

Les Neutrophil Extracellular Traps (NETs) : un biomarqueur dans les pathologies vasculaires ?

UEL 343

Du fondamental à l'appliqué : exemple de la biologie vasculaire

Vanessa Granger, 21/11/2024

- . Laboratoire d'Immunologie « Auto-immunité hypersensibilités et Biothérapies » Hôpital Bichat
- . INSERM UMRS 996
- . Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Saclay

Plan

1

Neutrophil Extracellular Traps (NETs): généralités

- *Définition*
- *Composition*
- *Mécanismes de formation*

2

Rôle physiopathologique des NETs : vue d'ensemble

3

Les NETs en tant que biomarqueurs?

- *définition*
- *dosage non standardisé*
- *Exemples en pathologie vasculaire*

Plan

1

Neutrophil Extracellular Traps (NETs): généralités

- ***Définition***
- ***Composition***
- ***Mécanismes de formation***

2

Rôle physiopathologique des NETs : vue d'ensemble

3

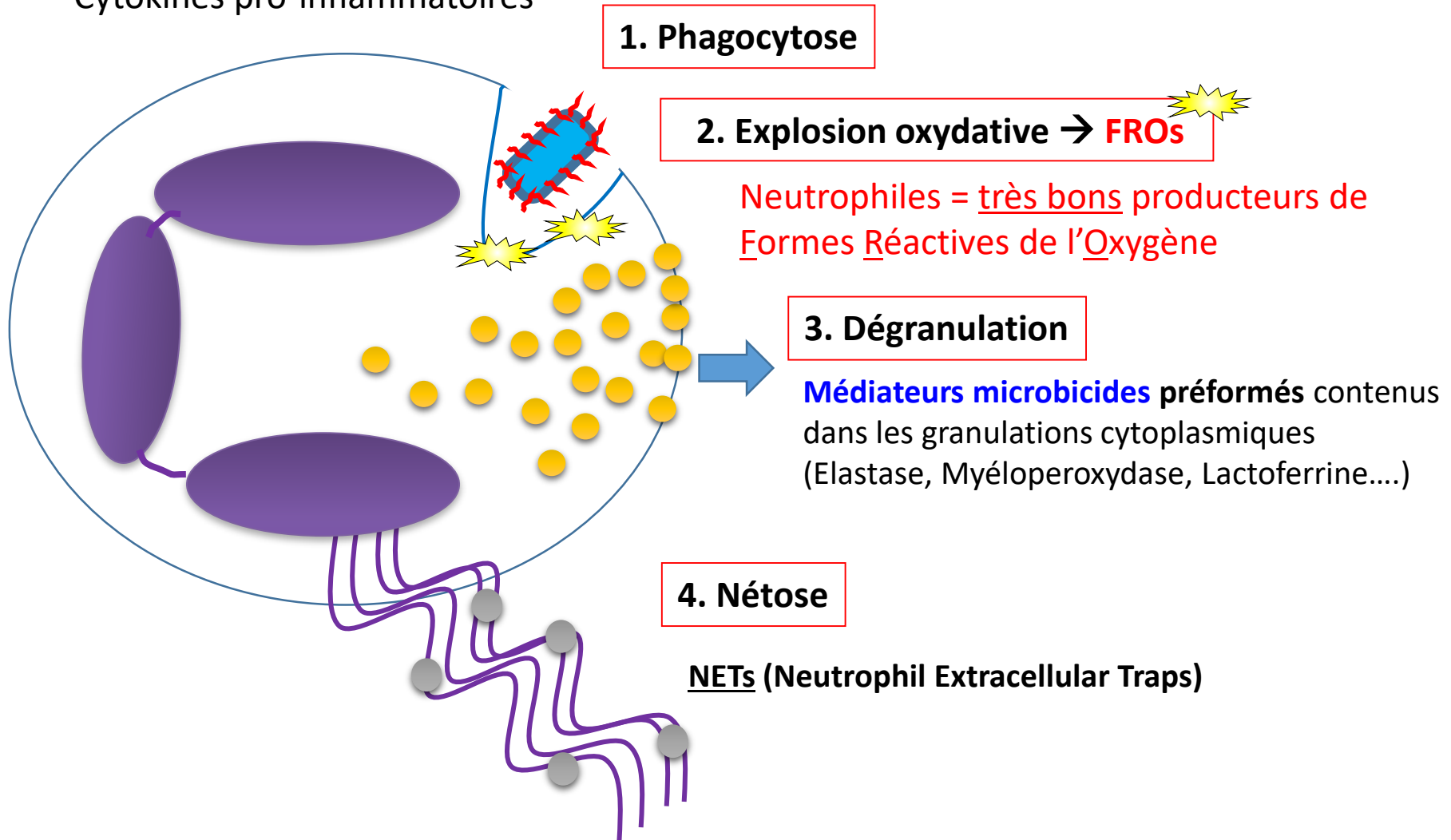
Les NETs en tant que biomarqueurs?

- ***définition***
- ***dosage non standardisé***
- ***Exemples en pathologie vasculaire***

Mécanismes antimicrobiens des neutrophiles

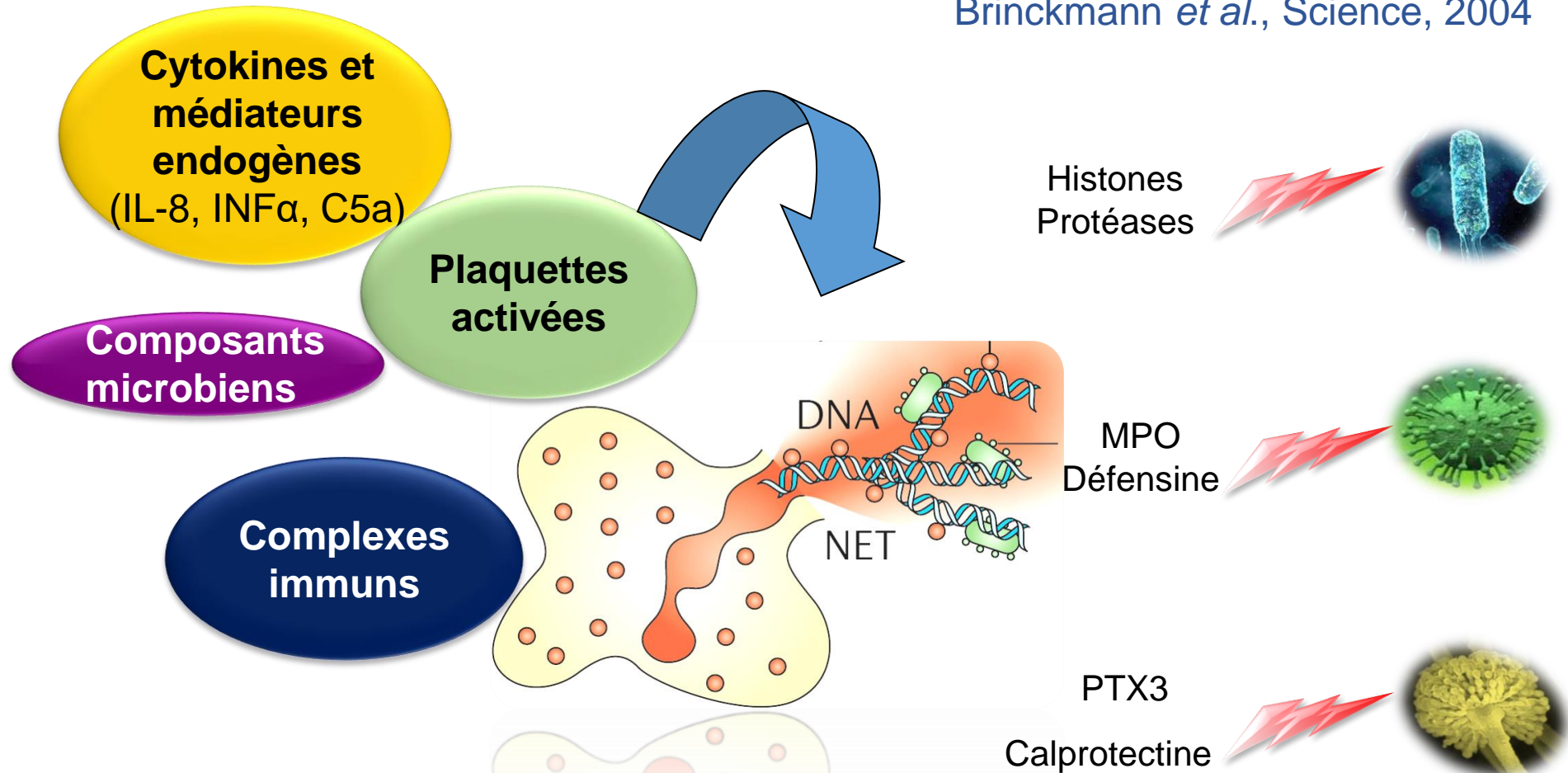
Activation du neutrophile :

