parler de ton aide linguistique sur la fin...). Merci pour ta patience, ton soutien permanent et ta présence de chaque instant.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer leurs consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses : que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

RÉSUMÉ

Les pathologies vasculaires placentaires regroupent des pathologies gestationnelles intriquées d'un point de vue clinique, avec pour dénominateur commun la présence d'anomalies de vascularisation placentaires qui détériorent la circulation materno-fœtale et sont responsables d'insuffisances vasculo-placentaires. Ces pathologies sont fréquemment associées à une thrombophilie, en particulier chez les patientes atteintes de syndrome des antiphospholipides pour lesquelles le rôle des thromboses au niveau de la chambre intervillieuse dans la survenue d'événements pathologiques obstétricaux est aujourd'hui bien établi. La thrombophilie est par ailleurs un facteur de risque de fausses couches spontanées précoces à répétition, qui est une autre complication fréquemment rencontrée dans la pratique obstétricale.

Il existe pourtant des patientes pour lesquelles le bilan de thrombophilie demeure négatif malgré la survenue de fausses couches spontanées à répétition ou d'événements obstétricaux liés à une insuffisance vasculo-placentaire, ce qui laisse à penser que d'autres mécanismes physiopathologiques entrent en jeu dans ces pathologies. La NETose est un processus physiopathologique assuré par les polynucléaires neutrophiles qui consiste en l'émission de filets de chromatine décondensée et de protéines, relargués dans le milieu extracellulaire. Ces filets, appelés NETs pour *Neutrophil Extracellular Traps*, constituent notamment une des voies d'initiation de la thrombogénèse, y compris dans le syndrome des antiphospholipides.

Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse de l'implication des NETs dans la survenue des pathologies vasculaires placentaires chez des patientes pour lesquelles aucun terrain de thrombophilie n'a été retrouvé, hypothèse renforcée par des observations récentes sur le potentiel pathogène des NETs sur les cellules endothéliales et trophoblastiques. Parmi quatre biomarqueurs plasmatiques de NETose dosés chez des femmes ayant eu des événements indésirables au cours de leurs grossesses imputables à une insuffisance vasculo-placentaire, ou une histoire personnelle de fausses couches spontanées à répétition, et sans étiologie connue d'activation de la NETose, nous avons retrouvé des taux significativement plus élevés de complexes MPO-ADN et de DNase par rapport aux témoins. En revanche, les taux d'histones H3 citrullinées et d'ADN plasmatiques étaient significativement plus élevés chez les témoins que chez les patientes de l'étude. Nous n'avons par ailleurs pas retrouvé de différence au niveau des taux de NETs en fonction du statut vis-à-vis des anticorps antiphospholipides (absence d'anticorps, présence d'anticorps intermittents ou non confirmés à 12 semaines, ou syndrome des antiphospholipides confirmé). De précédentes études ayant montré que les biomarqueurs de NETs comme l'ADN plasmatique et les complexes MPO-ADN étaient augmentés dans les contextes de syndrome des antiphospholipides, ce résultat semble compatible avec notre hypothèse d'une augmentation des niveaux de base des NETs chez les patientes exemptes de contexte de thrombophilie.

MOTS CLEFS

- NETose
- Pathologies vasculaires placentaires
- Insuffisance vasculaire placentaire
- Syndrome des antiphospholipides
- Fausses couches spontanées précoces à répétition
- ADN plasmatique
- Complexes MPO-ADN
- Histones H3 citrullinées
- DNase

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	2
SERMENT D'HIPPOCRATE.....	3
RÉSUMÉ.....	4
MOTS CLEFS.....	4
TABLE DES MATIÈRES.....	5
TABLE DES TABLEAUX.....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	10
A. Grossesse et pathologies vasculaires placentaires.....	10
1. Introduction.....	10
2. Définitions.....	10
a. Fausses couches spontanées précoces à répétition.....	10
b. Pré-éclampsie et éclampsie.....	11
c. Hématome rétroplacentaire.....	11
d. HELLP syndrome.....	12
e. Petit poids pour l'âge gestationnel et retard de croissance intra-utérin.....	12
f. Mort fœtale <i>in utero</i>	13
3. Physiopathologie vasculo-placentaire au cours de la grossesse.....	13
a. Grossesse et thrombophilie.....	13
b. Placentation normale.....	14
c. Mise en place de la circulation materno-fœtale.....	15
d. Anomalies d'invasion trophoblastique.....	16
e. Mécanismes physiopathologiques associés.....	17
B. <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (NETs) et biomarqueurs circulants de NETs.....	19
1. NETs.....	19
a. Généralités et historique.....	19
b. Structure et composition des NETs.....	21
c. Inducteurs de NETose.....	22
d. Mécanisme général de la NETose.....	23
2. Biomarqueurs circulants de NETs.....	23
a. Introduction.....	23
b. ADN plasmatique.....	24
c. Complexes MPO-ADN plasmatiques.....	25
d. Histones H3 citrullinées.....	26

e. DNase	28
3. NETs et pathologies thrombo-emboliques	29
a. Mécanismes de promotion de la thrombose par les NETs.....	29
b. NETs et SAPL.....	30
c. NETs et endothélium vasculaire.....	32
d. Le concept d'immunothrombose.....	33
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	34
A. Hypothèse	34
B. Objectifs	34
ARTICLE	36
Keywords.....	36
Abbreviations.....	36
Abstract	37
Introduction.....	38
Materials and Methods.....	39
Results.....	41
Discussion	49
References.....	50
BIBLIOGRAPHIE DE LA THÈSE	52

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Inducteurs physiologiques de NETose	22
Tableau 2 : Critères de classification du SAPL, dit "critères de Sydney", publiés en 2006 ¹¹⁷	30

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation du risque individuel de thrombose pendant la grossesse, d'après Sucker ³⁵	14
Figure 2 : (A) Adhésion du blastocyste ; (B) Implantation du blastocyste au 9 ^{ème} jour	14
Figure 3 : Formation des villosités. (A) 16 ^{ème} jour ; (B) 21 ^{ème} jour ; (C) Fin du 4 ^{ème} mois.....	15
Figure 4 : Illustration de la circulation utéro-placentaire, d'après Ramsey et Donner	16
Figure 5 : Invasion trophoblastique et remodelage vasculaire dans la grossesse normale et la pré-éclampsie, d'après Beaufls ³⁸	17
Figure 6 : Diagramme de Venn illustrant la triade de Virchow, d'après Wolberg et al. ⁴²	17
Figure 7 : Schéma physiopathologique de la pré-éclampsie, d'après Lecarpentier et al. ⁴⁷	19
Figure 8 : Analyse d'un PNN à l'état quiescent et activé par microscopie électronique, d'après Brinkmann ³	20
Figure 9 : Fonctions des PNN dans les maladies vasculaires, d'après Mócsai ⁴⁹	21
Figure 10 : La citrullination, médiée par PAD4, de résidus arginine sur les histones, entraîne la décondensation de la chromatine, d'après Mohanan et al. ⁵⁹	22
Figure 11 : Exemple de visualisation de NETs par des techniques de fluorescence, d'après Perdomo et al. ⁹¹	24
Figure 12 : Principe de détection de l'ADN plasmétique, d'après Sil et al. ⁷²	25
Figure 13 : Principe de détection des complexes MPO-ADN en ELISA, d'après Sil et al. ⁷²	26
Figure 14 : Schéma de la procédure ELISA H3Cit, d'après Thålin ¹⁰⁰	27
Figure 15 : Mécanismes de promotion de la thrombose par les NETs, d'après Guy et James ¹¹⁰ ..	29
Figure 16 : Rôle possible des NETs dans les fausses couches spontanées, d'après Hahn et al. ⁴⁰ ..	31
Figure 17 : Recrutement des PNN et renforcement de la thrombose veineuse, d'après Yago et al. ¹³²	32
Figure 18 : Un modèle d'implication des NETs dans la thrombose veineuse profonde, d'après Fuchs et al. ⁶⁸	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **ACC/LA** : anticoagulant circulant de type lupique/lupus anticoagulant
- **ADAMTS13** : *a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13*
- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **ANCA** : anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles
- **APL** : anticorps antiphospholipides
- **ARN** : acide ribonucléique
- **β₂GP1** : β₂ glycoprotéine 1
- **β-hCG** : hormone chorionique gonadotrope
- **Ca²⁺** : calcium
- **CTV** : cytotrophoblaste villositaire
- **CTEV** : cytotrophoblaste extravillous
- **DNase** : désoxyribonucléase
- **dRVVT** : temps de venin de vipère Russel dilué
- **ELISA** : *enzyme linked immunoabsorbant assay*
- **ET-1** : endothéline-1
- **ETs** : *extracellular traps*
- **FCP** : fausse couche spontanée précoce
- **FCR** : fausses couches spontanées précoces à répétition
- **FCS** : fausse couche spontanée
- **FCT** : fausse couche spontanée tardive
- **Flt-1** : *fms-like tyrosine kinase-1*
- **H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène
- **H3Cit** : histones H3 citrullinées
- **HClO** : acide hypochloreux
- **HRP** : hématome rétroplacentaire
- **IL-8** : interleukine 8
- **MFIU** : mort fœtale *in utero*
- **MPO** : myéloperoxydase
- **MMP9** : métalloprotéinase de matrice de type 9
- **NETs** : *neutrophil extracellular traps*
- **PAD4** : *peptidyl arginine deiminase, type IV*
- **PE** : pré-éclampsie
- **PIGF** : *placental growth factor*
- **PMA** : phorbol 12-myristate 13-acétate
- **PNN** : polynucléaires neutrophiles
- **PVP** : pathologies vasculaires placentaires
- **RCIU** : retard de croissance intra-utérin
- **PAF** : facteurs d'activation plaquettaires
- **PAG** : petit poids pour l'âge gestationnel
- **PBS** : *phosphate-buffered saline*
- **PGI₂** : prostaglandine I₂/prostacycline
- **PL** : phospholipides
- **RETs** : *root extracellular traps*
- **ROS** : *reactive oxygen species* ou dérivés réactifs de l'oxygène
- **S100 CBP** : *S100 calcium binding protein*
- **SA** : semaines d'aménorrhée
- **SAPL** : syndrome des antiphospholipides
- **SDS** : dodécylsulfate de sodium

- **sFlt-1** : *soluble fms-like tyrosine kinase-1*
- **SOPK** : syndrome des ovaires polykystiques
- **TFPI** : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
- **TMB** : tétraméthylbenzidine
- **TNF- α** : facteur de nécrose tumoral alpha
- **TXA₂** : thromboxane alpha-2
- **ULVWK** : facteur de von Willebrand ultra-large
- **VEGF** : *vascular endothelial growth factor*
- **VDRL** : *venereal disease research laboratory*
- **vWF** : facteur de von Willebrand
- **WPB** : corps de Weibel-Palade

INTRODUCTION

A. Grossesse et pathologies vasculaires placentaires

1. Introduction

Les pathologies vasculaires placentaires (PVP) regroupent des pathologies gestationnelles hétérogènes mais intriquées d'un point de vue clinique : pré-éclampsie (PE) et éclampsie, hématome rétroplacentaire (HRP), HELLP syndrome, petit poids pour l'âge gestationnel (PAG) et retard de croissance intra-utérin (RCIU), mort fœtale *in utero* (MFIU). Ces pathologies ont néanmoins pour point commun la présence d'anomalies de vascularisation au niveau placentaire détériorant la circulation materno-fœtale.

Les PVP sont fréquemment associées à une thrombophilie, un état pathologique défini par des notions cliniques (antécédents de thrombose veineuse profonde, d'embolie pulmonaire, de RCIU ou d'HRP avec lésions ischémiques de la plaque basale à l'examen anatomo-pathologique du placenta) ou biologiques (présence d'anticorps antiphospholipides (APL), déficits en antithrombine, en protéine C, en protéine S, résistance à la protéine C activée, mutations du facteur V Leiden ou du facteur II, hyperhomocystéinémie). Le lien entre thromboses au niveau de la chambre intervillueuse et PVP est en effet bien établi¹, en particulier dans le cadre du syndrome des antiphospholipides (SAPL)². La thrombophilie est par ailleurs un facteur de risque de fausses couches spontanées précoces à répétition (FCR), qui constituent un motif de consultation fréquent en médecine générale et gynécologie-obstétrique chez les femmes ayant un désir de grossesse.

Il existe pourtant des patientes pour lesquelles le bilan de thrombophilie demeure négatif malgré la survenue d'évènements obstétricaux à type de PVP ou de FCR, ce qui laisse à penser que d'autres mécanismes physiopathologiques entrent en jeu dans ces pathologies.

La NETose est un processus physiopathologique assuré par les polynucléaires neutrophiles (PNN) et qui consiste en l'émission de filets de chromatine décondensée et de protéines, relargués dans le milieu extracellulaire³. Ces filets, appelés *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), ont de multiples fonctions et constituent notamment une des voies d'initiation de la thrombogénèse⁴⁻⁷, y compris dans le SAPL⁸.

Nous avons donc fait l'hypothèse de l'implication des NETs dans la survenue de PVP chez des patientes pour lesquelles aucun terrain de thrombophilie n'a été retrouvé, hypothèse renforcée par des observations récentes sur le potentiel pathogène de ces composés sur les cellules endothéliales et trophoblastiques⁹.

2. Définitions

a. Fausses couches spontanées précoces à répétition

L'*European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE)¹⁰ définit la fausse couche spontanée (FCS) comme un arrêt spontané de la grossesse avant que le fœtus ne soit viable. Le seuil de viabilité retenu est de 22 SA. Les progrès en matière de soins néonataux permettent cependant la survie d'un petit nombre de nouveau-nés avant cet âge gestationnel.

Le *Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français* (CNGOF)¹¹ définit une fausse couche spontanée précoce (FCP) comme l'expulsion spontanée d'une grossesse intra-utérine de moins de 14 SA tandis qu'une fausse couche spontanée tardive (FCT) est définie comme une perte de grossesse intra-utérine survenant entre 14 SA et 22 SA.

Les fausses couches spontanées précoces dites « à répétition » (FCR) sont définies comme la survenue d'au moins trois FCP consécutives par le CNGOF, mais l'absence de consensus international concernant la terminologie des différents types de fausses couches a motivé la réalisation de recommandations européennes par l'ESHRE en 2017, qui retient un seuil de deux FCP, consécutives ou non. C'est ce dernier seuil, moins restrictif que celui du CNGOG et permettant de travailler sur davantage d'échantillons de notre plasmathèque, qui a été retenu pour cette étude.

La thrombophilie est un facteurs de risque de FCR, avec un risque variable en fonction du type d'anomalie retrouvée¹⁰. Des antécédents de FCR semblent être un facteur de risque de morbidité thromboembolique pendant le péripartum, indépendamment d'une thrombophilie maternelle connue¹².

La survenue d'une FCP est une problématique fréquente de la femme enceinte puisqu'elle complique plus de 10 % des grossesses, tandis que la FCT complique moins de 1 % des grossesses. On estime que les FCR concernent 1 à 5 % des couples fertiles.

Les anomalies chromosomiques représentent la cause la plus fréquente de FCP sporadiques et sont retrouvées dans 50 à 70 % des FCS du premier trimestre, soit 5 à 10 % des grossesses.

b. Pré-éclampsie et éclampsie

La conférence de consensus de l'*American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) de 2013 définit la PE comme la présence, chez une femme enceinte, d'une hypertension artérielle systolique > 140 mmHg et/ou diastolique > 90 mmHg, et d'une protéinurie supérieure à 300 mg/24 heures après la vingtième semaine d'aménorrhée (SA)¹³.

La PE doit être suspectée en cas de céphalées, vertiges, troubles de la vue, ou lorsque le fœtus est trop petit par rapport à l'âge gestationnel. Elle est à distinguer de l'hypertension artérielle gravidique sans protéinurie et d'une hypertension artérielle simple préexistante à la grossesse.

En France, la PE concerne 1 à 3 % des primipares, contre 0,5 à 1,5 % des multipares¹⁴. Elle est plus fréquente après 40 ans, en particulier chez les multipares¹⁵, ceci pouvant être en rapport avec l'augmentation des chiffres tensionnels avec l'âge et une plus grande fréquence des hypertension artérielles. Il existe par ailleurs un risque de récurrence après une première PE d'autant plus important que celle-ci est précoce et sévère.

L'ischémie placentaire, généralement due à des anomalies de placentation dans lesquelles rentrent en jeu des conflits immunologiques, est au centre de la physiopathologie de la PE. Si l'activation des PNN et leur fixation sur l'endothélium vasculaire ont été bien décrites dans cette pathologie depuis la fin des années 90¹⁶⁻²⁰, il a également été montré que des composés issus de placentas pré-éclamptiques tels que des fragments de syncytiotrophoblastes inflammatoires ou l'interleukine 8 (IL-8) peuvent déclencher la formation de NETs^{21,22} par les PNN activés. La présence accrue de NETs retrouvés dans la chambre intervillieuse de placentas pré-éclamptiques suggère ainsi qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de la maladie²³.

c. Hématome rétroplacentaire

L'HRP est défini comme le décollement prématuré d'un placenta normalement inséré avant l'accouchement.

La lésion anatomique responsable est constituée d'un hématome décidual basal qui, en interrompant la circulation materno-fœtale, entraîne rapidement des troubles hémodynamiques associés à une hypoxie fœtale et à des anomalies de la coagulation.

Son diagnostic peut être suspecté devant l'apparition de métrorragies associées à une contraction utérine, et confirmé par l'examen macroscopique et histologique du placenta.

L'HRP survient dans environ 0,4 à 1 % des grossesses selon les séries²⁴. Si sa prévalence est relativement faible, il est responsable de 9 à 12 % des cas de mortalité périnatale²⁴ et est une source importante de morbidité post-natale, avec notamment la survenue possible de troubles neurologiques importants pour l'enfant au décours.

Aucune des patientes de notre étude ne présentait d'antécédent d'HRP.

d. HELLP syndrome

Le terme « HELLP » correspond à l'acronyme en anglais de trois signes cliniques définis en 1990 par Sibai²⁵ : *Hemolysis* (hémolyse), *Elevated Liver enzymes* (augmentation des enzymes hépatiques) et *Low Platelet count* (thrombopénie).

Ce syndrome, considéré le plus souvent comme une complication possible ou une variante de PE, concerne 0,5 à 0,9 % des grossesses et 10 à 20 % des cas de PE. Il peut néanmoins apparaître sans signe de PE dans environ 15 % des cas²⁶.

Les mécanismes physiopathologiques supposés sont difficiles à différencier de ceux de la PE car la plupart des constatations faites dans le HELLP syndrome ne lui sont pas spécifiques. Ce syndrome correspond ainsi à une microangiopathie gravidique disséminée, conséquence d'un défaut d'implantation trophoblastique qui entraîne un déséquilibre local d'expression des médiateurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs aboutissant à une ischémie placentaire.

e. Petit poids pour l'âge gestationnel et retard de croissance intra-utérin

Le PAG, anciennement hypotrophie fœtale ou néonatale, et le RCIU, correspondent à des définitions statistiques établies à partir de courbes de référence variables selon les auteurs et le plus souvent adaptées au sexe du fœtus²⁷. La taille et le poids maternels en début de grossesse, la parité et l'origine ethnique sont parfois pris en compte dans l'élaboration de ces courbes.

Le CNGOF définit le PAG comme un poids isolé (estimation pondérale *in utero* ou poids de naissance) inférieur au 10^{ème} percentile²⁸. Le PAG est dit modéré s'il est compris entre les 3^{ème} et 10^{ème} percentiles tandis qu'un PAG sévère correspond à un PAG inférieur au 3^{ème} percentile.

Le RCIU correspond le plus souvent à un PAG associé à des arguments en faveur d'un défaut de croissance pathologique, tels qu'un arrêt ou un infléchissement de la croissance de manière longitudinale (au moins deux mesures à trois semaines d'intervalle). Dans les situations de PAG sur une mesure isolée, l'existence de signes d'altération du bien-être fœtal (diminution des mouvements fœtaux, anomalies du Doppler, oligoamnios) doit faire évoquer un RCIU. Plus rarement, un RCIU peut correspondre à un défaut de croissance avec un poids proche du 10^{ème} percentile sans atteindre le seuil de classification en PAG.

Les pathologies fœtales (anomalies chromosomiques, infections, etc.) sont responsables de 10 à 20 % des RCIU et sont fréquemment associées à des RCIU précoces (apparition au cours du 2^{ème} trimestre) et sévères (périmètre abdominal inférieur au 3^{ème} percentile).

Les PVP constituent l'étiologie de RCIU la plus fréquente, étant responsables d'environ 35 à 50 % des cas. Elles sont plutôt associées à des RCIU tardifs (apparition au 3^{ème} trimestre), mais les RCIU peuvent également être précoces dans les formes sévères.

Un tiers des RCIU restent cependant mal expliqués et sont classifiés comme « idiopathiques ».

f. Mort fœtale *in utero*

La MFIU correspond à l'arrêt spontané de l'activité cardiaque du fœtus à un stade gestationnel supérieur à 14 SA. Cet arrêt de la grossesse peut avoir lieu avant le travail (mort fœtale antepartum) ou en cours de travail (mort fœtale intrapartum).

Les anomalies placentaires sont associées à environ 60 % des MFIU²⁹ et sont responsables de troubles de la circulation fœto-placentaire pouvant aboutir au décès du fœtus. Elles représentent ainsi la première cause ou condition associée à cette pathologie.

Kidron et al. ont étudié les causes de décès *in utero* de 120 sujets et ont retrouvé une anomalie de la circulation materno-placentaire dans 51 % des cas, suivie d'une anomalie de la circulation fœto-placentaire dans 26 % des cas³⁰. Ces anomalies placentaires varient en fonction du terme de la grossesse. *Pinar et al.* ont en effet comparé la prévalence des lésions placentaires dans un groupe de 512 placentas provenant de MFIU à un groupe de 1200 placentas provenant de fœtus nés vivants, et il a été observé que les lésions inflammatoires du placenta étaient plus souvent retrouvées dans des MFIU précoces, alors que les lésions thrombotiques étaient plus souvent associées à des MFIU tardives.

