

Contribution de la modélisation des propriétés coagulantes de cellules cancéreuses dans la compréhension de leurs mécanismes d'action et dans l 'étude de l'éfficacité des agents anticoagulants

Aurélie Rousseau

▶ To cite this version:

Aurélie Rousseau. Contribution de la modélisation des propriétés coagulantes de cellules cancéreuses dans la compréhension de leurs mécanismes d'action et dans l'étude de l'éfficacité des agents antico-agulants. Cancer. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT: 2016PA066478. tel-01508633

HAL Id: tel-01508633 https://theses.hal.science/tel-01508633

Submitted on 14 Apr 2017 $\,$

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 Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale

Laboratoire d'hématologie biologique Hôpital Tenon / INSERM U938

Contribution de la modélisation des propriétés coagulantes de cellules cancéreuses dans la compréhension de leurs mécanismes d'action et dans l'étude de l'efficacité des agents anticoagulants

Par Aurélie ROUSSEAU

Thèse de doctorat de Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Dirigée par Grigoris Gerotziafas

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2016

Devant un jury composé de :

Président : M. le Professeur Jean- Pierre LOTZ Rapporteur : M. le Professeur Philippe POCHART Rapporteur : M. le Professeur Marc VASSE Examinateur : M. le Docteur Remi FAVIER Examinateur : M. le Docteur Patrick VAN DREDEN Directeur de thèse: Ms. le Professeur Ismail ELALAMY et Grigoris GEROTZIAFAS

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury :

Monsieur le Professeur **Jean- Pierre LOTZ**, Vous nous avez fait un très grand honneur en acceptant de présider notre jury de thèse. Nous vous remercions de votre confiance et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à notre travail. Nous vous prions d'accepter l'expression de notre plus profond respect et le témoignage de notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur **Philippe POCHART**, Nous vous remercions de nous faire l'honneur de participer au jugement de ce travail. Veuillez trouver l'expression de toute ma gratitude et de tout mon respect.

Monsieur le Professeur Marc VASSE, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Permetez moi de vous adresser ma reconnaissance la plus sincère. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et vos conseils avisés dont vous m'avez fait part tout au long de mon parcours professionnel. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect le plus sincère.

Monsieur le Docteur **Remi FAVIER** d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'accorder son temps ainsi que ses remarques et critiques constructives.

Monsieur le Docteur **Patrick VAN DREDEN**, « O grand chef ! » comment pourrai-je faire des remercîments à la hauteur ! Merci, merci pour tout ! Merci pour ta grande compétence scientifique et tes précieux conseils. Merci pour ta disponibilité, ta générosité, ton soutien et ton écoute. Et encore merci beaucoup d'avoir participé à la correction de ma thèse. Merci d'avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à: Monsieur le Professeur Ismail ELALAMY et Grigoris GEROTZIAFAS d'avoir dirigé cette thèse. Merci pour l'intérêt permanent que vous avez porté à ce travail, pour vos idées scientifiques et remarques toujours pertinentes ainsi que pour votre disponibilité. Je vous suis également très reconnaissante de m'avoir donné la possibilité de réaliser mon souhait de carrière. Vous m'avez accueillie tout dans votre service, puis vous m'avez soutenue tout au long de ce travail jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. J'ai particulièrement apprécié de travailler à vos côtés pendant ces quatre années. Vos connaissances, votre précision dans le travail et votre pédagogie vous honorent. Je vous remercie de m'avoir fait confiance Vos conseils et critiques ont toujours été constructifs. Vos remarques et vos encouragements m'ont été d'une grande utilité. Vous m'avez guidé et aidé avec disponibilité, bienveillance et patience au long de ce travail. Pour tout cela, je vous exprime ma sincère reconnaissance ainsi que mon profond respect. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements et de mon profond respect

Je remercie tout particulièrement Monsieur **Jean-Claude Piel** sans qui ce projet n'aurait pas pu être possible une seule seconde, Je vous remercie de m'avoir donné la possibilité de coupler mon travail au sein de la société Diagnostica Stago avec ce travail de recherche. Recevez toute ma gratitude et mon profond respect.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres du laboratoire d'hémostase de l'hôpital Tenon. Leur aide et leur bonne humeur ont grandement facilité mon travail.

Merci également à toi Matthieu Grusse pour ton aide apportée dans ce travail.

A **Thérése Warot**, ma grand mère maternelle, partie avant que je puisse terminer ce travail. Cette thèse, je te la dédie. Tu es et tu seras toujours dans mon esprit et dans mon cœur. Cette réussite est en partie grâce à toi car tu as toujours su m'encourager et cru en moi. Merci.

Bien évidemment à **Mathis** et **Nathanaël mes deux fils**, Vous êtes mes amours, mes rayons de soleil et mes plus précieux trésors. Je vous aime plus que tout au monde.

A mes parents. Vous avez toujours été à mes côtés pendant ces années. Merci pour votre soutien. Votre support indéfectible et ses nombreux encouragements dans les bons comme dans les moins bons moments. Vous m'avez toujours supporté tout au long de ces années et qui ont toujours cru en moi. À vous tous, je vous suis reconnaissante et vous reconnaît une part importante de cette thèse.

Summary

Background: The pathogenesis of the prothrombotic state in cancer is complex and may alter the efficiency of the antithrombotic agents but not all mechanisms are entirely understood.

Aims: In the present study in a first part we studied the influence of pancreas adenocarcinoma cells (BXPC3) and human breast carcinoma cells (MCF7) on the antithrombotic efficiency of apixaban, fondaparinux, in a second part we dissected the mechanisms responsible for the procoagulant activity of BXPC3 and MCF7 by thrombin generation assay (TG) in different relevant conditions. In last part we analyzed the impact of microenvironment which consist of the specific role of microparticles (MVs) originate from the cancer cells themselves and we estimated their necessary association with cancer cells for cancer induced hypercoagulability.

Methods: Cells were cultured and adhered in 96-well plates and normal platelet poor or rich plasma (PPP; PRP) spiked or not with apixaban, fondaparinux or enoxaparin was added. TG was done with CAT[®] assay. CAT[®] assay was also performed in different conditions of reagents, with or without any anti-tissue factor antibody (anti-TF), or corn trypsin inhibitor (CTI; inhibitor of the contact phase of coagulation). Alternatively spliced TF (asTF), TF activity (TFa) and cancer procoagulant (CP) were also assessed. Primary human umbilical vein cells (HUVEC) were used as normal control experiment. Thrombin generation (TG) of normal platelet poor plasma (PPP) added in wells carrying cancer cells, cancer cells in presence of their respectively isolated MVs from the culture supernatant of cells in the same conditions (cells number and volume), or with MVs alone were assessed by the CAT assay.

Results: Comparison on the basis of IC50 showed that in the presence of BXPC3 or MCF7 the efficiency of apixaban was preserved or partially reversed. Fondaparinux was more vulnerable to the presence of cancer cells as compared to apixaban. The effect of BXCP3 or MCF7 cells on the antithrombotic potency of enoxaparin was of similar magnitude as that on apixaban. The TFa and asTF were found in abundant amounts in BXCP3 than MCF7 cells. The CP levels were higher in MCF7. The BXPC3 amplified TG more than MCF7 did. The anti-TF inhibited TG triggered by BXCP3 and MCF7. The CTI had more pronounced inhibitory effect on TG triggered by MCF7. TG enhancement by BXPC3 and MCF7 was mediated by FVII. Factor XII was more important for TG enhancement by MCF7. The presence of MPs drastically increases the generation of thrombin and this effect depending of the type of their original cells. MPs of BxPC3 having a very superior effect to MCF7.

Conclusion: The type of cancer cells is determinant for the antithrombotic efficiency of the specific factor Xa inhibitors. In contrast it does not significantly influence the potency of enoxaparin. The present study shows that the impact of the type of cancer cells on the antithrombotic activity of the specific Xa inhibitors should not be neglected The mechanism of activation of blood coagulation by the BXPC3 is dominated by the TF pathway, MCF7 additionally imply also FXII activation. This experiment showed that hypercoagulability induced by cancer cells is the resultant of the combination of the procoagulant properties of cancer cells with procoagulant elements of the plasma microenvironment and highlight that circulating MVs are key players in the pathogenesis of cancer-associated thrombosis. Modeling procoagulant profile of cancer cells provides an understanding of the procoagulant mechanisms and could evaluate the efficiency of antithrombotic treatment.

Résumé

Contexte: La pathogenèse de l'état prothrombotique dans le cancer est complexe et peut altérer l'efficacité des agents antithrombotiques, cependant tous les mécanismes ne sont pas entièrement compris.

Objectifs: Pour cette étude, dans une première partie, nous avons étudié l'influence des cellules du pancréas d'adénocarcinome (BXPC3) et des cellules de carcinome du sein humain (MCF7) sur l'efficacité antithrombotique de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine. Dans une deuxième partie, nous avons disséqué les mécanismes responsables de l'activité procoagulante des BXPC3 et MCF7 par le test de génération de thrombine (GT) dans différentes conditions. Enfin, dans la dernière partie, nous avons analysé l'impact du microenvironnement que constituent spécifiquement les microparticules (MPs) provenant des cellules cancéreuses elles-mêmes et nous avons évalué leur association nécessaire aux cellules cancéreuses pour induire l'hypercoagulabilité.

Méthodes: Les cellules ont été cultivées dans des plaques à 96 puits. Un plasma normal pauvre en plaquettes ou riche (PPP; PRP) a été surchargé ou pas par de l'apixaban, du fondaparinux ou de l'énoxaparine. La GT a été réalisé par le test CAT®. La GT a également été effectuée dans des conditions différentes en réactifs, avec ou sans l'anticorps anti-facteur tissulaire (anti-FT) ou l'inhibiteur de trypsine de maïs (CTI: inhibiteur de la phase contact de la coagulation). Le facteur tissulaire alternatif épissé (asTF), l'activité du FT (FTa) et le cancer procoagulant (CP) ont également été eté utilisées comme contrôle normal. La génération de thrombine en plasma normal pauvre en plaquettes (PPP) dans des puits portant les cellules cancéreuses, les cellules cancéreuses en présence de leurs MPs respectivement isolées à partir du surnageant de culture de cellules dans les mêmes conditions, ou avec seulement MPs a été évaluée par le test CAT.

Résultats: La comparaison sur la base de l'IC50 a montré qu'en présence de BXPC3 ou de MCF7, l'efficacité de l'apixaban a été préservée ou partiellement diminuée. Le fondaparinux, est plus vulnérable à la présence de cellules cancéreuses par rapport à l'apixaban. L'effet des cellules BXCP3 ou MCF7 sur la puissance antithrombotique de l'énoxaparine était d'une ampleur similaire à celle de l'apixaban. Le FTa et l'asTF ont été trouvés dans des quantités plus abondantes pour les BXCP3 que les cellules MCF7. Les taux de CP étaient plus élevés pour les MCF7. Les BXPC3 amplifient la GT de facon plus prononcée que les MCF7. L'anti-FT a inhibé la GT déclenchée par les BXPC3 plus fortement que par les MCF7. La CTI avait

un effet inhibiteur plus prononcé sur la GT déclenchée par les MCF7. L'augmentation de la GT est médiée plus fortement par le FVII pour les BXPC3 que les MCF7. Le facteur XII était plus important pour l'augmentation de la GT médiée par les MCF7. La présence de MPs augmente considérablement la production de thrombine et cet effet est fonction du type de cellules à leur origine; les MPs de BXPC3 ayant un effet très supérieur aux MPs de MCF7.

Conclusion: Le type de cellules cancéreuses est déterminant pour l'efficacité antithrombotique des inhibiteurs spécifiques du facteur Xa. En revanche, il ne modifie pas de manière significative l'activité de l'énoxaparine. Cette étude montre que l'impact du type de cellules cancéreuses sur l'activité antithrombotique des inhibiteurs spécifiques du FXa ne doit pas être négligé. Le mécanisme d'activation de la coagulation sanguine par les BXPC3 est dominé par la voie du FT. Le rôle du FXII est plus impliqué pour les MCF7. Cette étude a montré que l'hypercoagulabilité induite par les cellules cancéreuses est la résultante de la combinaison des propriétés procoagulantes des cellules cancéreuses elles-mêmes avec des éléments procoagulants du microenvironnement, et met en évidence que les MPs circulantes jouent un rôle clé dans la pathogenèse de la thrombose associée aux cancers. La Modélisation du profil procoagulante des cellules cancéreuses permet de mieux comprendre les mécanismes procoagulants et peut permettre de mieux évaluer l'efficacité des traitements antithrombotiques.

Sommaire

Remerciemen	nts	i
Summary		iii
Résumé		v
Sommaire		1
Liste des prin	cipales abréviations	5
Liste des tabl	eaux	.11
Introduction.		13
Références -	Introduction	.17
Partie Biblio	graphique	19
Chapitre I: L	a relation cancer et maladie thromboembolique; aspects épidémiologiques	20
I.1 Rôle d	lu cancer dans la survenu de la MTEV	
I.1.1 L	es Facteurs de risque de MTEV spécifiques au cancer	27
I.1.1.1	Le stade du cancer	27
I.1.1.2	Le type du cancer	29
I.1.1.3	L'histologie du cancer	30
I.1.1.4	L'immobilisation ou hospitalisation	.31
I.1.1.5	Les traitements du cancer	32
I.1.1.6	Les cathéters centraux	.35
I.1.1.7	Le rôle du cancer lui même dans les MTEV	36
I.1.1.8	Les récidives	38
I.1.1.9	La chirurgie	39
I.1.1.10	La mortalité	.40
Références	- Chapitre I	.42
Chapitre II :	Rappel sur l'hémostase	47
II.1 Introd	uction générale	48
II.2 Les co	omposants sanguins et vasculaires de la coagulation	49
II.2.1 L	es éléments cellulaires	50
II.2.2 L	es facteurs plasmatiques:	51
II.2.3 L	e facteur tissulaire	53
II.3 Evolu	tion de la conception classique du processus de la coagulation en Y au modèle	e
moderne et a	u modèle cellulaire de la coagulation	57
II.3.1 L	e modèle classique de "Cascade" de la coagulation	57

II.3	.2	Le schéma moderne de la coagulation	58
Ι	<i>I.3.2</i> .	1 Phase d'initiation de la génération de thrombine	59
Ι	II.3.2.2 La phase contact de l'activation de la génération		63
Ι	<i>I.3.2</i> .	3 La Fibrinoformation	64
II.3	.3	Le modèle cellulaire de la coagulation	64
II.4	Les	inhibiteurs naturels de la coagulation et la régulation de la coagulation	67
II.4	.1	La voie des inhibiteurs constitutifs	68
II.4	.2	La voie d'inhibition dynamique.	69
Référ	ence	es – Chapitre II	71
Chapi	tre II	I : Physiopathologie de la thrombose chez les patients canceréreux	75
III.1	Intro	oduction	76
III.2 natien	Les	trois causes majeures impliquées dans la formation d'une thrombose chez les	78
III /	115 au 7 1	Les anomalies du flux vasculaire	78
III.	2.1 7 7	Les anomalies de l'endothélium vasculaire	70
III./	2.2	Les anomalies de l'hémostase	
III.	<u>и</u> за	Les anomanes de l'hemostase	01
III 3	Ied	léséquilibre de la fibrinolyse	02
III.5 III.4	Plac	uettes et cancers	
III.+ III.4	1 1ac	Effet pro et anti-angiogénique	90
III.	т.1 4 ?	Effets sur l'adhésion	102
III.	т. <i>2</i> 4 З	Effets sur la prolifération	102
III.	т.5 4 <i>4</i>	Effets protecteurs	103
III.5	т.т Тип	peur et inflammation	104
III.5 III.6	Chi	miothéranie et thrombose	104
III.0 III.7	Lac	shirurgie les cathéters centraux	100
nn. / Référe	ences	s – Chapitre III	111
Kelen			111
Chapi	tre IV	V : Rappel sur les anticoagulants en oncologie	117
IV.1	Intro	oduction	118
IV.2	Les	héparines	121
IV.3	Les	anti-vitamines K	123
IV.4	Le f	ondaparinux	124
IV.5	Les	anticoagulants oraux directs (AOD)	125
IV.6	Plac	e des anticoagulants dans la thrombose chez le patient cancéreux	128
Référe	ences	s – Chapitre IV	131

Partie	Exp	érimentale	.134
Chapi	tre V	7 : Matériels et méthodes	135
V.1		Lignées cellulaires adhérentes	136
V .2	2	Réactifs et conditions de cultures	136
V .1	.1	Mises en culture des cellules	138
V.1	.2	Purification des MPs à partir des milieux conditionnés	140
V.2	Tes	ts biologiques mis en œuvre	141
V .2	2.1	Le CAT (Calibrated Automated Thrombinography)	141
V .2	2.2	Détermination des phospholipides procoagulants (méthode chronométrique)	145
V .2	2.3	Dosage du facteur tissulaire	146
V .2	2.4	Dosage du cancer procoagulant	147
V.2	2.5	Détection de l'asTF par méthode ELISA	148
V .2	2.6	Cytométrie en flux	148
V.4	Sta	tistique	156
Référ	ence	s – Chapitre V	157
Chapi	tre V	/I : Validation du modèle expérimental	.159
VI.1	Cho	pix et culture des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses	.160
VI.2	Dét	ermination du nombre de cellules	.161
VI.3	Eff	et du milieu RPMI sur la génération de thrombine	.163
VI.4	Eff	et de la trypsine sur la génération de thrombine	.164
VI.5	Eff	et de la durée d'incubation des cellules sur plaque	. 165
VI.6	Eff	et du lavage de la plaque sur la génération de thrombine	.166
VI.7	Eff	et de la concentration en SVF sur la GT	.167
VI.8 plaque	Dét ettes	ermination du nombre de plaquettes pour les expériences en plasma riche en	.168
Chapi	tre V	/II : Résultats	170
VII.1	Le n	nodèle expérimental	171
VII.2	Arti	cle 1	173
VII inh	.1.1 ibitic	Version anglaise: Cancer cells BXPC3 and MCF7 differentially reverse the on of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin	173
VII mar	.1.2 nière	Version francaise: Les cellules cancéreuses BXPC 3 et MCF7 inhibent de différente la génération de thrombine par apixaban, le fondaparinux et	101
enc VII 2	хара	urine	.181
V 11.Z	P	$\Delta $ and	

VII.2.1 coagulatio	Version anglaise: Distinct roles of tissue factor and intrinsic pathway of blo n in thrombin generation triggered by pancreatic cancer and breast cancer ce 200	ood ells.
VII.2.2 coagulatio cancéreuse	Version francaise : Rôle du facteur tissulaire et de la voie intrinsèque de la n sanguine dans la génération de thrombine déclenchée par des cellules es du sein et du pancréas.	228
VII.3 App cancereuses.	proche du rôle du microenvironnement sur le pouvoir procoagulant des cellu	les 257
VII.3.1	Marquage des cellules cancéreuses par cytométrie en flux	257
VII.3.2	Marquage des microparticules par cytométrie en flux	258
VII.3.3 procoagula	Impact des microparticules sur la génération de thrombine, effet sur le pouv ant	voir 259
VII.4 List	e des présentations et des posters sur ce travail par notre groupe	263
Discussion g	énérale	266
Références –	Discussion générale	282
Conclusion		286

Liste des principales abréviations

ADP: adénosine diphosphate AOD: nouveaux anticoagulant oraux asTF: Alternatively spliced TF AT: antithrombine ATP: adénosine triphosphate AVK: anti-vitamine K BXPC3: Human primary pancreatic adenocarcinoma CP: cancer procoagulant CTI: corn trypsin inhibitor EGF: epidermal growth factor EP: embolie pulmonaire EPCR: endothelial protein C receptor EPO: erythropoiétine FII: facteur II de la coagulation FIX: facteur IX de la coagulation FT: facteur tissulaire FV:facteur V de la coagulation FVII: facteur VII de la coagulation FVIII: facteur VIII de la coagulation FvW: facteur von Willebrand FX: facteur X de la coagulation FXI: facteur XI de la coagulation FXII: facteur XII de la coagulation GT: génération de thrombine HBPM : héparine de bas poids moléculaire HNF : héparine non fractionnée HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells IC50 : concentration inhibitrice 50% ICAM-1: inter cellular adhesion molecule 1 IL: interleukine LPA: acide lysophosphatidique

MCF7: Michigan Cancer Foundation 7, human breast cancer cells

MCP-1: motochondrial pyruvate carrier 1

MIF: moyenne des index de fluorescence

MMP: métalloprotéinase de matrix

MP: microparticule

MRI: mean rate index

MTEV: maladie thromboembolique veineuse

MV: microvésicule

NK: natural killer

PAF: facteur de l'activation plaquettaire

PAI-1: inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

PC: protéine C

PCa: protéine C activée

PDGF: platelet derived growth factor

PF4: facteur 4 plaquettaire

pM: picomolaire

PPL: phospholipides procoagulants

PPP: plasma pauvre en plaquettes

PRP: plasma riche en plaquettes

PS: protéine S

Pser: phosphatidyl sérine

PSGL1: P-selectin glycoprotein ligand-1

RR: risque relatif

RVV: Russel Viper Venom

TAFI: thrombin activatable fibrinolysis inhibitor

TCA: temps de céphaline activée

TF: tissue factor

TFa: tissue factor activity

TFPI: tissue factor pathway inhibitor

TG: thrombin generation

TGF: transforming growth factor

TIH: thrombopénie induite à l'héparine

TIMP: inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases

TM: thrombomoduline

TNFα: tumor necrosis factor α TP: taux de prothrombine t-PA: tissue plasminogen activator TSP-1: thrombospondine-1 ttPeak: time to Peak TVP: thrombose veineuse profonde TX-A2: thromboxane A2 UNL: Upper Normal Limit u-PA: récepteur de l'u-PA VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1 VGEF: vascular endotheliale growth factor vs: versus ZPI: inhibiteur dépendant de la protéine Z

Liste des illustrations

Figure 1-1 : Taux absolus de thromboses veineuses	22
Figure 1-2: Risque de cancer en fonction du moment du diagnostic chez les patients présentantd'une TVP primaire ou d'une PE	24
Figure 1-3: Risque relatif de cancers associes à la MTVE	25
Figure 1-4 : Association cancer et MTEV	26
Figure 1-5: Les facteurs influençant les facteurs de risque de MTE	27
Figure 1-6 : Incidence de la MTEV en fonction du stage du cancer	28
Figure 1-7 : Risque de thromboses chez les patients cancéreux en fonction du type de tume	eur 29
Figure 1-8 : Proportion cumulative de thrombose veineuse chez les patients atteints d'un carcinome épidermoïde vs adénocarcinome	31
Figure 1-9: Probabilités de mort après hospitalisation	31
Figure 1-10: Impact de l'association Tamoxifen et chimiothérapie sur la survenu de thrombose	34
Figure 1-11 : Risque de MTEV en fonction de l'évolution du cancer	36
Figure 1-12 : Risque de MTEV en fonction du temps	37
Figure 1-13 : Evaluation du risque de récidive de MTEV	38
Figure 1-14 : Comparaison du % de récurrences et de saignements majeurs entre patients cancéreux et non cancéreux sous traitements	39
Figure 1-15 : Incidence des MTEV après chirurgie chez les patients cancéreux	39
Figure 1-16 : Estimation du pourcentage de survie du patient cancereux en fonction du moment du diagnostic du cancer	40
Figure II- 1: Structure du facteur tissulaire	53
Figure II- 2: Schémaen cascade de la coagulation	58
Figure II- 3 : Le schéma moderne de la coagulation	59
Figure II- 4 : Rôle principal du FT dans leschéma moderne de la coagulation	59
Figure II- 5 : Initiation de la coagulation en fonction du taux de facteur tissulaire	61
Figure II- 6: La fibrinoformation	64
Figure II- 7 : Modèle cellulaire de la coagulation sanguine	65
Figure II- 8 : Voies Intrinsèque et extrinsèque dans le modèle cellulaire de la coagulation .	67
Figure II- 9 : Cibles des principaux inhibiteurs de la coagulation	70
Figure III- 1 : la triade de Virchow chez les patients cancéreux	76
Figure III- 2 : Interactions tumeur-inflammation-thrombose	77

Figure III- 3 : Mécanismes de l'hypercoagulabilité dans le cancer82	2
Figure III- 4 : FT et angiogenèse	1
Figure III- 5 : Action du FT indépendante de la thrombine sur l'angiogenèse85	5
Figure III- 6 : Action du FT indépendante de la coagulation sur l'angiogenèse	5
Figure III- 7 : Action du FT dépendante de la coagulation sur l'angiogenèse	7
Figure III- 8: Représentation schématique du gène F3, des ARNm et des isoformes FT et asTF	3
Figure III- 9 : Représentation du panel de molécules transportées par les microparticules et leurs effets associés	ł
Figure III- 10 : Régulation de l'adhésion cellulaire dépendante de l'U-PAR par le PAI-1et l'u-PA	5
Figure III- 11 : Les différentes actions du PAI-197	7
Figure III- 12 : Les différentes étapes du processus de tumorigenèse)
Figure III- 13 :Les différents mécanismes par lesquelles les plaquettes peuvent favoriser la croissance tumorale et le développement des métastases	ł
Figure III- 14 :Effets prothrombotiques des agents chimiothérapeutiques109)
Figure III- 15 : Rôle de la cellule tumorale dans la pathologie thrombotique du cancer110)
Figure IV- 1 : Cibles des anticoagulants sur la coagulation119)
Figure IV- 2 : Chronologie des anticoagulants)
Figure IV- 3 : Héparines, mode d'action	3
Figure V-1 : Principe du modèle experimental172	2
Figure V- 2: Phase d'initiation de la génération de thrombine143	3
Figure V- 3: Phase d'amplification de la génération de thrombine143	3
Figure V- 4: Phase de terminaison de la génération de thrombine144	1
Figure V- 5: Paramètres du thrombogramme	5
Figure V- 6: Principe du test de coagulation STA ProcoagPPL®146	5
Figure V-7: Représentation schématique d'un cytomètre de flux)
Figure VI-1 : Variation de la génération de thrombine en fonction du nombre de cellules .163	3
Figure VI- 2 Effet du milieu RPMI sur la génération de thrombine164	1

Article 1 – Version française

Fig. 1 Inhibition de la génération de thrombine par l'apixaban (125 ng / ml), le fondaparinux (0,4 ug / ml) et l'énoxaparine (0,4 UI anti-Xa / ml) en PPP (cadres A, B, C) et en PRP (cadres

D, E, F) en présence de cellules BXPC3 (cadres B et E) et des cellules MCF7 (cadres C et F).