- PAMPs
- Cytokines pro-inflammatoires



La Nétose: un nouveau mécanisme anti-microbien des polynucléaires

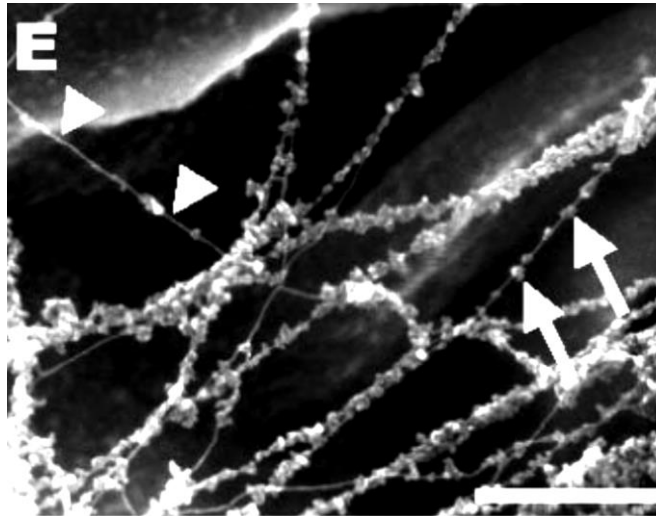
Brinckmann *et al.*, Science, 2004



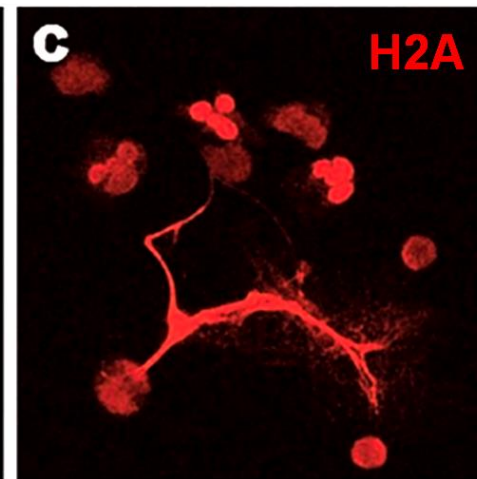
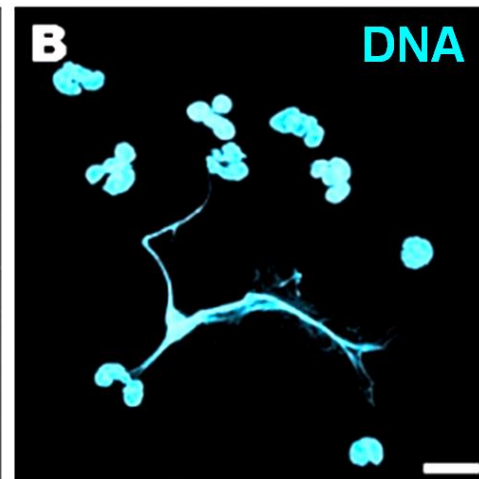
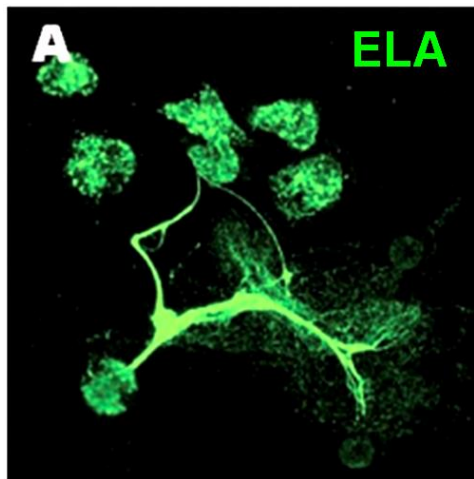
Squelette d'**ADN/histones** recouvert de **protéines granulaires, cytoplasmiques et nucléaires**

Les « Neutrophil Extracellular Traps »

NETs = filaments d'**ADN/histones** recouverts de **protéines granulaires, cytoplasmiques et nucléaires**



Brinkmann et al. Science. 2004



Composition protéique des NETs : une trentaine de protéines identifiées initialement

Compartiment	Protéines	Compartiment	Protéines
Noyau	Histones: H2A, H2B, H3 et H4	Granulations	Elastase 5,8%
	Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDCA)		Lactoferrine 2,7%
	High-mobility group protein B1 (HMGB1)		Azurocidine 2,6%
Cytoplasme	S 100 calcium-binding protein A8, A9 et A12		Cathepsine G 2,4%
	Membrane		B2-integrine (CD11b)
NOX2			Protéinase 3
Cytosquelette	Actine β et/ou γ		Lysozyme C
	Myosine-9		Défensines 1 et 3
	Plastine-2		Gélatinase
	Cytokeratine-10		Cathelcidine (LL-37)
	α -actinine 1 et/ou 4	Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)	
Enzymes glycolytiques	α -énoïase	Pentraxine 3	
	Transcétolase	SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor)	
Peroxisome	Catalase		

Brinkmann *et al.* Science 2004, Jaillon *et al.* J Exp Med 2007, Urban *et al.* PLoS Pathog 2009, Munafo *et al.* J Innate Immun 2009, Garcia-Romo *et al.* Sci Transl Med 2011, Marin-Esteban *et al.* Infect Immun 2012, Skreczynska-Moncznik *et al.* J Immunol 2012, Barrientos *et al.* Front Immunol 2013

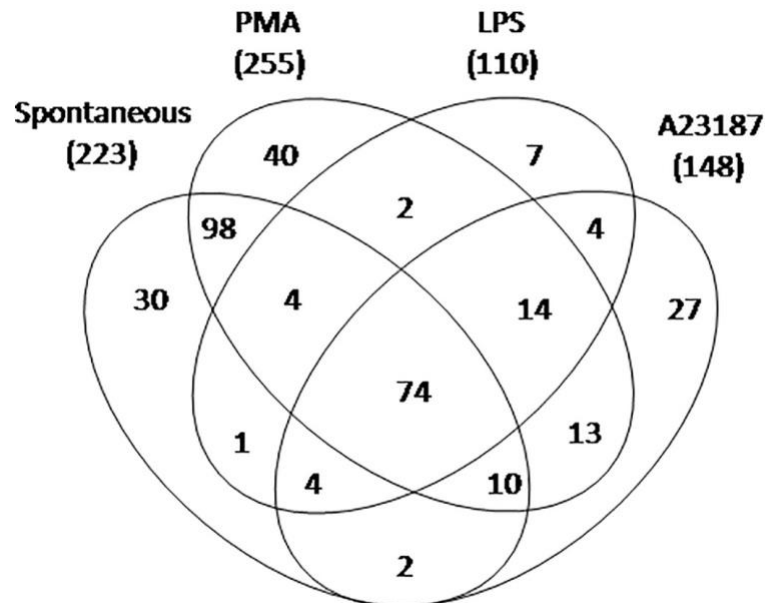
A l'heure actuelle : plusieurs centaines de protéines identifiées

RESEARCH ARTICLE

Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis PlosOne 2019

Andrea Petretto¹, Maurizio Bruschi², Federico Pratesi³, Cristina Croia³, Giovanni Candiano², Gianmarco Ghiggeri⁴, Paola Migliorini^{3*}