3. Physiopathologie vasculo-placentaire au cours de la grossesse

a. Grossesse et thrombophilie

La grossesse est une période à risque thrombogène élevé³¹ et dont les mécanismes physiopathologiques sont multiples et souvent intriqués. Il est décrit un état d'hypercoagulabilité physiologique, en lien avec les modifications hormonales, une fibrinogénèse augmentée, une augmentation des facteurs VII, VIII et X (les II, V et IX restant relativement inchangés), du facteur de von Willebrand (vWF), une diminution du taux de protéine S et l'acquisition d'une résistance à la protéine C activée³². Les modifications anatomiques qui surviennent au cours de la grossesse sont responsables d'une baisse du flux veineux des membres inférieurs par compression extrinsèque de l'utérus. Pour finir, des facteurs personnels et environnementaux tels qu'un âge supérieur à 35 ans, une parité supérieure à 2, un tabagisme actif ou passif, une surcharge pondérale, un allongement prolongé, une infection intercurrente ou la présence de varices constituent des facteurs supplémentaires impliqués dans le surrisque thrombogène³³.

Le risque thrombogène au cours de la grossesse est à l'origine de complications materno-fœtales importantes³⁴ qui peuvent être majorées par l'existence d'un état de thrombophilie sous-jacent. La thrombophilie est définie par des notions cliniques (antécédent de thrombose veineuse profonde, d'embolie pulmonaire, de RCIU ou d'HRP avec lésions ischémiques de la plaque basale à l'examen anatomo-pathologique du placenta) ou biologiques (présence d'APL, déficit en anti-thrombine, en protéine C, en protéine S, résistance à la protéine C activée, mutation du facteur V Leiden ou du facteur II, hyperhomocystéinémie).

Toutes ces anomalies sont retrouvées fréquemment dans la population générale, sans être systématiquement responsables de manifestations cliniques. Le polymorphisme des gènes contrôlant la coagulation et la pénétrance variable des mutations permettent d'expliquer cette hétérogénéité d'expression clinique (**Figure 1**).

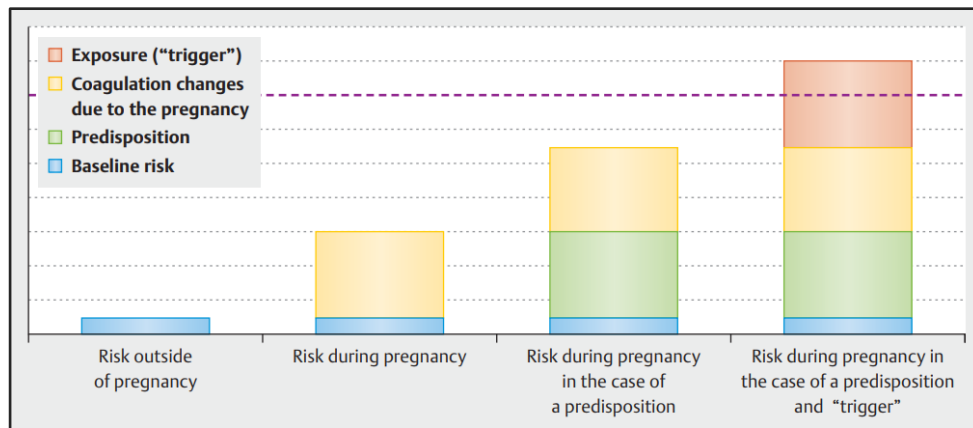
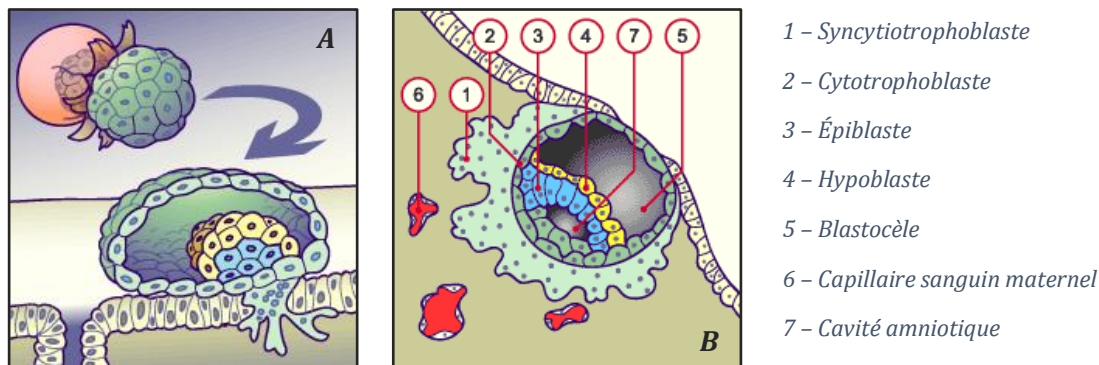


Figure 1 : Représentation du risque individuel de thrombose pendant la grossesse, d'après Sucker³⁵

Si le risque total dépasse un "seuil critique" imaginaire (pointillés), il y a manifestation de l'événement thrombotique.

b. Placentation normale

Six jours après la fécondation, le blastocyste s'accroche à l'épithélium utérin. Les microvillosités trophoblastiques les plus externes établissent un système d'interpénétration avec celles des cellules épithéliales utérines. Deux contingents cellulaires se différencient à partir du trophoblaste : le cytotrophoblaste en interne, siège d'une activité mitotique intense, et le syncytiotrophoblaste en externe, très invasif, et permettant l'ancrage puis l'enfouissement complet du blastocyste au sein de la muqueuse utérine (**Figure 2**).



- 1 - Syncytiotrophoblaste
- 2 - Cytotrophoblaste
- 3 - Épiblaste
- 4 - Hypoblaste
- 5 - Blastocèle
- 6 - Capillaire sanguin maternel
- 7 - Cavité amniotique

Figure 2 : (A) Adhésion du blastocyste ; (B) Implantation du blastocyste au 9^{ème} jour

D'après le Campus Virtuel Suisse des Universités de Fribourg, Lausanne et Berne [embryology.ch]

Vers le 8^{ème} jour qui suit la fécondation, des vacuoles extra-cytoplasmiques apparaissent dans la masse syncytiale et vont progressivement former des lacunes. L'activité lytique du syncytiotrophoblaste érode les capillaires de l'endomètre et permet l'invasion des lacunes par le sang maternel. Leur convergence aboutit à la formation des chambres intervilleuses, qui établissent une circulation utéro-placentaire primitive vers le 13^{ème} jour. Cette microcirculation permet notamment le passage de l'hormone chorionique gonadotrope (β -hCG) sécrétée par les cellules trophoblastiques vers la circulation sanguine maternelle, avec la possibilité de diagnostiquer une grossesse avant même le retard de règles.

La croissance invasive du syncytiotrophoblaste s'arrête une fois la couche compacte de la muqueuse utérine atteinte. Les zones interlacunaires sont envahies par les cellules du cytotrophoblaste, qui vont former les **villosités primaires**. Le mésenchyme d'origine embryonnaire migre dans le cytotrophoblaste, et sa prolifération aboutit à la formation des **villosités secondaires**.

À la fin de la 3^{ème} semaine, le mésoblaste villositaire se différencie en tissu conjonctif et en vaisseaux sanguins, établissant une véritable communication vasculaire fonctionnelle entre la circulation placentaire et la circulation embryonnaire. Les villosités contenant des vaisseaux sanguins différenciés sont appelées **villosités tertiaires**.

À partir du 4^{ème} mois, le cytotrophoblaste disparaît peu à peu de la paroi des villosités tertiaires, réduisant la distance entre les chambres intervillieuses remplies de sang maternel et les vaisseaux fœtaux. On parle alors de **villosités terminales**.

La barrière placentaire ainsi constituée est formée de l'endothélium capillaire des villosités, du TC lâche qui en occupe l'axe, du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste (**Figure 3**).

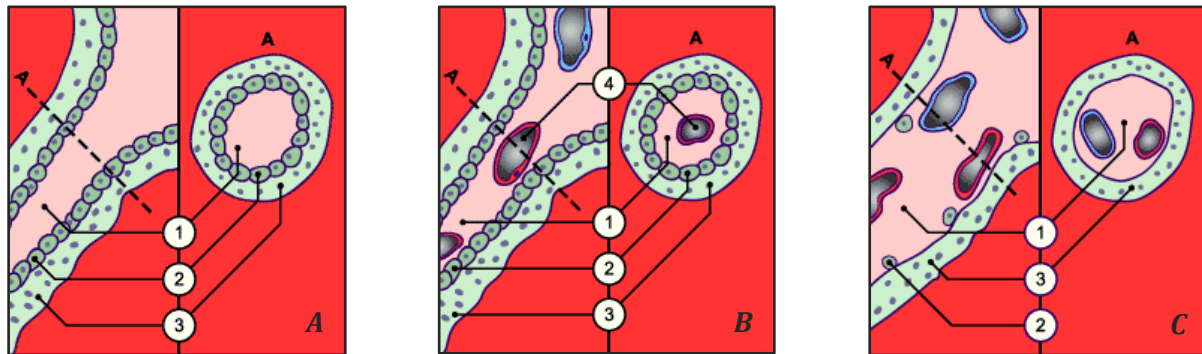


Figure 3 : Formation des villosités. (A) 16^{ème} jour ; (B) 21^{ème} jour ; (C) Fin du 4^{ème} mois

1 - mésoblaste extra-embryonnaire ; 2 - cytotrophoblaste ; 3 - syncytiotrophoblaste ; 4 - capillaires fœtaux

D'après le Campus Virtuel Suisse des Universités de Fribourg, Lausanne et Berne [embryology.ch]

c. Mise en place de la circulation materno-fœtale

Au cours de l'embryogenèse villositaire, les cellules trophoblastiques se différencient en cytotrophoblastes villositaires (CTV), qui fusionnent pour donner le syncytiotrophoblaste, et en cytotrophoblastes extravillous (CTEV), indispensables à l'implantation et au remodelage des vaisseaux utérins.

Le syncytiotrophoblaste, en contact direct avec le sang maternel, se différencie vers des fonctions d'échange, sécrétrices, endocrines et d'hémostase. Le tapis de microvillosités présent à sa surface favorise les échanges entre le sang maternel et le sang fœtal.

Au 1^{er} trimestre, les CTEV engainent les branches endométriales des artères spiralées, créant des bouchons trophoblastiques qui protègent l'embryon de l'hypoxie maternelle. La chambre intervillieuse est alors perfusée par un ultrafiltrat plasmatique. Ces bouchons disparaissent progressivement vers 9-10 SA, entraînant une augmentation progressive de la pression partielle en oxygène au sein de la chambre intervillieuse.

La paroi des artères spiralées est envahie dès 5 SA par une partie des CTEV, ce qui entraîne une disparition de la tunique musculaire lisse artérielle et des cellules endothéliales maternelles. Ces CTEV deviennent alors endovasculaires, avec des caractéristiques de cellules endothéliales. Les artères spiralées perdent leur caractère contractile par transformation de la tunique élastique artérielle en une paroi fibreuse atone, à l'origine d'une vasodilatation permettant l'instauration d'un débit sanguin suffisant dans la chambre intervillieuse pour la croissance fœtale au cours des 2^{ème} et 3^{ème} trimestres (**Figure 4**).

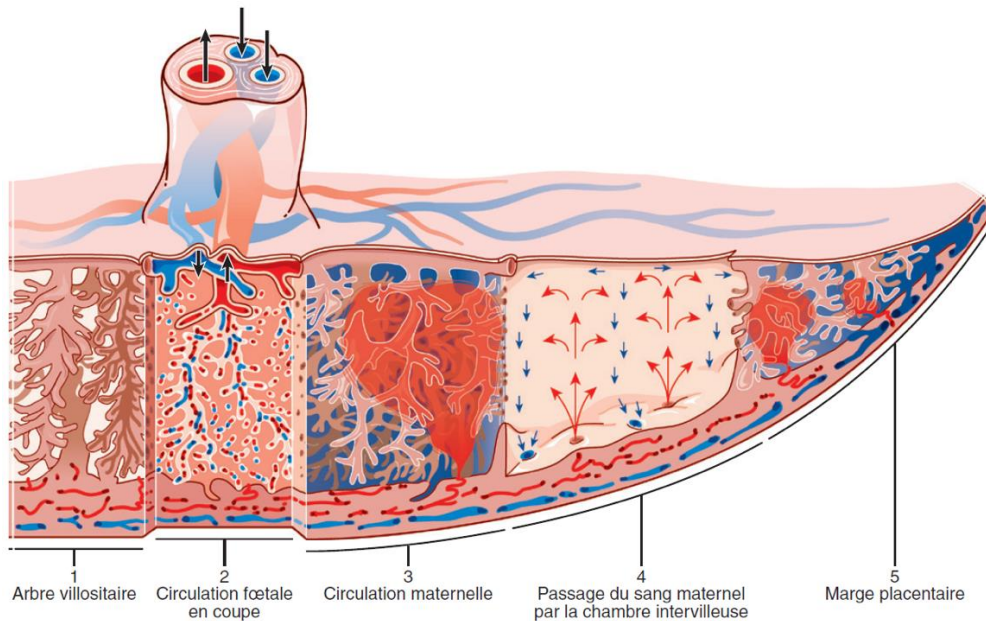


Figure 4 : Illustration de la circulation utéro-placentaire, d'après Ramsey et Donner

Carnegie Institute of Washington, 1961-62. Contributions to Embryology series, plate 10.

d. Anomalies d'invasion trophoblastique

Initialement décrit en 1972 chez des patientes hypertendues ou atteintes de PE³⁶, l'absence de remodelage vasculaire entraînant un défaut d'invasion trophoblastique au cours de la placentation a ensuite été établi dans des situations de FCR ou de RCIU³⁷.

Des lésions caractéristiques d'athérosclérose ont ainsi été mises en évidence au sein des artères spiralées non remodelées de patientes atteintes de PE, mettant en lumière les mécanismes physiopathologiques entrant en jeu au cours de ces pathologies. Sur le plan histologique, ces lésions sont constituées par des dépôts de nécrose fibrinoïde, des thrombi et des cellules adipeuses s'accumulant dans la paroi des artères spiralées et entraînant à terme une hypoxie placentaire responsable d'anomalies morphologiques (hypotrophie) et tissulaires (thromboses, infarctus) du placenta, avec des répercussions sur la croissance fœtale pouvant conduire à une MFIU.

Du défaut de remodelage par les cellules trophoblastiques résulte un diamètre plus petit des artères spiralées, qui gardent alors leur pouvoir contractile car la couche musculaire lisse est préservée³⁸. Ceci participe à l'hypoxie placentaire par non-adaptation du débit sanguin utéro-placentaire, ainsi qu'à des phénomènes d'ischémie reperfusion (**Figure 5**).

Dans le cadre du SAPL, des études ont montré que les APL étaient capables d'inhiber l'invasion trophoblastique en altérant l'adhésion entre les cytotrophoblastes et les cellules endothéliales, ou en modifiant l'expression de diverses molécules telles que des métalloprotéinases de matrice, des cadhérines et des intégrines trophoblastiques². Concernant les NETs, *Calo et al.* ont démontré *in vitro* leur effet néfaste sur la capacité des trophoblastes à migrer et à maintenir l'homéostasie immunitaire au niveau placentaire³⁹.

L'implication des NETs dans des mécanismes thrombogènes tels que le SAPL, les observations concernant leur potentiel pathogène sur les cellules endothéliales et trophoblastiques^{9,39}, et la présence de NETs dans la chambre intervillieuse de placentas pré-éclamptiques^{21,40} laissent alors à penser qu'ils puissent avoir un rôle thrombotique important et multifactoriel à ce stade de la pathologie vasculo-placentaire, en étant responsables de stase sanguine via la formation de microthrombi, et en participant à l'altération de l'endothélium vasculaire⁴¹ (**Figure 6**).

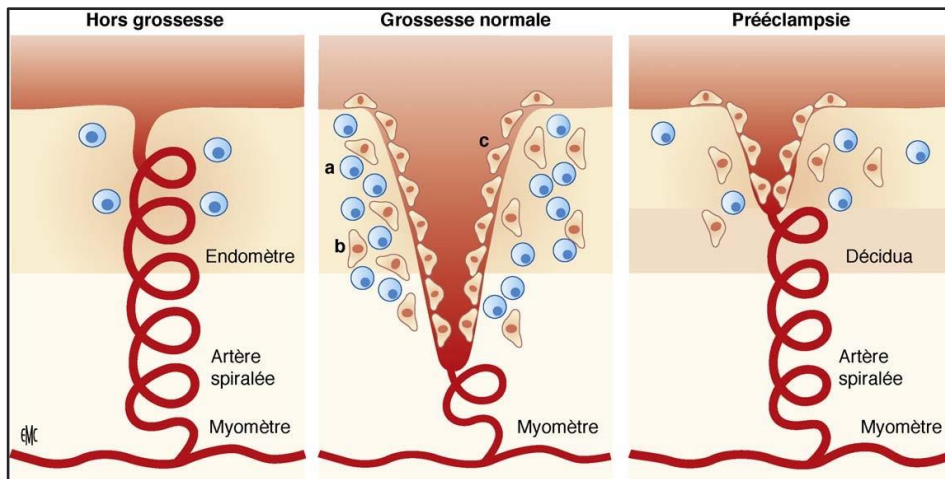


Figure 5 : Invasion trophoblastique et remodelage vasculaire dans la grossesse normale et la pré-éclampsie, d'après Beaufils³⁸

a - cellules NK ; b - trophoblastes extravasculaires ; c - trophoblastes endovasculaires « endothélialisés ».

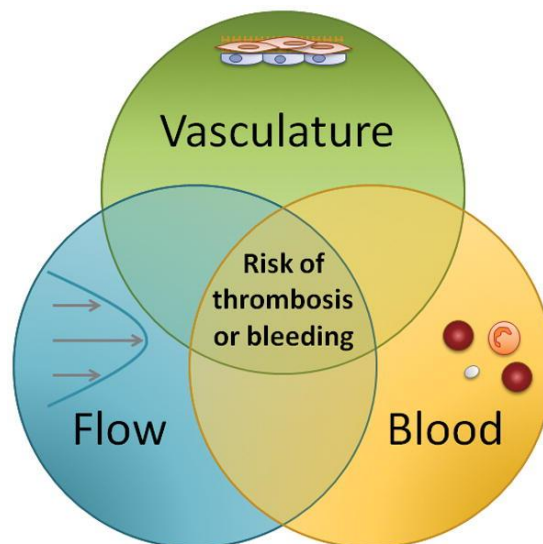


Figure 6 : Diagramme de Venn illustrant la triade de Virchow, d'après Wolberg et al.⁴²

e. Mécanismes physiopathologiques associés

D'autres mécanismes entrent en jeu, notamment dans les RCIU d'origine vasculaire et la PE :

- L'endothélium vasculaire régule la réponse du tissu musculo-élastique endothélial par la synthèse de substances comme le monoxyde d'azote, vasodilatateur et antiagrégant plaquettaire, et l'endothéline-1(ET-1), un puissant vasoconstricteur des cellules musculaires lisses. Il est également capable d'agir sur la coagulation locale en modulant la synthèse de protéine C et de prostaglandine I₂ (PGI₂).
- Le système des prostaglandines joue un rôle important dans la régulation des flux sanguins utéro-placentaires via la PGI₂, qui possède une action vasodilatatrice et antiagrégante, et le thromboxane alpha-2 (TXA₂), qui possède les propriétés inverses. L'équilibre entre ces deux molécules antagonistes est indispensable à la régulation du débit utéro-placentaire, avec une augmentation de production au cours de la grossesse en faveur de la PGI₂.

- L'augmentation du stress oxydant dans la PE via la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*) issus de la peroxydation lipidique est bien documentée⁴³. Bien que leur production soit un phénomène physiologique essentiel au métabolisme cellulaire, les ROS peuvent être à l'origine de dommages structuraux et fonctionnels de l'ADN, de l'ARN, des protéines, et des lipides des membranes cellulaires. Dans le placenta pré-éclampsique, le défaut du remodelage des artères spiralées restreint l'afflux de sang maternel au fœtus, produisant des fluctuations importantes de la concentration d'oxygène à l'origine d'épisodes d'ischémie-reperfusion et de la production de DRO⁴⁴. Ces perturbations induisent une apoptose trophoblastique et la libération de débris cellulaires et de facteurs anti-angiogéniques dans la circulation maternelle, ce qui provoque une inflammation et une dysfonction systémique de l'endothélium maternel.
- Des facteurs angiogéniques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le *placental growth factor* (PlGF) sont produits par le placenta lors de la grossesse et sont retrouvés à des taux élevés dans la circulation maternelle. Ils ont une action systémique vasodilatatrice et stimulent la production endothéliale de PGI₂ via leur récepteur membranaire *fms-like tyrosine kinase-1* (Flt-1). En se liant au VEGF et au PlGF, la forme soluble de ce récepteur (sFlt-1 pour *soluble fms-like tyrosine kinase-1*) diminue leur biodisponibilité et inhibe leur activité. Il a été montré sur des modèles animaux que l'augmentation des taux circulants de sFlt-1 provoquait des signes cardinaux de PE (hypertension artérielle, protéinurie, œdèmes) ainsi que les complications sévères associées⁴⁵. En cas de PE, il existe en effet une augmentation importante de sFlt-1 au niveau placentaire, potentiellement liée au stress oxydatif⁴⁶, et une augmentation moindre du VEGF et du PlGF en parallèle, ce qui aggrave l'hypoxie placentaire et participe à la dysfonction endothéliale. Ce déséquilibre de la balance angiogénique PlGF/sFlt-1 est aujourd'hui considéré comme l'un des déterminants physiopathologiques majeurs de PE⁴⁷.

Les RCIU d'origine vasculaire sont donc liés d'une part à un défaut d'invasion trophoblastique, et d'autre part à la constitution d'une véritable « maladie endothéliale », probablement induite par le défaut de remodelage vasculaire et à laquelle pourrait participer une activation de la NETose. La cellule endothéliale libère en excès de l'ET-1 et du TXA₂, ce qui entraîne une augmentation des résistances vasculaires. Les facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote et la PGI₂ sont au contraire libérés de façon réduite par la cellule endothéliale lésée. Cette inversion progressive des rapports TXA₂/PGI₂ aggravent les lésions de l'endothélium mais sont également responsables d'une activation de la cascade de la coagulation en stimulant l'activation de nouveaux thrombocytes et en augmentant l'agrégation plaquettaire.

Cette augmentation de l'agrégabilité plaquettaire a pour conséquence l'apparition de microthrombi, participant ainsi à la mise en place d'une microangiopathie gravidique et d'une coagulopathie intravasculaire qui peut se diffuser à la circulation maternelle générale et entraîner une PE. Cette « maladie endothéliale » touche alors le rein, avec apparition d'une protéinurie et d'une hypertension, puis les vaisseaux hépatiques (HELLP syndrome), voire la circulation cérébrale dans les cas les plus graves (éclampsie).