Fig. 2 Altération de l'IC50 de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le MRI de la génération de thrombine en PPP ou en PRP en présence de cellules BXPC3 ou MCF7...191

Article 2 – Version française

Figure 1 : Représentation des thrombinogrammes illustrant l'effet de cellules BXPC3, des cellules MCF7 et des cellules HUVEC (50 cellules /µl) sur la génération de thrombine d'un PPP normale (cadre A) ou d'un PRP (Cadre B) par rapport à l'essai témoin (sans cellules).249

Approche du rôle du microenvironnement sur le pouvoir procoagulant des cellules cancereuses

Figure 1 : Profils du marquage des cellules BXPC3 et MCF7 en cytometrie de flux258

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Effet des cancers sur le risque de maladie veineuse thromboembolique2	1
Tableau 1-2 : Incidence du cancer lors du suivi de patients avec thrombose idiopathique ou secondaire	3
Tableau 1-3 : Comparaison de l'incidence des MVTE en fonction du stage du cancer2	8
Tableau 1-4: La MTEV associés à des types spécifiques de cancer	0
Tableau 1-5 : Impact de la chimiothérapie sur la survenu de thrombose dans le cancer du seir	ı 3
Tableau 1-6 : Impact des chimiothérapies sur le risque de thrombose	3
Tableau 1-7 : Estimation du risque de thrombose en présence decathéters veineux centraux 3	5

Tableau II-1: Princi	pales caractéristiques	s des facteurs de coagulat	tion52

Tableau III- 1: Stase veineuse et cancer	79
Tableau III- 2: Lésion endothéliale et cancer	80
Tableau III- 3 : Hypercoagulabilité et cancer	81
Tableau III- 4:Les multiples rôles des microparticules	94
Tableau III- 5: Implications de la fibrinolyse dans le cancer	95
Tableau III- 6: Mécanismes d'action des plaquettes dans la croissance tumorale	99
Tableau III- 7 : Mécanismes des thromboses sous traitements cancéreux	107
Tableau III- 8 : Effets des agents de la chimiothérapie sur l'hémostase	108

Tableau IV-1: Principales caractéristiques des OAD	
Tableau IV- 2: Caractéristiques de l'enoxaparine, apixaban, fondaparinux	

Article 1 – Version française

Tableau 1 : Effets de l'apixaban (125 ng / ml); du fondaparinux (0,4 ug / ml) et de	
l'énoxaparine (0,4 UI anti-Xa / ml) sur la génération de thrombine déclenchées en PPP	' en
présence de FT et de phospholipides (PPP / TF) ou de cellules BXPC3 (PPP / BXPC 3	3)
ou de cellules MCF7 (PPP / MCF7).	189
Tableau 2 : Comparaison du potentiel inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux	et
de l'enoxaparine sur les paramétres du thrombogramme en PPP	189

Tableau 4 : Comparaison du potentiel inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'enoxaparine sur les paramétres du thrombogramme en PRP......190

Article 2 – Version française

Tableau 1 : Variabilité de l'effet procoagulant des cellules cancéreuses sur la generation dethrombine generation en plasma humain normal
Tableau 2 : Taux de FTa et d'asTF dans la surnageant de culture de cellules BXPC3, MCF7et HUVEC en plasma normal.253
Tableau 3 : Impact d'anticorps anti-FT(4509) etanti-Human CD142 sur la génération de thrombine on thrombin déclanchée en PPP normal (contrôle) et par les cellules de BXPC3, MCF7, ou d'HUVEC, en présence de MP-Reagent®254
Tableau 4 : Comparison de l'expression du cancer pro-coagulant (CP) par les cellules MCF7 et BXPC3.
Tableau 5 : Parameters de la generation de thrombine déclanchée par le MP reagent enpresence de cellules BXCP3 ou MCF7 en PPP normal et en plasmas selectivements deficientsen facteur de la coagulation
Tableau 6 : Génération de thrombine en présence de cellules de BXCP3, MCF7 etHUVECcells declanchée dans differentes conditions.256

Approche du rôle du microenvironnement sur le pouvoir procoagulant des cellules cancereuses

Tableau 1 : Impact de la présence des MPs sur la génération de thrombine en présence de cellules en PPP	50
Fableau 2 : Impact de la présence des MPs sur la génération de thrombine d'un PPP sans cellule	50
Fableau 3 : Génération de thrombine déclanchée par le MP reagent en presence de MPs deBXCP3, ou MCF7 ou HUVEC en PPP normal et en plasmas selectivements deficients enFacteur de la coagulation	52
Tableau 4 : Effet d'un anticorps anti-TF sur la génération de thrombine en presence de MPs de BXPC3, MCF7 et HUVEC 26	52

Introduction

Le plus ancien texte connu faisant allusion au cancer semble être le papyrus dit d'Edwin Smith, qui daterait de l'ancien empire égyptien, vers 1600 av J.-C, et où il est décrit pour la première fois des cas de pathologies pouvant s'apparenter à des cancers du sein (1). Le terme de cancer est apparu en Grèce, vers 400 av J.-C, parmi les prêtres-médecins d'Esculape ($A\sigma\kappa\lambda\eta\pi\epsilon\iota\delta\varsigma$), les Asclépiades, bien avant Hippocrate. Ces derniers ont identifié le cancer sous la forme d'un groupe de maladies caractérisées par une tuméfaction, ulcérée ou non, n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée, et l'ont décrit sous le terme de « carcinos », qui signifie « crabe » en grec ancien ou « pince », en raison de l'aspect qu'il prend à un stade évolué, les veines qui entourent de la tumeur étant alors comparables aux pinces d'un crabe (2). Plusieurs synonymes du mot cancer ont été utilisés dans le langage médical et populaire, notamment l'injonction: Noli me tangere, en français Ne me touche pas, qui fût autrefois l'un des synonymes du mot cancer, employé lorsque les médecins souhaitaient ne pas prononcer le terme médical devant un patient. Le cancer était alors désigné par le précepte même qui enjoignait de ne pas le toucher, sous peine de le rendre plus agressif.

Historiquement, en 1823, le médecin français Jean-Baptiste Bouillaud a publié ce qui semble être le premier rapport d'une association entre le cancer et la thrombose (3). En 1865, un autre médecin français Armand Trousseau en disant « Lorsque vous êtes indécis sur la nature d'une maladie de l'estomac, que vous hésitez entre une gastrite chronique, un ulcère simple et un carcinome, une *phlegmatia alba dolens*, survenant à la jambe ou au bras, fera cesser votre indécision et il vous sera permis de vous prononcer définitivement sur l'existence du cancer » dessinait les premiers contours d'une association forte entre la maladie veineuse thromboembolique (MTEV) et le cancer (4). Cette relation a été validée bien plus tard par de nombreuses études cliniques (5). La relation thrombose et cancer est en fait réciproque : le cancer prédispose à la survenue d'une thrombose et le développement du processus tumoral est lié à cet état d'hypercoagulabilité.

Il est bien admis actuellement, que le cancer et ses traitements sont des facteurs de risque de MTEV bien reconnus. Le risque absolu dépend du type histologique de la tumeur, du stade et de la localisation du cancer et du traitement par agents antinéoplasiques (6). Les manifestations des MTEV associées au cancer comprennent la thrombose veineuse profonde (TVP) et l'embolie pulmonaire (EP), ainsi que la thrombose veineuse viscérale ou splanchnique.

Plusieurs facteurs de risque de développer une thrombose veineuse coexistent généralement chez les patients atteints de cancer, comprenant la chirurgie, l'hospitalisation et l'immobilisation; la présence à demeure d'un cathéter central, la chimiothérapie; et les nouvelles thérapies ciblées (7-8). En plus des facteurs cliniques mentionnés ci-dessus, la présence de cellules tumorales induit un état d'hypercoagulabilité (9-10). Il y a donc non pas une, mais plusieurs MTEV au cours du cancer dont l'étiopathogénie peut être diverse (thrombose inaugurale, postopératoire, sur voie veineuse centrale, post chimio, etc).

Actuellement le traitement de la MTEV chez les patients atteints de cancer vise à réduire la mortalité et la morbidité, et à améliorer la qualité de vie. Jusqu'au milieu des années 2000, le traitement standard pour la MTEV était composé d'un traitement initial par les héparines de bas poids moléculaire ou par l'héparine non fractionnée (HNF) suivie d'un traitement à long terme avec un anticoagulant oral, à savoir les anti-vitamines K (AVK). Cependant ces patients présentaient un taux élevé de récidives MTEV au cours du traitement par AVK et un risque hémorragique élevé par rapport à des patients non-cancereux (11-12). Actuellement, les recommandations de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO), de la Société européenne d'oncologie médicale (ESMO), de l'American College of Chest Physicians (ACCP) et du National Comprehensive Cancer Network (NCCN) préconisent l'utilisation des HBPM, des HNF et du fondaparinux dans le traitement initial des thromboses associés au cancer (13-14).

Selon les recommandations internationales actuelles, l'HBPM est le traitement anticoagulant standard pendant les trois premiers mois après le diagnostic de la MTEV. L'HBPM est également systématiquement recommandée durant 6-12 mois ou indéfiniment, pour les patients atteints de maladie néoplasique active, pour les patients recevant une chimiothérapie, et si la thrombose est récurrente, ou si le patient avait une thrombophilie héréditaire. L'HBPM a largement remplacé l'HNF et les AVK car elle ne nécessite pas d'hospitalisation et de suivi biologique et adaptation régulière de la dose. En plus le traitement par HBPM est associé à un risque d'hémorragie majeure significativement inférieur par rapport au traitement par AVK. En outre, les HBPM sont associée à un moindre risque de thrombopénie induite par l'héparine (TIH) que l'HNF. De plus, une réduction statistiquement significative du risque de mortalité sous HBPM a été notée. La raison de cet avantage sur la survie reste cependant inconnue, le bénéfice de survie pouvant être du a la résolution du thrombus, mais aussi à un effet antinéoplasique (15-17). Actuellement, trois HBPM ont été téstés par des études de phase III et sont récommendées pour le traitement de la MTEV associée au cancer:

l'énoxaparine (Lovenox®), la daltéparine (Fragmine®) et la tinzparine (Innohep®).

Récemment, le développement de nouveaux anticoagulants oraux, ou anticoagulants d'action direct (AOD) qui inhibent de maniére sélectif et direct le facteur Xa (rivaroxaban, apixaban...) ou de la thrombine (dabigatran etexilate) ouvre une nouvelle voie dans le traitement de la MTEV. En effet, contrairement aux HBPM et aux AVK qui inhibent plusieurs facteurs de coagulation, les AOD ciblent des facteurs spécifiques du mécanisme de la coagulation. Les AOD sont attrayants pour les patients et les cliniciens parce qu'ils ne nécessitent pas de surveillance biologique, ils peuvent être pris par voie orale à des doses fixes une ou deux fois par jour, et présentent peu d'interactions médicamenteuses. Ils n'ont pas d'ailleurs des interactions alimentaires.

Les AOD et la MTEV associée au cancer

A ce jour, des études ont montré l'efficacité de l'apixaban dans la prévention de la MTEV chez les patients atteints de cancers métastatiques et chez les patients atteints de cancer à haut risque recevant une chimiothérapie (18-21). Cependant, aucun essai clinique publié n'a spécifiquement étudié l'éfficacité et la tolérence d'un AOD dans le traitement de la MTEV associée au cancer. Par concéquence, les AOD ne sont pas recommendés chez les patients oncologiques. Une anticoagulation efficace et stable pour la prévention et le traitement de la MTEV chez les patients atteints de cancer est la pierre angulaire dans la gestion des patients atteints de cancer, visant à réduire la morbidité, à améliorer la qualité de vie, et à contribuer à la diminution de la mortalité. La complexité des mécanismes d'actions et l'hétérogénéité des structures des anticoagulants comme les HBPM et les AVK, laissent penser que les AOD devraient améliorer la qualité du traitement anti-thrombotique, pour les patients atteints de cancer présentant des MTEV.

Etat d'hypercoagulabilité et cancer

L'identification des biomarqueurs d'hypercoagulabilité qui sont en relation avec la cellule tumorale est un véritable challenge compte tenu de la complexité des interactions cellulaires et plasmatiques qui conduisent à l'état prothrombotique chez le patient cancéreux. Ces interactions complexes et dynamiques pourraient influencer l'efficience des agents antithrombotiques, héparines de bas poids moléculaire (HBPM) et inhibiteurs spécifiques du facteur X activé (FXa), dans la modulation de l'hypercoagulabilité liée au cancer.

Dans le but de l'approfondissement de la compréhension des mécanismes prothrombotiques

liée aux cellules cancéreuses d'une part et dans l'amélioration de l'efficacité du traitement de la maladie thromboembolique chez les patients atteints d'un cancer, le but de ce travail a porté sur deux axes :

- la modélisation des capacités procoagulantes des cellules cancéreuses par l'élaboration d'un système expérimental qui permet l'étude des capacités procoagulantes des cellules cancéreuses et de leurs effets sur la génération de thrombine.

- l'évaluation dans ce modèle expérimental de l'efficacité biologique des traitements antithrombotiques de différents agents antithrombotiques antithrombine-dépendent ou d'action directe.

Compte tenu de l'impact de la génération de thrombine au niveau du risque thrombotique et au niveau de la modulation de la prolifération des cellules cancéreuses la connaissance du mécanisme de l'activation de la coagulation par les cellules cancéreuses pourrait nous mener - au développement d'une méthodologie intégrale pour la détermination de l'empreinte procoagulante des cellules cancéreuses permettant l'évaluation du risque thrombotique via des biomarqueurs d'hypercoagulabilité couplés aux caractéristiques des cellules.

- à l'amélioration du traitement antithrombotique, concernant le choix de l'agent antithrombotique et l'intensité de l'hypocoagulation la mieux adaptée.

Références - Introduction

1) Baize N, Mounier N, Bongain A et al. Féminité et cancer du sein, approche particulière de l'annonce en cancérologie. Bull Cancer 2008; 95 (9): 849- 57.

 Serin D, Escoute M. Cancer du sein de la femme de plus de 70 ans. 19es Journées Nationales de la Société Française de Sénologie et de Pathologie Mammaire. Paris: Arnette; 1997.

3) Bouillard JB, Bouillaud S. De l'Obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: consideration sur la hydropisies passive et general. Arch Gen Med. 1823; 1: 188- 204.

4) Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. Clin Med Hotel-dieu Paris. 1865; 3: 654-712.

5) Zwicker JI, Furie BC, Furie B. Cancer-associated thrombosis. Crit Rev Oncol Hematol 2007; 62: 126- 36.

6) Brose KM, Lee AY. Cancer-associated thrombosis: prevention and treatment. Curr Oncol. 2008; 15 (suppl 1): S58- 67.

7) Lee AY. Epidemiology and management of venous thromboembolism in patients with cancer. Thromb Res. 2003; 110 (4): 167-72.

Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. Lancet Oncol. 2005; 6 (6): 401- 10.

9) Rickles FR. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. Pathophysiol Haemost Thromb. 2006; 35 (1-2): 103- 10.

10) Lee AY. Cancer and thromboembolic disease: pathogenic mechanisms. Cancer Treat Rev 2002; 28:137-40.

11) Lee AY, Levine MN, Baker RI, et al. Randomized Comparison of Low-Molecular-Weight Heparin versus Oral Anticoagulant Therapy for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism in Patients with Cancer (CLOT) Investigators. Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer. N Engl J Med. 2003; 349 (2): 146- 53.

12) Mandalà M, Falanga A, Roila F. ESMO Guidelines Working Group Management of venous thromboembolism (VTE) in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol. 2011; 22 (suppl 6): vi85- 92.

13) Lee AY, Peterson EA. Treatment of cancer-associated thrombosis. Blood. 2013; 122 (14): 2310-7.

14) Akl EA, Vasireddi SR, Gunukula S, et al. Anticoagulation for the initial treatment of venous thromboembolism in patients with cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2011; 6: CD006649.

15) Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. Blood. 2005; 106 (8): 2710- 5.

16) Robert F. The potential benefits of low-molecular-weight heparins in cancer patients. J Hematol Oncol. 2010; 3: 3.

17) Walenga JM, Lyman GH. Evolution of heparin anticoagulants to ultra-low-molecularweight heparins: a review of pharmacologic and clinical differences and applications in patients with cancer. Crit Rev Oncol Hematol. 2013; 88 (1): 1- 18.

18) Lyman GH, Khorana AA, Kuderer NM, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2013; 31 (17): 2189- 204.

19) Tun NM, Oo TH. Prevention and treatment of venous thromboembolism with new oral anticoagulants: a practical update for clinicians. Thrombosis. 203; 183616.

20) Barbosa M. What is the best treatment for a cancer patient with thrombosis? Clin Med Insights Oncol. 2014; 8: 49- 55.

21) Levine MN, Gu C, Liebman HA, et al. A randomized phase II trial of apixaban for the prevention of thromboembolism in patients with metastatic cancer. J Thromb Haemost. 2012;10 (5): 807-14.

Partie Bibliographique

<u>Chapitre I:</u> La relation cancer et maladie thromboembolique; aspects épidémiologiques

I.1 Rôle du cancer dans la survenu de la MTEV

La relation entre cancer et MTEV est reconnue depuis près de deux siècles. Cette association a une incidence, un risque de récidive et de complications hémorragiques majeures élevés. La MTEV représente à la fois un facteur pronostique défavorable et la seconde cause de mortalité au cours du cancer (Tableau 1-1).

Tableau 1-1 : Effet des cancers sur le risque de maladie veineuse thromboembolique

	With ca	ncer	Without ca	ncer
Kakkar 1970	24/59	41 %	38/144	26 %
Hills 1972	8/16	50 %	7/34	21 %
Walsh 1974	16/45	35 %	22/217	10 %
Rosemberg 1975	28/66	42 %	29/128	23 %
Sue-Ling 1986	12/23	52 %	16/62	26 %
Allan 1983	31/100	31 %	21/100	21 %
Multicenter Trial 1984	9/37	22 %	13/53	24 %
	128 / 346	37 %	146 / 738	20 %
	[32	- 42 %]	[17 - 23 %]
	($\mathbf{DR} = 2.4$	[1.8 - 3.2]	

(d'après Prandini et al. 1999)

En effet, il est observé que les cancers du poumon, de l'ovaire, du rein, du cerveau, et les cancers digestifs sont à haut risque de MTEV. A l'inverse, les cancers ORL, de la vessie, du sein, de l'œsophage, et de l'utérus sont relativement peu thrombogènes. De plus en ce qui concerne les types anatomopathologiques, les adénocarcinomes sont deux fois plus thrombogènes que les tumeurs épidermoïdes [1-3].

Au fil des ans, l'incidence de la thrombose veineuse chez les patients atteints de cancer a augmenté. Parmi les patients hospitalisés pour un cancer entre 1979 et 1999, l'incidence cumulative de la thrombose veineuse a été rapportée par Stein et al. [2], cette incidence de la thrombose veineuse a augmenté depuis la fin des années 1980, avec une augmentation de 1,5% en 1989, et de 3,5% en 1999. Une tendance similaire a été observée dans une autre

étude réalisée par Khorana et al. [4] ou le taux de MTEV chez les patients hospitalisés avec un cancer a augmenté de 28 % entre 1995 et 2003, le taux de MTEV seule est passé de 3,9 à 5,7 % par hospitalisation et enfin, le taux d' EP a aussi doublé passant de 0,8 à 1,5 %. Dans une étude plus récente, Walker et al. [5] ont observé une augmentation similaire de l'incidence de la thrombose veineuse au fil du temps chez les patients cancéreux, mais à l'inverse des études précédentes pas chez les patients non cancéreux (Figure 1-1). Les raisons de cette augmentation pouvant être les stratégies de traitement améliorées, les patients atteints de cancer survivent actuellement plus, conduisant à des patients plus âgés subissant plusieurs traitements contre le cancer, ce qui augmente également le risque de thrombose, ce qui laisse à prévoire que l'incidence augmentera à l'avenir.



Figure 1-1 : Taux absolus de thromboses veineuses (pour 1000 personnes-années) pour les entre 1997 et 2006. Les cas sont des patients atteints de cancer et les contrôles sont des patients non cancéreux appariés selon l'âge (d'aprèsWalker et al 2013)

Différentes études de cohortes de patients ont été menées afin de répondre en partie aux questions : quel est le taux de cancer chez les patients avec MTEV, quels types de cancers rencontre-t-on le plus souvent associés aux MTEV et surtout est-il nécessaire de dépister ces cancers en cas de MTEV ?