330 protéines identifiées



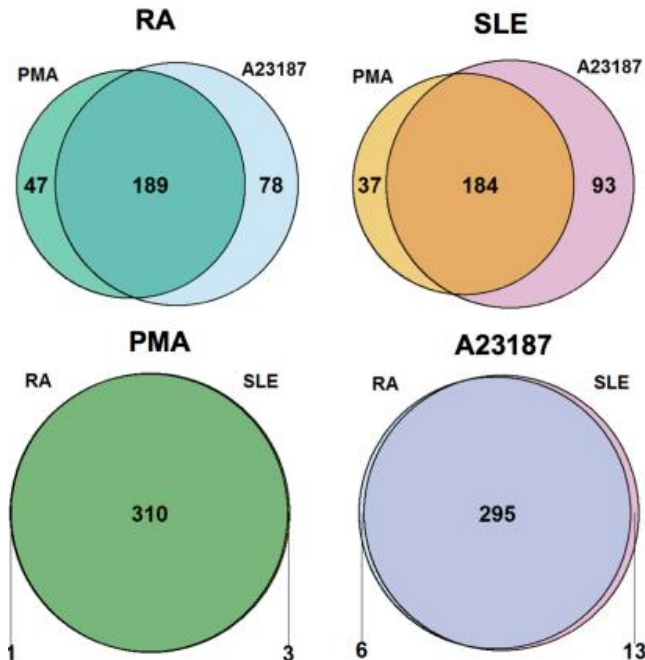
Composition variable selon le stimulus déclencheur

A l'heure actuelle : plusieurs centaines de protéines identifiées

Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus

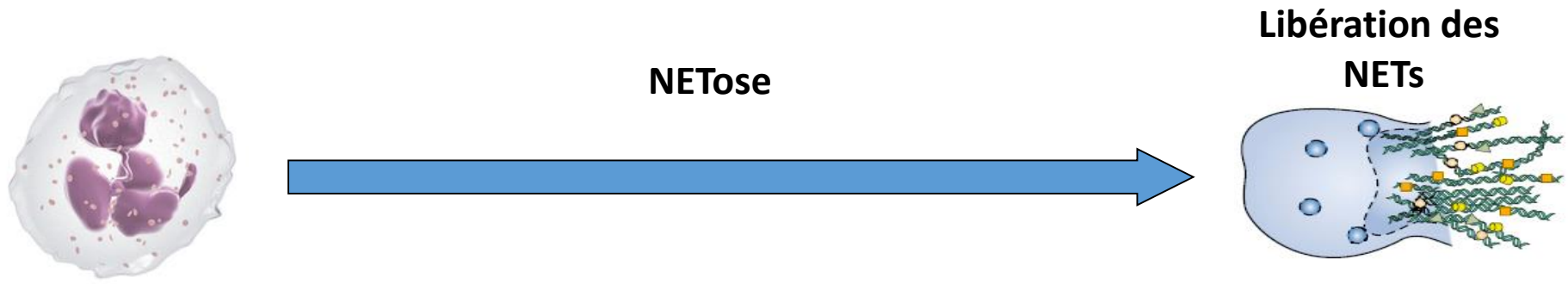
Elinor A. Chapman¹, Max Lyon¹, Deborah Simpson^{2,3}, David Mason^{2,4}, Robert J. Beynon^{2,3}, Robert J. Moots^{1,5} and Helen L. Wright^{1}*

Sujets sains : 197 protéines (≥ 2 peptides)
SLE/RA : 314 protéines (≥ 2 peptides)



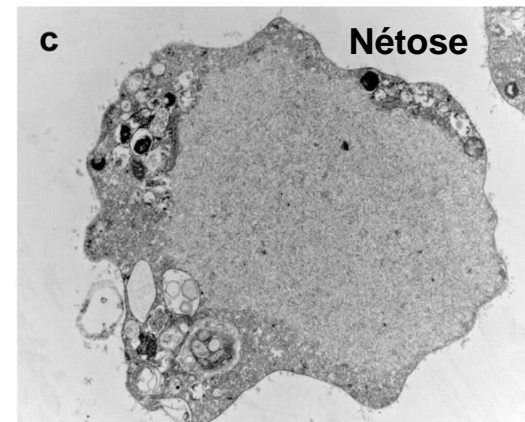
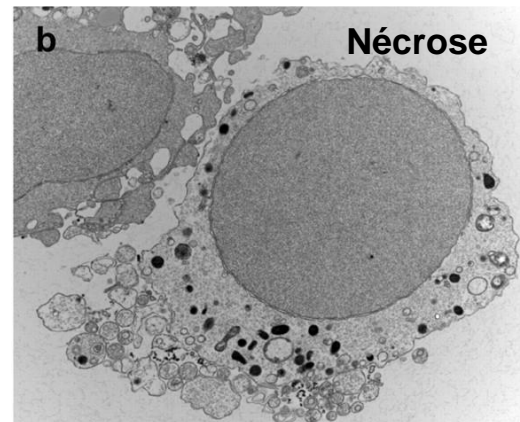
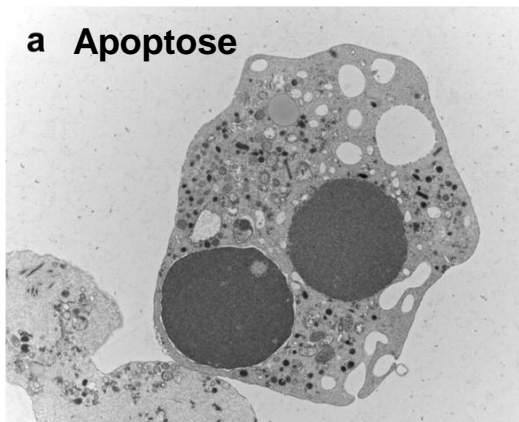
Variabilité de composition liée au stimulant et non au contexte pathologique sous-jacent

La nétose : un mécanisme cellulaire original

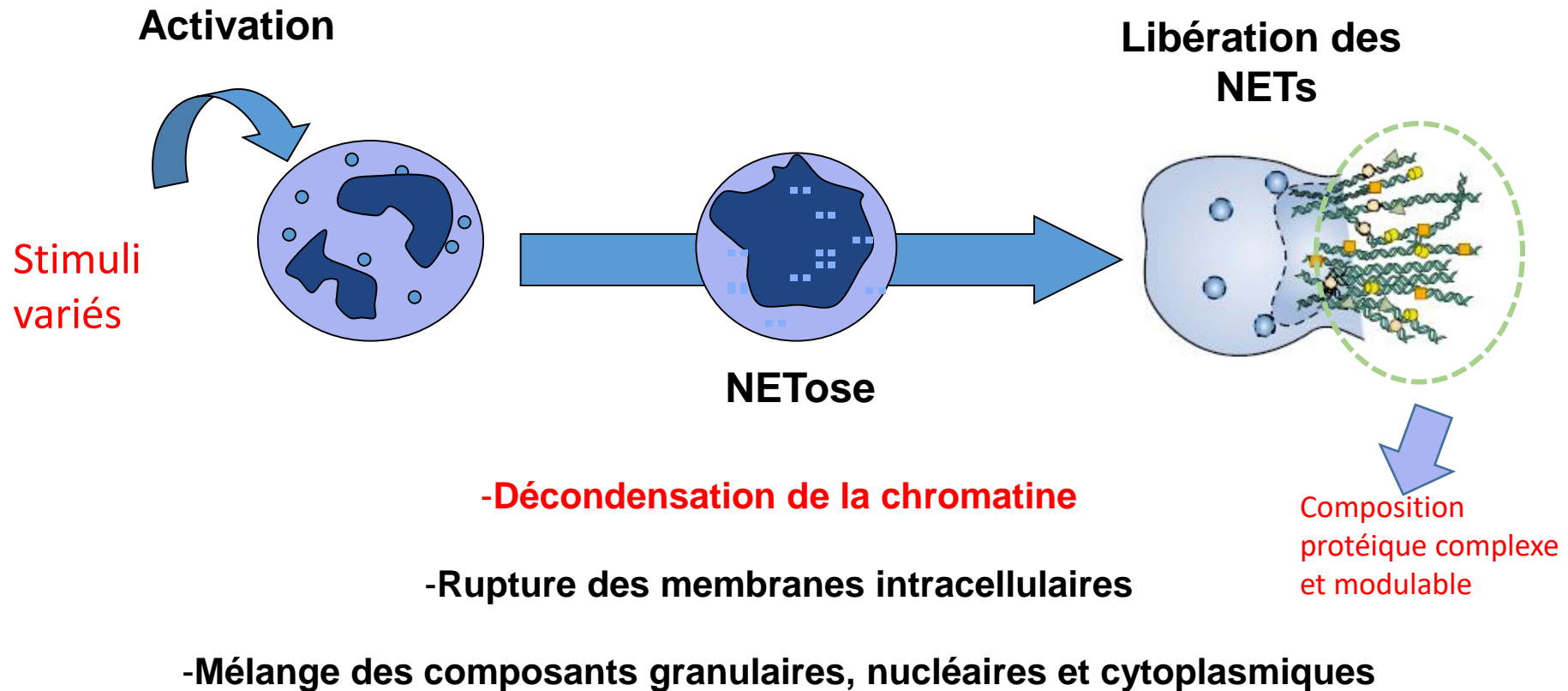


Modifications morphologiques séquentielles aboutissant à une **mort cellulaire** différente de l'apoptose ou la nécrose