Tous ces mécanismes sont résumés dans la **Figure 7**.

Le défaut de remodelage des artères spiralées, associé à des lésions d'infarctus, conduit donc à une fragilité vasculaire placentaire. Dans le cas de l'HRP, la restauration brutale de ce flux sanguin, comme par exemple au décours d'une poussée hypertensive, va entraîner un hématome au sein des tissus lésés. Il se forme alors un dépôt de fibrine et une activation de la fibrinolyse qui peut conduire à l'épuisement du fibrinogène et à l'extension de l'hématome.

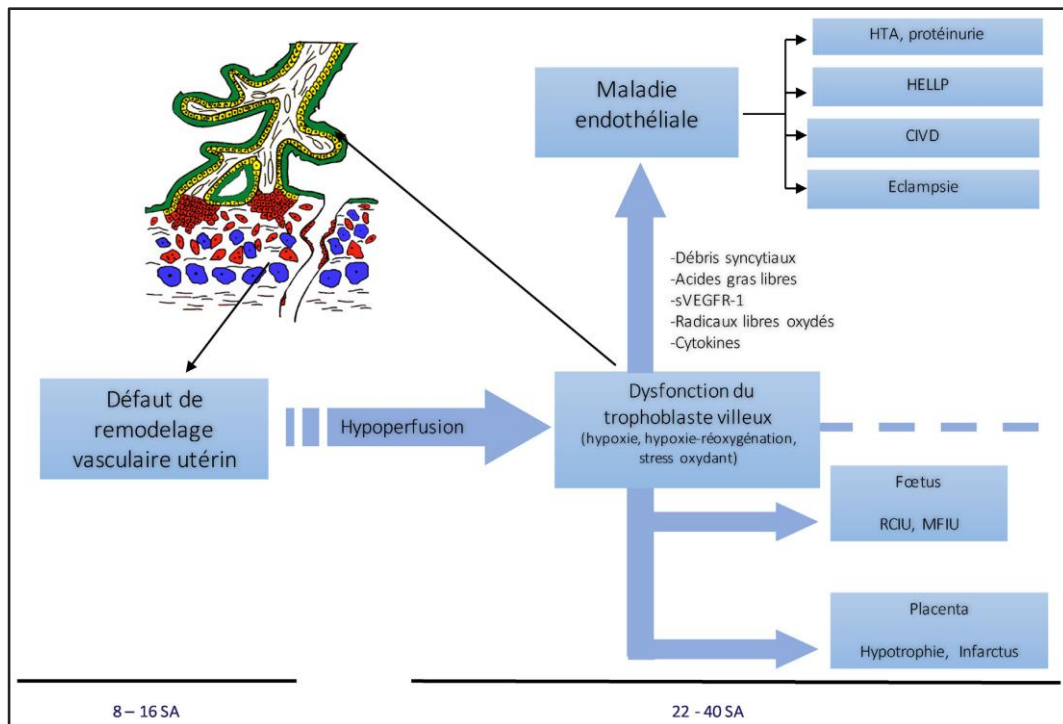


Figure 7 : Schéma physiopathologique de la pré-éclampsie, d'après Lecarpentier et al.⁴⁷

B. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) et biomarqueurs circulants de NETs

1. NETs

a. Généralités et historique

Les PNN représentent la sous-population majoritaire des leucocytes circulants en situation physiologique. En 1880, Paul Ehrlich permet leur classification parmi les autres sous-populations leucocytaires grâce à ses travaux sur les colorants cellulaires⁴⁸.

Ce sont des cellules clés du système immunitaire inné qui constituent une ligne de défense contre de nombreux agents pathogènes tels que les bactéries, les micromycètes et les parasites. Leurs implications dépassent cependant largement les mécanismes microbicides avec notamment des capacités de production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires et des rôles démontrés dans des processus de cicatrisation, d'anaphylaxie, d'athérosclérose, ou encore certains mécanismes thrombotiques⁴⁹ (Figure 9).

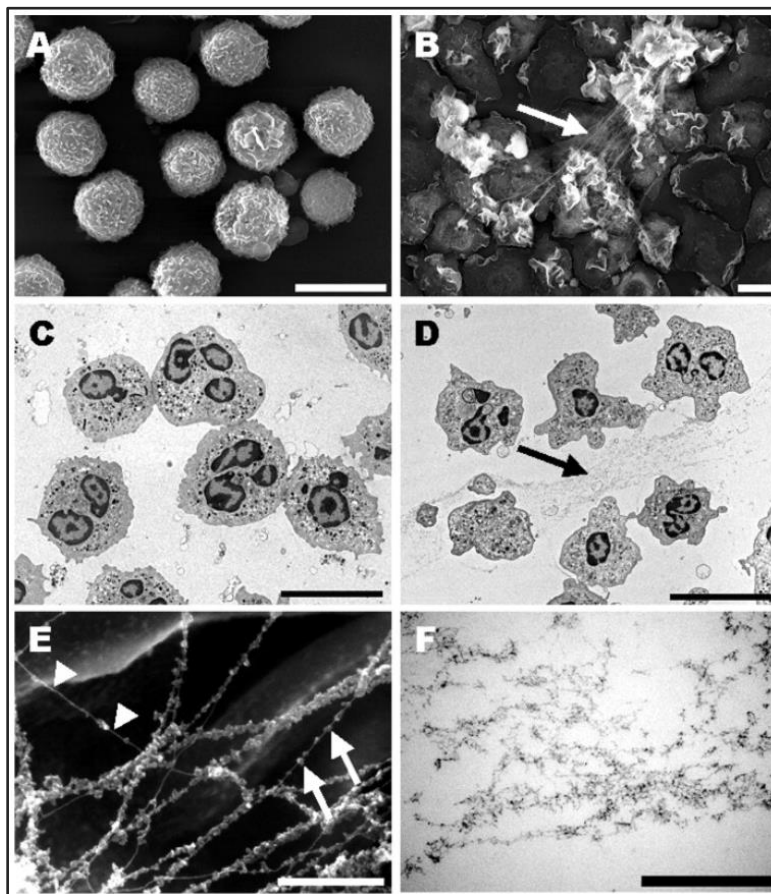
En 2004, une équipe du *Max Planck Institute for Infection Biology* dirigée par Brinkmann découvre *in vitro* qu'une induction des PNN par de l'IL-8, des lipopolysaccharides bactériens ou du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), qui est un activateur puissant de la protéine kinase C, entraîne la production de fibres extracellulaires³. Ces fibres sont composées d'ADN décondensé prenant la forme d'une toile et associées à des enzymes intracellulaires participant à la machinerie antibactérienne, telles que la myéloperoxydase (MPO), l'élastase neutrophile, des pentraxines, la lactoferrine ou la métalloprotéinase de matrice de type 9 (MMP9) (Figure 8).

La nature des composés utilisés pour l'induction suggère que ces fibres, baptisées NETs pour *Neutrophil Extracellular Traps*, interviennent dans certains mécanismes inflammatoires et infectieux. Cette hypothèse a été confirmée *in vitro* par la mise en évidence de l'activité antibactérienne des NETs après stimulation, attribuée auparavant à une action bactéricide des complexes d'histones⁵⁰.

La NETose apparaît ainsi comme une voie de mort cellulaire alternative pour le PNN, et fut pour cette raison l'objet de controverse car ce mécanisme semblait initialement incompatible avec les rôles essentiels et bien connus de chimiotactisme et de phagocytose de ces cellules dans l'immunité innée. L'importance des interactions avec les plaquettes dans la formation des NETs, via la mise en jeu d'une liaison entre les lipopolysaccharides bactériens et le récepteur plaquettaire TLR-4^{51,52} fut démontrée par la suite, ouvrant la voie à la compréhension de l'aspect prothrombotique et procoagulant des NETs.

La réalité de ces mécanismes est désormais bien connue et de nombreux travaux ont permis de comprendre leurs implications dans la physiopathologie de nombreuses maladies appartenant à des champs très variés de la pathologie humaine, tels que le sepsis, les maladies auto-immunes, les cancers et les maladies thrombotiques.

Il a été montré que les polynucléaires éosinophiles⁵³, basophiles et mastocytes⁵⁴ sont également capables de générer des pièges extracellulaires (*Extracellular Traps = ETs*), phénomènes regroupés sous le nom plus générique d'ETosis, et qui semblent coexister chez différentes espèces vivantes, y compris les plantes^{55,56} (*Root Extracellular Traps = RETs*), suggérant une relative conservation de ce mécanisme protecteur au cours de l'évolution.



A : Les PNN au repos sont circulaires et dépourvus de fibres.

B : Après stimulation par du PMA à 25 nM pendant 30 minutes, les cellules s'aplatissent, émettent des protrusions membranaires et forment des fibres = NETs (flèche).

C : PNN naïfs en suspension.

D : Après stimulation par 10 ng d'IL-8 pendant 45 minutes, émission de nombreux pseudopodes par les PNN et formation de NETs dans le milieu extra-cellulaire (flèche).

E : Analyse en MEB à haute résolution des NETs, qui se composent de fibres lisses avec un diamètre de 15 à 17 nm (pointes de flèche) et de domaines globulaires d'un diamètre d'environ 25 nm (flèche). Les complexes globulaires peuvent être agrégés en faisceaux ou fibres épais.

F : Après stimulation par 10 ng d'IL-8 pendant 45 minutes, les NETs émis par les PNN ne sont pas entourés par une membrane.

Figure 8 : Analyse d'un PNN à l'état quiescent et activé par microscopie électronique, d'après Brinkmann³

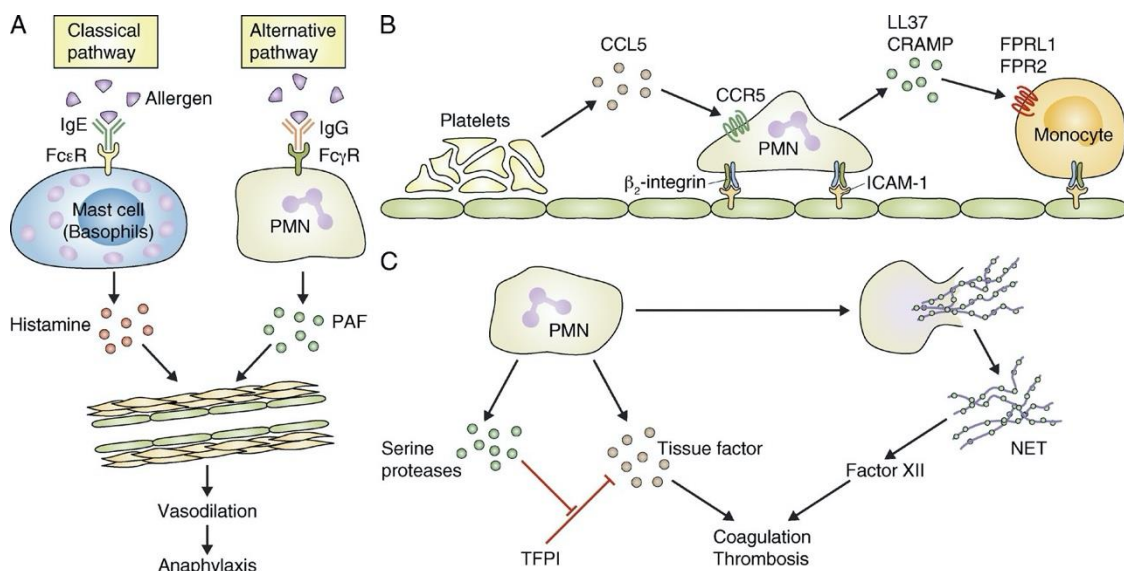


Figure 9 : Fonctions des PNN dans les maladies vasculaires, d'après Mócsai⁴⁹

(A) Les PNN interviennent dans une voie de réaction anaphylactique distincte de la voie classique médiée par les mastocytes ou les basophiles. (B) Le recrutement séquentiel de plaquettes, de PNN et de monocytes participe à la pathogenèse de l'athérosclérose. (C) Les PNN contribuent à la coagulation et à la thrombose en libérant du facteur tissulaire et des inhibiteurs du TFPI (inhibiteur de la voie du facteur tissulaire), ainsi que des NETs procoagulants.

b. Structure et composition des NETs

Les NETs sont composés de filaments d'ADN de l'ordre de 15 nm de diamètre s'enroulant autour d'histones sous forme de nucléosomes³, formant des domaines fortement chargés négativement. Ces réseaux d'ADN sont sensibles à l'action de la désoxyribonucléase (DNase) qui hydrolyse les liaisons phosphodiester de l'ADN et peut ainsi désassembler les NETs.

Les histones des classes H2A, H2B, H3 et H4, qui forment le cœur des nucléosomes en s'associant en octamère, représentent 70 % des protéines associées aux NETs⁵⁷. Ce sont des protéines très riches en acides aminés basiques, notamment en lysine et en arginine, dont la charge positive à pH physiologique permet une interaction forte avec les groupements phosphate de l'ADN qui portent des charges négatives. La transformation des résidus peptidylarginine en peptidylcitrulline se fait grâce à un processus médié par la *peptidyl arginine deiminase* de type IV (PAD4) nommé citrullination⁵⁸⁻⁶⁰ et qui permet ainsi la décondensation de la chromatine (**Figure 10**). Le réseau de NETs émis par un PNN prend alors l'aspect d'un filet occupant un espace environ dix fois plus important que celui occupé par la cellule d'origine.

Plus d'une trentaine de protéines associées aux NETs ont aujourd'hui été identifiées. Il s'agit de protéines d'origine granulaires (élastase neutrophile, lactoferrine, MPO, protéinase 3, *high-mobility group box 1*, cathepsine G), cytoplasmiques (calprotectine, *S100 calcium binding protein*) ou membranaires (intégrines Mac-1 (CD11b/CD18), composants de la NADPH oxydase 2).

À cette structure commune des NETs peuvent s'associer d'autres protéines et composants circulants en fonction des situations physiopathologiques. C'est notamment le cas du vWF⁶¹, du facteur XII⁴ et du facteur tissulaire^{4,62}, qui vont avoir des rôles majeurs dans l'implication des NETs au cours des phénomènes thrombotiques.

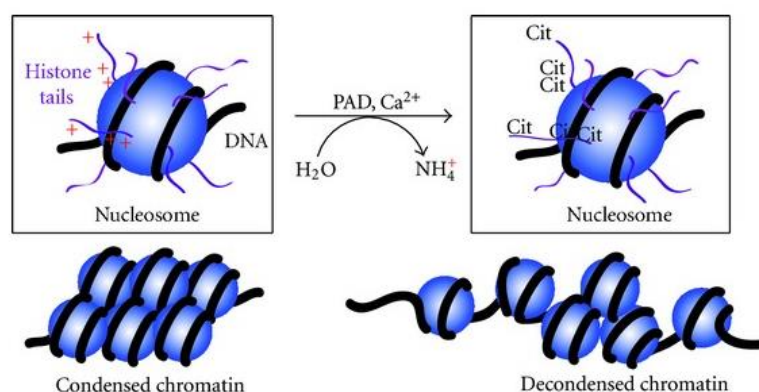


Figure 10 : La citrullination, médiée par PAD4, de résidus arginine sur les histones, entraîne la décondensation de la chromatine, d'après Mohanan et al.⁵⁹

c. Inducteurs de NETose

Le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) est un ester de phorbol synthétique actif à des concentrations nanomolaires, et fut le premier inducteur de formation de NETs à être étudié^{3,63}. C'est un activateur de la voie de signalisation de la protéine kinase C (voie MAPK-ERK)⁶⁴ qui reproduit *in vitro* certains aspects de l'inflammation. Le PMA est capable d'induire un « burst oxydatif » dans le PNN, entraînant un assemblage des différents composants du complexe de la NADPH oxydase⁶⁵. Cette induction pharmacologique court-circuite les récepteurs membranaires physiologiquement impliqués dans la génération de NETs *in vivo*, ainsi que les voies de signalisation secondairement mises en jeu.

De nombreux inducteurs physiologiques de NETose furent par la suite étudiés (**Tableau 1**), principalement dans le cadre de leur capacité de lutte anti-infectieuse. C'est le cas en particulier des lipopolysaccharides bactériens qui sont des composants majeurs de la membrane des bactéries Gram négatif et qui sont reconnus par les PNN via le récepteur TLR4, ce qui entraîne une activation de PAD4 par la voie des Src kinases⁶⁶.

Tableau 1 : Inducteurs physiologiques de NETose

Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i> ^{3,67,68} <i>Streptococcus pyogenes</i> ⁶⁹ <i>Escherichia coli</i> ⁷⁰ <i>Shigella flexneri</i> ³ <i>Salmonella typhimurium</i> ³ <i>Yersinia enterocolitica</i> ⁷¹ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁷² <i>Mannheimia haemolytica</i> ⁷³ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ⁷⁴
Composés bactériens ⁷⁵	Lipopolysaccharide Autres glycoprotéines de membrane
Levures	<i>Candida albicans</i> ^{57,76}
Parasites	<i>Toxoplasma gondii</i> ⁷⁷ <i>Leishmania amazonensis</i> ⁷⁸
Champignons	<i>Aspergillus fumigatus</i> ⁷⁹ <i>Aspergillus nidulans</i> ⁸⁰
Virus	VIH-1 ⁸¹
Médiateurs pro-inflammatoires	TNF- α - IL-8 - PAF
Auto-anticorps et complexes immuns ⁸²	ANCA ⁸³ - Anticorps antiphospholipides ⁹
Plaquettes activées ⁵¹	
Protéines du complément	
Dérivés réactifs de l'oxygène	

d. Mécanisme général de la NETose

En 2007, une équipe canadienne dirigée par Steinberg et Grinstein baptise la mort cellulaire coïncidant avec la formation des NETs de « NETose suicidaire »⁸⁴.

Ce mécanisme fut le premier à être décrit dans la littérature et est fortement dépendant de la production de ROS, et donc de l'action du complexe enzymatique de la NADPH oxydase, impliquant de multiples voies de signalisation intracellulaires.

La formation des NETs se déroulent en plusieurs étapes, au cours desquelles le PNN activé subit de profondes modifications morphologiques. Dans un premier temps, peu après l'activation, le PNN change de conformation et s'aplatit pour favoriser l'adhérence au substratum. Le noyau augmente de volume et les lobulations de la chromatine disparaissent. Les enzymes granulaires, parmi lesquelles l'élastase neutrophile et la MPO, sont transloquées dans le noyau par un mécanisme qui semble dépendre de la production de ROS⁸⁵, et dégradent les histones via une action synergique, entraînant la décondensation de la chromatine⁸⁶. L'enzyme PAD4 intervient à ce stade en assurant la citrullination des histones, amplifiant ainsi ce processus de décondensation⁵⁹. Après environ une heure, la membrane nucléaire se désagrège et le contenu, dénommé « nucléoplasme », constitue une masse homogène au sein du cytoplasme jusqu'à émission dans le milieu extracellulaire sous la forme de filets de chromatine, avec rupture de la membrane cytoplasmique. Les dernières étapes de formation des NETs impliquent l'assemblage avec de nombreuses protéines provenant majoritairement des granules des PNN.

La perméabilisation de la membrane cytoplasmique n'est pas une simple conséquence mécanique de l'expulsion du nucléoplasme mais constitue un véritable processus de mort programmée impliquant des interactions complexes entre filaments d'actine du cytosquelette et histones, et mettant en jeu le complexe d'intégrines Mac-1⁷⁵, récepteur membranaire faiblement exprimé de manière constitutive à la surface des PNN mais dont l'expression augmente lorsqu'ils sont activés. Ce complexe, dont le rôle était déjà connu dans la régulation de certaines fonctions leucocytaires telles que l'adhésion, la migration, la chimiotaxie, la phagocytose, le burst oxydatif et la dégranulation, intervient donc également dans la NETose.

Cette mort programmée se distingue ainsi du mécanisme d'apoptose classique, qui fait intervenir des voies de signalisation différentes. Ceci fut mis en évidence par des expériences de blocage de la voie des caspases, des MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain-Like*) et du protéasome, qui n'ont que très peu affecté la NETose^{87,88}.

L'implication systématique des ROS au cours de la NETose est cependant discutée, au travers d'études mettant en évidence des mécanismes de production de NETs indépendants de la voie des ROS et n'entraînant pas systématiquement une mort cellulaire⁸⁹.

2. Biomarqueurs circulants de NETs

a. Introduction

L'hétérogénéité des techniques utilisées dans la littérature et l'absence de *gold standard* clairement établi témoignent de la complexité de l'étude de la NETose en physiopathologie humaine ou animale.

Historiquement, la plupart des études sur les NETs sont basées sur des techniques d'analyse morphologique et de quantification *ex vivo*, principalement par microscopie. Ces méthodes requièrent une étape d'isolement des PNN suivie d'une étape d'immunomarquage dirigé contre les différents composants des NETs (histones H3 citrullinées (H3Cit), MPO, élastase neutrophile ou protéinase 3) grâce à des anticorps conjugués à des fluorochromes.

Il peut être associé des marquages supplémentaires type colorants Hoechst, qui marquent les cellules nucléées, ou *SYTOX Green* (*Thermo Fisher Scientific*), qui marque l'ADN extracellulaire ou de cellules à la membrane plasmique altérée. Ces colorations supplémentaires permettent de mettre en évidence une éventuelle colocalisation des protéines dérivées des PNN et de l'ADN extracellulaire, suggérant ainsi la présence de NETs (**Figure 11**).

L'immunofluorescence permet une visualisation directe des NETs et constitue souvent une technique complémentaire de vérification d'autres techniques expérimentales dans les études, permettant d'attester leur validité.

Cette technique est cependant de réalisation longue et d'interprétation subjective, s'avérant peu adaptée à la quantification⁹⁰. Les dosages de biomarqueurs circulants de NETs utilisés dans notre étude permettent en revanche une quantification plus objective et moins fastidieuse à mettre en place et tendent aujourd'hui à s'imposer dans les études sur la NETose.