Dans une petite étude, Prandoni [6] a suivi pendant 2 ans 250 patients atteints de TVP, et constaté 11 cas de cancers parmi les 145 TVP idiopathiques et 2 cas pour les 105 TVP secondaires, avec ainsi un risque relatif (RR) de 2,3 (Tableau 2). Le RR était plus élevé (4,3) pour les TVP récidivantes, chez les sujets de moins de 60 ans, et dans la 1ère année de suivi (9 cas sur 11).

Tableau 1-2: Incidence du cancer lors du suivi de patients avec thrombose idiopathique ou secondaire

VARIABLE	MONTHS OF FOLLOW-UP				
	0-6	7-12	13-18	19-24	TOTAL
Secondary thrombosis (n = 105)					
Incidence of cancer (no./no. at risk)	0/105	1/93	1/82	0/72	2/105
Death from nonmalignant causes (no.)	3	1	1	0	5
Lost to follow-up (no.)	0	1	1	0	2
Idiopathic thrombosis $(n = 145)^*$					
Incidence of cancer (no./no. at risk)	6/145	3/121	2/108	0/97	11/145
Death from nonmalignant causes (no.)	7	5	0	1	13
Lost to follow-up (no.)	0	1	0	0	1

follow-up (P = 0.048) and the total period (P = 0.043).

(d'après Prandoni et al. 1992)

- Deux grandes études de cohorte scandinaves publiées ont également apportées des réponses: Baron et al. [7] utilisant les registres suédois des hospitalisés et des cancers ont évalué l'incidence des cancers chez 61 998 patients hospitalisés pour MTEV entre 1965 et 1983. Ils ont comparé le taux de cancers dans la cohorte et dans la population générale et calculé le RR de cancers. Lors de la 1ère année, le RR était de 4,4 pour l'ensemble de la cohorte, de 6,7 pour les moins de 65 ans, et de 8,2 pour les TVP récidivantes. Le RR était au-dessus de 6 pour les cancers de l'ovaire, du pancréas, du foie, du cerveau, les lymphomes, par ordre décroissant. En ce qui concerne le cancer du sein, il n'était que de 1,8. Après la 1ère année, sur 25 ans de suivi, le RR est resté légèrement élevé, entre 1,1 et 1,5.
- Sorensen et al. [8], utilisant les registres danois des hospitalisés et des cancers, ont évalué l'incidence des cancers chez 26 653 patients hospitalisés pour MTEV entre

1977 et 1992. N'ont été retenues dans cette étude que les TVP et les EP idiopathiques (en éliminant les patients ayant eu une intervention dans les 6 mois précédents, un cancer, une maladie associée, ou une grossesse). Sur toute la durée totale, le RR de cancer était de 1,3 pour tous les types de cancers (1737 observés contre 1372 attendus). Dans la 1ère année, le RR était de 2,3 et de 3 dans les 6 premiers mois de suivi. Le RR était plus élevé pour les cancers du pancréas, de l'ovaire, du foie et du cerveau; il était plus faible pour le sein, la vessie, le rectum (Figure 1-2). Au-delà de la 1ère année, le RR restait légèrement supérieur à 1, sans prédominance pour un cancer particulier. Parmi 465 cancers diagnostiqués la 1ère année, 40% étaient métastatiques, 25% avaient une extension régionale et 36% étaient localisés. Le RR pour la 1èr année était plus élevé avant 60 ans (3,6 vs 2,2) et en cas de MTE récidivante (3,2 vs 2,2).



Figure 1-2: Risque de survenue d'un cancer en fonction du moment du diagnostic chez les patients présentant une TVP primaire ou un PE

(d'après Sorensen et al. 1998)

Tous ces résultats sont confirmés par plusieurs études récentes telles l'étude MEGA (Multiple Environmental and Genetic Assessment) portant sur plus de 3200 malades ayant présenté un premier épisode de TVP, EP ou les deux, indiquant clairement que les malades porteurs de cancer ont un risque accru de MTEV, en particulier pendant les premiers mois après le diagnostic et en cas de métastases [1]. En effet, dans cette étude, le risque global de MTEV était multiplié par 7 en cas de cancer, avec un RR chez les malades porteurs d'hémopathies malignes multiplié par 28, par 22 dans les cancers du poumon, par 20 dans les cancers digestifs, risque augmenté de 19.8 fois au stade métastatique (Figure 1-3). Ce risque de MTEV diminue avec le temps (54 fois supérieur entre 0 et 3 mois suivant le diagnostic, 14 fois entre 3 et 12 mois, et 3,6 fois entre 1 et 3 ans après le diagnostic).



Figure 1-3: Risque relatif de cancers associes à la MTVE (D'aprés Blom et al. 2005)

Ces études comme la nouvelle analyse de Blom [9] sur 66 329 patients ou l'étude de Nordstrom [10] sur 1183 patients hospitalisés, sont largement concordantes et confirment l'association MTEV et cancer, avec un risque accru dans la première année, surtout dans les 6 premiers mois suivant l'épisode de MTEV. Le risque de développer une MTEV est multiplié par 4 chez le sujet atteint de cancer et par 7 en cas de chimiothérapie [11].

On peut estimer que 4 à 20 % des patients atteints de cancer développent une MTEV [12]. Des études autopsiques ont révélé jusqu'à 50% de MTEV chez les patients atteints de cancer, parmi les MTEV idiopathiques, 20% des patients ont un cancer (Figure 1-4).



Figure 1-4 : Association cancer et MTEV

La MTEV représente la 2^{ème} cause de mortalité du patient cancéreux. Plusieurs études ont montré que l'incidence de la MTEV est associée à la durée de la maladie sous-jacente [3]. Les taux les plus élevé de MTEV sont vu dans la période initiale après le diagnostic, et la mortalité due à la MTVE est la plus élevée un an après le diagnostic [13-14].

Il faut également noter que tous les patients cancéreux ne partagent pas le même risque thromboembolique. En effet, en plus des facteurs de risque traditionnels de la MTEV (chirurgie, grossesse, immobilité prolongée, trauma, obésité, etc.), les patients cancéreux ont plusieurs facteurs de risque spécifiques comme le stade du cancer, le type histologique, l'ancienneté de la pathologie, les traitements (incluant la chimiothérapie, la thérapie hormonale....), et la présence de cathéters veineux centraux. Le cancer en plus d'être un facteur de risque de survenue d'une MTEV est un facteur de risque de MTEV.

I.1.1 Les Facteurs de risque de MTEV spécifiques au cancer

Plusieurs facteurs peuvent avoir en rôle sur l'association cancer-thrombose :



Figure 1-5: Les facteurs influençant les facteurs de risque de MTEV

I.1.1.1 Le stade du cancer

En ce qui concerne le stade du cancer, plusieurs études ont montré un risque plus élevé de MTEV chez les patients présentant un stade de cancer avancé. Blom et al. ont ainsi montré que l'incidence de la MTEV était 6 fois plus élevée chez les patients avec cancer du poumon métastasé [15].

De même dans l'analyse de l'étude californienne Chew et al. [3], le risque de thrombose dans l'année suivant le diagnostic de cancer était très fortement lié au stade du cancer. En comparaison avec la forme localisée, le risque de MTEV était 20 fois supérieur pour les patients avec mélanome métastatiques, 9 fois plus élevé pour les cancers métastatiques de la vessie, et 5 fois plus fort dans le cas du cancer du pancréas. Tous cancers confondus, le risque

de thrombose était multiplié d'un facteur 1,4 à 21,5 chez les patients ayant un cancer métastatique par rapport à ceux dont la maladie était localisée [16-17].

Des résultats identiques ont été retrouvés par les équipes de Wun et al [18] et de Falanga et al. [19] (Tableau 3, Figure 1-6).

Tableau 1-3 : Comparaison d	e l'incidence des MVTE er	fonction du stage du cancer
-----------------------------	---------------------------	-----------------------------

Cancer	Incidence rate of VTE in year after cancer diagnosis				
	Local stage	Regional stage	Remote stage		
Pancreas	4.3	5.3	19.7		
Stomach	2.7	3.9	12.9		
Kidney	1.2	3.9	8		
Bladder	0.7	2.7	7.6		
Uterus	0.9	1.6	6.2		
Lung	1.1	2.3	5.2		
Colon/rectum	0.9	2.3	4.6		
Melanoma	0.2	1	4.6		
Ovary	0.6	2.1	3.8		
Lymphoma	2	3.5	2.9		
Breast	0.6	1	2.8		

(d'après Wun et al. 2009)



Figure 1-6 : Incidence de la MTEV en fonction du stage du cancer

(d'après Falanga 2012)
I.1.1.2 Le type du cancer

Plusieurs études ont montré que le type (la localisation) du cancer joue un rôle sur le risque thrombotique associé. Le taux de MTEV est considérablement plus élevé dans les adénocarcinomes mucosecrétant du tube digestif, les cancers du pancréas, du poumon (en particulier les adénocarcinomes), du côlon, de la prostate, de l'ovaire, les leucémies aiguës promyélocytaires et les syndromes myéloprolifératifs [18-21] (Figure 1-7).



Figure 1-7 : Risque de thromboses chez les patients cancéreux en fonction du type de tumeur (d'après Levitan et al. 1999)

L'étude « MEGA Study » a montré que les tumeurs hématologiques présentaient un risque plus élevé notamment les lymphomes et myélomes [1]. Les myélomes et les lymphomes sont aussi grands pourvoyeurs de thromboses et ce d'autant qu'un traitement antiangiogénique est utilisé pour le myélome et que le syndrome tumoral est majeur pour les lymphomes (Tableau 1.4)

Tableau 1-4 : La MTEV associés à des types spécifiques de cancer

				1004
Cancer	California : Cumulative incidence of VTE (%) 1 year (n)	California : Rate of VTE (/100 patient-years)	Netherlands : cumulative incidence 6 months (n)	USA : hospitalized Medicare patients, prevalence 6 months (n)
Pancreas	5.3% (6524)	14.0%	2.3% (1674)	1.2% (41 551)
Brain	6.9% (3775)	11.1 %	3.2% (1058)	1.2% (13 529)
Acute myelogenous leukaemia	3.7% (2292)	7.4 %	1.9% (532)	-
Stomach	4.5% (5766)	7.4%	1.5% (2337)	0.9% (32 655)
Ocsophagus	3.6% (2491)	5.8%	1.3% (1040)	0.4% (14742)
Renal cell	3.5% (4891)	4.3%	1.3% (1503)	0.8% (34375)
Lung	2.4% (44 497)	4.3%	1.4% (9336)	0.6% (232 764)
Ovary	3.3% (5707)	4.2%	3.3% (1444)	1.2% (26 406)
Liver	1.7% (2312)	4.1%	0.7% (970)	0.7% (22 938)
Lymphoma	2.8% (9003)	3.7%	2.0% (2470)	1.0% (52.042)
Bladder	1.5% (7138)	1.7%	1.3% (2250)	0.2% (168 832)
Uterus	1,6% (8721)	1.7%	1.1% (1431)	0.4% (11 606)
Prostate	0.9% (51362)	1.0%	0.9% (6013)	0.5% (218 743)
Breast	0.9% (44 707)	0.9%	0.8% (10566)	0.2% (186 273)
Melanoma	0.5% (9 497)	0.5%	0.3% (2236)	-

(d'après Wun 2009)

I.1.1.3 L'histologie du cancer

L'histologie joue également un rôle comme montré dans l'étude hollandaise [15] qui parmi 258 patients atteints d'un carcinome épidermoïde confirmé, a trouvé 10 thromboses veineuses.

Le groupe de 133 patients souffrant d'un adénocarcinome a confirmé 14 thromboses. L'incidence de la MTEV chez les patients atteints d'un carcinome à cellules squameuses était de 21,2 pour 1000 personnes-années et pour les patients atteints d'un adénocarcinome 66,7 pour 1000 personnes-années. L'incidence de la thrombose après un diagnostic de cancer, parmi les cancers pulmonaires non à petites cellules, présentait donc un risque thrombotique trois fois plus élevé quand l'histologie révélait un adénocarcinome que quand le diagnostic de cancer épidermoïde était porté (Figure 1-8). De même Lee et al. [22] dans une étude d'autopsie de 145 patients avec cancer, une embolie pulmonaire était retrouvée chez 23 % des patients atteints d'adénocarcinome, contre 9 % des patients avec une autre histologie.



Figure 1-8 : Proportion cumulative de thrombose veineuse chez les patients atteints d'un carcinome épidermoïde vs adénocarcinome

(d'après Blom 2004)

I.1.1.4 L'immobilisation ou hospitalisation

L'immobilisation joue également un rôle dans la survenue de la MTEV. Entre 1979 et 1999, l'incidence de la MTEV chez les malades hospitalisés a fortement augmenté. Cette augmentation est significativement plus importante chez les malades cancéreux que celle observée chez les malades hospitalisés sans cancer [2 ; 23-25] (Figure 1-9). Cette observation a clairement été confirmée dans les études de Shen et Pollack [19] qui montre que 14% des patients avec cancer admis pour hospitalisation meurent avec une confirmation d'embolie pulmonaire à l'autopsie contre 8% chez les patients sans cancer.





Figure 1-9: Probabilités de mort après hospitalisation

(d'aprés Khorana 2007)

I.1.1.5 Les traitements du cancer

Les traitements anticancéreux augmentent le risque de survenue de la MTEV [26]. En effet les différents traitements utilisés dans le cancer comme la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, le traitement hormonal et la greffe de moelle, amplifient l'état d'hypercoagulabilité qui existe chez les patients cancéreux et sont associés à un risque thromboembolique accru. L'expression clinique des thromboses associées à une chimiothérapie est très hétérogène avec des thromboses veineuses ou artérielles : maladie veino-occlusive post-greffe de moelle (bléomycine et mitomycine), syndrome de Budd-Chiari (dacarbazine, 6-thioguanine associée ou non au méthotrexate ou cytosine arabinoside), infarctus du myocarde (vincristine, cisplatine, étoposide, bléomycine, cisplatine), accident vasculaire cérébral (traitement à base de cisplatine, L-asparaginase), microangiopathie thrombotique (mitomycine, cisplatine) [27]. Heit et al. [11] ont ainsi montré que les patients recevant un traitement immunosuppresseur ou une chimiothérapie cytotoxique en comparaison à ceux n'en recevant pas ont un risque de développer une MTEV six fois supérieur à celui des sujets indemnes de cancer, alors que les patients cancéreux ne recevant pas de chimiothérapie ont un risque de MVTE multiplié par quatre. La mise en évidence du rôle des agents anticancéreux a surtout été démontrée par les études dans le cancer du sein. Lee et al. [28] estiment le risque de TVP entre 2% et 10 % pour un stade II et jusqu'à 17,6 % pour le stade IV [28]. De même, le risque de thrombose artérielle a bien été étudié dans le cancer du sein avec une incidence de 1 %. Depuis l'utilisation du tamoxifène dans le traitement du cancer du sein, il a été clairement établi que cet anti-œstrogène était un facteur de risque de thrombose indépendant de la présence de cancer ou de chimiothérapie (Tableau 1-5 et Tableau 1-6). L'association d'une polychimiothérapie adjuvante (cyclophosphamide, méthotrexate et fluoro-uracile) au tamoxifène semble augmenter le risque d'accident thromboembolique: 13,6 % vs 2,6 % pour le tamoxifène seul [29]. Concernant plus particulièrement la chimiothérapie, Blom et al. [15] ont montré que la chimiothérapie triple le risque de MTEV avec une augmentation régulière lors des chimiothérapies successives. En effet, dans leur étude, l'incidence globale de la MTEV dans une population ambulatoire recevant une nouvelle chimiothérapie était de 1,93 % sur une période de suivi de 2, 4 mois. De plus, le taux de MTEV observé dans cette étude était 20 fois supérieur à celui estimé pour toute la population des malades porteurs de cancer (0.8 % vs 0,04 % par mois) [15]. Le traitement anti-angiogénique a également un impact sur l'incidence de la MTEV. Utilisé seul,

le taux de MTEV chez les malade sous thalidomide pour myélome est inférieur à 2 %. Par contre, lorsqu'il est associé à la dexaméthasone à forte dose ou d'autres chimiothérapies, ce pourcentage peut varier de 12 à 26 % [30-34].

Tableau 1-5 : Impact de la chimiothérapie sur la survenu de thrombose dans le cancer du sein (d'aprèsRickles FR 1998, Prandoni P 1999, Levine MN 1997)

• Essais St	ade K M	énopause Thr	omboses /N	type T A/	v
 Weiss 1981 	п	pré/post	22/433	5,1%	v
 Goodnough 1984 	IV	pré/post	28/159	17,6%	A/V
 Levine 1988 	п	pré/post	14/205	6,8%	A/V
• Wall 1989	\mathbf{II},\mathbf{III}	pré/post	13/1014	1,3%	A
 Fisher 1990 	п	post	12/383	3,1%	v
 Saphner 1991 	I, II	pré/post	128/2352	5,4%	A/V
 Clahsen 1994 	I, II	pré/post	27/1292	2,1%	v
 Rifkin 1994 	п	post	15/603	2,5%	A/V
 Pritchard 1996 	п	post	34/353	9,6%	A/V
 Tempelhoff 1996 	п	pré/post	5/50	10,0%	v
 Fisher 1997 	1	pré/post	68/1557	4,4%	
•		366 / 8401	4,4 % [3	.9 - 4.8 %]	

Tableau 1-6 : Impact des chimiothérapies sur le risque de thrombose

VTE and Chemotherapy			
Chemotherapy	- independer	nt risk for VTE	
Pts on Chemot	herapy 🔶	VTE 11% /yr	
VTE during Chemo → Early Mortality RR 2X			
	Cancer pts	Cancer pts + Chemo	
VTE risk	4x	6.5x	

L'hormonothérapie par tamoxifène augmente également le risque de MTEV [35]: dans une étude portant sur 2600 malades ayant un cancer du sein, la fréquence des évènements thromboemboliques veineux et artériels était significativement plus importante chez les patientes sous hormonothérapie adjuvante par rapport aux autres trairements. Pritchard et al. [25] ont montré que les patientes recevant du tamoxifène et une chimiothérapie pour un cancer du sein présentaient cinq fois plus d'épisodes thromboemboliques veineux que les patientes recevant le tamoxifène seul.

Ra	ite of VTE i	n Breast Cancer	
Stage	% VTE	Treatment	
1.1	0.1	none	
	1	tamoxifen	
	4.5	tamoxifen + CTX	
	0 -1.6	tamoxifen	
	1.3 -10	СТХ	
	3.1-9.6	tamoxifen + CTX	
III/IV	15-17	стх	

Figure 1-10: Impact de l'association tamoxifène et chimiothérapie sur la survenu de thrombose (d'après Pritchard KI 1996)

L'érythropoiétine (EPO) est également associée à la MTEV. Une revue systématique des essais randomisés a montré que ces agents (époétine, darbépoétine) augmentaient de 67 % environ le risque de MTEV [36]. Ainsi Wun et al. [37] ont montré que parmi 147 patientes traitées pour un cancer du col par radio chimiothérapie, 17 des 75 patientes recevant un traitement par EPO ont présenté une thrombose veineuse, contre deux patientes dans le groupe non traité par EPO: le risque de développer une thrombose veineuse serait ainsi dix fois supérieur à celui des autres patientes ne recevant pas d'EPO. L'utilisation de l'EPO et des globules blancs a été démontrée comme un facteur facteurs de risque indépendamment et significativement dans l'association cancer et MTEV chez les patients sous chimiothérapie [38-39].

I.1.1.6 Les cathéters centraux

Les cathéters veineux centraux ont également une incidence sur la survenue de thrombose [10]. Bien que les cathéters veineux centraux aient grandement améliorés la prise en charge des patients atteints de cancer, leur utilisation est associée à l'apparition de thromboses veineuses profondes du bras, en particulier chez les patients subissant une chimiothérapie [40]. L'incidence des thromboses symptomatiques, chez ces patients, a été évaluée dans différentes études de 0,02 à 0,92 événements par 1 000 jours de cathéter. 16 à 36 % des patients ayant développé une thrombose du membre supérieur avaient une embolie pulmonaire associée. Il ne semble pas y avoir de relation entre le type de cathéter et l'incidence des accidents thromboemboliques mais, en revanche, les patients qui reçoivent des chimiothérapies lourdes et des facteurs de croissance seraient à plus haut risque de thrombose [41]. Berne et al. [42] dans leur étude ont montré que le taux de thromboses veineuses profondes, documentées par phlébographie, était de 37% alors que Monreal et son équipe trouvent quant à eux des taux supérieurs [43]. Khorana et al. dans une dernière publication montrent des taux de risque à la baisse (Tableau 1-7) [44].

Tableau 1-7 : Estimation du risque de thrombose en présence de cathéters veineux centraux

(d'après Khorana et al. 2009)

Risk Factors	
Risk Factor	O.R .
More than 1 attempt	5.5
Previous CVC insertion	3.8
Left side CVC	3.5
Tip Position SVC vs RA	2.7
Arm vs Chest ports	8.1

I.1.1.7 Le rôle du cancer lui même dans les MTEV

Le cancer en lui-même est un facteur de risque de survenue de MTEV. L'incidence des thromboses veineuses et embolies pulmonaires au cours des cancers varie de 0,5% à 20 % [1] et augmente sensiblement ces dernières années. De plus, un cancer est diagnostiqué chez 10 % des malades atteints de thrombose idiopathique dans les deux ans qui suivent le diagnostic de la MTEV [45]. Un cancer est diagnostiqué 1,3 fois plus fréquemment dans les suites d'un épisode de MTEV par comparaison à une population de mêmes caractéristiques [8]. Ce risque est particulièrement élevé dans les suites immédiates de la thrombose; il est multiplié par 3 pendant les six premiers mois qui suivent le diagnostic de thrombose, et augmente avec le stade tumoral, elle est également plus élevée pour les adénocarcinomes que pour les tumeurs épidermoïdes et augmente pendant les périodes de chimiothérapie, cela a été particulièrement observé dans le cancer bronchique. Il diminue par la suite mais reste marginalement plus élevé que celui de la population témoin pendant plusieurs années. Le risque de développer un cancer dans les suites immédiates d'un épisode de MTEV est plus élevé après les thromboses idiopathiques, particulièrement quand elles récidivent pendant et après l'arrêt du traitement anticoagulant [6]. L'incidence de la MTEV varie avec la pathologie tumorale. Les thromboses sont particulièrement fréquentes au cours des cancers du pancréas, des lymphomes, des cancers du tube digestif, de l'ovaire et du poumon [3]. L'incidence est plus importante pendant les trois mois qui suivent le diagnostic [8]. L'épisode de MTEV précédant le diagnostic d'un cancer est le plus souvent idiopathique.



Figure 1-11 : Risque de MTEV en fonction de l'évolution du cancer

(Rao MV, et al. 2007)

Le risque de MTEV varie au fil du temps après le diagnostic de cancer, le risque est le plus élevé après un diagnostic précoce, (figure 10) et il y a une forte corrélation entre le stade métastatique et le risques de MTEV [46]. Les études de cohorte de Prandoni et al. [28] et Monrealet al. [47] ont évalué le risque de survenue d'un cancer dans les deux ans suivant un premier épisode de MVTE. L'incidence des néoplasies était supérieure chez les patients porteurs d'une MTEV idiopathique: 7 % vs 2 % dans le groupe des MTEV secondaires. La période de temps durant laquelle on peut observer une augmentation du risque de cancer après un épisode de MTEV idiopathique est variable, dans les études de Sorensen et al. [6] et White et al [48] la néoplasie était essentiellement découverte durant les six mois suivant l'épisode de MTEV, au-delà d'un an, l'incidence de cancer rejoignait celle de la population générale. Blom et al. [1] dans l'étude cas-témoins MEGA ont étudié la force de l'association entre cancer et MTEV en fonction du délai entre la découverte du cancer (Figure 1-12).