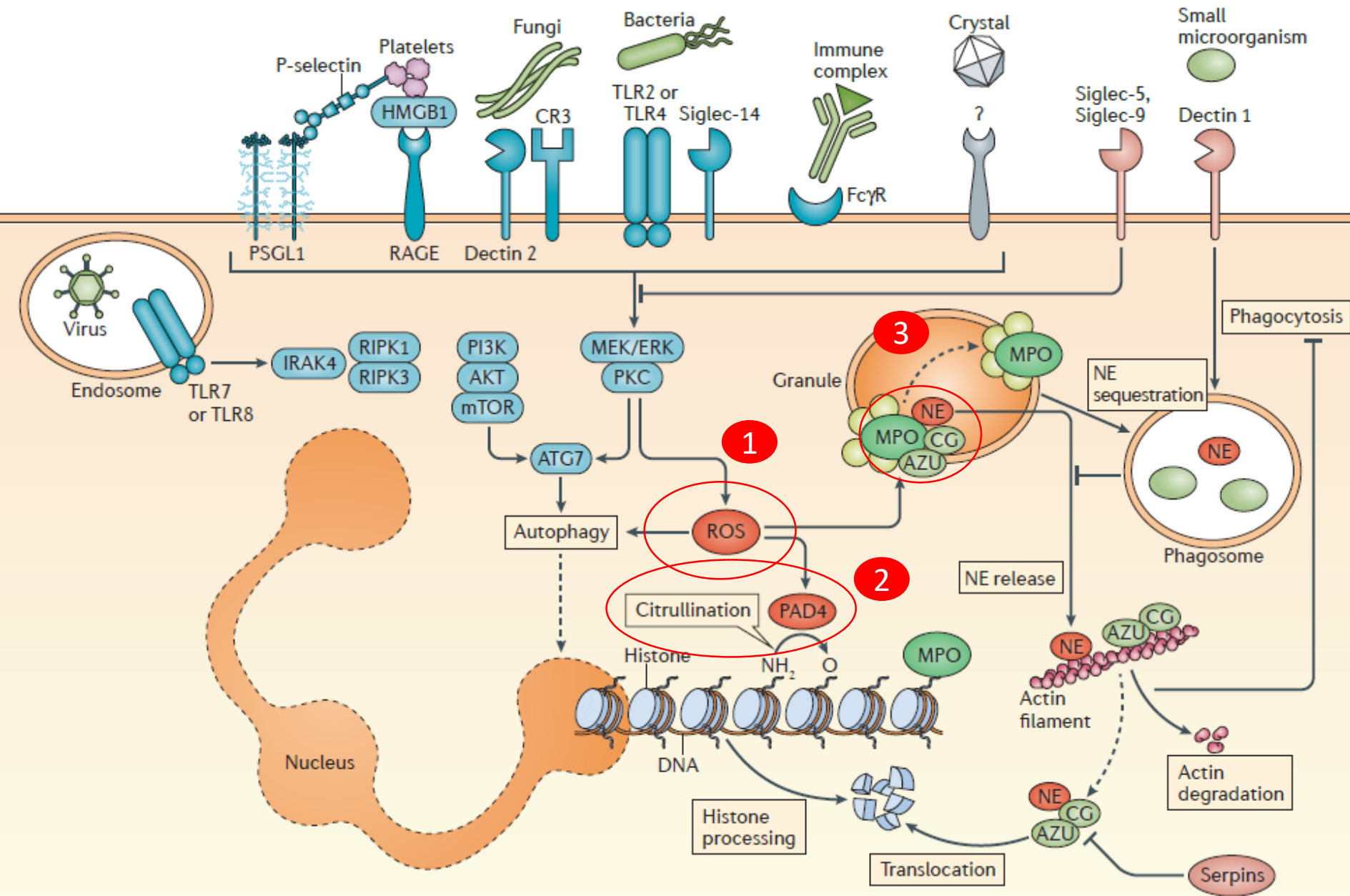
- Décondensation de la chromatine**
- Rupture des membranes intracellulaires**
- Mélange des composants granulaires, nucléaires et cytoplasmiques**



Des voies moléculaires complexes, multiples, pas encore totalement élucidées

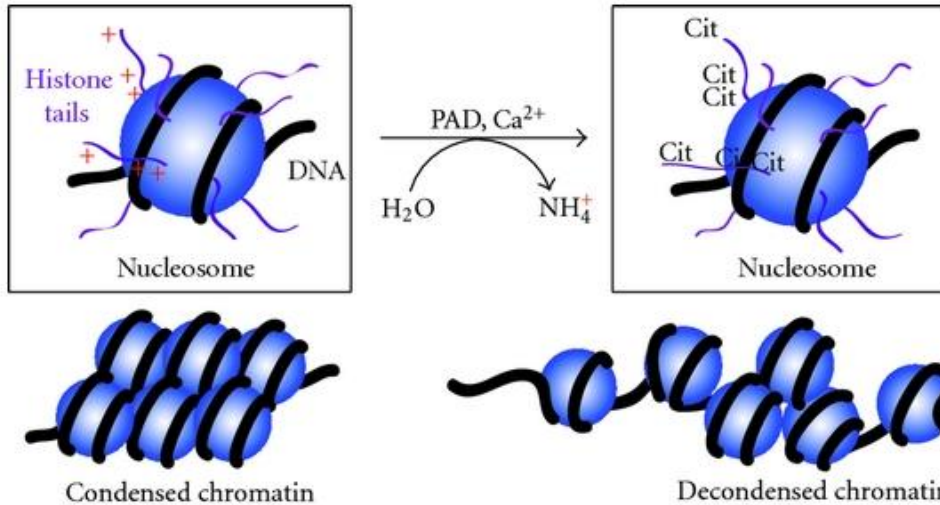
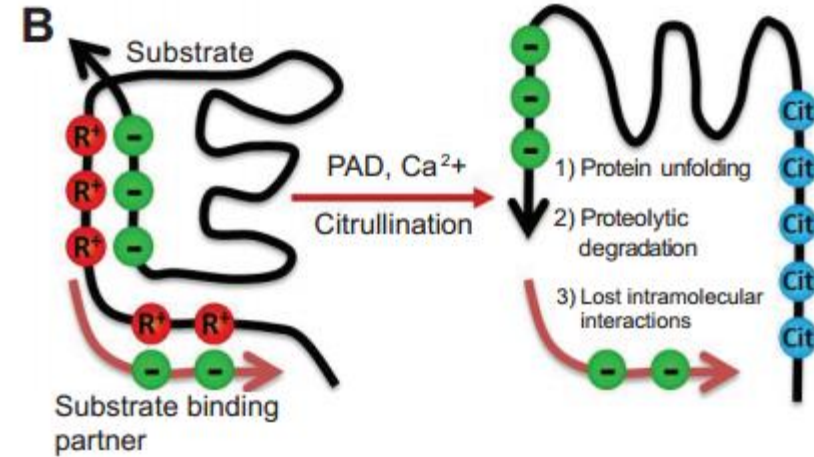
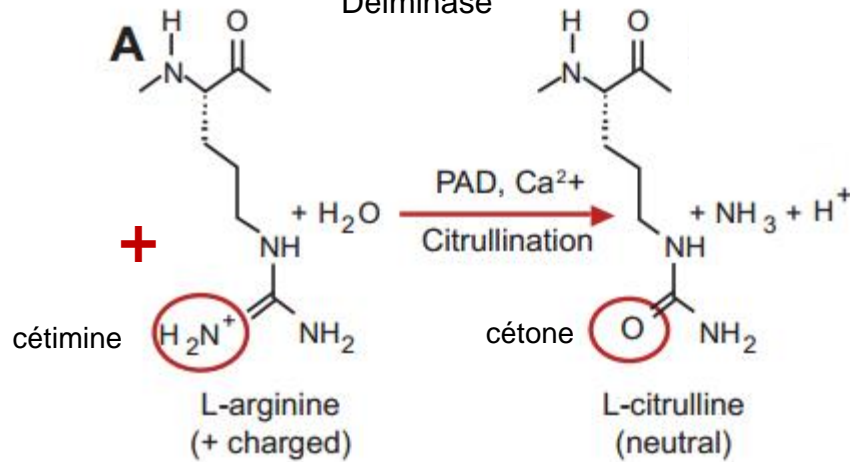