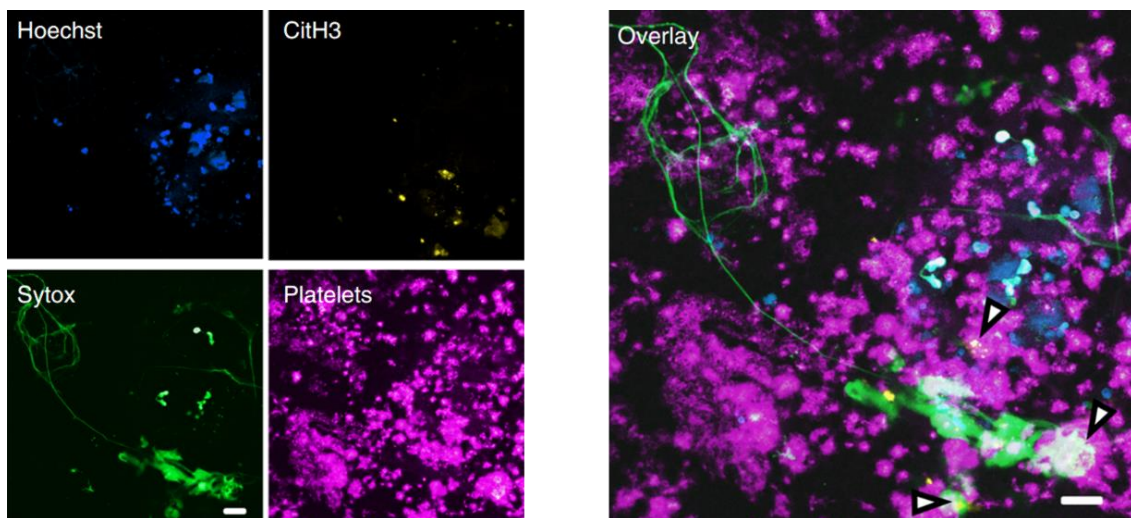


Figure 11 : Exemple de visualisation de NETs par des techniques de fluorescence, d'après Perdomo et al.⁹¹

b. ADN plasmatique

Bien que la quantification d'ADN plasmatique circulant ne soit pas spécifique aux NETs puisque les phénomènes d'apoptose et de lyse cellulaires, que l'on peut par exemple retrouver dans des contextes de cancers^{92,93} ou de pathologies autoimmunes^{94,95}, aboutissent également à la libération de matériel génétique dans la circulation sanguine, il s'agit d'un premier marqueur intéressant pouvant être le reflet d'une libération d'ADN associée à de la NETose. Il a par exemple été montré que les thromboses veineuses profondes étaient associées à des taux d'ADN plasmatique augmentés⁷.

Une étude, dont l'objectif était d'améliorer l'utilisation du fluorochrome sur lequel repose notre technique de dosage, a montré que les concentrations d'ADN plasmatiques étaient plus importantes sur sérum que sur plasma, suggérant que de l'ADN était libéré par les cellules lors de la coagulation⁹⁶. Les échantillons utilisés dans notre étude étaient donc issus de prélèvements sanguins réalisés sur tubes citratés, centrifugés deux fois à 2400 g pendant 10 minutes afin de récupérer le plasma pauvre en plaquettes, et immédiatement répartis en plusieurs aliquots d'environ 180 μ L conservés à -80 °C.

Nous avons ensuite mesuré l'ADN plasmatique en utilisant le kit commercial *Quant-it PicoGreen dsDNA* de *Thermo Fisher Scientific*. Le *PicoGreen* est une sonde capable de s'intercaler dans l'ADN, provoquant alors l'émission d'une fluorescence détectable par un spectrofluoromètre (*InfiniteM200 PRO*, *Tecan*) (**Figure 12**).

Les échantillons et la sonde sont déposés à volume égal dans une plaque de 96 puits. La plaque est de couleur noire pour limiter les interférences de fluorescence d'un puits à l'autre.

Après une incubation de 2 à 5 minutes, l'absorbance est mesurée par le spectrophotomètre à 523 nm, qui correspond à la mesure de la fluorescence après excitation à 480 nm.

Les résultats sont exprimés en ng/mL à partir d'une gamme étalon préparée en parallèle.

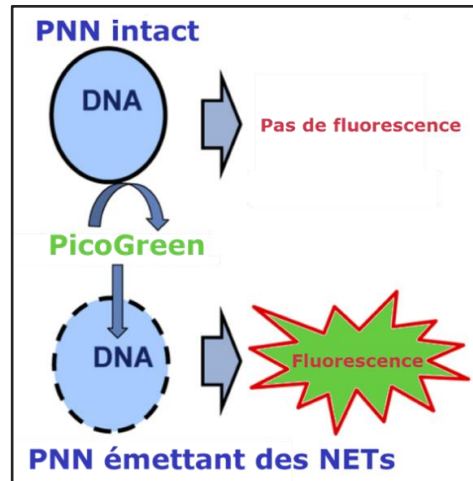


Figure 12 : Principe de détection de l'ADN plasmatisé, d'après Sil et al.⁷²

c. Complexes MPO-ADN plasmatiques

La MPO est une peroxydase héminique qui s'exprime principalement dans les PNN et, dans une moindre mesure, dans les monocytes. En présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'halogénures, la MPO catalyse la formation de ROS, dont l'acide hypochloreux (HClO). Ce dernier favorise la chloration de résidus tyrosine des histones, diminuant leur charge positive et permettant de réduire l'interaction ADN-histone selon un processus similaire à la citrullination⁹⁷. Le système MPO/HClO joue ainsi un rôle important dans la destruction de micro-organismes pathogènes par les PNN. Il a également été démontré que la MPO était un médiateur local des lésions tissulaires et de l'inflammation qui en résulte dans diverses maladies inflammatoires⁹⁸.

Il existe des kits commerciaux permettant de réaliser un immunodosage de la MPO plasmatique par une technique ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay*) classique, mais il est possible de gagner en spécificité en utilisant une technique basée sur un co-marquage de l'ADN circulant associé à la MPO sous forme de complexes MPO-ADN.

Devant l'absence de kit commercial disponible et de méthode validée pour l'étude de ces complexes au niveau plasmatique, nous avons utilisé une technique d'ELISA double sandwich développée dans le cadre du mémoire de Master 2 du Dr Deloison en 2010 à partir du kit *Cell Death Detection ELISA* de Roche, puis modifiée et améliorée par le Dr Colomer et actuellement utilisée au sein de l'unité INSERM 1034 dans le cadre de projets de recherche.

Cette technique ELISA permet de détecter les complexes MPO-ADN présents dans des plasmas obtenus à partir de tubes citratés ou EDTA. Le principe général est de capturer ces complexes circulants grâce à deux anticorps, l'un reconnaissant la MPO, et l'autre l'ADN (**Figure 13**).

Description de la technique :

- Une solution d'anticorps anti-MPO (*mouse anti-human myeloperoxydase, Bio-Rad*) à 5 $\mu\text{g/mL}$ est diluée au 1/200^{ème}, puis coâtée sur une plaque de 96 puits de haute affinité (fournie dans le kit ou plaque qualité ELISA type *MaxiSorp*).

- Après incubation d'une nuit à 4 °C sans agitation, la plaque est lavée trois fois avec un tampon de lavage (type PBS + Tween 20 à 0,05 %). Les puits sont saturés avec un tampon d'incubation (fourni dans le kit) pendant 30 minutes à température ambiante.
- La plaque est de nouveau lavée trois fois puis 40 µL de plasmas à tester, issus de prélèvements réalisés sur tubes citratés conservés à -80 °C, sont mis à incuber avec 60 µL de tampon d'incubation pendant 90 minutes à température ambiante et sans agitation.
- Chaque puits est lavé trois fois et incubé avec un anticorps anti-ADN couplé à la peroxydase (kit *Cell Death Detection ELISA, Roche*) dilué au 1/20^{ème} en tampon d'incubation.
- Après 90 minutes d'incubation sans agitation et un triple lavage, 100 µL de solution ABTS (fournie dans le kit) sont ajoutés, suivi d'une incubation de 30 minutes sous une agitation de 300 rotations par minute et à l'abri de la lumière.
- La réaction est stoppée par l'ajout de 100 µL de dodécylsulfate de sodium (SDS).
- La solution ABTS, incolore, donne un composé chromogénique vert après action de la peroxydase. L'absorbance est mesurée à 490 nm (au maximum du signal) et à 405 nm (correspondant au bruit de fond) par un spectrophotomètre (*InfiniteM200 PRO, Tecan*). L'absorbance corrigée est obtenue en soustrayant A_{490nm} à A_{405nm} .
- Tous les échantillons sont passés en double et un blanc est réalisé à chaque manipulation en substituant le plasma par du tampon d'incubation.

En raison du manque de standardisation d'une comparaison d'absorbances entre les différentes études, une équipe américaine a proposé une méthode basée sur la création d'une gamme à partir de NETs obtenus d'un pool de donneurs⁷². Nous avons ainsi considéré qu'un pool de 5 donneurs différents de NETs obtenus après activation par du PMA à 100 nM correspondait au 100 % de la gamme de dilution, puis rapporté les absorbances à cette gamme. Les résultats sont ainsi exprimés en « % équivalent NETs » par rapport à la gamme.

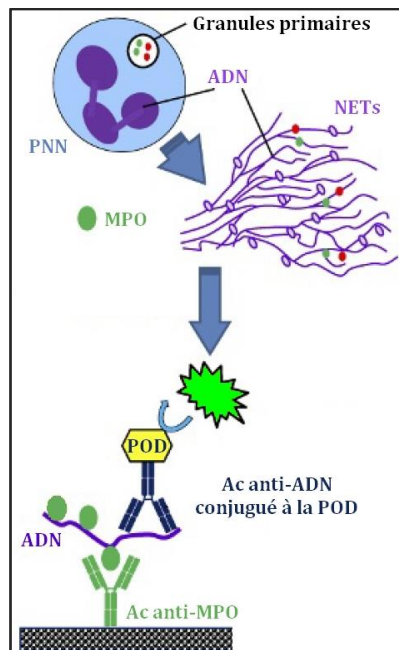


Figure 13 : Principe de détection des complexes MPO-ADN en ELISA, d'après Sil et al.⁷²

d. Histones H3 citrullinées

Bien que le dosage des complexes MPO-ADN semble être plus spécifique qu'un dosage de la MPO seule, celle-ci peut se lier à de l'ADN dans des contextes de lésions tissulaires indépendants de la formation de NETs, ce qui remet en question sa spécificité en tant que marqueur de NETs. Il semble donc important de développer de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques.

La citrullination des histones H3 par PAD4 joue un rôle central dans la formation des NETs^{60,99}. Les histones H3 citrullinées (H3Cit) sont ainsi considérées comme des biomarqueurs spécifiques de NETose. Leur quantification reste cependant délicate en raison d'un manque de tests standardisés.

Nous avons utilisé dans cette étude une technique validée par une équipe suédoise en 2017 à partir du kit *Cell Death Detection ELISA* de Roche¹⁰⁰ (**Figure 14**).

Description de la technique :

- Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'histones H3 humaines recombinantes (*Cayman Chemical*) citrullinées *in vitro* avec une PAD4 humaine recombinante (*Cayman Chemical*) par une incubation d'une heure à 37 °C dans une solution tampon.
- 100 µL de biotine anti-histone (fournie dans le kit) diluée au 1/10^{ème} en tampon d'incubation sont ajoutés dans les puits de la plaque pré-coatés avec de la streptavidine, molécule ayant une très haute affinité pour la biotine, et incubés pendant 2 heures.
- Après un quadruple lavage (PBS + Tween à 0,05 %), 50 µL de plasmas à tester, issus de prélèvements réalisés sur tubes citratés conservés à -80 °C, sont déposés dans les puits et incubés pendant 90 minutes avant un nouveau cycle de lavage.
- 100 µL d'anticorps polyclonaux anti-H3Cit de lapin (*Abcam*) sont déposés dans chaque puits et incubés pendant une heure.
- Après un quadruple lavage, les puits sont de nouveau incubés pendant une heure avec 100 µL d'anticorps caprins anti-péroxydase de raifort (HRP) de lapin, suivi d'un nouveau cycle de lavage.
- 100 µL de tétraméthylbenzidine (TMB) (*Sigma-Aldrich*) sont ajoutés dans chaque puits et incubés dans l'obscurité pendant 20 minutes. La réaction est alors stoppée par l'ajout de 50 µL de solution de blocage (*Thermo Scientific*).
- L'absorbance est mesurée à 450 nm (au maximum du signal) et à 620 nm (correspondant au bruit de fond) par le spectrophotomètre (*InfiniteM200 PRO, Tecan*).

Les résultats sont ainsi exprimés en mesure d'absorbance à 450 nm.

La limite de détection de cette technique est d'environ 5 ng/mL H3Cit¹⁰⁰.

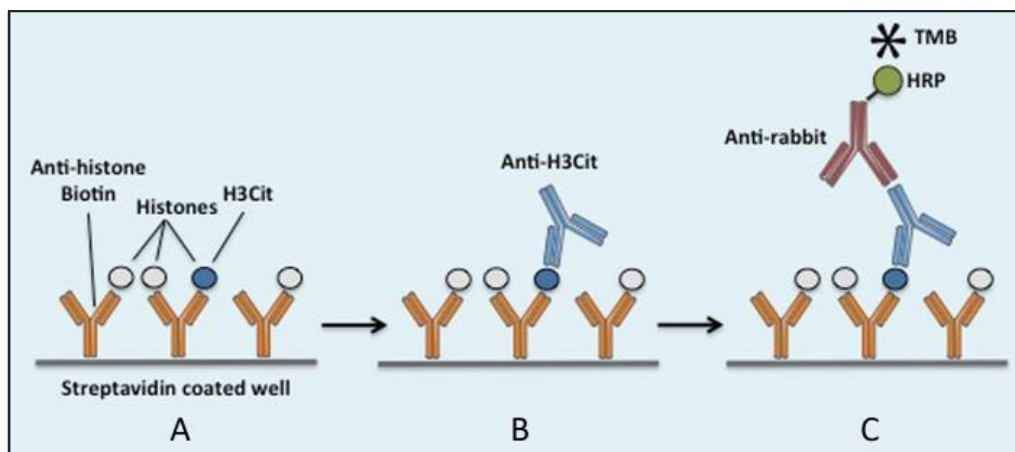


Figure 14 : Schéma de la procédure ELISA H3Cit, d'après Thålin¹⁰⁰

(A) L'anticorps de capture est coaté dans des puits pré-coatés avec de la streptavidine pendant une première incubation. Les échantillons sont déposés dans les puits et les histones se lient à l'anticorps de capture pendant une deuxième incubation. **(B)** Après lavage, l'anti-H3Cit est ajouté aux puits, se liant à l'H3Cit immobilisée mais pas aux histones H3 qui ne sont pas citrullinées, pendant la troisième incubation. **(C)** Au cours de la quatrième incubation, un anticorps anti-lapin conjugué à la HRP est ajouté et se lie à l'anti-H3Cit. Pour finir, la TMB est ajoutée pour la détection.

e. DNase

La DNase hydrolyse les liaisons phosphodiester de l'ADN, constituant ainsi un mécanisme physiologique de dégradation des NETs¹⁰¹. Elle est exprimée dans l'organisme par des tissus non hématopoïétiques ou des cellules immunitaires¹⁰².

Certaines bactéries pathogènes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ou *Staphylococcus aureus* expriment également à leur surface des DNases capables de désassembler les NETs, qui agissent ainsi comme des facteurs de virulence^{69,103}. À l'inverse, comme par exemple lors d'une activation pathologique de la NETose suite à une morsure de vipère, l'administration de DNase limite les lésions de l'hôte grâce à son action sur les NETs¹⁰⁴.

La production de DNase de type 1 semble pouvoir être altérée dans certaines pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé¹⁰¹. Il a également été montré dans le contexte de lupus que le niveau d'activité myéloperoxydase et le taux d'ADN libre plasmatique étaient corrélés à la concentration de DNase¹⁰⁵, laissant penser que celle-ci est exprimée de manière compensatoire de façon à réguler la NETose. Nous avons donc considéré la DNase comme un potentiel biomarqueur de NETose dans cette étude.

Il existe plusieurs techniques de détection de l'activité de la DNase 1. La technique historique est une méthode de diffusion radiale sur des plaques d'agar¹⁰⁶. Les échantillons de sérum et plasma testés sont déposés dans des puits creusés dans la plaque et la DNase 1 diffuse dans l'agar en hydrolysant l'ADN. Après une période déterminée, la réaction d'hydrolyse se termine par l'ajout de citrate de sodium. La lame est alors traitée avec de l'*Amido black 10B* qui colore l'ADN polymérisé. L'ADN hydrolysé n'étant pas coloré, il est alors possible de mesurer avec précision l'étendue de l'activité enzymatique, le diamètre de l'activité ADNasique correspondant au diamètre de l'aire non colorée moins le diamètre du puits. Les mesures peuvent ensuite être converties en ng/mL en utilisant une courbe d'étalonnage. Ce test est suffisamment sensible pour détecter une activité ADNasique allant de 1 à 100 ng/mL mais présente comme principal inconvénient une réalisation longue et délicate, avec des temps d'incubation et de séchage importants.

La technique que nous avons utilisée, développée par le Dr Colomer au sein de l'unité INSERM 1034, repose sur une incubation des plasmas à tester en présence d'ADN, suivie d'une quantification de l'ADN résiduel par le même principe que pour la détection de l'ADN plasmatique.

Description de la technique :

- Une gamme de DNase 1 recombinante est préparée en parallèle à partir d'une solution-mère à 10 mg/mL de Roche.
- Le kit commercial *Quant-it PicoGreen dsDNA* de *Thermo Fisher Scientific* est ensuite utilisé, avec une incubation des plasmas à tester à la fois en présence d'une quantité connue d'ADN (100 µL d'une solution ADN à 0,5 µg/mL) et sans ADN (remplacé par 100 µL de Tris-EDTA 1X, *Fisher Scientific*), afin de pouvoir déterminer la part d'ADN venant du plasma par soustraction.
- L'incubation est faite dans une plaque noire pour limiter les interférences de fluorescence d'un puits à l'autre à la lecture, pendant 2 heures, à 37°C et sans agitation. La DNase est ensuite inactivée par 25 µL de PBS-EDTA 25 mM à 4 °C.
- 150 µL de *PicoGreen* sont répartis dans chaque puits et la plaque est incubée à l'abri de la lumière pendant 2 à 5 minutes. La fluorescence est ensuite mesurée par le spectrophotomètre (*InfiniteM200 PRO*, *Tecan*) après une incubation de 2 à 5 minutes sous une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et d'émission de 523 nm.

Les résultats sont exprimés en ng/mL à partir des points de la gamme étalon.

3. NETs et pathologies thrombo-emboliques

a. Mécanismes de promotion de la thrombose par les NETs

L'importance des NETs dans la thrombose est désormais bien établie.

Les NETs favorisent la formation de fibrine en activant la coagulation, à la fois par les voies extrinsèque et intrinsèque : l'ADN, chargé négativement, peut activer le facteur XII, initiateur de la voie intrinsèque de la coagulation^{4,5}, et le facteur tissulaire présent sur les NETs peut activer la coagulation par la voie extrinsèque^{6,7}.

Il a en effet été montré que les PNN étaient capables d'exprimer du facteur tissulaire fonctionnel à leur surface, probablement par des mécanismes de transfert^{62,107,108}, et que celui-ci était retrouvé à la surface des NETs, participant à leur action pro-coagulante⁵.

Les NETs peuvent également lier à la fois le vWF et les plaquettes^{5,6}. Les histones H3 et H4 augmentent l'expression membranaire de phosphatidylsérine et de P-sélectine en activant les plaquettes, qui vont à leur tour potentialiser l'activation de la coagulation⁵. En se liant à la protéine C, les histones empêchent son activation par la thrombomoduline, neutralisant ainsi son action anticoagulante⁵. Elles sont également capables d'interagir avec l'endothélium en l'activant et peuvent avoir une action cytotoxique sur celui-ci¹⁰⁹. Les histones, de par leurs capacités à activer les plaquettes, à inhiber la fibrinolyse et à endommager l'endothélium, contribuent ainsi fortement à la formation des thromboses⁵ (**Figure 15**).

D'autres composants des NETs sont également impliqués dans la propagation de la coagulation. Les enzymes telles que l'élastase neutrophile et la MPO vont respectivement cliver et oxyder les anticoagulants endogènes dont le TFPI et la thrombomoduline⁶.

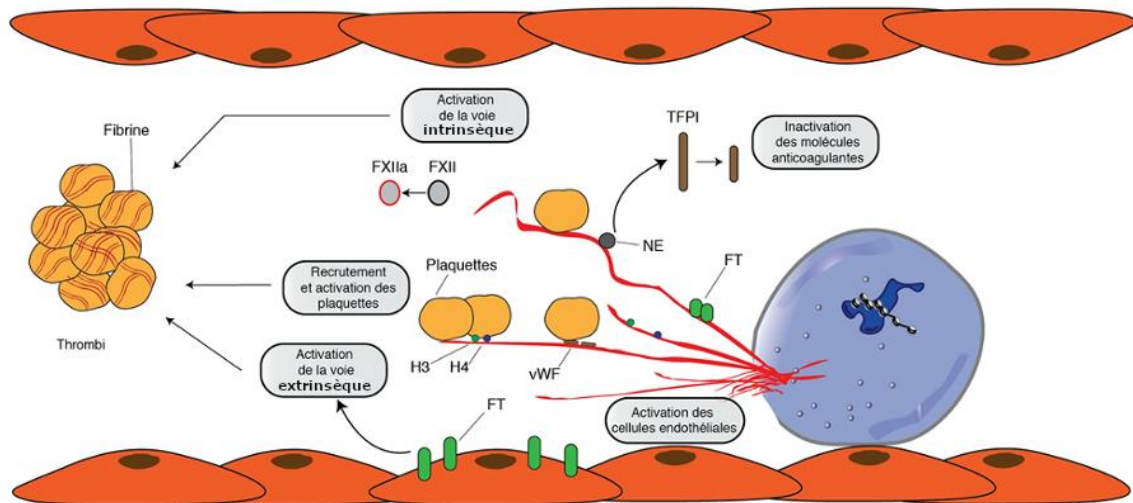


Figure 15 : Mécanismes de promotion de la thrombose par les NETs, d'après Guy et James¹¹⁰

Les NETs sont capables d'activer les cellules endothéliales, entraînant une surexpression du facteur tissulaire (FT) et une activation de la voie extrinsèque de la coagulation, qui est aussi médiée par le FT associé aux NETs. Les NETs activent également la voie intrinsèque via l'activation du facteur XII (FXII) et inhibent certaines protéines anticoagulantes comme le tissu factor pathway inhibitor (TFPI). Enfin, les NETs peuvent lier et activer les plaquettes via les histones H3 et H4, ainsi que par le facteur de von Willebrand (vWF) présent à leur surface.

L'action délétère des NETs dans la physiopathologie de la thrombose a été démontrée dans des modèles murins, à la fois dans la thrombose veineuse^{4,61} et dans la thrombose artérielle⁶².