Figure 1-12 : Risque de MTEV en fonction du temps

(d'après Blom et al. 2005)

L'association était la plus forte pour les cancers diagnostiqués depuis moins de trois mois avec un odds ratio pour le risque thrombotique à 54, elle décroissait par la suite: rapport de cotes à 14 quand le cancer avait été diagnostiqué entre trois mois et un an avant l'inclusion, à quatre pour des cancers datant d'un à trois ans, puis à trois pour des cancers de trois à cinq ans, à 2,6 entre cinq et dix ans, 2,3 pour des cancers datant d'entre dix et 15 ans, et enfin 1,1 pour des cancers diagnostiqués plus de 15 ans avant l'inclusion. Il est intéressant de constater

que le risque de MTEV reste sensiblement augmenté jusqu'à 15 ans après le diagnostic initial.

I.1.1.8 Les récidives

Le cancer associé au MTEV est également accompagné d'un caractère récidivant de MTEV. Plusieurs auteurs ont cherché à estimer ce risque de récidives comme Levitan et al [21] (Figure 1-13). Prandoni et al. [6,49], dans leur étude ont montré qu'après un suivi d'un an des patients, le taux de récidive était de 20,7 % dans ce groupe cancer, contre 6,8 % chez les patients sans cancer, soit un risque relatif de 3,2.



Figure 1-13 : Evaluation du risque de récidive de MTEV (d'après Levitan et al. 1999)

Cette association entre récidive de MTEV et cancer occulte est d'autant plus forte que cette récidive se fait sous traitement anticoagulant curatif [50]. Tout comme pour le risque de premier épisode, il existait un lien entre l'extension de la maladie cancéreuse et le risque de récidive thrombotique, ce risque de récidive est différent en fonction de la localisation cancéreuse (Figure 1-14) [49]. Les traitements du cancer semblent également impliqués dans le risque de récidive thrombotique comme le montre l'étude de Heit et al. où ce risque était associé au traitement par chimiothérapie [12].



Figure 1-14 : Comparaison du % de récurrences et de saignements majeurs entre patients cancéreux et non cancéreux sous traitements (d'après Prandoni et al. 2002)

I.1.1.9 La chirurgie

Les patients cancéreux ont également un risque accru de MTEV lié à la chirurgie. Les malades atteints d'uncancer et subissant des interventions chirurgicales ont deux fois plus de risque de présenter une MTEV que ceux non porteurs de cancer selon l'étude de White et al [51]. Les résultats de l'étude d'Agnelli et al. [52] montrent une persistance élevée d'incidence de MTEV après la chirurgie du cancer, en dépit des améliorations des soins aux patients, et malgré la prophylaxie, et montre que 40% de MTEV se produisent plus de 21 jours après la chirurgie (Figure 1-15).



Figure 1-15 : Incidence des MTEV après chirurgie chez les patients cancéreux

(d'après Agnelli et al. 2006)

I.1.1.10 La mortalité

Le lien entre survenue d'une MTEV chez les patients cancéreux et la mortalité a été pour la première fois étudié par Sorensen et al. [53]. Dans cette étude basée sur la population du Danemark, les patients cancéreux atteints de MTEV ont été comparés aux patients atteints de cancer qui n'ont jamais développé de MTEV. Les patients et les témoins ont été appariés selon le type de cancer, l'âge, le sexe et l'année du diagnostic du cancer.

Le taux de survie à 1 an était de seulement 12% chez les patients ayant eu un cancer au moment de la MTEV, comparativement à 36% dans le groupe témoin sans MTEV. Cette différence est également constatée chez les patients dont le cancer est diagnostiqué dans l'année qui suit l'épisode thromboembolique veineux (Figure 1-16).

En revanche, aucune différence en terme de survie n'est mise en évidence quand le diagnostic de cancer est porté plus d'un an après l'épisode.

Survival rate for patients with a diagnosis of cancer within 1 year after VTE

Survival rate for patients with a diagnosis of cancer at the time of VTE



Figure 1-16 : Estimation du pourcentage de survie du patient cancereux en fonction du moment du diagnostic du cancer (d'après Sorensen et al.2000)

De même dans l'analyse de survie des patients avec cancers pulmonaires non à petites cellules de Blom et al. [54], le risque de décès des patients ayant présenté une MVTE est multiplié par trois à quatre par rapport aux patients non atteints de MVTE, cette différence étant retrouvée à la fois chez les patients au stade de cancer métastatique et chez les patients n'ayant pas de métastases. Bien que quelque peu contre-intuitif, l'impact de la MTEV sur la survie est plus élevé chez les patients diagnostiqués avec un cancer au stade local, et plus petit parmi les cancers métastatiques [3,55-58]. Le risque de MTEV associé au cancer est donc multifactoriel.

Références – Chapitre I

- Blom JW, Doggen CJM, Osanto S et al. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. JAMA 2005; 293: 715–722.
- Stein PD, Beemath A, Meyers FA et al. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. Am J Med 2006; 119: 60– 68.
- Chew HK, Wun T, Harvey D et al. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. Arch Intern Med 2006; Feb 27; 166 [4]: 458- 464.
- Khorana AA, Francis CW, Culakova E et al. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. Cancer 2007; 110 (10): 2339-46.
- Walker AJ, Card TR, West J et al. Incidence of venous thromboembolism in patients with cancer - a cohort study using linked United Kingdom databases. Eur J Cancer 2013; 49 (6): 1404-1413.
- Prandoni P, Lensing AWA, Buller H et al. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med* 1992; 327: 1128-33.
- Baron JA, Gridley G, Weiderpass E et al. Venous thromboembolism and cancer. Lancet, 1988; 351:1077-80.
- Sørensen HT, Mellemkjaer L, Steffensen FH et al. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. N Engl J Med. 1998 Apr 23; 338: 1169-73.
- Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindier MJ et al. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. J Thromb Haemost. 2006; 4: 529- 535.
- 10) Nordstrom M, Lindblad B, Anderson H et al. Deep venous thrombosis and occult malignancy: an epidemiological study. BMJ 1994; 308: 891-894.
- 11) Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN et al. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. Arch Intern Med. 2000; 160: 809-15.
- 12) Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN et al. Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study. Arch Intern Med 1999; 159: 445-53.

- Haddad TC, Greeno EW. Chemotherapy-induced thrombosis. Thromb Res. 2006; 118: 555-68.
- 14) Wun T, White RH. Venous thromboembolism (VTE) in patients with cancer: epidemiology and risk factors. Cancer Invest. 2009; 27 (suppl 1): 63-74.
- 15) Blom JW, Osanto S, Rosendaal FR. The risk of a venous thrombotic event in lung cancer patients: higher risk for adenocarcinoma than squamous cell carcinoma. J Thromb Haemost 2004; 2 (10): 1760- 5.
- 16) Descourt R, Righini M, Carrier M et al. Place of cancer among the risk factors in venous thromboembolism Pathol Biol. 2008; 56 (4): 178-83.
- 17) Descourt R, Jezequel P, Couturaud F et al. Venous thromboembolism and cancer Rev Pneumol Clin. 2008; 64 (6): 282- 9.
- Wun T, White RH. Epidemiology of cancer-related venous thromboembolism. Best Pract Res Clin Haematol. 2009 (1): 9- 23.
- 19) Falanga A, Russo L. Epidemiology, risk and outcomes of venous thromboembolism in cancer. Hamostaseologie. 2012; 32 (2): 115-25.
- 20) Sauve C, Boffa M, Meyer G et al. Maladie thromboembolique veineuse et cancer. Rev Med Interne 2000; 21: 266-77.
- 21) Levitan N, Dowlati A, Remick SC et al. Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. Medicine (Baltimore) 1999; 78 (5): 285-91.
- 22) Lee AY. Epidemiology and management of venous thromboembolism in patients with cancer. Thromb Res<u>.</u> 2003; 110 (4): 167-72.
- 23) Shen VS, Pollak EW. Fatal pulmonary embolism in cancer patients: is heparin prophylaxis justified? South Med J 1980; 73: 841- 3.
- 24) Khorana AA, Francis CW, Culakova E et al. Thromboembolism in hospitalized neutropenic cancer patients. J Clin Oncol 2006; 24: 484- 490.
- 25) Khorana AA, Francis CW, Culakova E et al. Increasing risk for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients J of Clin Oncol, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 25, No 18S.
- 26) Levine MN. Prevention of thrombotic disorders in cancer patients undergoing chemotherapy. Thromb Haemost1997; 78: 133–36.
- 27) Green KB, Silverstein RL. Hypercoagulability in cancer. *Hematology/Oncology Clinics* of North America 1996; 10: 499- 530.

- 28) Lee AYY, Levine MN. The thrombophilic state induced by therapeutic agents in the cancer patient. *Sem Thromb Hemos* 1999; 25: 137-45.
- 29) Pritchard KI, Paterson AHG, Paul NA et al for the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Breast Cancer Site Group. Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of adjuvant therapy for women with breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2731-7.
- 30) Barlogie B, Desikan R, Eddlemon P et al. Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide: identification of prognostic factors in a phase 2 study of 169 patients. Blood 2001; 98: 492- 494.
- Zangari M, Anaissie E, Barlogie B et al. Increased risk of deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving thalidomide and chemotherapy. Blood 2001; 98: 1614-1615.
- 32) Cavo M, Zamagni E, Cellini C et al. Deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving first-line thalidomide-dexamethasone therapy. Blood 2002; 100: 2272-2273.
- 33) Rajkumar SV, Blood E, Vesole D et al. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. J Clin Oncol 2006; 24: 431- 436.
- 34) Rickles FR, Levine MN. Venous thromboembolism in malignancy and malignancy in venous thromboembolism. Haemostasis. 1998; 28 (Suppl 3): 43-9.
- 35) Saphner T, Tormey DC and Gray R. Venous and arterial thrombosis in patients who received adjuvant therapy for breast cancer. J Clin Oncol 1991; 9: 286- 294.
- 36) Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J et al. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. J Natl Cancer Inst 2006; 98: 708- 714.
- 37) Wun T, Law L, Harvey D et al. Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation, and erythropoietin. Cancer 2003; 98: 1514- 1520.
- 38) Khorana AA, Francis CW, Culakova E et al. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. Cancer 2005; 104: 2822-2829.
- 39) Khorana AA, Francis CW, Blumberg N et al. Blood transfusions, thrombosis, and mortality in hospitalized patients with cancer. Arch Intern Med 2008; 168: 2377-2381.

- 40) Verso M, Agnelli G. Venous thromboembolism associated with long-term use of central venous catheters in cancer patients. J Clin Oncol 2003; 21: 3665-75.
- 41) Bona RD. Thrombotic complications of central venous catheters in cancer patients. *Sem Thromb Hemos* 1999; 25: 131- 6.
- 42) Bern MM, Lokich JJ, Wallach SR, et al. Very low dose of warfarin can prevent thrombosis in central venous catheters: a prospective trial. Ann Intern Med 1990; 112: 423-28.
- 43) Monreal M, Alastrue A, Rull M, et al. Upper extremity deep venousthrombosis in cancer patients with venous access devicesprophylaxiswith a low molecular weight heparin (fragmin). *Thromb Haemost* 1996; 75: 251- 53.
- 44) Khorana AA, Connolly GC. Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer. Clin Oncol. 2009; 10; 27 (29): 4839-47.
- 45) Piccioli A, Lensing AWA, Prins MH, et al. Estensive screening for occult malignant disease in idiopathic venous thromboembolism. J Thromb Haemost 2004; 2: 884- 89.
- 46) Rao MV, Francis CW, Khorana AA. Who's at risk for thrombosis? Approaches to risk stratifying cancer patients. In: Khorana AA, Francis CW, editors. Cancer-Associated Thrombosis: New Findings in Translational Science, Prevention, and Treatment. New York, NY: Informa Healthcare USA, Inc; 2007; 169- 192.
- 47) Monreal M, Fernandez-Llamazares J, Perandreu J et al. Occult cancer in patients with venous thromboembolism: which patients, which cancers. Thromb Haemost 1997; 78: 1316-8.
- 48) White RH, Chew HK, Zhou H et al. Incidence of venous thromboembolism in the yearbefore the diagnosis of cancer in 528,693 adults. Arch Intern Med 2005; 165: 1782-7.
- 49) Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A et al. Recurrent venons thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venons thrombosis. Blood 2002; 100: 3484- 8.
- 50) Hutten BA, Prins MH, Gent M et al. Incidence of recurrent thromboembolic and bleeding complications among patients with venous thromboembolism in relation to both malignancy and achieved internationalized ratio: a retrospective analysis. J Clin Oncol 2000; 18: 3078-83.
- 51) White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. Thromb Haemost 2003; 90: 446-55.

- 52) Agnelli G, Bolis G, Capussotti L et al. A clinical outcome-based prospective study on venous thromboembolism after cancer surgery: the @RISTOS project. Ann Surg. 2006; 243 (1): 89- 95.
- 53) Sorensen HT, Mellemkjaer L, Olsen JH et al. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. N Engl J Med. 2000; 343: 1846- 50.
- 54) Blom JW, Osanto S, Rosendaal FR. The risk of a venous thrombotic event in lung cancer patients: higher risk for adenocarcinoma than squamous cell carcinoma. J Thromb Haemost 2004; 2 (10): 1760- 5.
- 55) Alcalay A, Wun T, Khatri V, et al. Venous thromboembolism in patients with colorectal cancer: incidence and effect on survival. J Clin Oncol. 2006; 24: 1112- 18.
- 56) Chew HK, Davies AM, Wun T et al. The incidence of venous thromboembolism among patients with primary lung cancer. J Thromb Haemost. 2008; 6: 601- 608.
- 57) Chew HK, Wun T, Harvey DJ et al. Incidence of venous thromboembolism and the impact on survival in breast cancer patients. J Clin Oncol. 2007; 25: 70- 76.
- 58) Bick RL. Cancer-associated thrombosis: focus on extended therapy with dalteparin. J Support Oncol, 2006; 4, 115-120.

Chapitre II : Rappel

sur l'hémostase

II.1 Introduction générale

L'hémostase est un phénomène physiologique permettant de limiter les pertes sanguines suite à une lésion vasculaire. La lésion de l'endothélium vasculaire entraîne la formation d'un thrombus plaquettaire (hémostase primaire) et la formation d'un réseau de fibrine insoluble qui va consolider ce thrombus (coagulation plasmatique). La durée de formation du caillot stable chez l'homme sain est d'environ 7 minutes.

La coagulation conduit à la gélification du sang suite à une séquence de réactions protéolytiques. Ces réactions sont localisées au site de la brèche vasculaire et régulées spatialement et temporellement par différents systèmes d'inhibiteurs physiologiques. L'équilibre entre la coagulation et les mécanismes qui vont la limiter (inhibiteurs naturels de la coagulation) est fondamental, une rupture ayant pour conséquence un risque hémorragique (déficit en facteurs) ou thrombotique (excès de facteurs activés ou déficit en inhibiteurs).

La première étape de la coagulation est l'expression du facteur tissulaire qui lié au facteur VIIa déclenche le processus de génération de thrombine qui entraine à l'amplification de sa propre génération via l'activation des facteurs V, VIII et XI et l'activation des plaquettes et aboutit à la transformation du fibrinogène en fibrine. Les monomères de fibrine se polymérisent et le réseau de fibrine se stabilise grâce à l'intervention du facteur XIIIa (générée également suite à l'action protéolytique de la thrombine sur le facteur XIII. La protection contre la dissémination du processus de la génération de thrombine à distance de son site d'initiation est assurée par plusieurs mécanismes.

- Les facteurs de coagulation activés localement sont rapidement dilués dans la circulation
- La formation des complexes enzymatiques (prothrombinase et ténase intrensèque) au niveau des membranes cellulaires qui expriment des phospholipides procoagulants (notament la membrane plaquettaire) est une réaction qui assure la localisation du processus de la génération de thrombine
- les facteurs activés seront inactivés par des inhibiteurs physiologiques de la coagulation.
- La fibrinolyse, étape finale avec ses mécanismes d'activation et de rétrorégulation, élimine progressivement le thrombus et re-perméabilise la lumière vasculaire.

Le processus d'hémostase qui vise à arrêter les hémorragies et empêcher les thromboses se déroule selon le schéma classique en trois temps :

- l'hémostase primaire qui ferme la brèche vasculaire par un "thrombus blanc" (clou plaquettaire),
- la coagulation qui consolide ce premier thrombus en formant un réseau de fibrine emprisonnant des globules rouges,
- la fibrinolyse, processus limitant, qui permet la destruction des caillots ou la limitation de leur extension.

Ces trois temps sont initiés simultanément dès que le processus d'hémostase est enclenché.

II.2 Les composants sanguins et vasculaires de la coagulation

Les composants sanguins et vasculaires qui participent au phénomène de l'hémostase sont:

- les éléments cellulaires (plaquettes, cellules endothéliales, monocytes, macrophages, fibroblastes, globules rouges....),
- les facteurs et inhibiteurs naturels de la coagulation, les facteurs et inhibiteurs de la fibrinolyse

Ces acteurs sont également classés en fonction de leur localisation en

Eléments sanguins : plaquettes, monocytes, macrophages, globule rouges,

Elements vasculaires: cellules endothéliales, les divers composants du tissu conjonctif (i.e. le collagène) ainsi que les cellules et les tissus qui forment les couches sous-endothéliales de la paroi vasculaire (1).

II.2.1 Les éléments cellulaires

Les cellules les plus importantes dans la coagulation sont les monocytes et les plaquettes, les cellules endothéliales.

- Les monocytes, cellules du sang circulant, sous l'influence de cytokines (IL-1, TNF), d'endotoxines bactériennes ou de certains antigènes, sont capables d'exprimer une protéine, le facteur tissulaire (FT), qui est associé à des phospholipides membranaires. Ce FT, anciennement appelé thromboplastine tissulaire est l'élément déclenchant et le support majeur de la coagulation. Les cellules endothéliales stimulées par des cytokines ou des facteurs physico-chimiques peuvent éventuellement en exprimer à leur surface.
- Les plaquettes sont les actrices principales de l'hémostase primaire. Elles circulent à l'état non activé. Elles portent à leur surface des sites de liaison dont les plus importants sont les glycoproteines Ib et IIb-IIIa (GP Ib, GP IIb-IIIa) et le récepteur de la thrombine. Ces glycoprotéines permettent aux plaquettes de reconnaître des ligands spécifiques comme le fibrinogène ou le Facteur Von Willebrand (FvW), ce dernier circule complexé au FVIII coagulant. Le Facteur FvW sert de lien entre les plaquettes et le sous endothélium. En cas de brèche vasculaire, les plaquettes vont adhérer au sous-endothélium via le FvW et GP Ib, puis s'agréger entre elles via un changement conformationnel de la GP IIb-IIIa, qui fixe le fibrinogène. Lorsque les plaquettes sont activées, les phospholipides anioniques exposés à leur surface permettent la formation rapide de thrombine par activation des complexes ténase et prothrombinase. Enfin les plaquettes (tout comme les monocytes) peuvent libérer dans le milieu plasmatique de petits fragments de membrane appelés microvésicules capables elles aussi de fixer les facteurs de coagulation et donc de l'amplifier.
- Les cellules endothéliales: le revêtement endothélial est une barrière continue ou discontinue selon la nature des capillaires. Il est composé d'une monocouche de cellules endothéliales de grande taille (40 à 50 µm de longueur) et très minces (1 µm d'épaisseur). Ces dernières sont non thrombogènes à l'état basal, car leur face exposée au sang est chargée négativement et recouverte de mucopolysaccharides (glycocalyx). Lors d'une agression, l'exposition des couches sous-endothéliales entraîne l'activation et l'agrégation plaquettaire ainsi que la coagulation par exposition de FT. Lors de la réaction hémostatique ou thrombogène, l'endothélium intervient comme

agent régulateur via deux mécanismes : - sécrétion de substances antiplaquettaires et vasodilatatrices (prostacycline, NO), activation de la fibrinolyse (t-PA) ; - interactions membranaires spécifiques (thrombomoduline, sulfate d'héparane et autres glycosaminoglycanes) avec les protéines plasmatiques anticoagulantes (protéine C, l'antithrombine et cofacteur II de l'héparine).

 D'autres cellules peuvent jouer un rôle dans la coagulation: les fibroblastes sont capables d'exprimer le FT; ils synthétisent tout comme les cellules musculaires beaucoup de facteurs impliqués dans la coagulation. Enfin, les macrophages qui infiltrent les lésions athéromateuses sont des sources importantes de FT, qui sera à l'origine des thromboses artérielles aiguës.

II.2.2 Les facteurs plasmatiques:

Les facteurs de coagulation

Les facteurs de la coagulation, les glycoprotéines plasmatiques sont désignés pour la plupart par des chiffres romains allant de I à XIII, sauf la prékallikréine et le kininogène (KHPM). Homis le facteur XIII qui n'intervient que dans la dernière étape de la coagulation (stabilisation de la fibrine), les autres interviennent dans l'ordre inverse de leur numérotation. Les glycoprotéines sont reportées dans le tableau I, à l'exception du facteur III (FT) et du facteur IV (Calcium) de l'ancienne nomenclature maintenant tombée en désuétude.

Ces facteurs peuvent être regroupés en deux catégories:

- *les enzymes de type sérine protéase* qui ont une activité protéolytique sur leurs substrats spécifiques. Ces facteurs passent de l'état inactif (zymogène) à un état actif (serine protéase) après une protéolyse limitée. Les sérines protéases sont: le facteur VII activé (FVIIa), le facteur X activé (FXa), le facteur XII activé (FXIIa), le facteur IX activé (FIXa), la thrombine (FIIa) et la protéine C activée (PCa).
- *les cofacteurs* qui, après activation par une protéolyse limitée induite par leur activateur spécifique, n'ont pas d'activité protéolytique. Ils s'associent avec une

serine protéase spécifique en présence d'ions calciques et de phospholipides. Cette association accélère l'activité protéolytique des sérines protéases. Dans le mécanisme de la coagulation, les cofacteurs sont : le facteur V activé (FVa) qui est le cofacteur du FXa, le facteur VIII activé (FVIIIa) qui est le cofacteur du FIXa et la protéine S qui est le cofacteur de la PCA.

N° Facteur	Nom	Particularités	Demi-vie	Concentration
Facteur I	Fibrinogène	Absent du sérum	4-6 jours	2 à 4 g/l
Facteur II	Prothrombine	Vit K dépendant	3-4 jours	100-150mg/l < 5 % dans sérum
Facteur V	Proaccélérine	Absent du sérum	12-36 h	5-10 mg/l
Facteur VII	Proconvertine	Vit K dépendant	4-6 h	0,35-0,60 mg/l
Facteur VIII	Anti-hémophilique A	Absent du sérum	10-16 h	0,10-0,20 mg/l
Facteur IX	Anti-hémophilique B	Vit K dépendant	24 h	3-5 mg/l
Facteur X	Stuart	Vit K dépendant	1-2 jours	7-17 mg/l
Facteur XI	Rosenthal		1-2 jours	3-6 mg/l
Facteur XII	Hageman		2-3 jours	30-40 mg/l
Facteur XIII	Stabilisant fibrine		3-7 jours	20-30 mg/l

Tableau II-1 : Principales caractéristiques des facteurs de coagulation

Une autre sous division des facteurs de la coagulation se fait selon la présence ou l'absence des résidus de l'acide gama-carboxy-glutamique (résidus Gla) dans l'extrémité aminoterminale deleurs chaînes polypeptidiques. Ces facteurs, dits «vitamine K-dépendants» sont synthétisés au niveau du foie et possèdent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles communes (Tableau I). Les facteurs vitamine K-dépendants sont: le FVII, le FX, la prothrombine (FII), le FIX, la protéine C (PC), la protéine S (PS) et la protéine Z (PZ).