Voies moléculaires ?



Exemple de la citrullination des histones

PAD : Peptidyl-Arginine Déiminase



Citrullination des histones

- perte de charge +
- Réduction des interactions électrostatiques



Décondensation chromatine

Plan

1

Neutrophil Extracellular Traps (NETs): généralités

- *Définition*
- *Composition*
- *Mécanismes de formation*

2

Rôle physiopathologique des NETs : vue d'ensemble

Les NETs en tant que biomarqueurs?

- *définition*
- *dosage non standardisé*
- *Exemples en pathologie vasculaire*

NETs et physiopathologie

Rôle anti-infectieux

Piègent et tuent les micro-organismes
(protéases, BPI, défensines...)



Toxicité cellulaire et immuno-modulation

Maladies autoimmunes et inflammatoires, thromboses, cancers...

Lésions tissulaires directes

Épithélia pulmonaires et intestinaux, endothélium

Lignée A549 (cellules épithéliales bronchiques)

16 h

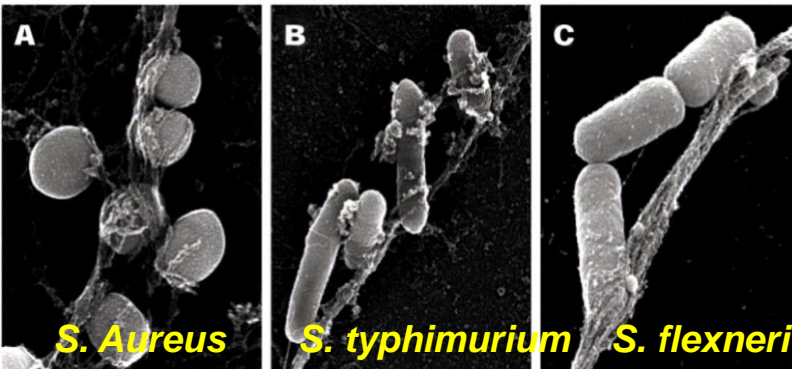


Control

NET

Saffarzadeh et al.2012

Cytotoxicité médiée par les **histones** et les **protéases**



S. Aureus

S. typhimurium

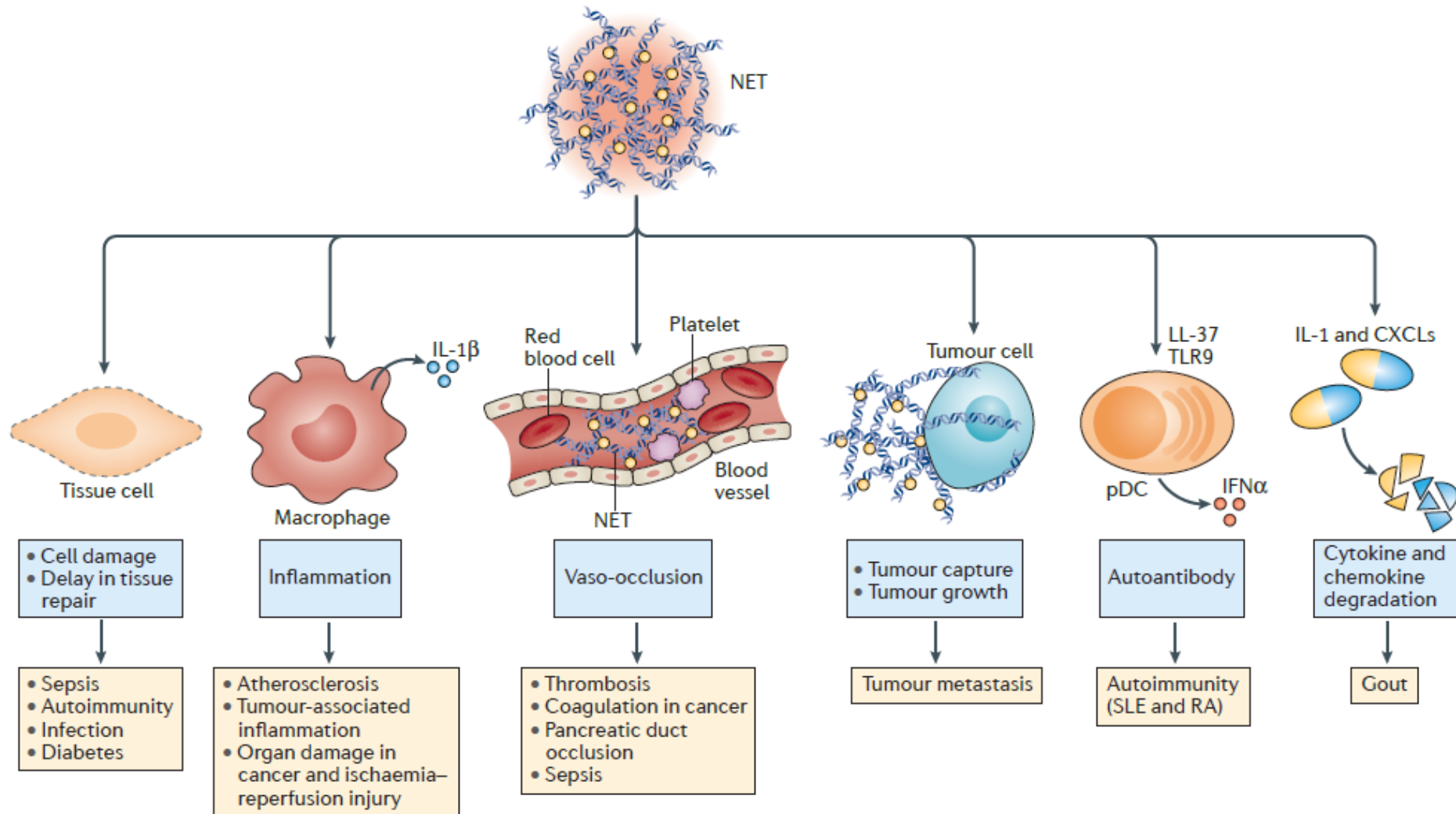
S. flexneri



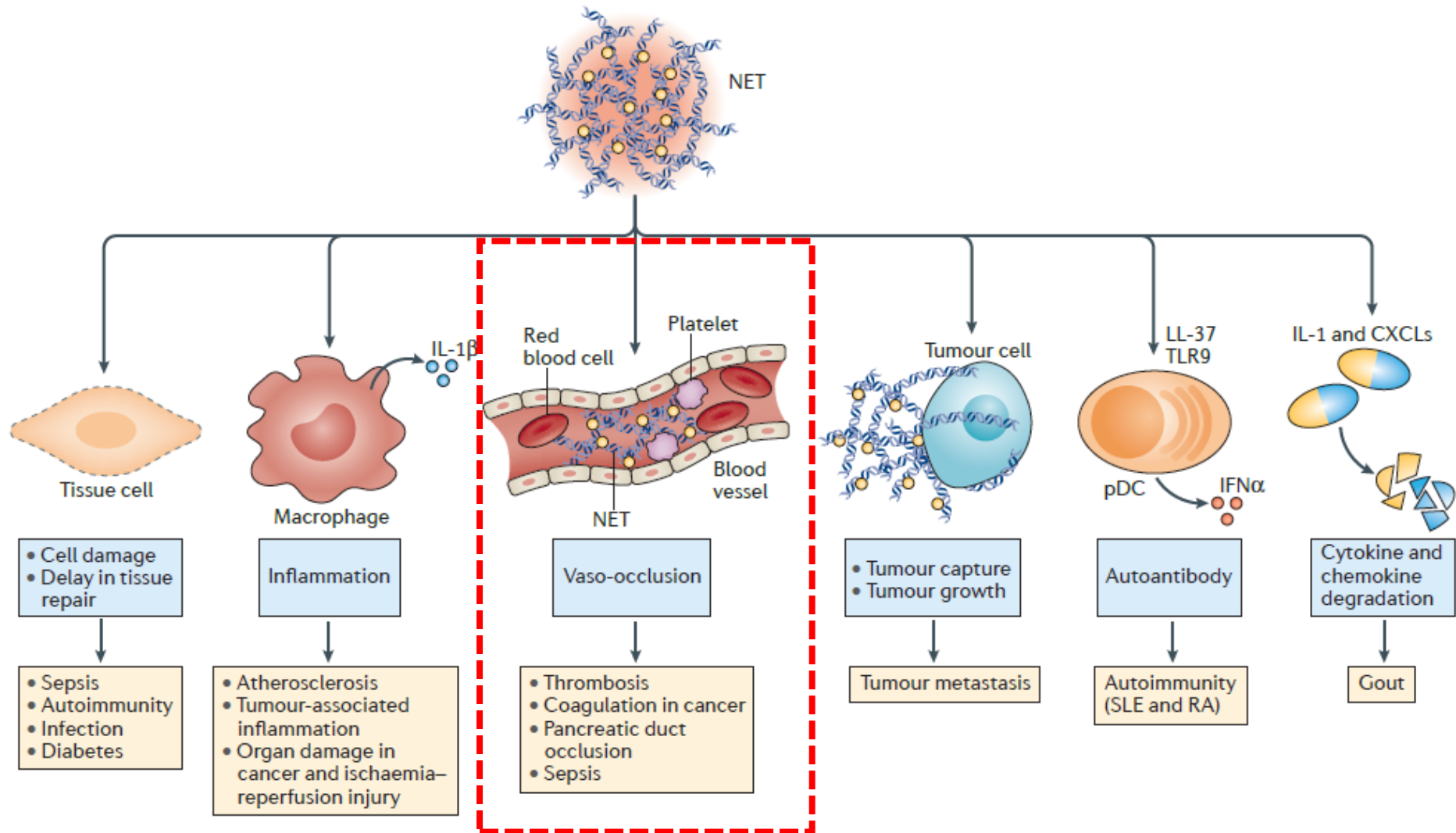
C. albicans

T.gondii

Les NETs : arme à double tranchant