Chez l'homme, des études ont montré la présence de NETs dans les thromboses veineuses¹¹¹. Une corrélation entre ces phénomènes thrombotiques et des biomarqueurs plasmatiques de NETose ont été mis en évidence, comme par exemple une augmentation de l'ADN plasmatique dans les thromboses veineuses profondes⁷ ou des taux élevés d'H3Cit associés à une augmentation de survenue d'évènements thrombotiques veineux chez des patients avec une pathologie tumorale¹¹².

b. NETs et SAPL

Les premiers cas de thromboses associées à un allongement des tests de coagulation lié à la présence d'un anticoagulant circulant de type lupique (LA) furent décrits en 1963¹¹³. En 1980, *Soulier* et *Boffa* rapportent les premières associations entre fausses couches répétées et évènements thrombotiques en présence d'un LA¹¹⁴.

Alors que la première conférence internationale sur les antiphospholipides a lieu en 1984, le SAPL est finalement décrit en 1987 par *Harris* comme l'association d'au moins un critère biologique à au moins une manifestation clinique¹¹⁵.

Le SAPL est une maladie auto-immune acquise, caractérisée par la survenue de manifestations thrombo-emboliques et/ou la survenue de complications obstétricales, associées à la présence, à au moins deux reprises et à au moins 12 semaines d'intervalle, d'anticorps de type antiphospholipides. Ces critères diagnostiques ont été définis en 1998 par un collège d'experts dans les suites d'une conférence à Sapporo, et publiés en 1999¹¹⁶. Ils ont été actualisés par la suite lors du congrès sur le SAPL de 2004 qui s'est déroulé à Sydney (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Critères de classification du SAPL, dit "critères de Sydney", publiés en 2006¹¹⁷

Critères cliniques
<i>Thrombose vasculaire :</i> Au moins un épisode thrombotique artériel, veineux ou capillaire Évènement confirmé par imagerie ou histologie
<i>Et/ou</i>
<i>Complications obstétricales :</i> Au moins trois fausses couches spontanées, consécutives et inexplicées, avant la 10 ^{ème} semaine de gestation, après exclusion d'une anomalie anatomique ou hormonale maternelle et d'une anomalie chromosomique maternelle ou paternelle ; <i>Ou</i> Une MFIU inexplicée avec fœtus de morphologie normale après la 10 ^{ème} semaine de gestation ; <i>Ou</i> Au moins un accouchement prématuré avec fœtus de morphologie normale avant la 34 ^{ème} semaine de gestation, en rapport avec la survenue d'une pré-éclampsie ou éclampsie sévère, ou avec démonstration d'une insuffisance placentaire.
Critères biologiques
<i>Retrouvés sur deux prélèvements de sérum ou plasma effectués à au moins 12 semaines d'intervalle</i> Lupus anticoagulant <i>(recherché selon les recommandations de l'International Society on Thrombosis and Haemostasis¹¹⁸)</i> <i>Ou</i> Anticorps anti-cardiolipine (IgG ou IgM) à un titre intermédiaire ou élevé <i>(mesurés par une technique ELISA standardisée)</i> <i>Ou</i> Anticorps anti-β ₂ GP1 (IgG ou IgM) à un titre intermédiaire ou élevé <i>(mesurés par une technique ELISA standardisée)</i>

On parle de SAPL primaire en l'absence de pathologie auto-immune associée et de SAPL secondaire dans le cas contraire.

Les APL sont classés en deux sous-types, en fonction de la méthode qui permet leur détection :

- Les **tests de coagulation**, variables selon les laboratoires, sont utilisés afin de mettre en évidence les anticoagulants circulants de type lupique (ACC) appelés également lupus anticoagulants (LA). Les tests utilisés sont généralement de type TCA sensibilisé avec un réactif spécifique, pauvre en phospholipides, et test du dRVVT (temps de venin de vipère Russel dilué), plus spécifique.
- La **méthode immunologique**, de type ELISA, permet de détecter les anticorps anticardioliipines et anti- β_2 glycoprotéine-1 (anti- β_2 GP1) anti, ceux-ci pouvant être des entités distinctes des ACC, leur taux de recouvrement n'étant que de 60 %.

Le SAPL est un facteur de risque bien établi dans la survenue d'accidents obstétricaux tels que les FCS précoces, les MFIU et la prématurité¹¹⁹. Certaines études mettent en avant la responsabilité d'un mécanisme thrombogène exclusif, via la liaison des APL aux protéines de la prothrombine^{120,121}, tandis que d'autres auteurs suggèrent que les APL fixeraient le complément activé aux plaquettes lors de la mise en jeu des cellules inflammatoires et de l'immunité innée, contribuant à l'augmentation du risque thrombotique¹²².

Yalavarthi et al. ont décrit la libération de NETs, favorisée par les anticorps anti-cardiolipine, comme un nouveau mécanisme possible de thrombose dans le SAPL. Après avoir confirmé l'hypothèse que les APL activent les PNN pour libérer les NETs, les chercheurs ont démontré que les PNN isolés de patients atteints de SAPL augmentaient significativement la libération spontanée de NETs par rapport aux témoins. Il a de plus été mis en évidence une corrélation positive entre les ACC, les anticorps anti- β_2 GP1 et anti-cardiolipine, et les complexes MPO-ADN circulants⁸.

La β_2 GP1 est sécrétée par le foie, les monocytes, les trophoblastes, les cellules endothéliales et les plaquettes¹²³. La présence d'anticorps anti- β_2 GP1 est fréquemment associée à des événements thrombotiques et une dysfonction des cellules vasculaires¹²⁴, suggérant une implication possible dans la survenue des PVP via une atteinte endothéliale.

Il a été montré dans des modèles murins que les fausses couches déclenchées par des APL impliquaient l'activation de la cascade du complément, notamment C3 et C5, qui conduisent à l'activation des PNN via l'expression de leur facteur tissulaire. Ces mécanismes induisent la production de ROS qui pourrait ensuite endommager le trophoblaste, entraînant à terme la fausse couche⁴⁰ (**Figure 16**).

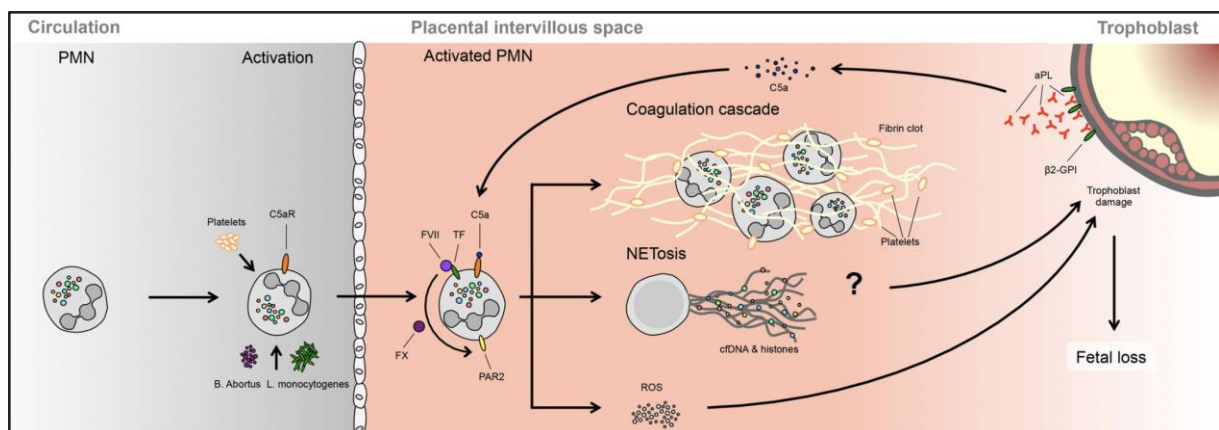


Figure 16 : Rôle possible des NETs dans les fausses couches spontanées, d'après Hahn et al⁴⁰.

c. NETs et endothélium vasculaire

La capacité des NETs à activer l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans l'initiation de la thrombose veineuse, en permettant la libération des corps de Weibel-Palade (WPB) endothéliaux qui contiennent notamment du vWF et de la P-sélectine.

Il a été montré sur des expériences *in vitro* que mettre en culture des cellules endothéliales activées avec des PNN favorisait la génération de NETs par ces derniers¹²⁵ (**Figure 18**). La formation des NETs dépend alors des plaquettes⁵¹ ou de l'IL-8 et des ROS libérés par l'endothélium¹²⁶. Les NETs formés peuvent ensuite être responsables d'une mort cellulaire endothéliale^{51,126,127} via l'activité de certaines protéases ou protéines cationiques qui leur sont associées, comme les défensines et les histones^{127,128}. Ces dernières présentent une haute affinité pour les PL membranaires et leur interaction avec les membranes endothéliales entraîne la formation de pores membranaires avec influx d'ions^{109,129,130}, en particulier de Ca²⁺, provoquant l'exacerbation de l'activation endothéliale et de la libération des WPB¹³¹.

Les interactions entre l'endothélium activé et les PNN circulants sont aujourd'hui de mieux en mieux connues¹³² (**Figure 17**) et s'inscrivent dans le concept plus général d'immunothrombose.

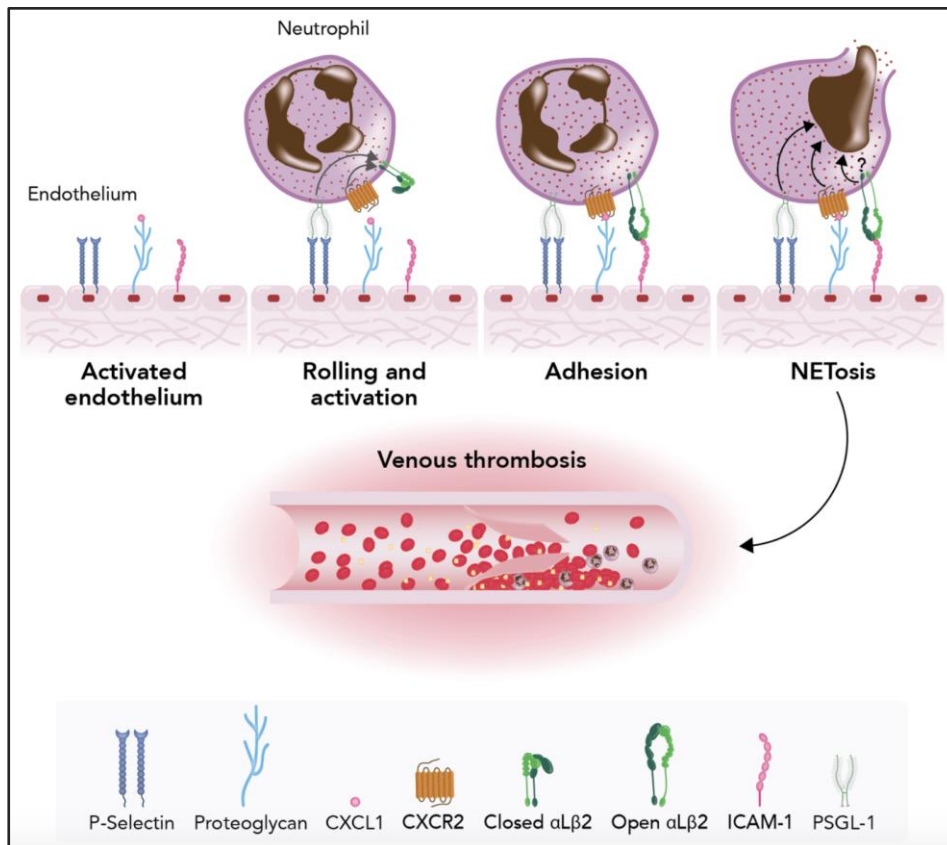


Figure 17 : Recrutement des PNN et renforcement de la thrombose veineuse, d'après Yago et al.¹³²

L'endothélium activé exprime la P-sélectine, l'ICAM-1 et la CXCL1 fixée aux protéoglycanes membranaires. Les PNN sont d'abord capturés par l'endothélium activé par une interaction entre la P-sélectine et la PSGL-1, puis par une interaction entre la CXCL1 et son récepteur, le CXCR2. La signalisation intracellulaire induite par la PSGL-1 et le CXCR2 conduit à un changement conformationnel de l'intégrine αLβ2 qui interagit avec l'ICAM-1 et assure une adhésion ferme. La formation de NETs est ensuite déclenchée par des signaux en aval de PSGL-1 et CXCR2.

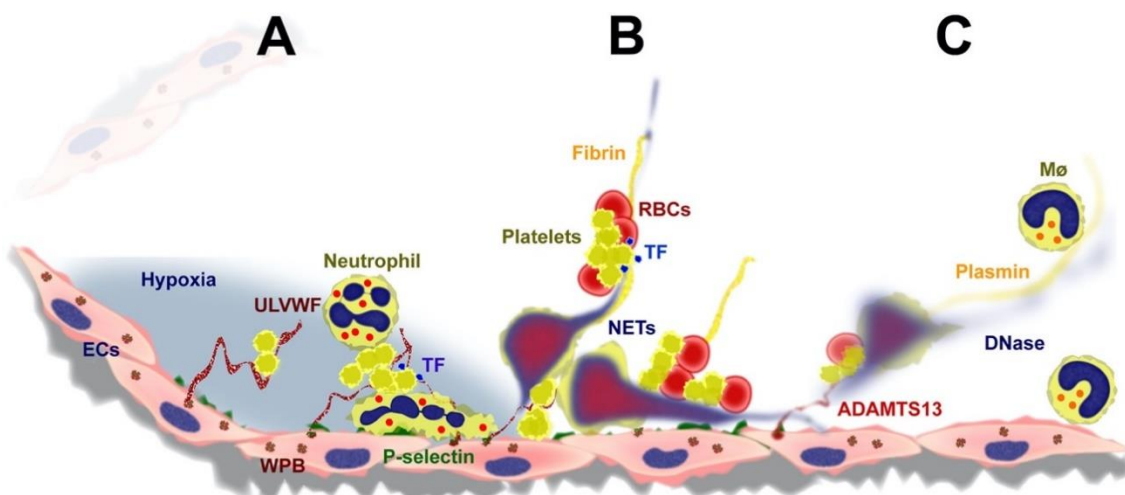


Figure 18 : Un modèle d'implication des NETs dans la thrombose veineuse profonde, d'après Fuchs et al.⁶⁸

(A) La thrombose veineuse profonde est déclenchée par une hypoxie locale et l'activation des cellules endothéliales (ECs) à la suite d'une restriction/perturbation du flux. L'endothélium activé libère du facteur de von Willebrand ultra-large (ULVWF) et de la P-sélectine contenus dans les corps de Weibel-Palade (WPB) endothéliaux et qui servent alors de médiateurs pour l'adhésion des plaquettes et des neutrophiles. Les plaquettes activées recrutent ensuite le facteur tissulaire (TF) qui va activer la voie intrinsèque de la coagulation. **(B)** Les plaquettes activées et l'endothélium induisent la formation de NETs chez les PNN adhérents. Les NETs fournissent une structure supplémentaire pour l'adhésion des plaquettes et des globules rouges, favorisent la formation de fibrine et exacerbent l'activation des plaquettes et de l'endothélium. **(C)** La plasmine, l'ADAMTS13 et la DNase dégradent ensuite respectivement la fibrine, l'ULVWF et l'ADN extracellulaire lors de la thromolyse. Les monocytes/macrophages (Mø) libèrent une source supplémentaire de DNase, génèrent de la plasmine et favorisent le rétablissement du flux sanguin.

d. Le concept d'immunothrombose

Le terme « immunothrombose » a été utilisé pour la première fois en 2013 par Engelmann et Massberg⁶, faisant évoluer le paradigme de Virchow en décrivant le lien entre réponse immunitaire innée et coagulation sanguine. La découverte de cette interaction étroite découle des observations réalisées ces dernières années, en particulier concernant la NETose.

De nombreux acteurs du système immunitaire inné (PNN, monocytes, système du complément) et hémostatique (plaquettes, cellules endothéliales, facteurs de la coagulation) interviennent et permettent la génération intravasculaire d'un réseau de microthrombi facilitant la capture, la reconnaissance puis la destruction des pathogènes, permettant ainsi d'endiguer leur dissémination tout en limitant les effets collatéraux sur l'organisme.

Les NETs jouent ainsi un rôle central dans ce concept d'immunothrombose, où leurs propriétés antimicrobiennes sont liées à leur activité prothrombotique^{61,133}. Le rôle protecteur des NETs dans l'infection peut néanmoins avoir un coût élevé, comme l'illustre l'association entre la formation intravasculaire de NETs et les lésions endothéliales, la mauvaise perfusion et les lésions organiques observées dans des modèles murins d'endotoxémie^{9,51,134}.

Dans le contexte des pathologies vasculaires placentaires, la constitution d'une « maladie endothéliale » au sein du placenta, probablement induite par le défaut de remodelage vasculaire, laisse à penser que tous ces mécanismes impliquant les NETs ont lieu également et pourraient être des éléments physiopathologiques importants chez les femmes pour lesquelles il n'est pas retrouvé de thrombophilie associée.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

A. Hypothèse

Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse que les NETs étaient impliqués dans la survenue d'une PVP ou de FCR chez les patientes pour lesquelles aucun terrain de thrombophilie sous-jacente n'a été démontrée. Plus précisément, que les patientes ayant des antécédents de PVP ou de FCR sans thrombophilie ont des taux basaux de biomarqueurs de NETose augmentés par rapport à des témoins sains, et se rapprochant des taux observés chez des patientes ayant un SAPL avéré.

B. Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient de comparer les taux de plusieurs biomarqueurs de NETose (ADN libre plasmatique, complexes MPO-ADN, histones H3 citrullinées, et DNase) des patientes pour lesquelles les complications obstétricales restent inexpliquées avec (1) les taux de NETs de sujets contrôles sains, et (2) les taux de NETs dosés chez des patientes avec complications obstétricales et des antiphospholipides intermittents ou un SAPL avéré.

Les résultats de la thèse sont présentés sous forme d'article.

ARTICLE

NETs-associated markers in placental vascular pathologies

Keywords

- Neutrophil extracellular traps
- Placental vascular pathology
- Uteroplacental vascular insufficiency
- Antiphospholipid syndrome
- Recurrent early pregnancy loss
- Cell-free DNA
- MPO-DNA complex
- Citrullinated histone H3
- DNase

Abbreviations

- **APS:** antiphospholipid syndrome
- **cfDNA:** cell-free DNA
- **DNase:** deoxyribonuclease
- **H3Cit :** citrullinated histone H3
- **IUFD:** intrauterine fetal demise
- **IUGR:** intrauterine growth restriction
- **NETs:** neutrophil extracellular traps
- **PVP:** placental vascular pathology
- **REPL:** recurrent pregnancy loss
- **RPH:** retroplacental hematoma
- **VWF:** von Willebrand factor

Abstract

Placental vascular pathologies refer to vascular complications associated with a dysregulated maternal-blood circulation caused by an abnormal placental vascularization. These pathologies frequently involve thrombophilia. For example, patients with antiphospholipid syndrome, a hypercoagulable state, are severely affected by these pregnancy-related complications. Thrombophilia is also a risk factor for recurrent early pregnancy loss, another common obstetric disorder.

However, thrombophilia does not explain all placental vascular pathologies and recurrent early pregnancy losses. Some patients are indeed free of the biological markers of thrombophilia (presence of antiphospholipids; deficiency in antithrombin, protein C or protein S; activated protein C resistance; factor V Leiden or factor II mutations; or hyperhomocysteinemia), suggesting that these conditions may be driven by another underlying mechanism.

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) are networks of decondensed chromatin and proteins released by polymorphonuclear neutrophils actively involved in thrombosis, including the antiphospholipid syndrome.

No study has yet investigated the relationship between NETs and PVP/REPL. According to recent observations on the pathogenic potential of the compounds on endothelial and trophoblastic cells, we hypothesized that NETs are involved in the onset of PVP/REPL in patients without thrombophilia. More precisely, that patients with PVP/REPL free of thrombophilia have increased baseline levels of NETs compared to healthy controls and have similar levels to those achieved in patients with obstetric APS. The aim of this study was thus to compare plasma levels of several NET biomarkers (cell-free DNA, MPO-DNA complexes, citrullinated histones H3, and DNase) of patients with a history of unexplained PVP or REPL with (1) healthy controls, and (2) patients with obstetric APS or unconfirmed antiphospholipid antibodies.

We found significantly higher levels of MPO-DNA complexes and DNase in patients with unexplained PVP/REPL compared to healthy controls. Conversely, levels of citrullinated histones H3 and cell-free DNA were significantly higher in healthy controls than in the study patients. There was no difference in NETs levels according to the antiphospholipid antibody status (no antiphospholipid antibodies, intermittent or unconfirmed antiphospholipid antibodies at 12 weeks, or confirmed obstetric antiphospholipid syndrome).

As previous studies have shown that NET biomarkers such as MPO-DNA complexes were increased in antiphospholipid syndrome, these results appear to be consistent with our hypothesis of increased baseline NETs levels in patients without thrombophilia. The lower levels of NETs found in patients compared to healthy controls may reflect the lack of sensitivity of some NETs biomarkers to evaluate NETosis. Further studies with larger sample sizes, prospective follow-ups and a control group of women with a history of non-complicated pregnancies are required to confirm these results.

Introduction

Placental vascular pathology (PVP) refers to a vascular complication associated with preeclampsia and eclampsia, retroplacental hematoma (RPH), HELLP syndrome, small for gestational age newborns, intrauterine growth restriction (IUGR), and intrauterine fetal demise (IUFD). These conditions are characterized by a dysregulated maternal-fetal blood circulation caused by an abnormal placenta vascularization and for which thrombophilia is frequently involved. For example, patients with antiphospholipid syndrome (APS), a hypercoagulable state, are severely affected by these pregnancy-related complications. Thrombophilia is also a risk factor for recurrent early pregnancy loss (REPL), another common obstetric disorder.

However, thrombophilia does not explain all PVP and REPL. Some patients with a history of PVP or REPL are indeed free of the biological markers of thrombophilia (presence of antiphospholipids; deficiency in antithrombin, protein C or protein S; activated protein C resistance; factor V Leiden or factor II mutations; or hyperhomocysteinemia), suggesting that these conditions may be driven by another underlying mechanism.