Cas particulier de la thrombine :

La thrombine est l'enzyme pivot de la coagulation. Elle accomplit plusieurs actions sur plusieurs substrats :

par son activité protéasique :

- en transformant le fibrinogène en fibrine avec libération de fibrinopeptides (A et B)

- en activant le facteur XIII qui devient le XIIIa, qui stabilise la fibrine par des liaisons covalentes

- en activant les facteurs V et VIII qui deviennent Va et VIIIa,

par son activité de messager :

- elle active les plaquettes qui changent de forme, s'agrègent et libèrent diverses substances.

- elle favorise la prolifération des fibroblastes et des myocytes.

- elle augmente la capacité d'adhésion de diverses cellules dont les cellules métastatiques.

- elle possède des effets vasculaires, vasoconstriction par effet direct (artère lésée), ou vasodilatation par libération de NO (artère saine).

- elle active les leucocytes et les macrophages qui libèrent des cytokines pro inflammatoires. Enfin, la thrombine possède des actions activatrices et inhibitrices de la coagulation par le biais de mécanismes respectivement plasmatiques et endothéliaux. Elle active les cellules endothéliales qui libèrent des prostacyclines, l'endothéline, le NO et le t-PA (tissue plasminogen activator = activateur de la fibrinolyse).

II.2.3 Le facteur tissulaire

Le facteur tissulaire (FT) est une glycoprotéine transmembranaire qui est le principal responsable de l'activation des cascades de la coagulation en cas de brèche vasculaire. Son gène est situé sur le chromosome 1 en position 1P21-22.

Le FT est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa synthétisée sous forme d'un propeptide de 295 AA qui après clivage du peptide signal de 32 AA donne la protéine mature de 263 AA (Figure II- 1). Cette protéine comporte un domaine extracellulaire (1-219), un domaine transmembranaire (220-242) et un domaine cytoplasmique (243-263).



Figure II-1: Structure du facteur tissulaire

(d'après Morrissey 1987)

Le facteur tissulaire, normalement absent de la circulation sanguine, est un récepteur de très haute affinité pour les facteurs VII et VIIa. C'est son domaine extracellulaire qui est le récepteur du FVII ainsi que de sa forme activée.

La liaison du FT au FVII entraîne son activation en FVIIa, par rupture d'un pont dissulfure dans la molécule FVII par différentes sérine protéases dont le facteur Xa, le facteur IXa, la thrombine et par le complexe FT-VIIa lui-même (autoactivation). Le facteur tissulaire a donc deux fonctions principales: il est le cofacteur du facteur VIIa pour l'activation du IX et du X ; il est aussi responsable de l'autoactivation du VII en VIIa. Ces réactions nécessitent des phospholipides anioniques et du Ca²⁺. Les capacités d'activation catalytique des FIX et FX par le FVIIa isolé sont faibles mais sont considérablement augmentées après fixation du FVIIa sur le FT en présence de phospholipides anioniques. Il a été démontré que le complexe FT-FVIIa activait plus rapidement le FX que le FIX [3]. Lorsque les FIX et FX sont présents simultanément, l'activation du FIX est augmentée et celle du FX est diminuée [4]. Dès que du FXa est généré, il est rapidement inhibé par le TFPI puis par l'AT. Cependant, les traces de FXa générée sont suffisantes pour la synthèse des premières traces de thrombine.

Le segment transmembranaire, riche en AA hydrophobes, semble indispensable à la liaison du VII au domaine extracellulaire: une molécule de FT soluble privée du domaine transmembranaire est incapable de lier et d'activer le FVII [5].

Le rôle de la partie intracytoplasmique reste encore mal connu. La fixation du FT au FVIIa entraîne des modifications du calcium intracellulaire et la phosphorylation du résidu Ser 258,

ce qui entrainerait l'initiation de la transduction d'un signal intracellulaire, *via* la voie MAPkinase, aboutissant à un état d'activation et de multiplication cellulaire accrue [6].

L'activation de la coagulation par la voie du FT-FVIIa est régulée par 2 systèmes inhibiteurs agissant sur l'activité du complexe FT-FVIIa: l'antithrombine (AT) et le *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI). L'AT est le principal inhibiteur des sérines-protéases de la coagulation (Serpine). Cette glycoprotéine de synthèse hépatique, inhibe le FT par 2 mécanismes indirects. D'une part, la formation du complexe AT-FT-FVIIa rend le FVIIa incapable de lier un nouveau site du FT et d'autre part, la liaison de l'AT au FVIIa entraîne des modifications conformationnelles du FVIIa qui accélèrent alors la dissociation des complexes FT-FVIIa [7].

Le TFPI, synthétisé de manière constitutive par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes, est l'inhibiteur naturel majeur de la voie initiée par le facteur tissulaire.

L'inhibition de l'activité du complexe FT-VIIa se fait en deux étapes: le TFPI forme tout d'abord un complexe binaire avec le facteur Xa dans lequel ce dernier est neutralisé; se forme ensuite un complexe quaternaire, TFPI-Xa-VIIa-FT, inactif. Récemment, une autre molécule de type Kunitz, présentant une forte homologie avec le TFPI a été purifiée et nommée TFPI-2 [8]; le TFPI-2, qui est transcrit par les cellules endothéliales, hépatiques et placentaires, inhibe directement l'activité du complexe FT-VIIa sans formation préalable d'un complexe avec le Xa. Des travaux récents ont également montré que l'antithrombine III en présence d'héparine inhibait l'activité du VIIa à condition qu'il soit lié au facteur tissulaire; la fixation du VIIa au facteur tissulaire serait altérée par l'interaction VIIa-antithrombine III [7]. Outre son activité hémostatique, le FT a également un rôle dans l'inflammation,

l'angiogénèse, la dissémination métastasique et la migration cellulaire *via* son activation des PARs (Protease Activated Receptors) sur les cellules vasculaires.

L'expression cellulaire du facteur tissulaire par les cellules permet de les classer en trois types :

- les cellules qui ne produisent pas de facteur tissulaire comme les globules rouges, les lymphocytes, les polynucléaires et les plaquettes ;
- *les cellules qui en produisent de façon constitutive* [9] ; le facteur tissulaire est trouvé en grande quantité dans le poumon et le cerveau, les cellules des capsules de différents organes comme le foie, la rate, le rein, par les cellules de l'épiderme et celles des muqueuses intestinales et urinaires. La répartition constitutive du facteur tissulaire est telle que celui-ci n'est exprimé qu'au niveau des cellules non en contact normalement avec le sang).
- *les cellules dont la production de facteur tissulaire est inductible* (monocytes et cellules endothéliales).

Les cellules endothéliales et les monocytes, à l'état normal, n'expriment pas de facteur tissulaire. *In vitro*, les monocytes produisent le facteur tissulaire en réponse à l'endotoxine et à un grand nombre d'autres agonistes (fractions activées du complément (C5a), au tumor necrosis factor (TNF), interleukine 1, protéine C réactive, facteur de perméabilité vasculaire, lipoprotéines acétylées) dont le taux est souvent augmenté au cours de la réaction inflammatoire [10]; parmi les agents stimulant la production de facteur tissulaire par les

cellules endothéliales figurent les virus, certaines cytokines (TNF, interleukine 1), la thrombine, les protéines glyquées et l'endotoxine bactérienne.

En résumé :

La coagulation normale peut être décrite en trois phases:

- *la phase d'initiation* pendant laquelle le FT lié au FVIIa declenche le processus de génération de thrombine Cette interaction aboutit à la formation des premières traces de thrombine qui induisent l'activation plaquettaire et à l'activation des facteurs V et VIII.
- la phase de propagation au cours de laquelle les premières traces de thrombine amplifient l'activation des facteurs de la coagulation et des plaquettes. Les plaquettes activées en sécrétant leur contenu et en modifiant la composition de leurs membranes enrichissent le micro-environnement en facteurs de la coagulation et en phospholipides procoagulants nécessaires à l'optimisation des réactions entre les facteurs de la coagulation et également en inhibiteur de la voie du FT (TFPI).
- *la phase de la localisation.* Les inhibiteurs naturels de la coagulation inhibent les facteurs activés et réduisent la génération de la thrombine. L'endothélium normal sécrète également des substances anticoagulantes et antiagrégantes qui localisent l'activation de la coagulation et la formation du thrombus au niveau de la lésion vasculaire. Les principaux inhibiteurs sont: l'antithrombine (AT), l'inhibiteur de la voie tissulaire ("tissue factor pathway inhibitor" ou TFPI), le complexe PZ et l'inhibiteur dépendant de la PZ (ZPI) et la voie anticoagulante du système de la protéine C (PC). Celle-ci est composée par la PC, la PS et la thrombomoduline (TM).

L'hémostase peut donc être représentée comme une balance. Un déséquilibre de cette dernière vers une diminution de la génération de thrombine favorise le saignement alors qu'un déplacement vers un excès de thrombine favorise un état d'hyper-coagulation prédisposant à la thrombose.

II.3 Evolution de la conception classique du processus de la coagulation en Y au modèle moderne et au modèle cellulaire de la coagulation

II.3.1 Le modèle classique de "Cascade" de la coagulation

Ce modèle, proposé simultanément par deux groupes dès 1964 (11, 12), a permis un grand progrès dans la compréhension de la coagulation. Le système de la coagulation a historiquement été divisé en deux voies : la voie intrinsèque, la voie extrinsèque avec leur convergence (Boucle de Josso); la voie commune (13). La conception classique de la coagulation décrivait deux voies différentes pour aboutir à la production de thrombine (Figure II- 2). En fait, ces deux voies sont imbriquées puisque des passages existent entre elles. La voie intrinsèque (endogène) dans laquelle tous les éléments nécessaires à la coagulation sont présents dans le plasma sans apport extérieur. Cette voie s'active en présence de surface mouillable et électronégative comme le verre ou le kaolin. La voie extrinsèque (exogène) qui pour être activée nécessite la présence d'éléments tissulaires (14,15).

Ce modèle traditionnel représentait le processus de coagulation comme une série de réactions protéolytiques. Chaque protéase clive et active la protéase ultérieure de la série. Le modèle « cascade » comprenait également la reconnaissance des phospholipides anioniques, en particulier la phosphatidylsérine, qui était nécessaire pour l'assemblage et un fonctionnement optimal de la plupart des complexes de coagulation.

Ce modèle de la coagulation correspond en fait aux processus de coagulation *in vitro* et est très utile pour l'exploration des altérations liées à un déficit en facteurs de la coagulation. En effet, la voie intrinsèque (ou endogène) et la voie extrinsèque (ou exogène) sont respectivement explorées par le temps de céphaline activée (TCA) et le temps de Quick ou taux de prothrombine (TP). C'est donc sur ce schéma que pourra se faire le raisonnement diagnostique d'interprétation des tests de coagulation bien que ce schéma ne corresponde pas à la réalité *in vivo*.



Figure II- 2: Schéma en cascade de la coagulation

II.3.2 Le schéma moderne de la coagulation

Le schéma moderne incorpore la théorie des complexes en impliquant plusieurs étapes consécutives: initiation de la génération de thrombine, formation des complexes enzymatiques ténase, et prothrombinase et propagation de la génération de thrombine formation de la fibrine, et stabilisation de la fibrine (Figure II- 3).



Figure II- 3 : Representation schématique des complexes enzymatiques qui amplient la génération de thrombine

II.3.2.1 Phase d'initiation de la génération de thrombine

Dans cette phaseles différentes étapes qui conduisent à la génération de thrombine sont :

L'interaction entre le facteur tissulaire et le FVII/FVIIa

Dans ce modèle le FT joue le rôle principal dans le déclanchement de la génération de thrombine (Figure II- 4). *In vivo*, dans les conditions physiologiques, le FT n'est pas accessible à la circulation sanguine. Le FT est une protéine intégrale ancrée à la membrane cellulaire *via* un domaine transmembranaire. Le FT est localisé surtout dans l'adventice et devient disponible en cas de lésion vasculaire. Le complexe FT-FVIIa est la clef de l'initiation de la génération de thrombine par l'activation rapide mais limitée du facteur X en Xa et via l'activation du Facteur IX (boucle de Josso) en IXa, ce qui permet l'activation, plus lente, d'un plus grand nombre de Xa. La ténase intrinsèque, qui comprend les phospholipides et le facteur VIII, est fondamentale pour l'amplification de la coagulation et la génération



Figure II- 4 : Rôle principal du FT dans le schéma moderne de la coagulation

Les monocytes et les macrophages activés sont une source de FT dans le système vasculaire sanguin ainsi que la paroi vasculaire athéromateuse.

Dans la circulation sanguine, 98% environ de FVII existe sous une forme inactive (zymogéne) et moins de 2% du FVII est présent sous la forme de FVII activé (FVIIa). Les deux formes du FVII sont en équilibre pour maintenir l'hémostase basale. Le FVIIa isolé en l'absence de FT a une faible activité catalytique et n'exerce pas d'activité procoagulante significative. Le FVIIa associé avec le FT est 10 000 fois plus actif que l'enzyme seul (16-17).

Une lésion au niveau de la paroi vasculaire provoque l'exposition du FT vers le flux sanguin. Le FT fixe alors le facteur VII circulant, qu'il active pour former un complexe: FVIIa/FT [facteur VII activé - facteur tissulaire].

> Activation du FX et du FIX par le complexe FVIIa/FT.

A partir de la formation du complexe FVIIa/FT, deux voies d'activation sont possibles (Figure II- 5). Le complexe FVIIa/FT agit sur deux substrats naturels: le facteur X et le facteur IX pour les transformer en FXa et FIXa (18,19). Il est bien démontré que le complexe FVIIa/FT active rapidement et efficacement le FIX et le FX. Cet événement fait de la voie du FT "la prima ballerina" du processus de la coagulation (20,21).

- Quand le facteur tissulaire est en excès, le complexe FVIIa/FT active directement le facteur X. Cette voie peut cependant être rapidement inhibée par le TFPI: inhibiteur de la voie du facteur tissulaire.

- Quand le facteur tissulaire est en faible quantité (ou l'inhibition par le TFPI prépondérante), le complexe [facteur VII activé - facteur tissulaire] active alors le facteur IX.

L'accumulation de facteur IX activé en présence de son cofacteur le facteur VIII activé, de phospholipides et d'ions calcium (complexe anti-hémophilique) permettra secondairement l'activation du facteur X en facteur X activé (22).



Figure II-5: Initiation de la coagulation en fonction du taux de facteur tissulaire

La fixation du facteur VII au facteur tissulaire permet l'activation du facteur VII. Le facteur VIIapeut soit activer directement le facteur Xsoit activer le facteur IX.

Phase de propagation de la génération de thrombine

Le point central dans cette phase est la génération du FXa (23,24). Le FXa lié avec le FVa aux phospholipides en présence de Ca^{2+} constitue le complexe de la prothrombinase (FXa/FVa/Phospholipides/Ca²⁺) qui active la prothrombine en thrombine (25). Les premières traces de thrombines aboutissent :

- à l'amplification de l'activation de la coagulation via les boucles de rétro-activation,
- à l'activation plaquettaire et à la transformation du fibrinogène en fibrine.

Les premières traces de thrombine activent le FV et le FVIII. Ainsi ces facteurs activés participent à la formation de la prothrombinase (FXa/FVa/phospholipides/Ca²⁺) et du de la ténase (FIXa/FVIIIa/phospholipides/Ca²⁺) (26,27).

La thrombine générée active rapidement le FV en FVa. La thrombine active le FV environ 100 fois plus rapidement que le FXa et amplifie ainsi sa propre génération (28,29).

Rôle central de la thrombine :

Dans l'étape finale de la formation du thrombus, la thrombine clive le fibrinogène et provoque la formation de monomères de fibrine. Les monomères de fibrine se polymérisent formant ainsi un réseau qui se stabilise grâce à l'effet du FXIIIa. Ce dernier est généré suite à l'action protéolytique de la thrombine sur son prédecesseur, le FXIII.

Elle active également le TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) ce qui permet de préserver le caillot de façon prolongée. Inversement elle active la voie de la PC; ce qui limite sa propre formation. Elle active le FVII et elle induit l'expression du FT au niveau de la membrane des cellules endothéliales essentiellement *in vitro*.

• Importance des cofacteurs de la coagulation :

Les sérines protéases, FXa et FIXa, ont une activité faible en l'absence de leurs cofacteurs et en l'absence de phospholipides procoagulants.

Les facteurs VIIIa et Va sont les cofacteurs essentiels des facteurs IXa et Xa respectivement. Le FVIII et le FV sont activés après une protéolyse limitée par la thrombine et le FXa. Le FV (et le FVa) en présence de Ca²⁺ est associé avec le FXa. Cette réaction aboutit à la formation du complexe enzymatique "prothrombinase" qui activera la prothrombine. De façon similaire, le FVIIIa est associé au FIXa sur les phospholipides en présence d'ions calciques et forme le complexe activateur du FX (ou tenase intrinsèque).

Le complexe FIXa/FVIIIa/phospholipides/Ca2+ active le FX en FXa (30).

La présence des phospholipides est nécessaire pour que l'activation des facteurs de la coagulation s'accélère et que la formation des complexes entre les sérines protéases et leurs cofacteurs respectifs se réalisent.

• Rôle des phospholipides dans la formation et l'activité des complexes enzymatiques :

Afin que les interactions enzymatiques soient optimales, les complexes enzymatiques doivent se localiser sur une surface appropriée composée par des phospholipides négativement chargés (31).

Les cellules au repos n'expriment pas de phospholipides procoagulants à la surface extracellulaire de la membrane. Les phospholipides négativement chargés [phosphatidyl-sérine (PS) et phosphatidyl-inositol (PI)] sont localisés à l'intérieur de la membrane des plaquettes ou de cellules endothéliales au repos.

In vivo, les plaquettes activées sont la source principale des phospholipides procoagulants.

• Rôle des plaquettes dans la formation et l'activité de la prothrombinase :

Les plaquettes au cours de leur activation soit par la thrombine soit par les autres activateurs cellulaires ou vasculaires sécrètent leur contenu et fournissent par remodelage de leurs membranes les phospholipides procoagulants qui sont nécessaires pour la formation des complexes enzymatiques de la coagulation (32,33).

L'activation du FX par la ténase intrinsèque nécessite la présence des phospholipides membranaires et des ions calciques.

II.3.2.2 La phase contact de l'activation de la génération

Le système contact est composé de 4 facteurs : le facteur XII, la prékallicréine, le kininogène de haut poids moléculaire et le facteur XI.

La phase contactest activée par le contact entre le FXII, la prékallikreine, le kininogène de haut poids moléculaire et les surfaces électronégatives (comme le tissu conjonctif, le collagène, les lipoprotéines *in vivo* ou le verre et le kaolin *in vitro*). L'activation du FXII induit une activation séquentielle des facteurs XI et IX, ce dernier activant le FX à son tour.

Dans le schéma moderne de la coagulation, l'activation de la phase contact joue un rôle secondaire dans la physiologie de l'hémostase par rapport au rôle de la voie du FT. Un déficit même complet de l'un des 3 premiers facteurs : XII, prékallicréine, kininogène de haut poids moléculaire n'entraîne pas d'hémorragie. Ces éléments ne paraissent donc pas indispensables à la coagulation *in vivo*. En revanche, les déficits en facteur XI peuvent s'accompagner de syndromes hémorragiques. Ceci est dû au fait que le facteur XI participe à la coagulation par une boucle de rétro-activation : l'amplification du phénomène de coagulation se fait grâce à la thrombine qui active le facteur XI en XI activé.

Malgrés son rôle secondaire dans l'hémostase physiologique, l'activation du FXII parrait d'avoir une importance dans la pathogénése de la thrombose.

II.3.2.3 La Fibrinoformation

La thrombine scinde le fibrinogène en libérant 2 petits peptides : le fibrinopeptide A et lefibrinopeptide B. En perdant le fibrinopeptide A puis le fibrinopeptide B, le fibrinogène devient un monomère de fibrine (1). Spontanément les monomères de fibrine se polymérisent et forment un premier réseau ou polymère soluble de fibrine. Ce polymère instable est stabilisé par le facteur XIIIa (facteur stabilisant la fibrine: FSF) qui est activé par les premières traces de thrombine. Le facteur XIIIa crée des liaisons covalentes solides entre ces monomères de fibrine. On a alors formation d'un réseau de fibrine qui emprisonne les globules rouges : le thrombus rouge définitif est ainsi formé (Figure II-6).



Figure II- 6: La fibrinoformation

La thrombine (FIIa) clive les fibrinopeptides A et B sur la molécule de fibrinogène, libérant des sites de liaison. Ces monomères de fibrine s'organisent enréseau dans les différents plans de l'espace. Ce réseau est ensuitestabilisé par des liaisons covalentes générées par le facteur XIII activé.

II.3.3 Le modèle cellulaire de la coagulation

Bien que cette description de la coagulation en cascade protéolytique des années 60 et a l'intérêt de conceptualiser le phénomène, elle ne reflète pas complètement la physiologie, ni les altérations du procédé. La vision moderne appelée modèle cellulaire de la coagulation car localisée sur des surfaces cellulaires particulières permet à la fois d'accélérer le phénomène
(phospholipides procoagulants) tout en contrôlant sa durée et son intensité spatialement au niveau du site de lésions (34-35). Dans ce modèle ou la coagulation se fait à la surface des cellules, les cellules impliquées sont essentiellement les plaquettes et les cellules endothéliales séparées entre elles par la barrière vasculaire. Lorsqu'une blessure rompt la barrière vasculaire, elle expose le FT au plasma. L'hémostase débute alors suivant trois étapes : initiation, amplification et propagation (Figure II-7) :



Figure II- 7 : Modèle cellulaire de la coagulation sanguine (d'après Hoffman 2007)

> *L'initiation*: le déclenchement du mécanisme se situe aux niveaux des cellules exposant le FT. Le facteur VII, qui circule dans le sang comme patrouilleur, se lie au FT dès son exposition à travers la brèche vasculaire pour former le complexe FT-FVIIa qui active une petite quantité de X et IX. Le Xa se lie au Va (provenant des granules α des plaquettes activées) pour former le complexe prothrombinase à la surface des cellules exposant le FT (36). Le complexe prothrombinase clive la prothrombine (II) pour générer de petites quantités de thrombine (facteur II activé). Deux inhibiteurs régulent la réponse procoagulante déclenchée permettant de limiter la coagulation au site de lésion vasculaire : le TFPI qui inhibe le complexe facteur VII activé-FT-facteur X et l'antithrombine (AT) qui neutralise le facteur X activé récemment formé et la thrombine. Ce n'est pas le cas du FIXa qui peut se déplacer vers une autre plaquette ou autre surface cellulaire car il n'est pas inhibé par le TFPI.