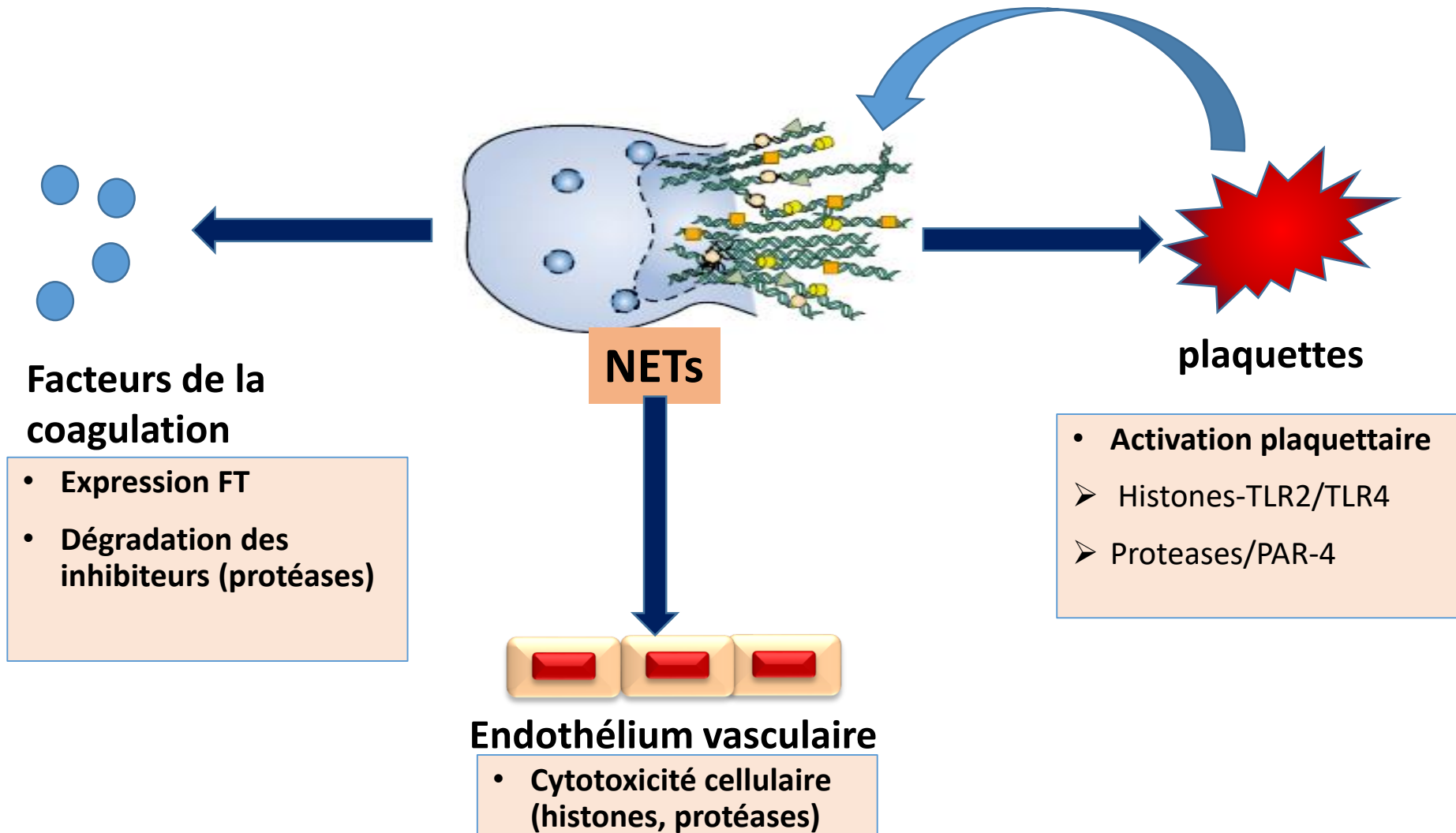


Les NETs : arme à double tranchant



Mécanismes de l'effet thrombogène des NETs

Action pléiotrope sur les acteurs de la coagulation



Plan

1

Neutrophil Extracellular Traps (NETs): généralités

- *Définition*
- *Composition*
- *Mécanismes de formation*

2

Rôle physiopathologique des NETs : vue d'ensemble

3

Les NETs en tant que biomarqueurs?

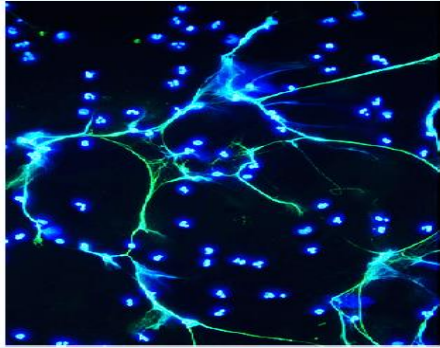
- ***définition***
- ***dosage non standardisé***
- ***Exemples en pathologie vasculaire***

Biomarqueur : définition

- Un groupe d'expert « Biomarkers Definition Working Group » piloté par l'institut américain national de la santé, définit les biomarqueurs comme des **paramètres mesurables objectivement**, reflétant un **processus biologique physiologique ou pathologique**, ou capables de **prédire une réponse pharmacologique** à un traitement
- biomarqueur idéal :
 - **Sensible, spécifique, reproductible**
 - non influencé par d'autres facteurs
 - en vue d'une application en routine clinique :
 - **valeurs seuils clairement définies**
 - technique simple et relativement peu onéreuse à partir des prélèvements les moins invasifs possibles.