Neutrophil Extracellular Traps (NETs), which are networks of chromatin and proteins released by polymorphonuclear neutrophils, are actively involved in thrombosis¹⁻⁴, including in patients with APS⁵. No study has yet investigated the relationship between NETs and PVP/REPL. According to recent observations on the pathogenic potential of these compounds on endothelial and trophoblastic cells⁶, we hypothesized that NETs are involved in the onset of PVP/REPL in patients without thrombophilia. More precisely, that patients with PVP/REPL free of thrombophilia have increased baseline levels of NETs compared to healthy controls and have similar levels to those achieved in patients with obstetric APS. The aim of this study was thus to compare plasma levels of several NET biomarkers (cell-free DNA (cfDNA), MPO-DNA complexes, citrullinated histones H3 (H3Cit), and DNase) of patients with a history of unexplained PVP or REPL with (1) healthy controls, and (2) patients with obstetric APS or unconfirmed antiphospholipid antibodies.

Materials and Methods

Study population:

In this cross-sectional study, plasma samples were selected from patients referred for etiological evaluation of obstetrical complications related to uteroplacental vascular insufficiency in the Internal Medicine Unit of the University Hospital of Bordeaux between November 2013 and December 2019. As we aimed at demonstrating that patients with unexplained PVP or REPL have an increased baseline NETosis activity, we excluded plasma samples from patients with other conditions and for which increased (age over 45 y⁷, a family history of PVP or REPL, a current pregnancy^{8,9}, or with significant antinuclear antibodies^{10,11}) or decreased (a heparin or aspirin medication¹²) levels of NET biomarkers are expected. Then, we stratified patients according to the presence of antiphospholipid antibodies in three subgroups: patients with unexplained PVP/REPL, and two patient control groups with an expected increased NETosis activity (patients with a diagnosis of obstetric APS and patients with intermittent or unconfirmed antiphospholipid antibodies). To compare levels of NETs biomarkers to reference levels, healthy controls (men and women) were also recruited from the laboratory staff.

Plasma collections:

Plasma samples were obtained from citrated tubes. As increased NET levels are expected during pregnancy, tubes were collected at least several weeks after delivery to allow a return to baseline NET levels.

Quantification of plasma DNA:

Plasma DNA were measured using *Quant-it PicoGreen dsDNA* kit (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA). *PicoGreen* is a probe capable of intercalating into the DNA, causing it to emit a fluorescence. Plasmas were mixed with 150 µL of *PicoGreen*-containing solution to label DNA. The samples and the probe are deposited at equal volume in a 96-well plate. The plate is black in color to limit interference of fluorescence from one well to another. After incubation for 2 to 5 minutes, fluorescence was recorded using spectrofluorometer (*InfiniteM200 PRO*; *Tecan*, Männedorf, Switzerland) with a 480 excitation and 523 emission filter set. Autofluorescence was considered as background and determined in samples mixed with TE 1X buffer solution without *PicoGreen*. DNA concentrations (ng/mL) were calculated based on a standard curve of known concentrations of DNA.

Quantification of citrullinated histone H3:

H3Cit levels were determined according to Thålin et al¹³. In detail, 96-well plates were coated with an anti-histone antibody (*Cell Death Detection ELISA*; *Sigma-Aldrich*, Saint-Louis, MO, USA) overnight at 4 °C, and blocked with the incubation buffer. H3Cit standards were obtained by incubation of recombinant human peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) (*Cayman Chemicals*, Ann Arbor, MI, USA) and recombinant human histone (*Cayman Chemicals*). H3Cit standards and plasma samples were incubated at room temperature and washed with 0.05% PBS containing Tween 20, and anti-H3Cit antibody (*ab5103*; *Abcam*, Cambridge, MA, USA), was added for 90 minutes. After another washing step, anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (*Bio-Rad*, Hercules, CA, USA) was incubated for one hour, and washing was performed again. After incubation with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (*Sigma-Aldrich*) for 25 min, the reaction was stopped with 2% sulfuric acid. The absorbance was measured using spectrofluorometer (*InfiniteM200 PRO*; *Tecan*, Männedorf, Switzerland) with a 450 excitation and 620 emission filter set. H3Cit levels were thus expressed in absorbance units.

Quantification of MPO-associated DNA:

To quantify the MPO-associated DNA in plasma, we used a sandwich ELISA method based on capture of the MPO-associated DNA and derived from an existing kit (*Cell Death ELISA*; Roche, Basel, Switzerland). Anti-MPO solution (1:200; 5 µg/mL) (*mouse anti-human myeloperoxidase*; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was coated onto 96-well plates overnight at 4 °C. After three washes (with PBS + Tween 20 0.05%; 300 µL each), the wells were saturated with incubation buffer (supplied in the kit) for 30 minutes at room temperature. Then, the wells were washed three times and 40 µL of plasma were incubated with 60 µL of incubation buffer for 90 minutes without shaking. After a new wash cycle, 100 µL of incubation buffer containing peroxidase-labelled anti-DNA (1:25) were added to the wells and incubated without shaking for 90 minutes at room temperature. Then, the wells were washed three times and 100 µL of ABTS (supplied in the kit) was added. After 30 minutes of incubation at room temperature and 300 r.p.m. in the dark, the reaction was stopped with 100 µL of SDS. The absorbance was measured using spectrofluorometer (*InfiniteM200 PRO*; Tecan, Männedorf, Switzerland) with a 405 excitation and 490 emission filter set. To calculate NET percentage, fluorescence obtained from cells activated with PMA 100 nM was considered as 100% NET formation. The NET-standard was a mix of DNase-digested supernatants of PMA-stimulated neutrophils obtained from at least five different and independent human donors.

Quantification of DNase:

DNase levels were determined according to a method developed by Dr Colomer (INSERM 1034). Plasmas were incubated with DNA (100 µL of a 0.5 µg/mL DNA solution) and without DNA (replaced by 100 µL of Tris-EDTA 1X, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) for two hours at 37 °C and without shaking in a black multi-well plate. DNase was then inactivated with 25 µL of 25 mM PBS-EDTA at 4 °C, and 150 µL of *PicoGreen* from the *Quant-it PicoGreen dsDNA* kit (*Thermo Fisher Scientific*) was distributed in each well. After 2 to 5 minutes of incubation in the dark, fluorescence was measured by the spectrophotometer (*InfiniteM200 PRO*; Tecan, Männedorf, Switzerland) at an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 523 nm. The black plate limited fluorescence interferences from one well to another. Results were expressed in ng/mL from standard range points of recombinant DNase 1 prepared from a 10 mg/mL stock solution (*Roche*, Basel, Switzerland).

Statistical analyses:

To describe the biological, demographic and clinical characteristics of the patients and the levels of NETs in the studied samples, data were summarized using mean (standard deviation), median (quartiles), and minimum and maximum values for quantitative variables; and frequencies and proportions for qualitative variables. Wilcoxon rank sum test and Kruskal-Wallis test were used to compare the group of unexplained PVP/REPL with the healthy control group and with the groups of unconfirmed antiphospholipid antibodies and obstetric APS, respectively. Significance was set at $p < 0.05$. Notched box plots were then used as representations of the distribution of the NETs values for controls and subgroups of patients, and according to the type of antiphospholipid antibodies detected in the plasma. We also used scatter plots to explore a possible role of age and delay between delivery and blood collection on NETs levels. All statistical analyses were performed with R software (version 3.5.2).

Results

Characteristics of the study population

Forty-eight participants were included in the present study: 38 with obstetrical complications and 10 healthy controls. Among patients with obstetrical complications, 14 had an history of PVP/REPL with a diagnosis of obstetric APS, 9 had PVP/REPL with intermittent or unconfirmed antiphospholipid antibodies, and 15 had unexplained PVP/REPL. Patients were 33.3 ± 5.5 years old in average and those with unexplained PVP/REPL were slightly older (**Table 1**). Obstetrical complications include REPL (44.7%), IUGR (28.9%), eclampsia (15.8%), IUFD (13.2%), and small for gestational age newborns (7.9%). IUFD was most commonly found in patients with unexplained PVP/REPL (26.7% versus 0% for those with unconfirmed antiphospholipid antibodies and 7.1% for those with obstetric APS), while patients who suffered from REPL were mostly those unexplained or with unconfirmed antiphospholipid antibodies, and IUGR and eclampsia affected patients with unconfirmed antiphospholipid antibodies and obstetric APS.

The delay between the delivery and the blood collection was 10.7 ± 17.8 months in average. Patients with obstetric APS were positive for lupus anticoagulants at 78.6%, for anticardiolipin antibodies at 33.3% and for anti- β 2GP1 antibodies at 14.3% (55.6%, 33.3%, and 11.1% for patients with intermittent or unconfirmed antiphospholipid antibodies, respectively).

Significant differences in NET biomarkers between patients with unexplained PVP/REPL and healthy controls

We first observed that levels of MPO-DNA complexes were higher in average in the groups with PVP/REPL compared with healthy control group (**Figure 1**). Surprisingly, levels of cfDNA and H3Cit were decreased in any of the groups with PVP/REPL compared with healthy controls (**Figure 2 and 3**). Conversely, levels of DNase were lower in average in the healthy control group compared to the groups with PVP/REPL (**Figure 4**). DNase was expected to vary inversely to other biomarkers according to his role in the regulation of NETs, but it can also be assumed that DNase levels may not increase sufficiently to be able to destroy all circulating NETs, and thus constitute a positive marker of NETosis.

These differences in NET biomarkers between patients with unexplained PVP/REPL and healthy controls were significant (**Table 2**).

No difference in NET biomarkers between patients with unexplained PVP/REPL and patients with obstetric APS or unconfirmed antibodies

The groups of patients with unconfirmed antiphospholipid antibodies or obstetric APS were considered as patient control groups with impaired NETosis activity.

Except when comparing levels of cfDNA between patients with obstetric APS and healthy controls, all biomarkers of NETosis where significantly different between each patient control group and healthy controls: MPO-DNA and DNase were higher in patients with unconfirmed antiphospholipid antibodies and patients with obstetric APS ($p=0.004$ and $p=0.003$, and $p<0.001$, $p=0.001$, respectively); cfDNA ($p=0.030$, $p=0.080$) and H3Cit ($p=0.002$, $p=0.006$) were lower. The levels of NET biomarkers were compared between these groups and patients with unexplained PVP/REPL. No difference was found between the groups (**Table 2**).

In addition, the levels of NETs did not differ according to the presence or the absence of a certain type of antiphospholipid antibodies in the plasma (**Figure 5**), age (**Figure 6**), or the delay between the delivery and the blood collection (**Figure 7**).

Table 1. Characteristics of patients with vascular-related pregnancy complications according to antiphospholipid syndrome status. Bordeaux (France), 2013-2019.

Characteristics	Overall N = 38	Placental vascular pathology or recurrent early pregnancy loss		
		Unexplained N = 15	With intermittent or unconfirmed aPL antibodies N = 9	With obstetric APS N = 14
Antibodies presence				
Lupus anticoagulants** , N (%)	16 (42.1)		5 (55.6)	11 (78.6)
Anticardiolipin** , N (%)	9 (23.7)		3 (33.3)	6 (42.9)
Anti-β₂GP1** , N (%)	3 (7.9)		1 (11.1)	2 (14.3)
Demographic				
Age (years)				
Median (Q1 - Q3)	34.2 (29.8 – 36.0)	35.6 (32.2 – 36.2)	33.0 (27.9 – 36.0)	33.5 (29.4 – 35.1)
Min - Max	21.2 – 43.5	26.0 – 42.1	24.7 – 43.5	21.2 – 43.5
Delay between delivery and sampling (months)				
Median (Q1 - Q3)	3.5 (1.8 – 10.0)	2.0 (0.9 – 9.0)	2.6 (0.7 – 4.3)	4.4 (2.9 – 10.0)
Min - Max	0 – 60.5	0 – 60.0	0 – 50.2	1.2 – 60.5
Placental vascular pathology				
Early pregnancy loss ≥ 3 , N (%)	17 (44.7)	10 (66.7)	4 (44.4)	3 (21.4)
Intrauterine growth restriction , N (%)	11 (28.9)	2 (13.3)	3 (33.3)	6 (42.9)
Eclampsia , N (%)	6 (15.8)	0 (0)	1 (11.1)	5 (35.7)
Small for gestational age newborns , N (%)	3 (7.9)	1 (6.7)	1 (11.1)	1 (7.1)
Intrauterine fetal demise , N (%)	5 (13.2)	4 (26.7)	0 (0)	1 (7.1)

Notes: aPL: antiphospholipid; APS: antiphospholipid syndrome; Q1: quartile 1; Q3: quartile 3; Min: minimum; Max: maximum.

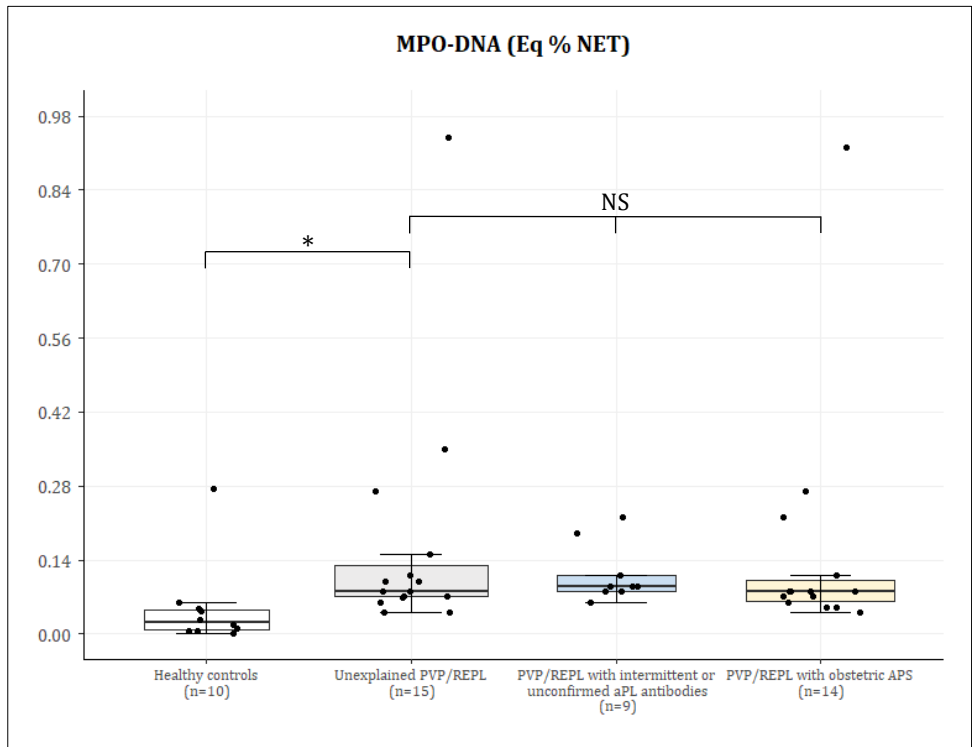
Table 2. Levels of neutrophil extracellular traps biomarkers in controls and patients with vascular-related pregnancy complications according to the antiphospholipid syndrome status. Bordeaux (France), 2013-2019.

NETs	Overall N = 48	Healthy controls N = 10	Unexplained PVP/REPL N = 15	<i>p</i> *	PVP/REPL with intermittent or unconfirmed aPL antibodies N = 9	PVP/REPL with obstetric APS N = 14	<i>p</i> **
Cell-free DNA (ng/mL)							
Mean (SD)	122.6 (17.1)	135.5 (19.7)	116.8 (15.0)	0.012	118.9 (14.2)	121.9 (15.6)	0.787
Median (Q1 - Q3)	125.0 (113.8 - 131.2)	140.5 (130.2 - 148.2)	119.0 (103.5 - 128.0)		126.0 (116.0 - 128.0)	120.5 (114.8 - 127.8)	
Min - Max	91.0 - 156.0	92.0 - 156.0	91.0 - 141.0		92.0 - 131.0	95.0 - 146.0	
Myeloperoxidase-DNA complexes (Eq % NET)							
Mean (SD)	0.129 (0.185)	0.049 (0.082)	0.169 (0.230)	0.002	0.112 (0.055)	0.156 (0.230)	0.539
Median (Q1 - Q3)	0.080 (0.050 - 0.110)	0.022 (0.007 - 0.046)	0.080 (0.070 - 0.130)		0.090 (0.080 - 0.110)	0.080 (0.063 - 0.103)	
Min - Max	0.002 - 0.940	0.002 - 0.275	0.040 - 0.940		0.060 - 0.220	0.040 - 0.920	
Citrullinated histone H3 (Abs 450 nm)							
Mean (SD)	0.145 (0.069)	0.145 (0.069)	0.079 (0.030)	0.007	0.063 (0.020)	0.079 (0.026)	0.296
Median (Q1 - Q3)	0.140 (0.095 - 0.175)	0.140 (0.095 - 0.175)	0.072 (0.054 - 0.101)		0.054 (0.049 - 0.076)	0.075 (0.063 - 0.094)	
Min - Max	0.060 - 0.300	0.060 - 0.300	0.039 - 0.134		0.038 - 0.093	0.046 - 0.140	
DNase (ng/mL)							
Mean (SD)	52.5 (10.9)	37.8 (3.6)	58.7 (3.4)	<0.001	54.7 (8.6)	55.1 (12.0)	0.289
Median (Q1 - Q3)	56.0 (45.0 - 60.0)	38.0 (36.5 - 38.3)	58.0 (56.0 - 61.0)		54.0 (48.0 - 58.0)	58.0 (55.2 - 60.8)	
Min - Max	17.0 - 72.0	30.5 - 43.5	54.0 - 64.0		45.0 - 72.0	17.0 - 64.0	

Notes: aPL: antiphospholipid; APS: antiphospholipid syndrome; PVP: placental vascular pathology; REPL: recurrent early pregnancy loss; Q1: quartile 1; Q3: quartile 3; Min: minimum; Max: maximum.

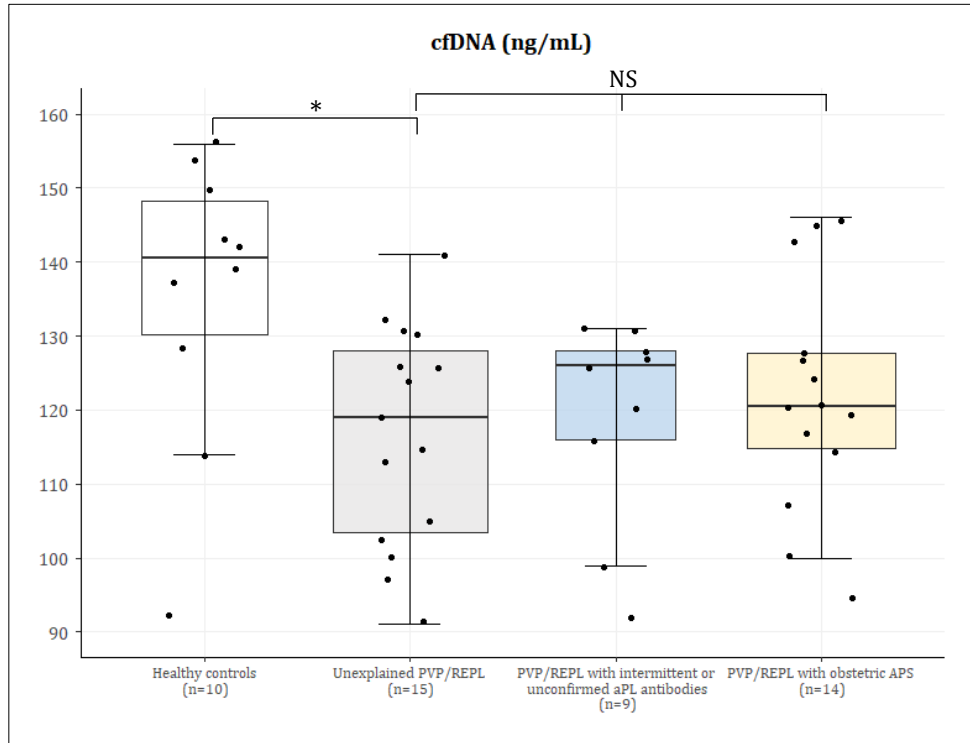
* Wilcoxon rank sum test to compare the group of unexplained PVP with the healthy control group.

** Kruskal-Wallis test to compare the group of unexplained PVP with the groups with intermittent or unconfirmed aPL antibodies and with obstetric APS.



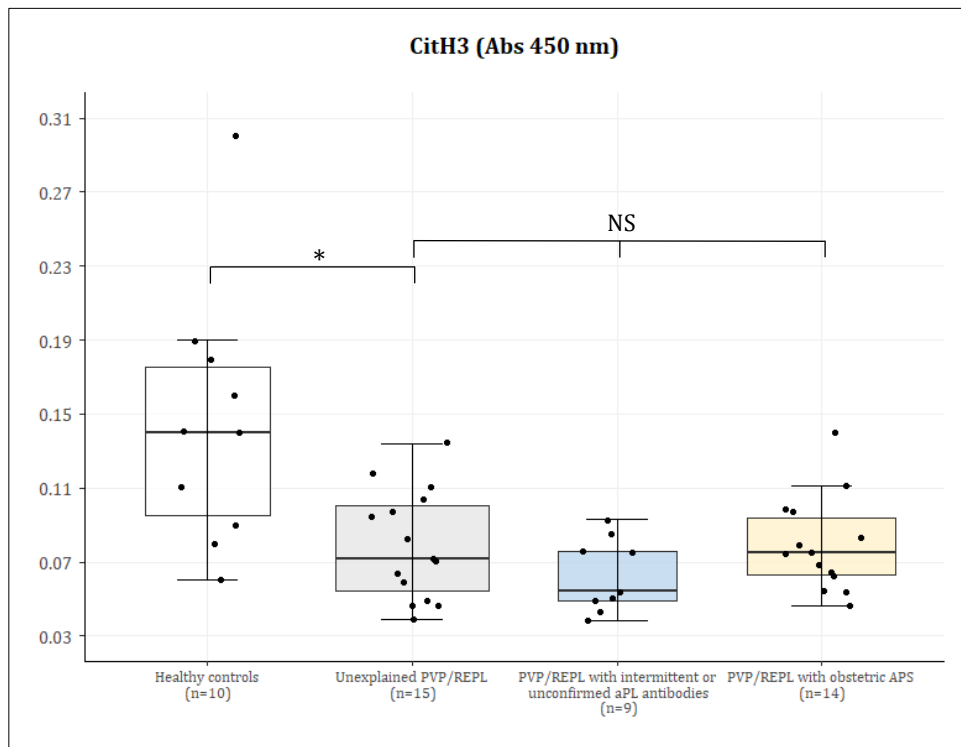
* Statistically significant ($p < 0.005$); NS: Not significant

Figure 1. Levels of myeloperoxidase-DNA complexes in patients with vascular-related pregnancy complications (PVP/REPL) according to antiphospholipid (aPL) syndrome status (APS) and in controls. Bordeaux (France), 2013-2019.