- L'amplification : Les petites quantités de thrombine générées à la surface des cellules porteuses de FT ont plusieurs fonctions. Tout d'abord, la thrombine a une fonction d'activation des plaquettes induisant des modifications physiologiques. Les plaquettes exposent les phospholipides membranaires à leur surface amplifiant les réactions de coagulation (37) et deviennent hautement pro-coagulantes. Ensuite, la thrombine permet aussi l'activation des facteurs V, VIII et XI à la surface des plaquettes. Ces facteurs activés vont contribuer à la génération explosive de thrombine (38).
- La phase de propagation: elle a lieu à la surface des plaquettes activées qui recrutent d'autres plaquettes. Des complexes tenases (facteur IXa facteur VIIIa) s'y forment et permettent l'activation directe du facteur X au niveau des plaquettes; complexes qui peuvent activer le X sur les plaquettes (car ce dernier ne peut pas se déplacer dans sa forme activée), et la prothombinase. La création rapide de complexes tenase et prothrombinase engendre un « burst » de génération de thrombine jusqu'à un seuil suffisant pour générer la fibrine. La fibrine est ensuite polymérisée et stabilisée par le facteur XIII. C'est la constitution d'un caillot. La fin de la coagulation débute quand le site d'initiation de la coagulation est recouvert de dépôt de plaquettes et de fibrine, les facteurs activés ne pouvant plus pénétrer au sein du caillot. La thrombine qui est produite après la formation du caillot active le TAFI. Ce dernier permet de protéger le caillot de la fibrinolyse permettant ainsi la réparation tissulaire.

Ce modèle cellulaire de la coagulation suggère bien qu'il existe les voies intrinsèques et extrinsèques dans le processus de coagulation, mais avec quelques modifications dans la définition de ces voies.

- La voie extrinsèque (ou TF) est composé du complexe TF/ FVIIa et du complexe FXa
 / Va elle agit au niveau des cellules portant le FT.
- La voie intrinsèque ne comprend pas le FXII ou de ses cofacteurs la prékallicréine et le kininogène de haut poids moléculaire, qui ne semblent pas être nécessaire. Ainsi, on considére que la voie intrinsèque comprend le FXI(a), le complexe FIXa / VIIIa, et le complexe FXa / Va. Elle fonctionne à la surface des plaquettes au cours de la phase

de propagation afin de générer une salve de thrombine comme illustré sur la Figure II-8. Ainsi, ces deux voies sont nécessaires pour l'hémostase, car elles fonctionnent sur des surfaces différentes et jouent des rôles distincts.



Figure II-8 : Voies Intrinsèque et extrinsèque dans le modèle cellulaire de la coagulation

(d'après Monroe 2005)

II.4 Les inhibiteurs naturels de la coagulation et la régulation de la coagulation

Un tel système ne peut se concevoir sans une série de systèmes régulateurs ou inhibiteurs de la coagulation. Il doit donc être vu comme un équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs. En effet l'extension des réactions de l'hémostase à distance de la brèche vasculaire est limitée, d'une part par le flux sanguin qui permet la dilution des enzymes de la coagulation,

d'autre part par différents systèmes d'inhibiteurs physiologiques, qui sont tous sous le contrôle de la cellule endothéliale. De plus, il faut souligner que le caillot de fibrine constitue un piège à thrombine. Les voies des inhibiteurs naturels de la coagulation jouent un rôle prépondérant dans la modulation de la thrombogénése. Ces voies inhibent les sérines protéases ou les cofacteurs de la coagulation. L'intervention des inhibiteurs naturels aboutit à la régulation de la génération de thrombine. Un fonctionnement déficient des voies des inhibiteurs naturels conduit à une génération de thrombine excessive, une dissémination des facteurs activés à distance de la lésion vasculaire et un arrêt catastrophique du flux sanguin dans les tissus et les organes.

Les inhibiteurs naturels de la coagulation peuvent être regroupés en deux catégories selon leur fonctionnement.

II.4.1 La voie des inhibiteurs constitutifs

Pour exemple, le TFPI, l'AT, et le deuxième cofacteur de l'héparine (HCII) inhibent de façon stoechiométrique l'activité des sérines protéases.

On trouve également la PZ ainsi que l'inhibiteur dépendant de la protéine Z (ZPI).

- La voie du facteur tissulaire (FT) est régulée par un inhibiteur plasmatique produit par la cellule endothéliale, le TFPI. Le TFPI est présent à la fois dans le sang circulant et fixé sur les glycosaminoglycanes de la paroi vasculaire.
- Le TFPI forme d'abord un complexe binaire avec le FXa puis ce complexe va se fixer sur le FVIIa lui-même lié au FT. Le complexe quaternaire Xa-TFPI-VIIa-FT bloque l'activité du FT (39,40). L'héparine libère le TFPI de la paroi vasculaire et augmente son affinité pour le FXa (41).
- L'AT est le principal inhibiteur de la thrombine mais elle inhibe également les facteurs Xa, IXa, XIa, XIIa, et la kallicréine. L'inhibition des sérines protéases se fait en deux temps : la protéase cible la liaison Arg 393-Ser 394 sur l'AT, lui permettant de former un complexe stable avec l'enzyme. Cette inhibition est lente et progressive; cependant l'AT possède un site spécifique de fixation à l'héparine et autres glycosaminoglycanes (présents au niveau de la paroi vasculaire, comme l'héparane sulfate). La liaison de l'AT aux héparane-sulfates de la paroi vasculaire

entraîne un changement de conformation de l'inibiteur, lui permettant d'inhiber rapidement la thrombine, et les FXa, IXa, XIa, XIIa. Le complexe enzyme-AT est covalent donc très stable: l'inhibition est irréversible. Une fois formé, le complexe se détache de l'héparane-sulfate et va se fixer sur un récepteur de l'hépatocyte pour être internalisé. L'héparane-sulfate est alors à nouveau disponible pour fixer l'AT. Cette fixation accélère fortement la vitesse d'inhibition de la thrombine et des autres sérines protéases (inhibition immédiate). Les enzymes de la coagulation échappent au contrôle de l'AT tant qu'elles sont liées aux phospholipides de la membrane plaquettaire mais sont accessibles quand elles diffusent vers la phase liquide et plus encore vers la paroi vasculaire. Enfin l'AT en présence d'héparine ou des glycosaminoglycanes au niveau de la paroi vasculaire inhibe le FVIIa lié au FT. Puis se forme un complexe stable AT/FVIIa qui se détache du FT (42,43).

- L'HCII est un inhibiteur de la thrombine dont l'action est catalysée par l'héparine et très spécifiquement par le sulfate de dermatane, un autre glycosaminoglycane. Il est inactif sur les facteurs Xa, IXa, VIIa, le t-PA, l'u-PA et la plasmine. Il possède donc une activité antithrombinique plus étroite que l'AT.
- La protéine Z est un facteur vitamine K-dépendant. Son rôle physiologique est resté longtemps méconnu, mais il a pu être établi ces dernières années qu'elle agit comme cofacteur d'une serpine, appelé inhibiteur dépendant de la protéine Z, qui inhibe le facteur Xa. Elle a donc un rôle «d'héparine de bas poids moléculaire naturelle». Le ZPI inhibe le facteur Xa à la surface des phospholipides, en présence de calcium et de PZ. La PZ augmente d'environ 1000 fois la vitesse d'inhibition du facteur Xa par le ZPI (44,45).

II.4.2 La voie d'inhibition dynamique.

C'est la voie de la PC qui inhibe la génération de thrombine et la génération de la prothrombinase *via* la régulation de l'activité des cofacteurs activés (46,47).

La PC est une protéine plasmatique dont l'activation est régulée par un récepteur membranaire de la cellule endothéliale: la thrombomoduline (TM). La TM est présente en grande quantité dans la microcirculation. En se fixant à la TM, la thrombine perd ses propriétés procoagulantes et acquiert des propriétés anticoagulantes: elle devient incapable de coaguler le fibrinogène et d'activer les cofacteurs V et VIII ou les plaquettes mais devient capable d'activer la PC (48). Un second récepteur, l'EPCR (endothelial protein C receptor) dont la densité est très élevée dans les gros vaisseaux (aorte) fixe la PC et accélère son activation par le complexe thrombine/TM. Son rôle pourrait être de concentrer la protéine C sur des sites où la TM est peu présente (gros vaisseaux) (49-50). La PCa est une sérine protéase. Son cofacteur, la protéine S (PS) favorise sa fixation sur les phospholipides acides des membranes cellulaires, lui permettant d'inactiver par protéolyse les FVa et VIIIa. Les complexes d'activation des FII et X ne peuvent plus se former efficacement puisque les cofacteurs Va et VIIIa ne sont plus actifs et la cinétique de production de la thrombine devient très lente. La PS circule dans le sang, liée en partie à une protéine du système du complément: la C4b Binding protein (C4bBp). Seule la PS libre (soit environ 40% de la protéine S totale) a une activité cofacteur de la PC (51-54).

Les deux systèmes associés inhibent la génération et l'activité de la thrombine ainsi que celle des complexes enzymatiques (Figure II- 9).



Figure II-9: Cibles des principaux inhibiteurs de la coagulation

Références – Chapitre II

1) Samama M.M. Physiologie et exploration de l'hémostase. Paris Doin Ed, 1990.

2) Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science 1964; 145: 1310- 12.

3) Mac Farlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism. And its function as a biochemical amplifier. Nature 1964; 202: 498-9.

4) Rapaport SI. Hemostatic mechanisms. In: Introduction to Hematology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott 1987: 455.

5) Warm-cramer BJ, Bajaj SP. Intrinsic versus extrinsic coagulation: Kinetic considerations. Biochem J 1986; 239: 757- 62.

6) Bajaj MS, Ameri A, Bajaj SP. Tissue factor pathway inhihitor-A regulator of tissue factor induced coagulation. In: Green D, ed. Anticoagulants: Physiologic. Pathologic and Pharmacologic. Florida: CRC Press 1994: 41- 65.

7) Nemerson Y, Repke D. Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII. The role of a bifunctional coagulation cofactor. Thromb Res 1985; 40: 351- 58.

8) Yamamoto M, Nakagaki T, Kisiel W. Tissue factor-dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII. J Biol Chem 1992; 267: 1989-94.

9) Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII. Additional pathway for initiating blood coagulation. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5260- 64.

10) Bajaj SP, Rapaport SI, Russell WA.Redetermination of the rate-limiting step in the activation of factor IX by factor f XIa and by factor VIIa/tissue factor. Biochemistry 1983: 22; 4047-53.

11) Rapaport SI, Rao VM. The tissue factor pathway. How it has become a "prima ballerina". Thromb Haemostas 1995; 74: 7- 17.

12) Bajaj SP, Joist JH. New insights into how blood clots: implications for the use of APTT and PT as coagulation screening tests and in monitoring of anticoagulant therapy. Seminars in Thromb Hemost 1999; 25, 4: 407- 18.

13) BauerKA, Kass BL, ten Cate H et al. Factor IX is activated by the tissue factor mechanism. Blood 1990; 76: 731- 36.

14) Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. Thromb Haemost 1999;82: 165-74.

15) Esmon CT. Regulation of blood coagulation. Biochim Biophys Acta 2000; 1477: 349-60.

16) Foster WB, Nesheim ME, Mann KG. The factor IIa-catlyzed activation of FV. J Biol Chem 1983; 258: 13970-7.

17) David EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance, and regulation. Biochemistry 1991; 30: 10363-70.

18) Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XIa is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surface. J Biol Chem 1991; 266: 7353- 8.

19) Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. Science 1991; 253: 909- 12.

20) von Dem Borne PAK, Meijers JCM, Bouma BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. Blood 1995; 86: 3035-42.

21) Rick ME. Activation of factor VIII by factor IXa. Blood 1982; 60: 744-51.

22) Neuenschwander PF, Bianco-Fisher E, Rezaie AR et al. Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. Biochemistry 1995; 34: 13988- 93.

23) Colman RW, Scott CF. When and where is factor XI activated by thrombin? Blood 1996;87: 2089- 91.

24) Walsh PN, Baglia FA, Jamenson BA. Factor XI and platelets: Activation and regulation. Thromb Haemost 1993; 70: 75- 9.

25) Monroe DM. What Does It Take to Make the Perfect Clot? Arterioscler Thromb Vasc Biol.2006; 1; 26: 41- 8.

26) Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. Thromb Haemost. 2001; 85(6): 958-65.

27) Hoffman M, Monroe DM.Coagulation 2006: a modern view of hemostasis Hematol Oncol North AM. 2007; 21: 1- 11.

28) Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin Regulation: Anesth Analg. 2009; 108: 1433- 46.

29) Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. J Thromb Haemost. 2005; 3: 2185- 92.

30) Van Dreden P, Grosley M, Cost H. Total and free levels of tissue factor pathway inhibitor: a risk factor in patients with factor V Leiden. Blood Coagul Fibrinol1999; 10, 2: 115-6.

31) Morrissey J.H, Neuenschwander P.F, Huang Q. Factor VIIa-tissue factor: functional importance of protein-membrane interactions. Thromb Haemost 1997; 78: 112- 6.

32) Van't Veer C, Mann K.G. Regulation of tissue factor initiated thrombin generation by the stoichiometric inhibitors tissue factor pathway inhibitor, antithrombin-III, and heparin cofactor-II. J Biol Chem 1997; 272: 4367-77.

33) Rao LV, Nordfang O, Hoang AD, et al. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. Blood 1995; 85: 121-9.

34) Jesty J, Lorenz A, Rodriguez J et al. Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. Blood 1996; 87: 2301-7.

35) Vasse M, Guillard C. La protéine Z : un autre facteur vitamine K-dépendant. Sang Thrombose Vaisseaux 1996; 8, 3: 176- 81.

36) Vasse M. Le complexe protéine Z-inhibiteur dépendant de la protéine Z : un nouveau régulateur de la coagulation? Sang Thrombose Vaisseaux 2002; 14, 4: 209-16.

37) Esmon C.T. The role of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation J Biol Chem 1989; 264: 4743- 6.

38) Dahlback B., Villoutreix B.O. The anticoagulant protein C pathway. FEBS Lett 2005; 579: 3310- 6.

39) Conard J, Horellou MH, Van Dreden et al. La protéine C.Rev. Med. Int 1986; 7,4: 391-404.

40) Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombincatalysed activation of protein C. ProcNatl Acad Sci USA 1981; 78: 2249- 52.

41) FukudomeK, Esmon CT. Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. J Biol Chem 1994; 269: 26486- 91.

42) Laszik Z, Mitro A, Taylor FB et al. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. Circulation 1997; 96: 3633- 40.

43) Greengard JS, Fernandez JA, Radtke KP et al. Identification of candidate residues for interaction of protein S withC4b binding protein and activated protein C. Biochem J 1995; 305: 397-403.

44) Griffin JH, Gruber A, Fernandez JA. Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. Blood 1992; 79: 3203-11.

45) Van dreden P. La proteine S. Med.Biopatho.1990; 11: 14-9.

Chapitre III :

Physiopathologie de la thrombose chez les patients canceréreux

III.1 Introduction

La physiopathologie de la thrombose chez le cancéreux est complexe et multifactorielle. Chez le patient cancéreux, tous les éléments de la triade de Virchow sont réunis. Dès 1872, Virchow a décrit la triade à l'origine de la thrombose, donc l'association de trois mécanismes principaux susceptibles de favoriser le développement de thromboses veineuses profondes: la stase veineuse, les modifications de la composition du sang et les altérations de la paroi vasculaire. Les patients cancéreux ont la particularité de présenter les trois anomalies associées et donc d'être à haut risque de thrombose (Figure III- 1). L'hypercoagulabilité rencontrée chez les patients cancéreux est en rapport avec la production par les cellules cancéreuses de substances entrant en interaction avec les plaquettes, le système de la coagulation et de la fibrinolyse. Ces facteurs ont également des actions procoagulantes directes sur les cellules endothéliales.



Figure III-1 : la triade de Virchow chez les patients cancéreux

L'ensemble de ces anomalies peuvent expliquer qu'une tumeur de petite taille (indécelable cliniquement) entraîne à distance des thromboses.

Un autre paramètre de cet état d'hypercoagulation est l'inflammation qui est intimement liée au processus tumoral, en impliquant toutes les cellules du compartiment vasculaire telles que les lymphocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules tumorales, l'endothélium et les plaquettes. En fait, la tumeur produit des substances procoagulantes qui peuvent activer la cascade de la coagulation directement ou indirectement en induisant chez le patient une réponse inflammatoire qui peut par feedback sur les cellules de la tumeur induire un release de substances procoagulantes. La progression de la tumeur, l'angiogenèse et les métastases sont influencées par l'activation de la coagulation et peuvent par feedback sur la coagulation augmenter l'effet thrombotique (Figure III- 2). A ceci, il faut ajouter les facteurs extrinsèques comme la chimiothérapie, la chirurgie, l'hormonothérapie, l'âge et l'immobilité.



Figure III-2: Interactions tumeur-inflammation-thrombose

III.2 Les trois causes majeures impliquées dans la formation d'une thrombose chez les patients atteints de cancers.

- les anomalies du flux vasculaire
- les anomalies de l'endothélium vasculaire
- les anomalies de l'hémostase (et éléments figurés du sang)

III.2.1 Les anomalies du flux vasculaire

La maladie thrombo-emboliqueveineuse est déjà connue comme une complication grave de l'alitement. La MTEV est favorisée par l'immobilisation, la stase, et l'augmentation de la viscosité sanguine que l'alitement induit. Les autres causes d'anomalie du flux vasculaire comme la déshydratation, les varices, l'insuffisance respiratoire et les antécédents de maladie thrombo-embolique sont également des facteurs de risque [1].

Chez le patient atteint d'un cancer, le phénomène de stase veineuse peut être lié à plusieurs facteurs: l'immobilisation, l'obstruction veineuse par compression extrinsèque ou l'invasion endovasculaire, ou enfin une hyperviscosité consécutive à des phénomènes inflammatoires ou dysprotéinémiques. Cette stase veineuse entraîne une diminution de la clairance des facteurs activés de la coagulation et crée des lésions hypoxiques des valvules veineuses favorisant la formation de thrombose [2]. De plus la stase crée des lésions endothéliales, en diminuant le taux de thrombomoduline liée à la surface endothéliale et en augmentant l'expression du facteur tissulaire.

	Stase Veineuse
-	Accumulation des facteurs procoagulants
-	Diminution de l'élimination des facteurs activés
-	Compression extrinsèque
-	Hyperviscosité sanguine
-	Déshydratation
-	Immobilisation

Lorsqu'une thrombose survient du fait de ce type de mécanisme, le cancer en cause est toujours à un stade développé. Une insuffisance cardiaque ou une augmentation des éléments figurés du sang (polyglobulie, hyperleucocytose, thrombocytémie) sont également plus fréquentes chez ces patients (Tableau III- 1).

III.2.2 Les anomalies de l'endothélium vasculaire

Les cellules endothéliales peuvent être en cas de cancer soit lésées par effraction, par les cellules tumorales, par la chimiothérapie, et par les cathéters, soit activées par la tumeur ellemême ou par les cytokines ce qui favorise un état prothrombotique (Tableau III- 2)

Les cellules tumorales produisent de nombreuses cytokines (TNF α , IL-1 β) responsables de lésions de l'endothélium, et du facteur de croissance endothélial (VEGF), qui sont impliqués dans le développement des troubles thrombotiques chez les patients atteints de cancer. Les cellules malignes circulantes possèdent également des propriétés d'adhésion à l'endothélium, en particulier par l'intermédiaire de molécules de type intégrine ou sélectine [3]. La paroi vasculaire peut être atteinte par invasion endovasculaire, infiltration tumorale transpariétale directe, ou simplement par un traumatisme dû aux voies d'abord veineux nécessaires aux traitements. De même la toxicité des traitements anticancéreux peut atteindre l'endothélium [4].

Lésion endotheliale
- Adhésivité accrue
- Augmentation du TF, PAI-1, du FvW
- Diminution de la thrombomoduline
- Traumatismes opératoires
- Actes chirurgicaux
- Cathéters veineux
- Produits intraveineux
- Agressifs (chimiothérapie++)
- Radiothérapie

Tableau III- 2: Lésion endothéliale et cancer

- Cette activation des cellules endothéliales augmente la sécrétion–expression: du FT, de l'inhibiteur du plasminogène de type 1 (PAI-1), du FvW, du thromboxane A2 (TX-A2), du platelet-activating factor (PAF), et libèrent des microparticules.
- La sécrétion par la cellule tumorale des cytokines comme l'IL-1β et du TNFα favorise l'état prothrombotique, en diminuant l'activité fibrinolytique, la thrombomoduline, et en augmentant l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes, du PAF, et du facteur tissulaire, cette augmentation du FT et la diminution de la thrombomoduline en association avec l'augmentation du PAI-1 rendent l'endothélium procoagulant [5].
- Le VEGF (vascular endothelial growth factor) produit par la tumeur induit également l'expression du facteur tissulaire par les cellules endothéliales. Enfin, les cytokines induisent des changements au niveau de l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales, augmentant la capacité de la paroi du vaisseau à attirer les leucocytes et les plaquettes et donc la promotion localisée de l'activation de la coagulation et la formation de fibrine [6-7]. De même les monocytes sont activés par les cellules tumorales, produisent l'expression facteur tissulaire sur leur surface [8].

III.2.3 Les anomalies de l'hémostase

L'induction de l'état procoagulant par une tumeur est un phénomène qui nécessite des interactions parfois encore mal comprises entre les cellules cancéreuses et les différentes composantes du système hémostatique, provoquant un déséquilibre entre les facteurs procoagulants et les facteurs anticoagulants. Ces interactions font intervenir des mécanismes intrinsèques et extrinsèques à la tumeur (Tableau III- 3, Figure III- 3).

L'hypercoagulabilité ou volet trois de la triade de Virchow peut être dûe à différents facteurs:

- Des facteurs intrinsèques : activités procoagulantes de la tumeur, activités fibrinolytiques, activités pro-inflammatoires, interactions entre cellules cancéreuses et plaquettes
- Des facteurs extrinsèques : comme la chimiothérapie, les cathéters....

Hypercoagulabilité		
- Augmentation du potentiel prothrombotique		
- Diminution du potentiel antithrombotique		
- La production de facteurs procoagulants (FT, CP,		
MVs.)		
- Le déséquilibre de la fibrinolyse		
- Action sur les plaquettes		
- La libération accrue de cytokines pro-inflammatoires		
- L'hypercoagulabilité iatrogène liée au traitement		
chimique antitumoral.		
- La chirurgie, les cathéters centraux.		

Les cellules tumorales peuvent exprimer des marqueurs de surface et libérer des facteurs solubles ayant une activité procoagulante, dont les deux principaux sont le FT et le « cancer procoagulant» (CP).

Les cellules tumorales libèrent également des cytokines de l'inflammation et des chémokines comme le TNF (tissue necrosis factor), l'IL-l (interleukine-1) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) qui agissent sur les leucocytes et les cellules endothéliales générant une activité procoagulante. Les mucines par activation directe du FX jouent également un rôle dans l'activité procoagulante.

III.2.3.1 La production de facteurs procoagulants (FT, CP, MVs)

L'activité procoagulante associée aux cellules cancéreuses, responsable de l'état d'hypercoagulabilité retrouvé chez les patients cancéreux, est principalement due à l'expression à la fois du facteur tissulaire et d'une protéine « cancer procoagulant » à la surface de ces cellules.



Figure III- 3 : Mécanismes de l'hypercoagulabilité dans le cancer

III.2.3.1.1 Le cancer procoagulant

La protéine «cancer procoagulant» (CP) est une cystéine protéase vitamine K dépendante qui active directement le facteur X indépendamment du facteur VIIa (sur des sites différents des autres serines proteases comme le FVII, le facteur IX et le RVV). L'activité «cancer pro-

coagulant» est spécifique des cellules cancéreuses et n'est pas présente dans les tissus sains [9-10].