Méthodes d'étude des NETs

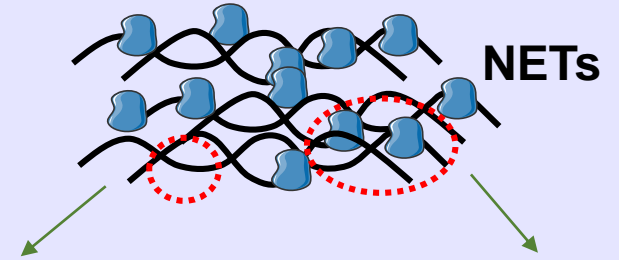
In vitro : suspension de PN purifiés



IFI :
co-marquage ADN
+protéines des NETs

Semi-quantitatif
subjectif

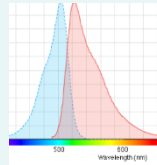
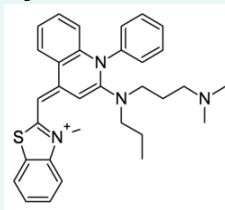
In vivo : liquides biologiques, biopsies
tissulaires



Dosage de l'ADN
extracellulaire
Facile
Non spécifique

Dosage ELISA complexes
ADN-protéines granulaires
spécifique

Sytox-Green®



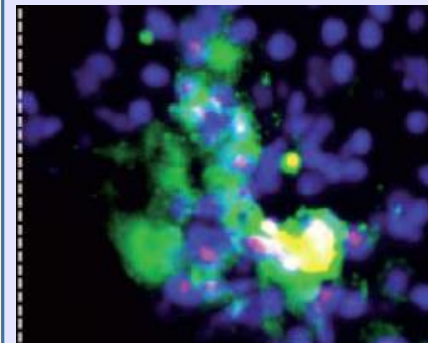
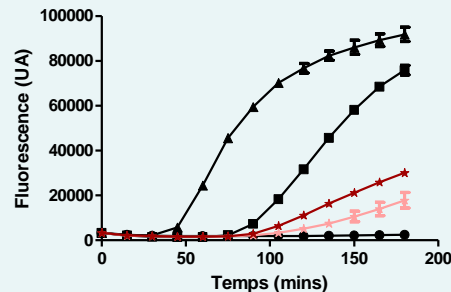
Sonde fluo

intercalante de l'ADN

Imperméable aux
cellules

fluorimètre

Quantitatif
Très sensible
non spécifique nérose



NETs visualisés par IFI
Modèle murin d'I/R rénale

Nakazawa et al. 2016

NETs : biomarqueurs d'activité de nombreuses pathologies inflammatoires ?

Mais variabilité ++ des biomarqueurs de NETs

Maladies autoimmunes

Lupus

- Cf ADN
- % PN en nérose sur biopsies rénales

Vascularite à ANCA

- % NETs induits/MPO ANCA des patients
 - Nucléosomes-MPO
 - ADN-MPO *controversé*

Psoriasis

- % NETs induits/sérum patients

PN de volontaires sains stimulés par le sérum de patients

Maladies inflammatoires

sepsis

- H3 citrullinées
- Nucléosomes

Marqueurs de diagnostic précoce et de survie

asthme

- Cf ADN expectoration
 - ADN-MPO sérum
- H3 citrullinées plasma et fonction pulmonaire

Biomarqueurs : définition



Un groupe d'expert « Biomarkers Definition Working Group » piloté par l'institut américain national de la santé, définit les biomarqueurs comme des **paramètres mesurables objectivement**, reflétant un **processus biologique physiologique ou pathologique**, ou capables de **prédire une réponse pharmacologique** à un traitement

→ Diagnostique

→ Suivi

→ Pronostique

→ De réponse

→ Prédicatif

...

Biomarqueur idéal :

- **Sensible, spécifique, reproductible**
- non influencé par d'autres facteurs

En vue d'une application en routine

clinique :

- **valeurs seuils clairement définies**
- technique simple et relativement peu onéreuse à partir des prélèvements les moins invasifs possibles.

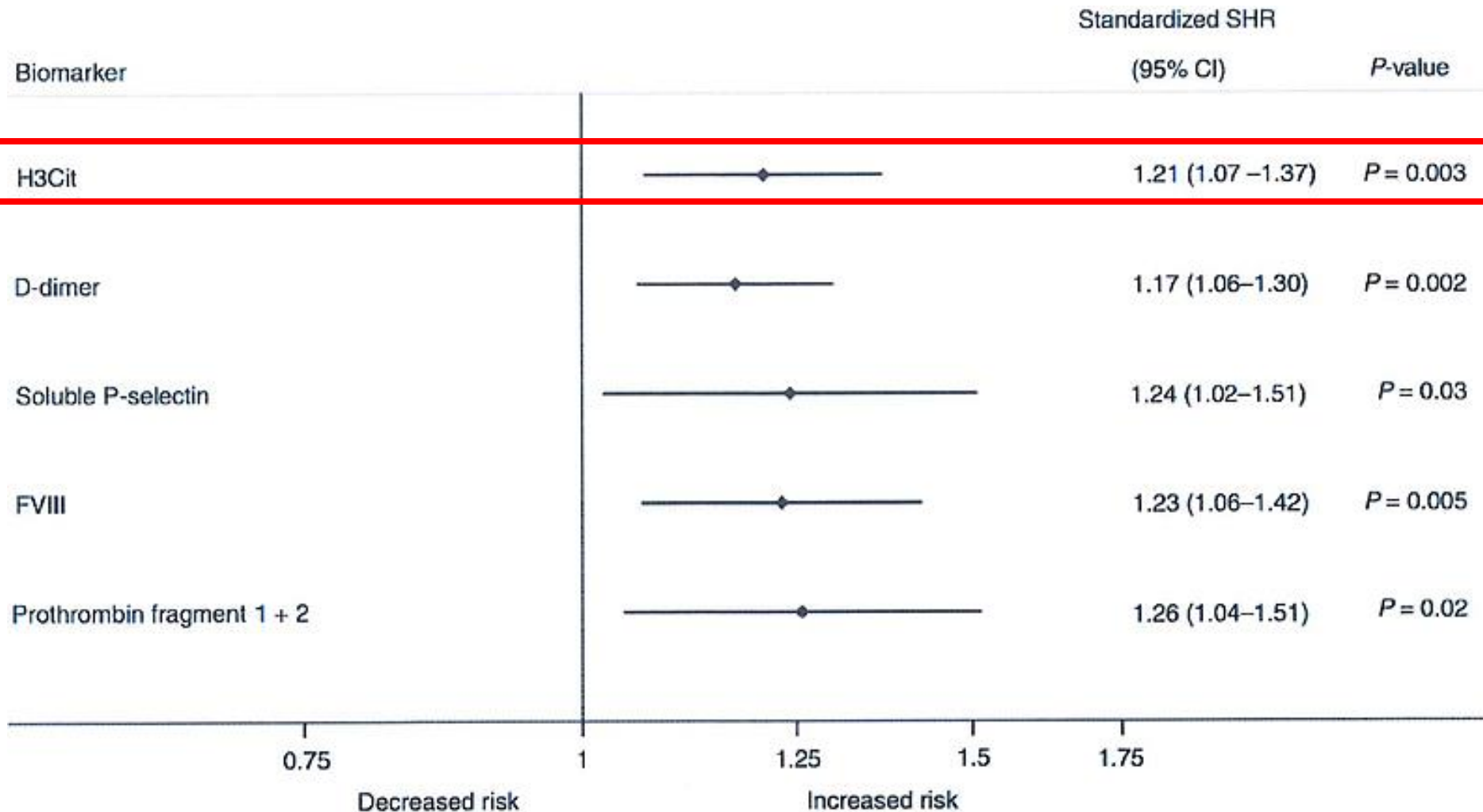
NETs : biomarqueurs d'activité de nombreuses pathologies inflammatoires ?