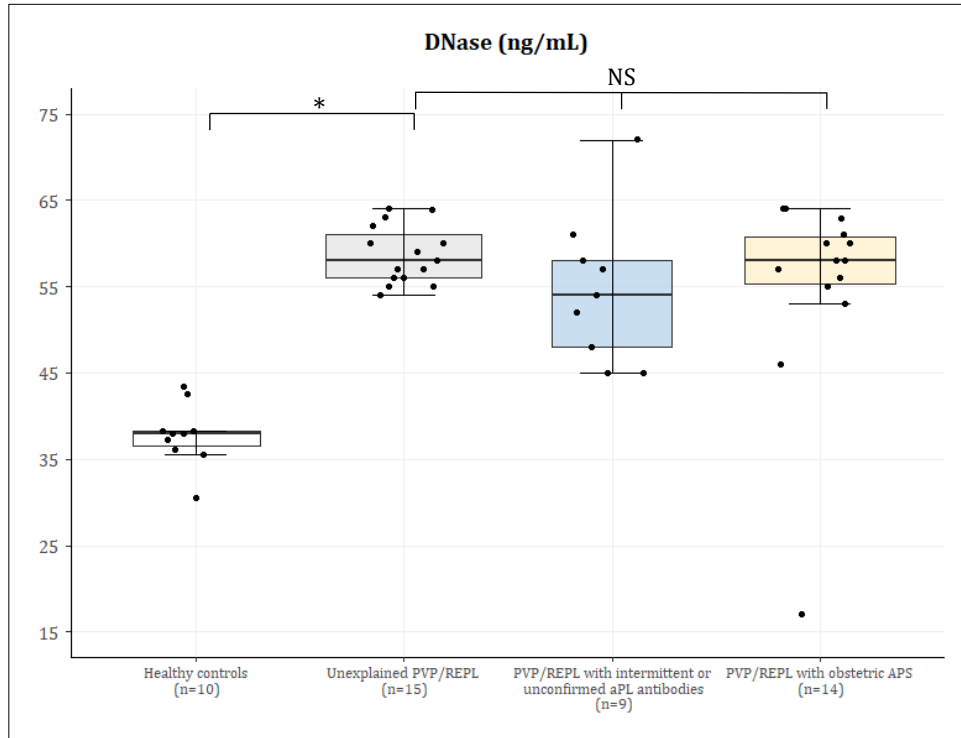
* Statistically significant ($p < 0.005$); NS: Not significant

Figure 2. Levels of cell-free DNA in patients with vascular-related pregnancy complications (PVP/REPL) according to antiphospholipid (aPL) syndrome status (APS) and in controls. Bordeaux (France), 2013-2019.



* Statistically significant ($p < 0.005$); NS: Not significant

Figure 3. Levels of citrullinated histone H3 in patients with vascular-related pregnancy complications (PVP/REPL) according to antiphospholipid (aPL) syndrome status (APS) and in controls. Bordeaux (France), 2013-2019.



* Statistically significant ($p < 0.005$); NS: Not significant

Figure 4. Levels of DNase in patients with vascular-related pregnancy complications (PVP/REPL) according to antiphospholipid (aPL) syndrome status (APS) and in controls. Bordeaux (France), 2013-2019.

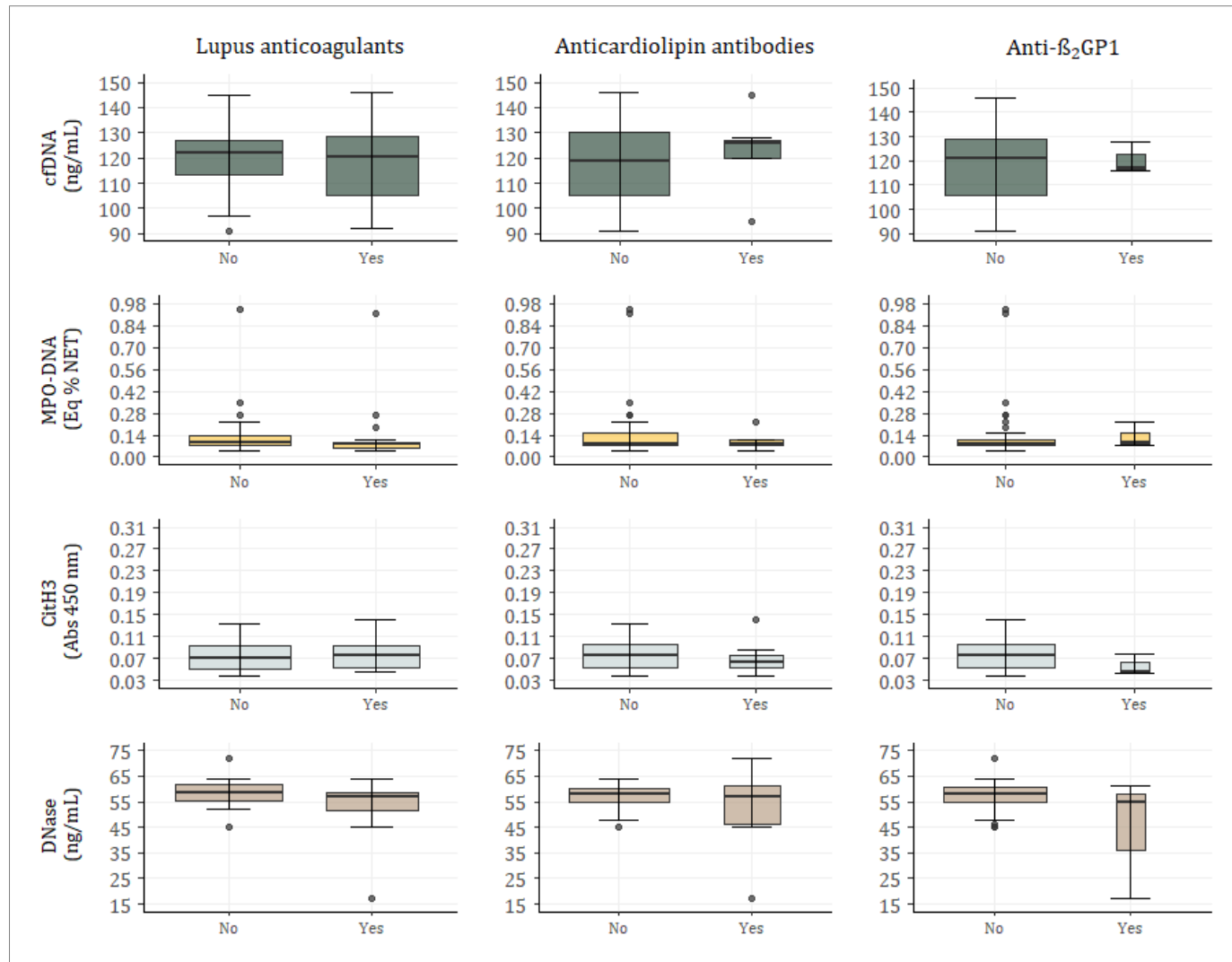


Figure 5. Levels of neutrophil extracellular traps biomarkers in patients with vascular-related pregnancy complications according to the presence or the absence of a certain type of antiphospholipid antibodies in the plasma. Line 1 displays cell-free DNA levels, line 2, myeloperoxidase-DNA complexes, line 3, citrullinated histone H3, and line 4, DNase. Bordeaux (France), 2013-2019.

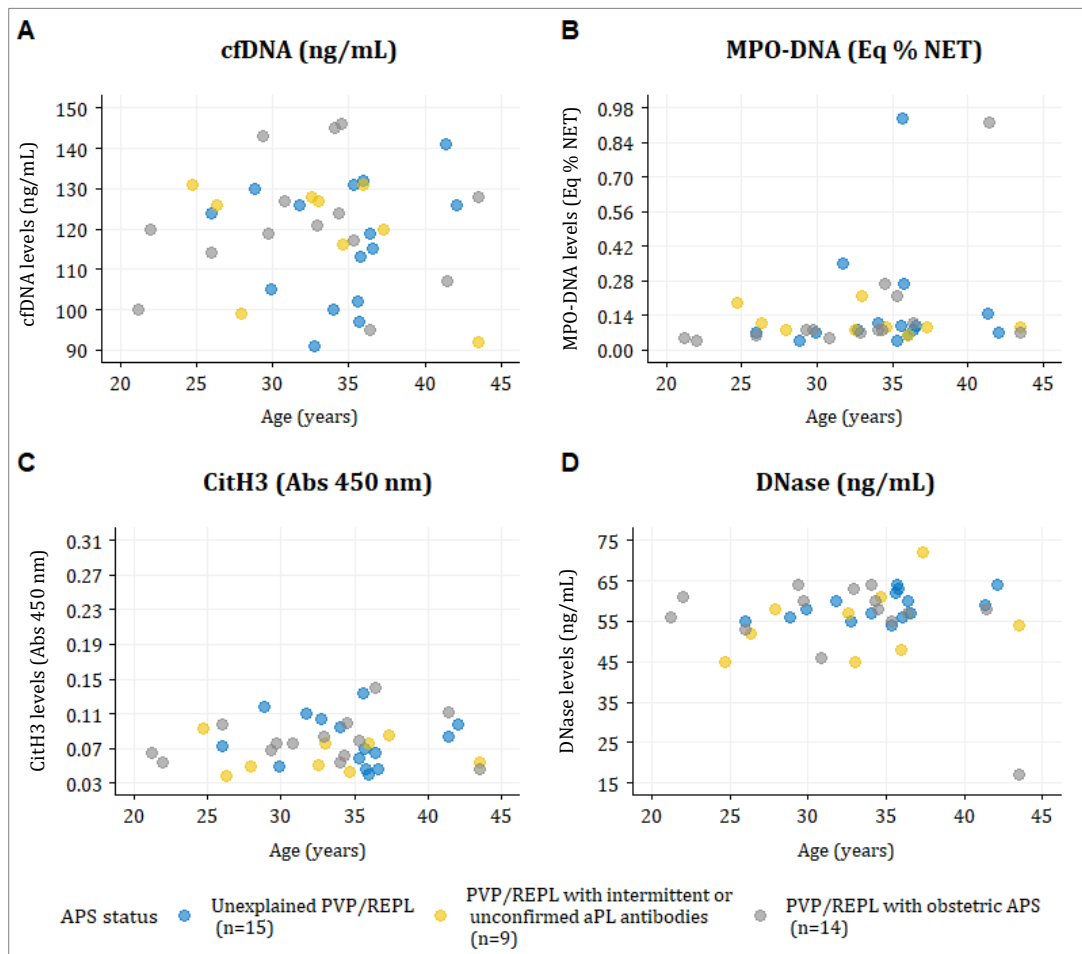


Figure 6. Levels of neutrophil extracellular traps biomarkers with age in patients with vascular-related pregnancy complications (PVP/REPL) according to antiphospholipid (aPL) syndrome status (APS): (A) cell-free DNA, (B) myeloperoxidase-DNA complexes, (C) citrullinated histone H3, and (D) DNase. Bordeaux (France), 2013-2019.

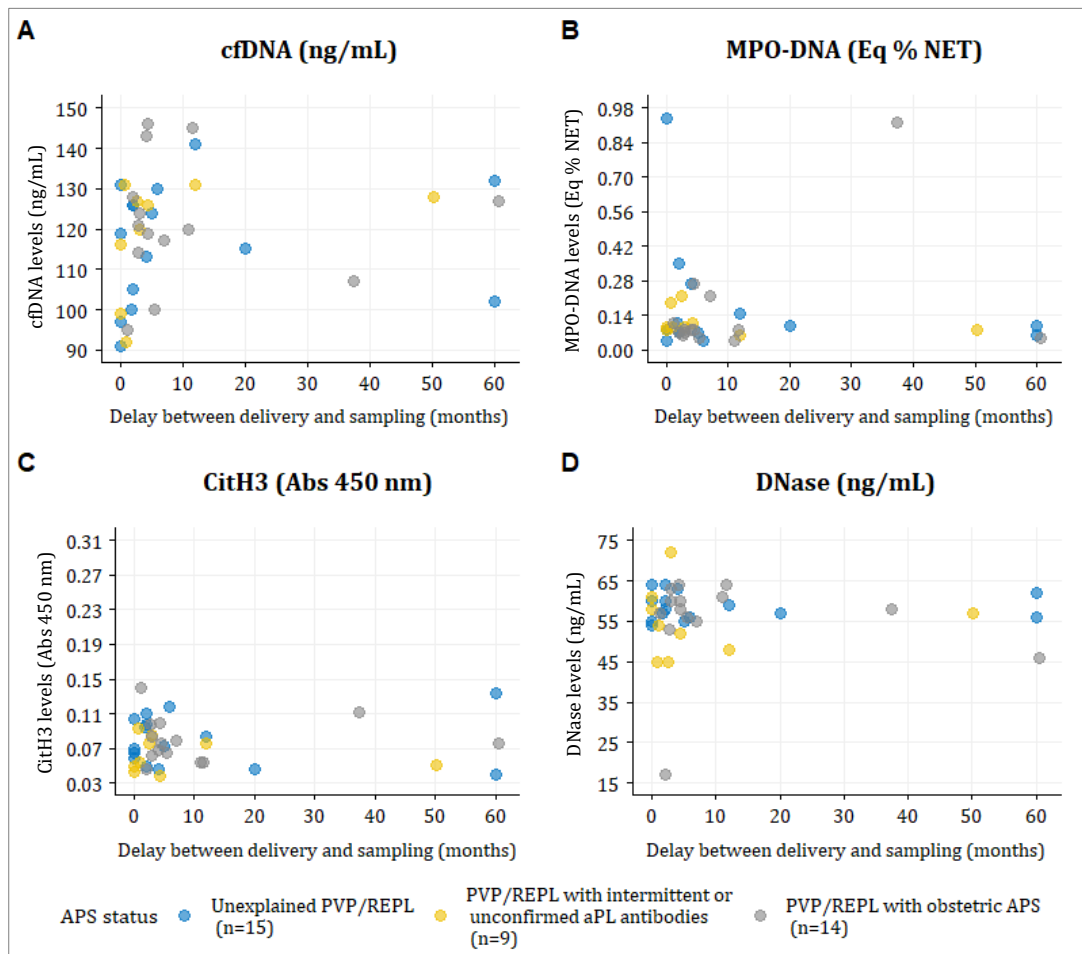


Figure 7. Levels of neutrophil extracellular traps biomarkers in patients with vascular-related pregnancy complications (PVP/REPL) with delay between delivery and sampling and according to antiphospholipid (aPL) syndrome status (APS): (A) cell-free DNA, (B) myeloperoxidase-DNA complexes, (C) citrullinated histone H3, and (D) DNase. Bordeaux (France), 2013-2019.

Discussion

In this descriptive study, mean levels of MPO-DNA complexes and DNase were significantly higher in patients with unexplained PVP/REPL compared to healthy controls. MPO-DNA complexes remain an unexplored plasma biomarker in the context of PVP/REPL, as well as H3Cit, while a high DNase I activity has been previously reported in IUGR¹⁴. Conversely, cfDNA and H3Cit were significantly higher in healthy controls than in patients with unexplained PVP/REPL. This result is unexpected as high levels of cfDNA have been correlated to a high DNase I activity (a component of the cfDNA elimination system) in a previous study¹⁵. However, cfDNA is also a product of apoptosis and other cell lysis processes which could partially explain the higher mean levels of cfDNA in the healthy control group compared to the patient groups. We also found no evidence of a difference in NET levels according to the APS status (absence of antiphospholipid antibodies, presence of intermittent or unconfirmed antiphospholipid antibodies at 12 weeks or confirmed obstetric APS). As previous studies have shown that NETs biomarkers like cfDNA and MPO-DNA complexes are increased in a context of APS⁵, this result appears to be consistent with our hypothesis of baseline increased NETs levels in patients free of thrombophilia.

The limitations of the study include a small sample size and the lack of a control group composed by women with a history of non-complicated pregnancies. As we aimed to specifically investigate NETosis in the context of unexplained PVP/REPL, we selected plasma samples from patients for which increased levels of NETs was not expected: age < 45 y, no family history of PVP or REPL, no current pregnancy, and no significant antinuclear antibodies; and without a heparin or an aspirin medication that could have lowered the levels of NETs. Indeed, neutrophil ageing predisposes to over activation by increasing NETosis¹⁶. NETs formation and neutrophil pro-NETotic priming, which are associated with increases in NETosis markers including PAD4, H3Cit, and MPO, are also increased during pregnancy⁹, and NETs may be involved in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis^{10,11}. Conversely, heparins can directly interact with VWF, thereby blocking DNA binding to VWF, which could inhibit the prothrombotic effect of NETs¹². These exclusion criteria limited the sample size in this study.

Some of the methods to measure NETs biomarkers lack specificity and sensitivity to investigate NETosis. As explained before and although the technique is very reproducible, cfDNA is a product of cell lysis, regardless of the process involved. In addition, although H3Cit are a more specific NETosis biomarker, their quantification remains difficult due to a lack of standardized tests and concerns only PAD4-dependent NETosis¹⁷. *Thålin et al.* recently showed that enzymatically citrullinated H3 proteins are compromised by high enzyme-dependent lot variability as well as instability in plasma. They furthermore demonstrated that most of commercially available antibodies directed against intrapeptidyl citrulline display poor specificity for their reported target when tested against a panel of semi-synthetic nucleosomes containing distinct histone H3 citrullinations¹³. However, to detect NETosis as precisely as possible, this present study measured several biomarkers of NETosis with methods currently described in the literature.

Given that thrombosis is related to dysfunctions at the interface between innate immunity and haemostasis¹⁸⁻²⁰, it is important to investigate the potential role of neutrophils activation and NETosis in thrombosis-related diseases such as PVP and REPL. NETs may play an important role through their action on endothelial²¹⁻²³ and trophoblastic cells⁶ and the genesis of uteroplacental vascular insufficiency²⁴. Further studies with prospective follow-ups, larger sample sizes, and adequate control groups are required to confirm this hypothesis. The highlighting of a link between increased NETs levels in thrombophilia-free women and unexplained PVP/REPL could lead to the use of NETs biomarkers as predictive markers of PVP/REPL in the future, especially as innovative simpler and potentially more specific methods of detection such as flow cytometry are currently under development^{25,26}.

References

1. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819–35.
2. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost*. 2015;13(S1):S82–91.
3. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jan;13(1):34–45.
4. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Hovinga JAK, Lämmle B, Henke PK, et al. Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2013 Oct 1;1(4):341-348.e1.
5. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, et al. Release of Neutrophil Extracellular Traps by Neutrophils Stimulated With Antiphospholipid Antibodies: A Newly Identified Mechanism of Thrombosis in the Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(11):2990–3003.
6. Lu Y, Dong Y, Zhang Y, Shen D, Wang X, Ge R, et al. Antiphospholipid antibody-activated NETs exacerbate trophoblast and endothelial cell injury in obstetric antiphospholipid syndrome. *J Cell Mol Med*. 2020 Jun;24(12):6690–703.
7. Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F, Lüscher TF, Camici GG, et al. Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2019 Jul 1;115(8):1266–85.
8. Yasuda H, Sonoda A, Yamamoto M, Kawashima Y, Takishita Y, Morita A, et al. 17- β -estradiol enhances neutrophil extracellular trap formation by interaction with estrogen membrane receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2019 Mar 15;663:64–70.
9. Giaglis S, Stoikou M, Sur Chowdhury C, Schaefer G, Grimolizzi F, Rossi SW, et al. Multimodal Regulation of NET Formation in Pregnancy: Progesterone Antagonizes the Pro-NETotic Effect of Estrogen and G-CSF. *Front Immunol*. 2016;7:565.
10. Jeremic I, Nikolic BB. Neutrophil Extracellular Traps Markers Are Elevated in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jun 1;75(Suppl 2):778–778.
11. Söderberg D, Segelmark M. Neutrophil Extracellular Traps in ANCA-Associated Vasculitis. *Front Immunol*. 2016 Jun 30;7:256.
12. Grässle Sandra, Huck Volker, Pappelbaum Karin I, Gorzelanny Christian, Aponte-Santamaría Camilo, Baldauf Carsten, et al. von Willebrand Factor Directly Interacts With DNA From Neutrophil Extracellular Traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Jul 1;34(7):1382–9.
13. Thålin C, Daleskog M, Göransson SP, Schatzberg D, Lasselin J, Laska A-C, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol Res*. 2017;65(3):706–12.

14. Ershova E, Sergeeva V, Klimenko M, Avetisova K, Klimenko P, Kostyuk E, et al. Circulating cell-free DNA concentration and DNase I activity of peripheral blood plasma change in case of pregnancy with intrauterine growth restriction compared to normal pregnancy. *Biomed Rep.* 2017 Oct;7(4):319–24.
15. Korzeneva IB, Kostuyk SV, Ershova LS, Osipov AN, Zhuravleva VF, Pankratova GV, et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 2015 Sep 1;779:1–15.
16. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, et al. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature.* 2015 Sep 24;525(7570):528–32.
17. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta.* 2016 Aug 1;459:89–93.
18. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
19. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010 Aug;16(8):887–96.
20. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jan;13(1):34–45.
21. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. NET impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Aug;32(8):1777–83.
22. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.* 2010 Jul 16;584(14):3193–7.
23. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLOS ONE.* 2012 Feb 28;7(2):e32366.
24. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of Neutrophil Extracellular DNA Lattices by Placental Microparticles and IL-8 and Their Presence in Preeclampsia. *Hum Immunol.* 2005 Nov 1;66(11):1146–54.
25. Lee KH, Cavanaugh L, Leung H, Yan F, Ahmadi Z, Chong BH, et al. Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(4):392–9.
26. Masuda S, Shimizu S, Matsuo J, Nishibata Y, Kusunoki Y, Hattanda F, et al. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry A.* 2017;91(8):822–9.