Cette protéine est surtout présente au niveau des tissus néoplasiques incluant les sarcomes, les neuroblastomes, les mélanomes, les carcinomes du poumon, le cancer du sein, le cancer du rein et les leucémies [11].

Le CP est également capable d'activer les plaquettes par un mécanisme proche de la thrombine.

Bien que rencontrée dans de nombreux cancers son rôle en tant que marqueur ou facteur prédictif de la thrombose n'a pas été montré.

III.2.3.1.2 Le facteur tissulaire

> Activité procoagulante du facteur tissulaire

L'activité procoagulante associée aux cellules cancéreuses, responsable de l'état d'hypercoagulabilité retrouvé chez les patients cancéreux, est due en grande partie à l'expression du facteur tissulaire, d'une part par la tumeur elle-même, mais également par l'endothelium et les cellules activées par l'inflammation.

Le FT glycoprotéine transmembranaire. l'initiateur est principal de la coagulation normale, il forme un complexe avec le facteur VIIa (FT / FVIIa) pour déclencher la coagulation sanguine en activant protéolytiquement les FIX et FX. La cellule endothéliale tapisse sous forme d'une monocouche cellulaire l'ensemble de l'arbre vasculaire et est en interface direct avec le flux sanguin. Elle est physiologiquement non thrombogène car présente sur sa surface apicale des glycoaminoglycanes (GAG) et de la thrombomoduline. Elle présente aussi une activité profibrinolytique en étant capable de relarguer de grandes quantités de tissue Plasminogen Activator (t-PA). Au repos, la cellule endothéliale ne synthétise pas de FT. Cependant dans le cancer l'endotoxine, le TNFα ou l'IL-1β induisent sa synthèse tout en diminuant l'activité de la thrombomoduline. La formation de la thrombine peut activer la cellule endothéliale en se liant à ses récepteurs PARs membranaires. A l'inverse le FT est constitutivement exprimée par des cellules malignes des cancers [12-13].

Activité du facteur tissulaire dans l'angiogenèse

Le FT contribue à la croissance tumorale selon deux mécanismes (Figure III- 4). D'une part, via la coagulation et la génération de thrombine, il est un puissant activateur de l'angiogenèse et du processus métastatique via les récepteurs protease-activated receptor (PAR-1, PAR-3 et PAR- 4) couplés à des protéines G régulatrices.

D'autre part, de manière indépendante de la coagulation, l'extrémité intracyto-plasmique du FT est impliquée via le jeu de diverses kinases (MAP kinase P38, ERK.1/2) et de certains gènes (K-ras ou p53, par exemple) dans le remodelage vasculaire, l'angiogenèse via le VEGF et la progression tumorale. Le FT participe ainsi activement aux modifications du microenvironnement tumoral [12-15].



Figure III- 4 : FT et angiogenèse

> Action du facteur tissulaire indépendante de la thrombine sur l'angiogenèse

La tumeur ou la cellule endothéliale secrète de la protéine kinase C qui en phosphorylant la partie sérine intra cytoplasmique du FT va induire au niveau du noyau la synthése de VEGF proangiogénique et la diminution de thrombospondine anti angiogénique, mais va également induire une expression accru de FT et donc augmenter la prolifération des cellules endothéliales, cette action du FT est indépendante du FVII.

D'autre part la fixation du facteur VII sur le FT va engendrer une augmentation du calcium intracellulaire qui va permettre l'attachement de ABP 280 entraînant un assemblage des filaments d'actine, et donc augmenter l'adhésion et la migration cellulaire (

Figure III- 5).



Figure III-5 : Action du FT indépendante de la thrombine sur l'angiogenèse

(d'après Rickles 2003)

> Action du facteur tissulaire indépendante de la coagulation sur l'angiogenèse

Dans une seconde voie le FT en présence de VIIa par l'intermédiaire de la thrombine et indépendamment de la fibrine, va induire l'angiogenèse en clivant les récepteurs endothéliaux PARs.

Au niveau du PAR2 cette activation se fait par le couple FVIIa-TF.

- soit par activation de la protéine G ayant pour effet: une augmentation des régulateurs immuns, une augmentation de l'angiogenèse et une diminution de l'apoptose
- soit par recrutement de la beta arrestins ayant un effet sur la migration cellulaire

L'activation directe de PAR-2 par le complexe TF-VIIa contribue aussi à la prolifération tumorale via des effets anti-apoptotiques et l'induction de diverses cytokines et autres régulateurs angiogéniques [15-18].

Au niveau du PAR 1 et 3, cette activation nécessite le complexe FT-VIIa-Xa et a un effet d'augmentation de l'angiogenèse via une augmentation de la P-selectine, du VEGF, des MMPs, de l'IL-6 et 8 mais induit également une augmentation du FT (Figure III- 6).



Figure III- 6 : Action du FT indépendante de la coagulation sur l'angiogenèse (d'après Rickles 2003).

> Action du facteur tissulaire dépendant de la coagulation

Le FT va par la formation du IIa activer des plaquettes, augmenter la production de facteurs pro-engiogeniques comme le VEGF, PDGF, augmenter la production demolécules d'adhésion, l'expression de CD40 et donc agit sur l'angiogenèse.

La formation du complexe FT-FVIIa agissant sur la thrombine va générer de la fibrine. La formation de fibrine va dans un premier temps diminuer la migration des cellules et donc les concentrer, puis dans un second temps lorsque la fibrinolyse va débuter, la formation de plasmine va diminuer la matrice de fibrine et permette la migration des cellules dans le gel vers le site de réparation (Figure III-7)

Donc la fibrine générée favoriserait la dissémination métastatique en facilitant l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire et en les protégeant de l'agression du système immunitaire. La production d'une protéine factor XIII-like a également été rapportée dans le cancer et elle serait responsable d'une stabilisation accrue des monomères de fibrine [19-20].



Figure III- 7 : Action du FT dépendante de la coagulation sur l'angiogenèse

(d'après Rickles 2003)

III.2.3.1.3 L'alternatively spliced tissue factor (asTF)

Un isoforme du FT a été identifié par Bogdanov *et al.* en 2003 [22]. Ce variant, appelé asTF (*alternatively spliced tissue factor*) résulte d'un épissage de l'exon 5. Cette forme comporte les 4 premiers exons du FT, le cinquième ayant été exclu lors de l'épissage alternatif. L'exon 6 persiste mais est modifié (Figure III- 8). Au niveau protéique, cela aboutit à une forme tronquée qui n'a plus de domaine transmembranaire ce qui explique aussi que l'asTF soit soluble. L'asTF comprend 206 aa, avec une séquence d'acides aminés 1-166 identique au domaine extracellulaire du FT avec une séquence C-terminale de 40 aa qui lui est spécifique [23].

En dépit de l'absence du domaine transmembranaire et de la queue intracytoplasmique, l'AsTF aurait encore une activité procoagulante. Cette propriété a été montrée en présence de phospholipides: l'AsTF est alors capable de s'incorporer au thrombus généré *in vitr*o et pourrait ainsi stimuler la croissance du caillot de fibrine [24].



Figure III- 8: Représentation schématique du gène F3, des ARNm et des isoformes FT et asTF (d'après Rollin 2012)

D'autre part, plus récemment, il a été montré qu'après libération de l'AsTF par des HUVECs en réponse à une cytokine pro-inflammatoire, le TNF α , il existait une forte génération de facteur Xa [25]. Cependant, d'autres travaux ont montré que cette forme de FT n'a pas d'activité procoagulante mais pourrait en revanche favoriser la croissance tumorale et l'angiogenèse, l'impact de cette action procoagulante reste à discuter. La concentration plasmatique d'asTF peut représenter jusqu'à 30 % de la quantité totale circulante de facteur tissulaire [26]. L'AsTF a été détecté dans les poumons, le placenta, le pancréas, le plasma mais surtout dans les tumeurs : glioblastome, mélanome, adénocarcinome de l'estomac et colorectal, et dans des cellules squameuses issues de lignées carcinomateuses. En dehors du cancer, l'asTF plasmatique est d'origine monocytaire et endothéliale. Les cellules endothéliales synthétisent l'asTF à un niveau basal faible, mais cette expression est fortement induite en réponse à l'IL-6 ou au TNF α [27]. Les mécanismes régulant l'expression de l'asTF restent encore mal connus.

Au niveau du cancer il a était montré que les cellules de tumeurs pancréatiques exprimant l'AsTF produisent plus de vaisseaux sanguins [28]. Ces résultats suggèrent que l'AsTF représente un mécanisme pro-angiogénique de l'AsTF qui semble être indépendant de la génération de thrombine [29-30]. Cependant, le mécanisme n'est pas encore connu. Une des possibilités est que l'AsTF stimule les cellules cancéreuses pour produire des facteurs d'angiogenèse. D'autre part une expression plus élevée de l'asTF, comparativement au poumon non atteint, a été mesurée dans les tumeurs de patients ayant un cancer bronchopulmonaire non à petites cellules [31]. Contrairement à ce qui a été montré avec le FT entier, aucune relation n'a été mise en évidence, dans le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules, entre la synthèse tumorale des ARNm spécifiques de l'asTF et la présence de mutations affectant les gènes KRAS, p53 suggèrant donc que les mécanismes régulant l'expression tumorale du FT et de l'asTF sont différents. Un niveau élevé de synthèse tumorale des ARNm de l'asTF paraît être un facteur de mauvais pronostic dans le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules [31]. Les propriétés proangiogéniques de l'asTF ont été étudiées par Van den Berg et al., qui ont montré que l'asTF participait à la migration des cellules endothéliales et à la formation des capillaires en interagissant avec les intégrines $\alpha_{v}\beta_{3}$ et $\alpha_{6}\beta_{1}$ [32]. Il a egalement mis en evidence que le taux d'asTF dans le cancer du pancreas est lié à l'agressivité de la tumeur [33]. L'ensemble de ces données suggère que l'asTF pourrait physiologiquement participer à des processus qui sont différents de ceux contrôlés par le FT entier. À ce titre, l'asTF n'est pas capable d'activer la voie du récepteur PAR 2 présent à la surface des cellules endothéliales, contrairement au FT entier.

III.2.3.1.4 Les Microparticules procoagulantes

Le sous-comité de standardisation en biologie vasculaire de la société internationale de thrombose et d'hémostase (ISTH) définit les microparticules (MPs) comme des vésicules de tailles hétérogènes, comprise entre 0.1 et 1 μ m, résultant du bourgeonnement de la membrane cellulaire de la plupart des cellules activées ou apoptotiques. Elles sont retrouvées dans le culot d'une centrifugation rapide d'un plasma déplaquetté ou d'un surnageant de culture. Elles expriment généralement de la phosphatidylsérine (PS) et différentes molécules de la cellule d'origine permettant leur identification. [34-35].

Les mécanismes de formation des microparticules ne sont pas parfaitement élucidés, actuellement les explications de ce phénomène font intervenir au moins deux types d'événement: un remaniement des phospholipides de la membrane plasmique et un réarrangement du cytosquelette qui conduisent au bourgeonnement cellulaire.

De part leur mécanisme de formation, les MPs sont composées d'une membrane phospholipidique qui porte des caractéristiques antigéniques spécifiques de la cellule émettrice (cytoadhésines, glycoprotéines...). Néanmoins, la représentation relative des antigènes entre la cellule mère et la MP sont susceptibles d'être différent. Les MPs sont de véritables effecteurs bioactifs jouant un rôle physiopathologique important dans de nombreuses réponses de l'organisme comme l'hémostase, la thrombose, l'inflammation, le tonus vasculaire, la réponse immunitaire, l'angiogenèse et la croissance tumorale. Grâce à leur petite taille, les MPs circulent tout le long de l'arbre vasculaire ce qui leur permet de participer à la fois à des phénomènes locaux ou distants. Outre leurs fonctions propres, ces éléments apparaissent véritablement comme un moyen de communication intercellulaire important par interaction avec des récepteurs, par transfert de molécules de surfaces ou de contenu cytoplasmique protéique ou génétique.

Le rôle des microparticules est donc plurifactoriel. En effet, elles agissent sur la coagulation, l'adhésion, la fibrinolyse, l'angiogenèse, et la croissance tumorale (Figure III- 9).



Figure III- 9 : Représentation du panel de molécules transportées par les microparticules et leurs effets associés

(modifié de Dignat-George 2011)

Au niveau du cancer : les cellules cancéreuses peuvent par microvésiculation membranaire produire des MPs donc les actions sont multiples :

- Au niveau de la coagulation une des caractéristiques principales des MP est qu'elles ont un fort pouvoir procoagulant, dépendant d'une part de la phosphatidyl serine (PSer) qu'elles expriment à leur surface (fournissant dans le compartiment vasculaire des surfaces phospholipidiques additionnelles), et d'autre part parce qu'elles peuvent porter également le FT qui initie la cascade de coagulation [37-38]. La PSer augmente également l'activité procoagulante du facteur tissulaire (FT) qui en présence du FVIIa est capable d'initier la voie extrinsèque de la coagulation aboutissant à la génération de thrombine. La P-sélectine joue un rôle important dans l'initiation du processus thrombotique en recrutant des MPs porteuses de PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) riches en facteur tissulaire et permettant leur fixation. L'activité facteur tissulaire du compartiment vasculaire est ainsi médiée par les MPs. En effet, il a été demontré que les MPs-TF⁺constituaient la forme circulante du FT (blood borne-TF) alors que le facteur tissulaire clivé, dépourvu de phospholipides, était sans action procoagulante. Les MPs induisent également la synthèse de facteur tissulaire par les monocytes, augmentant le phénoméne procoagulant. Une autre propriété des MPs est qu'elles peuvent se lier au fibrinogène soluble ou immobilisé au sein d'agrégats leucoplaquettaires permettant de concentrer l'activité facteur tissulaire au site de formation du thrombus. Si la résultante des activités des MPs sur l'équilibre hémostatique semble clairement pro-coagulante, des protéines anticoagulantes ont été également mises en évidence à leur surface. Ainsi les MPs dérivées de monocytes sont porteuses de thrombomoduline [39] et d'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) [40]. Les MPs d'origine cancéreuse montrent également une activité procoagulante dépendante du facteur tissulaire. Ainsi la problématique du lien entre les MPs et les thromboses associées aux cancers est un sujet important dans la littérature. Bien qu'un nombre important de données existe pour supporter l'implication physiopathologique des MPs dérivées de cellules cancéreuses dans les thromboses liées aux cancers [41-42] le lien de causalité n'est pas encore totalement établi.

- Au niveau de la fibrinolyse: l'activité fibrinolytique des MPs a également récemment été mise en évidence. Les MPs expriment des sites de liaison du plasminogène, qui joue un role pivot dans la fixation initiale du plasminogène via ses sites de liaison à la lysine. D'autres récepteurs du plasminogene, comme l'annexine II, pourraient être également présents sur les MPs en fonction de leur origine cellulaire. L'uPA liée à son recepteur uPAR sur ces MPs, transforme le plasminogene en plasmine, laquelle peut agir sur la fibrine ou participer à la dégradation de proteines matricielles directement ou en activant des MMPs. Ces MPs représentent donc des surfaces catalytiques capables de transformer le plasminogène en plasmine, grâce à l'expression du système de l'urokinase et de son recepteur. *In vivo*, les MPs dotées de cette fonction pourraient donc former et transporter la plasmine et developper ainsi non seulement une activite fibrinolytique mais participer également à la migration cellulaire et à l'angiogenese [43].

- Au niveau de l'angiogenèse: les MPs interviennent à trois niveaux: la dégradation _ matricielle, le recrutement et la différenciation des progéniteurs endothéliaux, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les cellules tumorales malignes possèdent un potentiel protéolytique important, caractérisé par la production de MMP et d'uPA, nécessaires à leur dissémination et à l'invasion tissulaire. Les microvésicules générées par les cellules cancéreuses jouent un rôle important dans l'angiogenèse tumorale en véhiculant et en transférant des oncoprotéines telles que EGFRvIII aux cellules endothéliales environnantes [44]. Le transfert d'EGFRvIII stimule l'activation des voies MAPK et AKT, et déclenche ainsi la production de VEGF [45]. De plus, le FT porté par les MPs est un puissant régulateur de l'angiogenèse en particulier, il augmente la synthèse du VEGF. De nombreux agonistes vasculaires comme le VEGF, le PAI-1 et le fibroblast growth factor (FGF) sont par ailleurs impliqués dans la formation des MPs porteuses de métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9). Les mécanismes à l'origine de l'effet des MPs sur l'angiogenèse impliquent probablement les radicaux libres oxygénés, les MMPs et les facteurs de croissance tels que le VEGF ou la sphingomyéline.
- Au niveau de l'inflammation: les MPs jouent un rôle dans la modulation de l'inflammation dans le compartiment vasculaire. L'effet pro-inflammatoire des MPs implique les phospholipides oxydés capables d'activer les récepteurs du PAF (facteur de l'activation plaquettaire) présents sur les cellules endothéliales et les leucocytes. Les MPs constituent également une source importante de substrat pour la phospholipase A2, générant l'acide lysophosphatidique, un puissant médiateur proinflammatoire et agoniste plaquettaire. L'acide arachidonique transporté par les MPs induit une augmentation de l'expression membranaire des molécules d'adhésions, les ICAM-1 favorisant les interactions leuco-endothéliales. Les MPs d'origines plaquettaires ou leucocytaires induisent la libération de plusieurs cytokines endothéliales (II-1b, II-6, II-8, MCP-1) ou monocytaires (II-1b, TNFa, II-8) renforçant ainsi la réponse inflammatoire [46-49].

Les implications des microparticules sont regroupées dans le Tableau III-4.

- Les MPs régulent le tonus vasculaire par diminution de la production de monoxyde d'azote.

- Les MPs circulantes affectent la réparation de l'endothélium par les cellules progénitrices.

- Les MPs endothéliales agissent sur l'angiogenèse au niveau de la dégradation matricielle, au niveau du recrutement et de la différenciation des progéniteurs, et enfin au niveau de la prolifération et migration (ceci par l'intermédiaire des MMPs).

- Les MPs au niveau de l'hémostase ont plusieurs rôles: par leur surface riche en PhSer elles permettent la formation de la tenase et de la prothrombinase, elles permettent également l'assemblage du complexe de la protéine C, elles augmentent l'activité procoagulante du FT.

- Les interactions P-selectine / MP semblent importantes également dans le processus thrombotique ; la P-selectine permettrait le recrutement des MPs porteuses de PSGL-1 riche en FT. La P-selectine induit également la synthèse de FT par les monocytes, qui se lie au fibrinogène soluble au sein de l'agrégat leucoplaquettaire concentrant au site de lésion l'activité FT.

- La formation des complexes MP-Plaquettes-monocytes augmente la synthèse de cytokines et de radicaux de l'oxygène capables d'augmenter l'expression du FT à la surface endothéliale et d'inhiber l'expression duTFPI.

- L'acquisition de FT par les plaquettes et les MP résulte de transfert intercellulaire suite à une stimulation proinflammatoire, ou aux monocytes activés.

- Les MPs pourraient également participer à l'instabilité de la plaque d'athérome en favorisant la dégradation de la charpente fibreuse.

- Les interactions selectines/MP contribuent à l'incrémentation du thrombus veineux.

- Les MPs modulent l'inflammation par la libération de cytokines : IL1, IL6, IL8 (endothéliales) et IL1, TNF, IL8 (monocytaires).

- Les MPs ont une fonction profibrinolytique par génération de plasmine.

III.3 Le déséquilibre de la fibrinolyse

Le système de la fibrinolyse est également touché dans le contexte tumoral avec une modulation de sa régulation. En effet, les tumeurs secrètent la plupart des facteurs de la fibrinolyse (u-PA, t-PA, PAI-1 et 2) et expriment à leurs surfaces des récepteurs de l'u-PA (u-PAR). Il semble de plus établi que les protéases, dont l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA), jouent un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire, considérée comme une des étapes majeures du processus métastatique. L'interaction entre cellules cancéreuses et système fibrinolytique est complexe et la résultante peut se traduire par des manifestations hémorragiques, par activation de la fibrinolyse, ou au contraire favoriser le développement de thromboses par inhibition de la fibrinolyse. Le système fibrinolytique est aussi fortement impliqué dans la prolifération tumorale, le développement de métastases et l'angiogenèse. Parmi les activateurs physiologiques de la fibrinolyse, l'urokinase type plasminogen activator (u-PA) et son récepteur cellulaire (u-PAR) ainsi que le PAI-1 semblent être les acteurs les plus impliqué [50-51].

Le système de la fibrinolyse peut au niveau du cancer jouer à différents niveaux (Tableau III-5):

- Au niveau de la prolifération et de l'apoptose
- Au niveau de la migration et de l'invasion
- Au niveau de l'angiogenése

Tableau III- 5: Implications de la fibrinolyse dans le cancer



Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI-1, PAI-2), produits par les cellules tumorales en grande quantité, de par leur activité inhibitrice de la fibrinolyse, augmentent l'état d'hypercoagulabilité et donc contribuent vraisemblablement au développement de thromboses veineuses dans la pathologie cancéreuse. De plus, il semble que le PAI-1, en association avec l'u-PA, l'u-PAR et le plasminogène, facilite l'invasion cellulaire et l'angiogenèse dans les cancers. Enfin, les cellules cancéreuses produisent un certain nombre de cytokines qui interfèrent avec l'endothélium vasculaire. Entre autres, l'IL1 β et le TNF α libérés par les cellules cancéreuses d'une part induisent l'expression de facteur tissulaire et de PAI-1 et, d'autre part, diminuent l'expression de la thrombomoduline et de l'activateur tissulaire du plasminogène, transformant ainsi l'endothélium non thrombogène en endothélium thrombogène [52-54].

L'expression à la surface des cellules endothéliales du récepteur à l'u-PA induite par le VEGF et la libération du t-PA par ces cellules, entraînent la transformation du plasminogène en plasmine dans l'atmosphère péricellulaire, là où l'angiogenèse doit s'effectuer. Cette plasmine permet la digestion du réseau de fibrine et d'autres protéines de la matrice extracellulaire, directement ou indirectement par activation des métalloprotéases, et permet donc la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes capillaires. Cependant, et provoquant un effet inverse, la plasmine et l'urokinase clivent le VEGF, celui-ci ayant alors une activité angiogénique atténuée.

L'u-PA est exprimé par un grand nombre de types cellulaires et sa surexpression est souvent corrélée à la tumorigenèse. Le système plasminogène/plasmine régule la migration cellulaire.



Figure III- 10 : Régulation de l'adhésion cellulaire dépendante de l'u-PAR par le PAI-1 et l'u-PA

La tumeur peut également moduler l'expression du PAI-1, ce qui provoque une diminution de la fibrinolyse au profit de la coagulation. Dans les conditions cancereuses, plusieurs autres tissus sécrètent de grandes quantités de PAI-1, comme par exemple les cellules tumorales, les cellules endothéliales en réponse aux cytokines inflammatoires et d'autres cellules activées par l'inflammation. Depuis quelques années, il est devenu évident que le PAI-1 pouvait influencer le comportement des cellules à travers des activités indépendantes de ses effets inhibiteurs sur u-PA et t-PA et sur la génération de plasmine. En particulier, le PAI-1 module l'adhésion et la migration cellulaire, et apparaît jouer un rôle important dans l'inflammation, l'angiogénèse et la formation de métastases [55-56]. Ces activités impliquent des intéractions complexes entre le PAI-1, la vitronectine, et l'u-PAR et certains récepteurs d'intégrines avec des implications différentes, selon le type cellulaire et la composition de leur microenvironnement immédiat (Figure III- 10 et Figure III- 11).