Résultats pouvant être d'apparence contradictoire

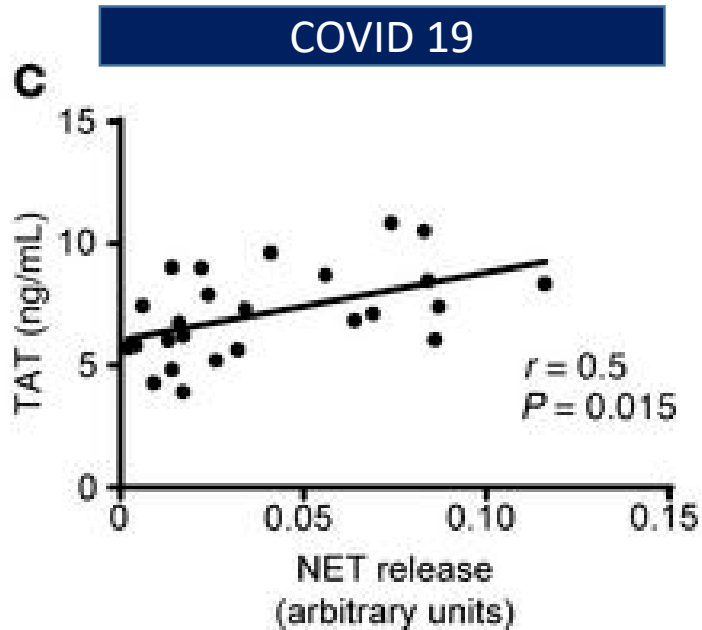
- Marqueur de NETs évalué?
 - Exemple : H3 citrullinée marqueur de sévérité du sepsis mais H3 citrullinée : marqueur de nécrose?
- Méthode de dosage, mode d'expression des résultats
- Matrice biologique : LBA, sérum...
- Marqueur d'activité évalué
 - Contrôle de l'asthme (ACT), FEV1/FVC...
- Recrutement de patients

Marqueurs de nétose circulants associés au risque thrombotique chez l'homme

H3cit : facteur de risque de TVP équivalent aux biomarqueurs classiques au sein d'une cohorte de patients cancéreux nouvellement diagnostiqués



Marqueurs de nétose circulants associés au risque thrombotique chez l'homme



Skendros, *J Clin Invest.* 2020

Cancer gastrique

Table 2. Correlation between neutrophil extracellular trap components and a hypercoagulable state in gastric cancer

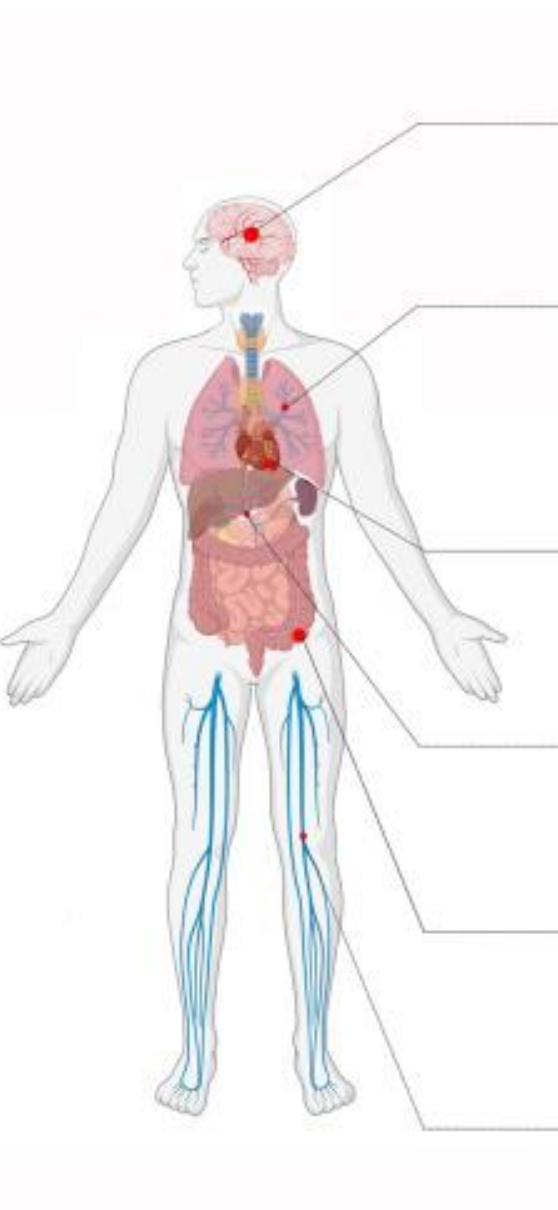
Variable	TAT (pg/mL)		D-dimers (ng/ml)	
	r	P	r	P
CFDNA	0.602	< .0001	0.674	< .0001
MPO-DNA (OD 405)	0.625	< .0001	0.49	< .0001
Nucleosomes (OD 405)	0.473	< .0001	0.597	< .0001
NE (ng/mL)	0.812	< .0001	0.363	0.011







TAT, thrombin-antithrombin complex; CFDNA, cell-free deoxyribonucleic acid; MPO, myeloperoxidase; OD, optic density; NE, neutrophil elastase.

Yang, *Int J Clin Exp Pathol* 2015

Marqueurs de nétose circulants corrént avec les marqueurs biologiques de thrombose dans différents contextes pathologiques

Biomarqueurs de NETs et thromboses



NETs biomarkers	Diagnosis	Prognostication	Treatment
 <p>IS: CD66b¹, H4Cit¹, H3Cit², MPO¹, NE¹, nucleosomes², and DNA^{1,2}</p>	✓	✓	✗
 <p>PE: H3Cit², H3Cit-DNA², MPO², nucleosomes², DNA-histone-MPO², and DNA²</p> <p>COVID-19-associated thromboembolism: calprotectin², H3Cit^{1,2}, MPO¹, MPO-DNA², and DNA^{1,2}</p>	✓ ✓	✓ ✗	✗ ✗
 <p>CAD: CD177¹, CD66b¹, H4Cit¹, MPO-DNA², NE¹, nucleosomes², and DNA^{1,2}</p> <p>MI: H3Cit^{1,2}, H4Cit², histone¹, MPO¹, MPO-DNA², NE¹, NE-DNA², DNA-histone¹, and DNA^{1,2}</p>	✓ ✓	✓ ✓	✗ ✗
 <p>PVT: H3Cit², MPO², MPO-DNA², NE², and DNA²</p>	✓	✗	✗
 <p>Cancer-associated thromboembolism: H3Cit^{1,2}, MPO², MPO-DNA², NE², nucleosomes², and DNA^{1,2}</p>	✓	✗	✗
 <p>DVT: calprotectin², CD11b¹, H3Cit^{1,2}, H3Cit-DNA², MPO^{1,2}, MPO-DNA², NE^{1,2}, nucleosomes², PAD4¹, DNA-histone¹, DNA-histone-MPO², and DNA^{1,2}</p>	✓	✗	✗

NETs : messages clés

- Les NETs sont **des filaments d'ADN** recouverts de **nombreuses protéines granulaires, nucléaires et cytoplasmiques**
- Les NETs sont libérés par **activation du neutrophile** en réponse à **divers stimuli : micro-organismes, cytokines pro-inflammatoires, plaquettes activées...**
- Les voies moléculaires impliquées sont complexes, encore partiellement élucidées mais convergent vers la **décondensation de la chromatine**
- Les NETs exercent des **effets bénéfiques anti-infectieux** mais également **délétères** si leur production est excessive : rôle **dans les maladies inflammatoires, auto-immunes, thrombotiques...**
- Les NETs amplifient le mécanisme thrombotique via leurs **propriétés procoagulantes multiples (activation plaquettaire, dégradation des inhibiteurs physiologiques, expression FT)**
- **Définition et standardisation nécessaire ++** : prérequis en vu d'une application clinique en tant que biomarqueur