BIBLIOGRAPHIE DE LA THÈSE

1. Verspyck E, Marpeau L. Thrombophilies et pathologies vasculaires placentaires. Revue de la littérature. Rev Médecine Interne. 2005 Feb 1;26(2):103–8.
2. Tong M, Viall CA, Chamley LW. Antiphospholipid antibodies and the placenta: a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment. Hum Reprod Update. 2015 Jan 1;21(1):97–118.
3. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science. 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
4. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. J Exp Med. 2012 Apr 9;209(4):819–35.
5. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. J Thromb Haemost. 2015;13(S1):S82–91.
6. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2013 Jan;13(1):34–45.
7. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Hovinga JAK, Lämmle B, Henke PK, et al. Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. J Vasc Surg Venous Lymphat Disord. 2013 Oct 1;1(4):341-348.e1.
8. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, Mazza LF, Morris AE, Núñez-Álvarez C, et al. Release of Neutrophil Extracellular Traps by Neutrophils Stimulated With Antiphospholipid Antibodies: A Newly Identified Mechanism of Thrombosis in the Antiphospholipid Syndrome. Arthritis Rheumatol. 2015;67(11):2990–3003.
9. Lu Y, Dong Y, Zhang Y, Shen D, Wang X, Ge R, et al. Antiphospholipid antibody-activated NETs exacerbate trophoblast and endothelial cell injury in obstetric antiphospholipid syndrome. J Cell Mol Med. 2020 Jun;24(12):6690–703.
10. ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. Hum Reprod Open. 2018;2018(2):1–12.
11. Delabaere A, Huchon C, Lavoue V, Lejeune V, Iraola E, Nedellec S, et al. [Definition of pregnancy losses: Standardization of terminology from the French National College of Obstetricians and Gynecologists (CNGOF)]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 2014 Dec;43(10):756–63.
12. Schwarzman P, Paz Levy D, Walfisch A, Sergienko R, Bernstein EH, Sheiner E. Maternal history of recurrent pregnancy loss and long-term risk of thromboembolic events. J Reprod Immunol. 2020 Apr 1;138:103084.
13. Hypertension in Pregnancy: Executive Summary. Obstet Gynecol. 2013 Nov;122(5):1122–31.
14. Collange O, Launoy A, Kopf-Pottecher A, Dietemann J-L, Pottecher T. Chapitre 12 - Éclampsie. In: Pottecher T, Luton D, Collet M, Luton D, Pottecher T, Zupan-Simunek V, editors. Prise en charge multidisciplinaire de la prééclampsie. Paris: Elsevier Masson; 2009. p. 141–55.
15. Steegers EAP, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. Lancet Lond Engl. 2010 Aug 21;376(9741):631–44.

16. Clark P, Boswell F, Greer IA. The neutrophil and preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol*. 1998;16(1):57–64.
17. Crocker IP, Wellings RP, Fletcher J, Baker PN. Neutrophil function in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999 Aug;106(8):822–8.
18. Wang Y, Gu Y, Philibert L, Lucas MJ. Neutrophil Activation Induced by Placental Factors in Normal and Pre-eclamptic Pregnancies In Vitro. *Placenta*. 2001 Jul 1;22(6):560–5.
19. Mellembakken Jan Roar, Aukrust Pål, Olafsen Mette Kløvstad, Ueland Thor, Hestdal Kjetil, Videm Vibeke. Activation of Leukocytes During the Uteroplacental Passage in Preeclampsia. Hypertension. 2002 Jan 1;39(1):155–60.
20. Wang Y, Gu Y, Lucas MJ. Expression of Thrombin Receptors in Endothelial Cells and Neutrophils from Normal and Preeclamptic Pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Aug 1;87(8):3728–34.
21. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of Neutrophil Extracellular DNA Lattices by Placental Microparticles and IL-8 and Their Presence in Preeclampsia. *Hum Immunol*. 2005 Nov 1;66(11):1146–54.
22. Bravo-Barrera J, Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C. Neutrophil Extracellular Traps, Antiphospholipid Antibodies and Treatment. *Antibodies*. 2017 Mar 6;6(1):4.
23. Marder W, Knight JS, Kaplan MJ, Somers EC, Zhang X, O'Dell AA, et al. Placental histology and neutrophil extracellular traps in lupus and pre-eclampsia pregnancies. *Lupus Sci Med*. 2016 Apr 1;3(1):e000134.
24. Boisramé T, Sananès N, Fritz G, Boudier E, Viville B, Aissi G, et al. Hématome rétroplacentaire. Diagnostic, prise en charge et pronostic maternofoetal : étude rétrospective de 100 cas. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. 2014 Feb 1;42(2):78–83.
25. Sibai BM. The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): Much ado about nothing? *Am J Obstet Gynecol*. 1990 Feb 1;162(2):311–6.
26. Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol*. 1993 Oct 1;169(4):1000–6.
27. Ego A. [Definitions: small for gestational age and intrauterine growth retardation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2013 Dec;42(8):872–94.
28. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. 2005 Sep;34(5):513.
29. Korteweg FJ, Gordijn SJ, Timmer A, Holm JP, Ravisé JM, Erwich JJHM. A Placental Cause of Intra-uterine Fetal Death Depends on the Perinatal Mortality Classification System Used. *Placenta*. 2008 Jan 1;29(1):71–80.
30. Kidron D, Bernheim J, Aviram R. Placental Findings Contributing to Fetal Death, a Study of 120 Stillbirths between 23 and 40 Weeks Gestation. *Placenta*. 2009 Aug 1;30(8):700–4.
31. Alsheef MA, Alabbad AM, Albassam RA, Alarfaj RM, Zaidi ARZ, Al-Arfaj O, et al. Pregnancy and Venous Thromboembolism: Risk Factors, Trends, Management, and Mortality. *BioMed Res Int*. 2020 Apr 11;2020:1–6.

32. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003 Jun 1;16(2):153–68.
33. James AH. Venous Thromboembolism in Pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Mar;29(3):326–31.
34. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller A-B, Daniels J, et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014 Jun 1;2(6):e323–33.
35. Sucker C. Prophylaxis and Therapy of Venous Thrombotic Events (VTE) in Pregnancy and the Postpartum Period. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2020 Jan;80(1):48–59.
36. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu*. 1972;1:177–91.
37. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: A review of the literature. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Nov 1;187(5):1416–23.
38. Beaufils M. Hypertensions de la grossesse. *Néphrologie Thérapeutique*. 2010 Jun 1;6(3):200–14.
39. Calo G, Sabbione F, Pascuali N, Keitelman I, Vota D, Papparini D, et al. Interplay between neutrophils and trophoblast cells conditions trophoblast function and triggers vascular transformation signals. *J Cell Physiol*. 2020;235(4):3592–603.
40. Hahn S, Giaglis S, Hoesli I, Hasler P. Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Front Immunol*. 2012 Nov 27;3:362.
41. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011 Jun 21;123(24):2856–69.
42. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant Activity in Hemostasis and Thrombosis: Virchow's Triad Revisited. *Anesth Analg*. 2012 Feb;114(2):275–85.
43. Elliot MG. Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2016 Apr 1;114:75–80.
44. Challier J-C, Uzan S. Le placenta humain et ses pathologies : l'oxygène en question. *médecine/sciences*. 2003 Nov 1;19(11):1111–20.
45. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003 Mar 1;111(5):649–58.
46. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant J-F, Pignon M-R, Noël A, et al. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: Pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Nov 1;88(11):5555–63.
47. Lecarpentier E, Fournier T, Guibourdenche J, Tsatsaris V. Physiopathologie de la pré-éclampsie. *Presse Médicale*. 2016 Jul 1;45(7, Part 1):631–7.
48. Dhom G. [History of histopathology]. *Pathol*. 2000 Jul;21(4):285–91.
49. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*. 2013 Jul 1;210(7):1283–99.

50. Hirsch JG. Bactericidal Action of Histone. *J Exp Med*. 1958 Dec 1;108(6):925–44.
51. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007 Apr;13(4):463–9.
52. Andrews R, Arthur J, Gardiner E. Neutrophil extracellular traps (NETs) and the role of platelets in infection. *Thromb Haemost*. 2014;112(10):659–65.
53. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozłowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):949–53.
54. von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3070–80.
55. Driouich A, Smith C, Ropitiaux M, Chambard M, Boulogne I, Bernard S, et al. Root extracellular traps versus neutrophil extracellular traps in host defence, a case of functional convergence? *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2019;94(5):1685–700.
56. Wen F, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. Extracellular DNA Is Required for Root Tip Resistance to Fungal Infection. *Plant Physiol*. 2009 Oct;151(2):820–9.
57. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009 Oct 30;5(10):e1000639.
58. GS Chirivi R. Citrullination: A Target for Disease Intervention in Multiple Sclerosis and other Inflammatory Diseases? *J Clin Cell Immunol*. 2013;04(03):1–8.
59. Mohanan S, Cherrington BD, Horibata S, McElwee JL, Thompson PR, Coonrod SA. Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem Res Int*. 2012;2012:895343.
60. Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, et al. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol*. 2012 Oct 4;3:307.
61. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
62. Stakos DA, Kambas K, Konstantinidis T, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2015 Jun 7;36(22):1405–14.
63. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*. 1996;59(2):229–40.
64. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:127–55.
65. Karlsson A, Dahlgren C. Assembly and Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase in Granule Membranes. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Feb 1;4(1):49–60.

66. Goldmann O, Medina E. The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol.* 2013 Jan 11;3:420.
67. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7413–25.
68. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007 Jan 15;176(2):231–41.
69. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol CB.* 2006 Feb 21;16(4):396–400.
70. Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2008 Jun;76(6):2802–7.
71. Casutt-Meyer S, Renzi F, Schmalzer M, Jann NJ, Amstutz M, Cornelis GR. Oligomeric coiled-coil adhesin YadA is a double-edged sword. *PloS One.* 2010 Dec 8;5(12):e15159.
72. Sil P, Yoo D, Floyd M, Gingerich A, Rada B. High Throughput Measurement of Extracellular DNA Release and Quantitative NET Formation in Human Neutrophils In Vitro. *J Vis Exp JoVE.* 2016 Jun 18;(112):e52779.
73. Aulik NA, Hellenbrand KM, Klos H, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and Its Leukotoxin Cause Neutrophil Extracellular Trap Formation by Bovine Neutrophils. *Infect Immun.* 2010 Nov;78(11):4454–66.
74. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2009 Jan 1;89(1):29–37.
75. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of Extracellular Chromatin Release from Neutrophils. *J Innate Immun.* 2009 Apr;1(3):194–201.
76. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668–76.
77. Abi Abdallah DS, Lin C, Ball CJ, King MR, Duhamel GE, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* Triggers Release of Human and Mouse Neutrophil Extracellular Traps. *Infect Immun.* 2012 Feb;80(2):768–77.
78. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 21;106(16):6748–53.
79. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Amanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, et al. Production of Extracellular Traps against *Aspergillus fumigatus* In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 29;6(4):e1000873.
80. Bianchi M, Niemiec MJ, Siler U, Urban CF, Reichenbach J. Restoration of anti-*Aspergillus* defense by neutrophil extracellular traps in human chronic granulomatous disease after gene therapy is calprotectin-dependent. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 May 1;127(5):1243-1252.e7.

81. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012 Jul 19;12(1):109–16.
82. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 9;3(73):73ra20.
83. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönernermark U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):623–5.
84. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Sci STKE*. 2007 Mar 27;2007(379):pe11–pe11.
85. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*. 2014 Aug 7;8(3):883–96.
86. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010 Nov 1;191(3):677–91.
87. Amini P, Stojkov D, Wang X, Wicki S, Kaufmann T, Wong WW, et al. NET formation can occur independently of RIPK3 and MLKL signaling. *Eur J Immunol*. 2016 Jan;46(1):178–84.
88. Desai J, Foresto-Neto O, Honarpisheh M, Steiger S, Nakazawa D, Popper B, et al. Particles of different sizes and shapes induce neutrophil necroptosis followed by the release of neutrophil extracellular trap-like chromatin. *Sci Rep*. 2017 Nov 3;7(1):1–10.
89. Chen K, Nishi H, Travers R, Tsuboi N, Martinod K, Wagner DD, et al. Endocytosis of soluble immune complexes leads to their clearance by FcγRIIIB but induces neutrophil extracellular traps via FcγRIIA in vivo. *Blood*. 2012 Nov 22;120(22):4421–31.
90. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, Miyoshi A, Kusunoki Y, Tomaru U, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*. 2016 Aug 1;459:89–93.
91. Perdomo J, Leung HHL, Ahmadi Z, Yan F, Chong JJH, Passam FH, et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun*. 2019 Mar 21;10(1):1322.
92. Osumi H, Shinozaki E, Yamaguchi K, Zembutsu H. Clinical utility of circulating tumor DNA for colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2019 Apr;110(4):1148–55.
93. Fettke H, Kwan EM, Azad AA. Cell-free DNA in cancer: current insights. *Cell Oncol*. 2019 Feb 1;42(1):13–28.
94. Truszczyńska A, Foronczewicz B, Pączek L. The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2017 Apr;35(2):330–6.
95. Mosca M, Giuliano T, Cuomo G, Doveri M, Tani C, Curcio M, et al. Cell-free DNA in the plasma of patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2009 Aug 11;28(12):1437.
96. Chen JA, Meister S, Urbonaviciute V, Rödel F, Wilhelm S, Kalden JR, et al. Sensitive detection of plasma/serum DNA in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2007 Jan 1;40(4):307–10.

97. Sørensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps — the dark side of neutrophils. *J Clin Invest*. 2012;122(5):1612–20.
98. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Feb 15;640:47–52.
99. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee Y-H, Perlin JR, Leonelli L, et al. Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylination. *Science*. 2004 Oct 8;306(5694):279–83.
100. Thålin C, Daleskog M, Göransson SP, Schatzberg D, Lasselin J, Laska A-C, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of citrullinated histone H3 as a marker for neutrophil extracellular traps in human plasma. *Immunol Res*. 2017;65(3):706–12.
101. Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 25;107(21):9813–8.
102. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017 Dec 1;358(6367):1202–6.
103. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An Endonuclease Allows *Streptococcus pneumoniae* to Escape from Neutrophil Extracellular Traps. *Curr Biol*. 2006 Feb 21;16(4):401–7.
104. Katkar GD, Sundaram MS, Naveenkumar SK, Swethakumar B, Sharma RD, Paul M, et al. NETosis and lack of DNase activity are key factors in *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction. *Nat Commun*. 2016 Apr 19;7:11361.
105. Jeremic I, Nikolic BB. Neutrophil Extracellular Traps Markers Are Elevated in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jun 1;75(Suppl 2):778–778.
106. Chitrabamrung S, Bennett JS, Rubin RL, Tan EM. A radial diffusion assay for plasma and serum deoxyribonuclease I. *Rheumatol Int*. 1981 Jun 1;1(2):49–53.
107. Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E, Girod A, Chrysanthopoulou A, Pneumatikos I, et al. Autophagy Mediates the Delivery of Thrombogenic Tissue Factor to Neutrophil Extracellular Traps in Human Sepsis. *PLoS ONE*. 2012 Sep 19;7(9):e45427.
108. Lakbakbi S, Debrumetz A, Terryn C, Szymezak J, Rieu P, Nguyen P. Tissue factor expressed by adherent cells contributes to hemodialysis-membrane thrombogenicity. *Thromb Res*. 2016 Aug 1;144:218–23.
109. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009 Nov;15(11):1318–21.
110. Guy A, James C. La thrombose au cours des néoplasies myéloprolifératives - Influence de la mutation JAK2V617F. *médecine/sciences*. 2019 Aug 1;35(8–9):651–8.
111. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JI, Piazza G, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost*. 2014;12(6):860–70.

112. Mauracher L-M, Posch F, Martinod K, Grilz E, Däullary T, Hell L, et al. Citrullinated histone H3, a biomarker of neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of venous thromboembolism in cancer patients. *J Thromb Haemost JTH*. 2018 Mar;16(3):508–18.
113. Bowie EJW, Thompson JH, Pascuzzi CA, Owen CA. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. *J Lab Clin Med*. 1963 Sep 1;62(3):416–30.
114. Soulier J, Boffa M. Avortements à répétition, thromboses et anticoagulant circulant anti-thromboplastine. Trois observations. *Nouv Presse Médicale*. 1980;9:859–64.
115. Harris EN. Clinical and serological features of the “antiphospholipid syndrome.” *Brit J Rheumatol*. 1987;26:19.
116. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette J-C, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: Report of an International workshop. *Arthritis Rheum*. 1999;42(7):1309–11.
117. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):295–306.
118. Cohen H, Mackie IJ, Devreese KMJ. Clinical and laboratory practice for lupus anticoagulant testing: An International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost*. 2019;17(10):1715–32.
119. Costedoat-Chalumeau N, Guettrot-Imbert G, Leguern V, Leroux G, Le Thi Huong D, Wechsler B, et al. [Pregnancy and antiphospholipid syndrome]. *Rev Med Interne*. 2012 Apr;33(4):209–16.
120. Nielsen HS, Christiansen OB. Prognostic impact of anticardiolipin antibodies in women with recurrent miscarriage negative for the lupus anticoagulant. *Hum Reprod*. 2005 Jun 1;20(6):1720–8.
121. Firkin BG, Howard MA, Radford N. Possible relationship between lupus inhibitor and recurrent abortion in young women. *The Lancet*. 1980 Aug 16;316(8190):366.
122. Girardi G, Redecha P, Salmon JE. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nat Med*. 2004 Nov;10(11):1222–6.
123. Conti F, Sorice M, Circella A, Alessandri C, Pittoni V, CARONTI B, et al. Beta-2-glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and correlates with tissue factor expression. *Clin Exp Immunol*. 2003 Jun;132(3):509–16.
124. Sorice M, Buttari B, Capozzi A, Profumo E, Facchiano F, Truglia S, et al. Antibodies to age- β 2glycoprotein I in patients with anti-phospholipid antibody syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2016 May;184(2):174–82.
125. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. NET impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Aug;32(8):1777–83.
126. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett*. 2010 Jul 16;584(14):3193–7.

127. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLOS ONE*. 2012 Feb 28;7(2):e32366.
128. Okrent DG, Lichtenstein AK, Ganz T. Direct Cytotoxicity of Polymorphonuclear Leukocyte Granule Proteins to Human Lung-derived Cells and Endothelial Cells. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Jan 1;141(1):179–85.
129. Pereira LF, Marco FM, Boimorto R, Caturla A, Bustos A, Concha EGD, et al. Histones interact with anionic phospholipids with high avidity; its relevance for the binding of histone-antihistone immune complexes. *Clin Exp Immunol*. 1994;97(2):175–80.
130. Kleine T, Gladfelter A, Lewis P, Lewis S. Histone-induced damage of a mammalian epithelium: the conductive effect. *Am J Physiol*. 1995 May 1;268(5 Pt 1):C1114-25.
131. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell*. 1986 Jul 18;46(2):185–90.
132. Yago T, Liu Z, Ahamed J, McEver RP. Cooperative PSGL-1 and CXCR2 signaling in neutrophils promotes deep vein thrombosis in mice. *Blood*. 2018 Sep 27;132(13):1426–37.
133. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010 Aug;16(8):887–96.
134. McDonald B, Davis RP, Kim S-J, Tse M, Esmon CT, Kolaczowska E, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice. *Blood*. 2017 Mar 9;129(10):1357–67.

Titre : Marqueurs de NETs dans les pathologies vasculaires placentaires

Résumé :

Les pathologies vasculaires placentaires (PVP) sont des complications vasculaires ayant pour dénominateur commun la présence d'anomalies de vascularisation placentaire qui détériorent la circulation materno-fœtale et sont responsables d'insuffisances vasculo-placentaires. Ces pathologies sont fréquemment associées à une thrombophilie, en particulier chez les patientes atteintes de syndrome des antiphospholipides. La thrombophilie est par ailleurs un facteur de risque de fausses couches spontanées précoces à répétition (FCR), qui est une autre complication fréquemment rencontrée dans la pratique obstétricale.

Certaines patientes ont néanmoins un bilan de thrombophilie négatif malgré la survenue de FCR ou d'évènements obstétricaux liés à une insuffisance vasculo-placentaire, ce qui laisse à penser que d'autres mécanismes physiopathologiques entrent en jeu dans ces pathologies. La NETose est un processus physiopathologique assuré par les polynucléaires neutrophiles qui consiste en l'émission de filets de chromatine décondensée et de protéines, relargués dans le milieu extracellulaire. Ces filets, appelés NETs pour *Neutrophil Extracellular Traps*, constituent une des voies d'initiation de la thrombogénèse, y compris dans le syndrome des antiphospholipides.

Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse de l'implication des NETs dans la survenue des PVP et des FCR chez des patientes sans thrombophilie, hypothèse renforcée par des observations récentes sur le potentiel pathogène des NETs sur les cellules endothéliales et trophoblastiques. Plus précisément, que les patientes ayant des antécédents de PVP ou de FCR sans thrombophilie ont des taux basaux de biomarqueurs de NETose augmentés par rapport à des témoins sains, mais comparables aux taux de celles ayant un SAPL avéré. Les objectifs de cette étude étaient ainsi de comparer les taux de plusieurs biomarqueurs de NETose (ADN libre plasmatique, complexes MPO-ADN, histones H3 citrullinées, et DNase) des patientes pour lesquelles les complications obstétricales restent inexplicables avec (1) les taux de NETs de témoins sains, et (2) les taux de NETs de patientes avec des antiphospholipides intermittents ou un SAPL avéré.

Les taux plasmatiques de complexes MPO-ADN et de DNase étaient significativement plus élevés chez les patientes ayant des PVP/FCR inexplicables par rapport aux témoins sains. En revanche, les taux d'histones H3 citrullinées et d'ADN plasmatiques étaient significativement plus élevés chez les témoins sains que chez les patientes de l'étude. Nous n'avons par ailleurs pas retrouvé de différence en fonction du statut vis-à-vis des anticorps antiphospholipides (absence d'anticorps, présence d'anticorps intermittents ou non confirmés à 12 semaines, ou syndrome des antiphospholipides confirmé). De précédentes études ayant montré que certains biomarqueurs de NETs comme les complexes MPO-ADN étaient augmentés dans le syndrome des antiphospholipides, ce résultat semble confirmer notre hypothèse d'une augmentation des taux de base des NETs chez les patientes sans thrombophilie. Les taux plus faibles d'autres marqueurs de NETs chez les patientes par rapport aux témoins sains peuvent refléter le manque de sensibilité de ces marqueurs pour évaluer la NETose. Des études supplémentaires avec des échantillons plus importants, un suivi prospectif et un groupe témoin composé de femmes ayant des antécédents de grossesses sans complication sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Mots clés : NETose, pathologie vasculaire placentaire, insuffisance vasculaire placentaire, syndrome des antiphospholipides, fausses couches spontanées précoces à répétition, ADN plasmatique, complexes MPO-ADN, histones H3 citrullinées, DNase.

Discipline :

Biologie Médicale

Collège Sciences de la santé – Université de Bordeaux

146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux CEDEX