Figure III- 11 : Les différentes actions du PAI-1

III.4 Plaquettes et cancers

Les plaquettes sont fortement affectées dans le cancer, plus de 30% des patients présentent des thrombocytoses et moins de 11% des thrombocytopenies [1]. En effet, dans différents types de cancers (poumon, rein, gastrique, colorectal et sein), il a été observé qu'un nombre élevé de plaquettes était associé à une baisse du pronostic vital des patients [57]. A l'inverse une diminution du nombre de plaquettes dans le sang entraîne une réduction du nombre de métastases [58], et même une déplétion du sang en plaquettes conduisait à un effet antimétastatique [59-60]. Le rôle des plaquettes dans le processus cancéreux est clairement établi et semble pouvoir agir à différents niveaux. En effet, une succession d'évènements est nécessaire à l'évolution d'une tumeur primaire en cancer avancé avec présence de métastases. Ces étapes, sont les suivantes : 1) croissance d'une tumeur primaire ; 2) vascularisation de cette tumeur par angiogenèse ; 3) détachement d'un certain nombre de cellules tumorales et entrée dans la circulation sanguine par intravasation ; 4) adhésion de ces cellules tumorales à la paroi vasculaire au niveau d'un site secondaire situé à distance ; 5) sortie de la circulation par extravasation ; et 6) migration à travers les tissus pour former une colonie secondaire ou métastase (Figure III- 12). Lors de leur passage dans la circulation sanguine, les cellules tumorales forment rapidement des micro-emboles par association avec des plaquettes et des leucocytes qui vont permettre aux plaquettes de protéger les cellules tumorales. D'autre part, les plaquettes peuvent protéger les cellules tumorales d'une clairance précoce par le système immunitaire. Elles peuvent aussi promouvoir l'adhésion des cellules tumorales à la paroi vasculaire et favoriser ainsi leur extravasation. En relargant des facteurs de croissance, des agents mitogènes et pro-angiogéniques, les plaquettes ont un effet stimulateur sur la prolifération des cellules tumorales et sur l'angiogenèse. Il semble donc que différents mécanismes sont associés aux fonctions des plaquettes dans le processus de métastase : l'agrégation des plaquettes avec les cellules de la tumeur, l'implication dans l'invasion, l'adhésion, et l'angiogenèse (Tableau III- 6).

Tableau III- 6: Mécanismes d'action des plaquettes dans la croissance tumorale

- Effet pro(-anti) -angiogénique
- Effet pro-adhésif
- Effet sur la prolifération
- Effet protecteur



Figure III-12 : Les différentes étapes du processus de tumorigenèse

(d'après Fribourg 2006)

III.4.1 Effet pro et anti-angiogénique

Les plaquettes sont une source non négligeable de facteurs pro- et anti-angiogéniques même si la tumeur a elle-même la capacité de produire la plupart de ces facteurs impliquées dans l'angiogenèse. La libération par les plaquettes de ces agents va permettre d'influencer les processus de tumorigenèse. (Figure III- 12).

Parmi les facteurs pro-angiogéniques on peut citer principalement: le VEGF qui est libéré par les plaquettes une fois celles-ci stimulées par la thrombine, le FGF-2, l'angiopoiétine 1, l'EGF

(epidermal growth factor), le PDGF, la sphingosine-1-phosphate et l'HGF. Le VEGF joue un rôle essentiel dans les processus d'angiogenèse et de croissance tumorale.

Le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales, leur mobilité et la perméabilité vasculaire en agissant sur des récepteurs à activité tyrosine kinase présents à la surface des cellules endothéliales. Une fois sécrété par les plaquettes activées, le VEGF peut également stimuler la libération du FvW des cellules endothéliales influençant ainsi l'adhésion plaquettaire et l'agrégation des cellules tumorales aux plaquettes. In vivo, il a été observé que la concentration en VEGF était corrélée de façon positive au nombre de plaquettes et qu'une forte concentration était associée à une réduction du pronostic vital chez les patients cancéreux [61-67]

L'angiopoïetine-1 a une action complémentaire et collabore avec le VEGF pour stabiliser les cellules endothéliales en prolifération. Le bFGF exerce un effet direct sur les cellules endothéliales, en stimulant leur prolifération et en inhibant leur apoptose mais agit également en augmentant l'expression du VEGF. Dans le processus tumoral, l'action de l'HGF secreté par les plaquettes semble également importante car en plus de stimuler l'expression du VEGF, il réduit l'expression de la TSP1.

- Parmi les agents anti-angiogéniques qui proviennent de l'activation des plaquettes, le PF4, la thrombospondine, le TGF-beta 1, le PAI-1 semblent avoir une importance dans le processus de métastase.

- *Le facteur 4 plaquettaire (PF4)* favorise la formation des caillots en inhibant l'activité antithrombotique de l'antithrombine. Il se lie aux glycosaminoglycanes de la cellule endothéliale qui perdent alors leur capacité à fixer les facteurs de croissance contenant un site de liaison à l'héparine (HBGF : heparin binding growth factor, VEGF, FGF...) d'où un effet anti angiogénique en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales

- *La thrombospondine-1* (*TSP-1*) est une glycoprotéine contenue dans les granules alpha plaquettaires; elle est également sécrétée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les macrophages, et peut être incorporée dans la matrice extracellulaire où elle peut se lier à différents constituants (fibronectine, collagène...). Elle peut se lier également aux glycosaminoglycanes heparin-like, à CD36 (GPIIIb) et à l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ des surfaces endothéliales. Cette multiplicité de liaison de la thrombospondine-1 en fait un facteur anti-angiogénique. En plus de son rôle dans l'agrégation plaquettaire, la thrombospondine, par cette liaison à différents constituants de la matrice extracellulaire, inhibe l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice, favorisant ainsi leur migration.
- Le TGF-β1 (transforming growth factor beta1) contenu également dans les granules alpha plaquettaires inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, in vivo le TGF-beta1 est considéré comme favorisant l'angiogenèse, par recrutement des macrophages qui fournissent de nombreux facteurs angiogéniques.

- *Le PAI-1* est également contenu dans les granules alpha plaquettaires. Le PAI-1, libéré par les granules alpha de la plaquette, en inhibant la formation de plasmine, inhibe l'angiogenèse induite par celle-ci.

- *L'a2-antiplasmine et l'a2-macroglobuline* des granules α ont potentiellement des effets régulateurs de l'angiogenèse similaires à ceux du PAI-1.



Figure III- 13: Les différents mécanismes par lesquelles les plaquettes peuvent favoriser la croissance tumorale et le développement des métastases

(d'après Fribourg 2006)

III.4.2 Effets sur l'adhésion

La sortie des cellules tumorales du système vasculaire pour aller former des métastases est facilitée par la formation de complexes entre plaquettes, cellules tumorales et leucocytes. Il a ainsi été montré que le potentiel métastatique d'une lignée tumorale dépend directement de sa capacité à activer et à agréger les plaquettes. Il est à noter que chez les patients atteints d'un cancer à un stade avancé, l'expression de molécules d'adhésion est augmentée au niveau plaquettaire, indiquant un état activé des plaquettes. Les plaquettes favorisent le développement métastatique en facilitant non seulement l'arrêt des cellules tumorales dans la circulation sanguine mais également leur adhésion à l'endothélium. Comme pour l'hémostase, l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium exposé fait intervenir une liaison entre la glycoprotéine (GP) Ib plaquettaire et une protéine adhésive plasmatique, le FvW [68]. Un rapport a confirmé la synthèse d'une glycoprotéine similaire à la GPIb plaquettaire dans les cellules MCF7 [69]. Le processus d'adhésion plaquettaire est ensuite amplifié par l'activation des plaquettes entraînant la surexpression et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [70]. Finalement, les plaquettes activées vont recruter de nouvelles plaquettes par l'intermédiaire d'interactions entre $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le FvW ou le fibrinogène conduisant ainsi à l'agrégation plaquettaire et à la formation du thrombus. La capacité des cellules tumorales à activer les plaquettes peut donc éventuellement avoir pour but de stimuler le relargage à partir des granules α , de ces mêmes molécules potentiellement pro-adhésives et/ou pro-agrégantes tels que le FvW, le fibrinogène, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la P-sélectine [71-72].

L'interaction des plaquettes avec les cellules tumorales implique deux types de médiateurs : des molécules exprimées à la surface cellulaire telles que les molécules d'adhésion mais également des produits secrétés et solubles tel que le 12(S)-HETE, un métabolite de l'acide arachidonique. La production de 12(S)-HETE par les plaquettes activées et par de nombreuses cellules tumorales facilite le processus métastatique.

Par ces mécanismes les plaquettes contribuent à fixer les cellules tumorales dans le lit vasculaire et à les protéger des forces de cisaillement du flux circulatoire (*shear-stress*), les emboles tumoraux, engainés par la fibrine et les plaquettes, peuvent se disséminer dans le flux circulatoire et favoriser le processus métastatique (Figure III- 13).

III.4.3 Effets sur la prolifération

Les plaquettes en produisant des agents mitogènes jouent un rôle stimulateur dans la prolifération des cellules tumorales. En effet, les plaquettes présentes dans la circulation sanguine sont source d'acide lysophosphatidique (LPA). Le LPA qui a des propriétés similaires à celles de facteurs de croissance est relargué par les plaquettes après activation par la thrombine. Le LPA ainsi secrété stimule non seulement la survie de cellules tumorales provenant de nombreux types de cancer mais aussi leur migration et leur prolifération en agissant sur des récepteurs couplés à la protéine G [73-74].

La thrombine générée lors de l'activation de la cascade de coagulation par les cellules tumorales peut également être considérée comme un agent mitogène. La thrombine active les cellules tumorales et mobilise l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ permettant alors à cette intégrine de se lier à ses ligands, la fibronectine et le FvW [75]. L'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales est également augmentée par la thrombine. La majorité des cellules tumorales expriment des récepteurs de la thrombine, les PARs et ont également la capacité de générer elles-mêmes de la thrombine. La thrombine augmente l'expression des récepteurs au VEGF, ce qui pourrait augmenter l'intensité de la réponse au VEGF; elle entraîne également la libération du VEGF intraplaquettaire, ainsi que d'autres facteurs des granules alpha plaquettaires, et l'expression et la libération du FGF-2 (puissant facteur angiogénique) par les cellules endothéliales. Elle inhibe l'adhésion des cellules endothéliales à la laminine et au collagène de type IV; ces cellules peuvent donc migrer plus facilement. Elle active la collagénase IV, ce qui dissout la membrane basale et permet la migration des cellules endothéliales dans les premières phases de l'angiogenèse et entraîne la libération de t-PA et PAI-1 par la cellule endothéliale. La thrombine induit également une augmentation de la sécrétion sur la surface basolatérale de la cellule endothéliale de protéines de la matrice extra-cellulaire (fibronectine et collagène de type I), ce qui est indipensable aux étapes finales de l'angiogenèse, lorsque les cellules endothéliales nouvellement produites adhèrent à une nouvelle matrice pour former un nouveau vaisseau. Enfin la thrombine, en activant les macrophages, induit la libération de TNF-alpha (tumor necrosis factor) et de FGF-2, et a ainsi un effet angiogénique indirect.

Il semble donc que les cellules tumorales soient capables de s'auto-activer afin d'acquérir un phénotype métastatique plus agressif [76]. Les PARs sont également présents sur les plaquettes. La production de thrombine n'est pas la seule source des cellules tumorales pour activer les plaquettes. Elles sont capables de produire du facteur tissulaire ou de l'adénosine

diphosphate (ADP), qui vont également conduire à l'activation plaquettaire. En fait dans ce processus de métastase quel que soit le mode d'activation des plaquettes, un certain nombre de molécules (ADP, thromboxane A2, sérotonine...) vont être libérées des granules, amplifiant ainsi les phénomènes de croissance tumorale ou d'agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales.

III.4.4 Effets protecteurs

La grande majorité des cellules tumorales est éliminée par le système immunitaire mais certaines d'entre elles vont bénéficier d'une protection grâce à leur interaction avec les plaquettes. Ce rôle protecteur peut probablement s'exercer de deux manières différentes :

- Le premier mécanisme est qu'en relarguant l'acide 12(S)-hydroxyéicosatétraénoïque (12(S)-HETE), les plaquettes protégeraient les cellules tumorales de la cytotoxicité et de la cytolyse entraînées par le facteur nécrosant des tumeurs- α (TNF- α). Le 12(S)-HETE, induisant la rétractation des cellules endothéliales, facilite l'extravasation des cellules tumorales et leur développement métastatique [77].

- Les plaquettes interviennent en formant des agrégats autour de ces cellules tumorales, les soustrayant ainsi de la lyse induite par les cellules NK (*natural killer*). Différents facteurs solubles issus des plaquettes inhibent l'activité des cellules NK comme la PGE2 et le TGFβ [78].

Il semble donc que l'un des mécanismes par lesquels les plaquettes vont favoriser le développement métastatique, s'appuie sur leur capacité à empêcher les cellules tumorales d'être détruites par les cellules NK [61].

III.5 Tumeur et inflammation

La tumeur relâche dans son environnement certaines cytokines favorisant l'établissement d'un état inflammatoire. Ces cytokines, entre autres, le TNF- α et l'interleukine-1b induisent l'expression de FT et de PAI-1 en plus de diminuer l'expression de la thrombomoduline au niveau des cellules endothéliales. De surcroît, la présence de ces cytokines au site d'inflammation provoque une accumulation de neutrophiles et de macrophages qui une fois activés produisent une quantité de protéines, dont les MMPs. Certaines de ces protéases, notamment les MMP-1, - 7, -8, -9 et -12, sont capables de cliver le TFPI et ainsi diminuer l'efficacité de l'inhibiteur. L'activité pro-inflammatoire des tumeurs contribue donc grandement à réduire les défenses anticoagulantes.

Un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires sont présentes dans le cancer:le TNFalpha, IL1, IL6, IL8, IL12, IFN γ ...,. Elles participent, seules ou en association, à differents phénoménes, elles favorisent le recrutement des monocytes circulants par stimulation de la libération de MCP-1 par les cellules, favorisent leur adhérence à l'endothélium par l'expression de VCAM-1 (et la surexpression de ICAM-1) par les cellules endothéliales. En outre, ces cytokines modulent la réponse fibro-proliférante. De plus, ces cytokines induisent l'expression par les cellules musculaires lisses (mais aussi les macrophages et les cellules endothéliale. Elles stimulent l'activité de la MMP-2, et induisent l'expression et la sécrétion des MMP-3 et MMP-9. L'activité des MMP est inhibée par des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (les TIMP), mais dont l'activité n'est pas modifiée par IL1 et TNF α : l'équilibre physiologique entre les MMP et les TIMP est donc rompu lorsque ces deux cytokines sont très exprimées, aboutissant à une dégradation accrue des protéines matricielles.

Les endotoxines et cytokines de l'inflammation, telles l'IL1 β ou le TNF α , peuvent induire l'expression de molécules d'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium. L'IL1 β et le TNF α peuvent diminuer l'expression de la thrombomoduline et du récepteur cellulaire de la PC au niveau des cellules endothéliales. La protéine C est une sérine-protéase qui sert de régulateur majeur du processus de coagulation sur les cellules endothéliales: la protéine C lié à son récepteur endothélial (EPCR) est activée en protéine C activée, par le complexe thrombine-thrombomoduline. La PCa, en combinaison avec la protéine S son cofacteur, limite l'amplification et la progression de la cascade de coagulation en dégradant les facteurs Va et VIIIa. L'EPCR a été mis en évidence dans de nombreuses cellules cancéreuses [79], ainsi que dans des lignées cellulaires leucémiques [80]. L'EPCR peut être libéré des cellules cancéreuses par les cytokines pro-inflammatoires IL1- β et le TNF-a [81-82], cet EPCR pourrait être responsable des événements thrombotiques dans le cancer. La forme soluble de l'EPCR (sEPCR) circule dans le plasma et inhibe l'activité anticoagulante de la PCa.

Les cytokines interviennent sur la production du fibrinogène. Le système fibrinolytique joue un rôle majeur dans les phénomènes d'invasion tumorale, d'angiogenèse tumorale et de dissémination métastatique. Nous avons vu que ce système est dérégulé dans le cancer. Le TNF et INF augmentent fortement l'expression de l'u-PAR. L'u-PAR joue un rôle dans la signalisation des β1 et des β2intégrines qui elle-même favorise la migration tumorale.

Au final les cytokines pro-inflammatoires peuvent également intervenir dans les complications thrombotiques. Les propriétés antithrombotiques des cellules endothéliales sont en effet très altérées par l'IL1 et le TNF α , qui augmentent l'activité procoagulante de type tissulaire et suppriment l'activité anticoagulante du système thrombomoduline-protéine C, en diminuant l'expression de la protéine C. Ces cytokines modifient aussi les propriétés fibrinolytiques des cellules endothéliales, en inhibant la production de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et en augmentant la production de son inhibiteur principal, le PAI-1.

III.6 Chimiothérapie et thrombose

Les agents antinéoplasiques peuvent aussi majorer le risque thrombotique par différents mécanismes (Tableau III- 7) :

- Lésions de l'endothélium vasculaire.

L'endothélium vasculaire est un des sites d'agression des medicaments de la chimiothérapie. En effet c'est la première barrière au contact du toxique, l'endothélium peut être altéré précocement et très directement; la toxicité endothéliale est d'autant plus forte que l'on utilise des doses toujours plus élevées menant à des concentrations très importantes dans le flux sanguin, donc au contact de la membrane plasmique des cellules endothéliales. Très souvent, le médicament est administré par voie veineuse sous sa forme directement active; c'est donc pendant une période brève, une très forte concentration de la molécule qui va circuler au contact de l'endothélium [83-85].

Les anticancéreux peuvent altérer la membrane plasmique à la face luminale, c'est-à-dire directement à l'interface du sang et des vaisseaux, comme les substances lipophiles qui modifient les protéines membranaires et l'agencement phospholipidique, induisant une restructuration lamellaire avec des accumulations de phospholipides.

De même l'activation ou l'altération de l'endothélium peut localement favoriser l'adhésion des polynucléaires neutrophiles, des plaquettes ou encore modifier ses propriétés de phagocytose ; la lésion endothéliale peut aussi mener à des anomalies métaboliques qui touchent la

production ou le catabolisme de peptides vasoactifs comme les angiotensines, la bradykinine, les endothélines, le facteur auriculaire natriurétique ou encore de peptides facteurs de croissance.

L'atteinte de l'endothélium peut également provenir de la réponse du système immunitaire qui par la synthèse de cytokines, comme le TNF peut détruire l'endothélium.

- l'activation plaquettaire peut être une réponse à la lésion des cellules endothéliales, induite par un médicament (mitomycine, ciclosporine), pouvant conduire à l'état d'hypercoagulation.

Tableau III- 7 : Mécanismes des thromboses sous traitements cancéreux

Mécanismes de thrombose des traitements cancéreux - Lésions de l'endothélium vasculaire - Modification des cofacteurs : élévation du taux sérique de facteur de von Willebrand (vWF), diminution du taux d'antithrombine III, déficit en facteur V, protéine S et protéine C.... - Libération de facteurs tumoraux pro coagulants et de facteur tissulaire - Modification de la membrane érythrocytaire favorisant l'agrégation et augmentant la viscosité - Suppression de l'activité de la fibrinolyse - Augmentation du fibrinogène et du FVIIa - Augmentation de l'activation des plaquettes - Augmentation de l'adhésion endothéliale des neutrophiles - diminution du système de la protéine C par diminution de la thrombomoduline

Le déficit acquis des inhibiteurs physiologiques de la coagulation (antithrombine III, protéines C et S, t-PA, fibrinogéne.....) peut être induit ou accentué par une chimiothérapie ou une hormonothérapie. Des drogues comme le fluoro-uracile, la L-asparaginase, le cyclophosphamide, la bléomycine, l'étoposide, la vincristine, le méthotrexate, le cisplatine, le thalidomide, le tamoxifène, le diéthylstilbestrol, l'estramustine ainsi que l'érythropoïétine ou les facteurs de croissance granulocytaire ont été associés avec une MTE (Tableau III- 8).

Tableau III- 8 : Effets de la chimiothérapie anti-cancéreuse sur l'hémostase

Г	T		
CMF	- Diminution de la protéine C		
(cyclophosphamide,	- Diminution de la protéine S		
metrotrexate,	-Augmentation du PAI-1		
5-fluoroucil)	- Pas de changement du TP, de l'aPTT, de l'AT, des D-Di, TAT, F1+2		
Thalidomine	- APC-R aquise		
Actimid Lénalidomide	- Pas de modification des D-Di, F1+2		
	- Augmentation du TAFI, du fibrinogène, du FVIII, p-selectine		
	- Diminution des proteines C et S		
Cisplatine	- Augmentation du FTa		
	- Augmentation du FvW		
L- Asparaginase	- Prolongation du TP et de l'aPTT		
	- Diminution de la Proteine C, S, de l'AT, du plasminogène		
	- Augmentation du FV et FVIII		
Fluorouracil	- Diminution de la protéine C		
	- Augmentation du fibrinopeptide A		
Tamoxifène	- Diminution de la protéine S et C, de l'AT, du TFPI		
	- Pas de changement des D-Di, des TAT et du F1+2		
	- APC-R aquise		
Erythropoiétine	- Augmentation du FvW, FVIII, TAT		
	- Diminution des proteines C et S		
1			

- Autre mécanisme: Une résistance à la protéine C activée, la mutation du facteur V Leiden (homo ou hétérozygote) ou la présence d'une anomalie génétique ou acquise de la coagulation sont les anomalies les plus fréquemment retrouvées chez les patients ayant un cancer et des antécédents personnels ou familiaux de MTE. De plus, jusqu'à 30 % de patients ayant un cancer peuvent avoir des anticorps antiphospholipides, responsables des thromboses artérielles ou veineuses.

- Dans certaines conditions l'endothelium vasculaire subit une agression qui conduit à une libération de facteur Willebrand de très haut poids moléculaire ayant une forte affinité pour les plaquettes. Dans les conditions normales, une métalloprotéase, appelée ADAMST13, scinde le facteur Willebrand en particules de bas poids moléculaire, de faible affinité pour les plaquettes, avec comme résultat pas ou peu d'agrégation plaquettaire. Dans le PTT, un inhibiteur de la métalloprotéase (auto-anticorps de type IgG le plus fréquemment) est à l'origine d'un déficit en ADAMST13. Ce déficit conduit à l'absence de clivage du facteur Willebrand de très haut poids moléculaire, avec pour conséquence une hyperagrégation

plaquettaire à l'origine de microthrombi; mécanisme évoqué également dans la chimiothérapie (Figure III- 14).



Figure III- 14 : Effets prothrombotiques des agents chimiothérapeutiques

III.7 La chirurgie, les cathéters centraux

Les patients subissant une intervention chirurgicale pour un cancer sont à risque élevé de développer une thrombose veineuse profonde postopératoire. L'incidence globale de la thrombose veineuse profonde postopératoire chez les patients atteints de cancer est environ deux fois plus élevée que chez les patients exempts de malignité. En outre, la fréquence de l'EP postopératoire est sept fois plus élevée chez les patients cancéreux que chez ceux sans cancer. La conséquence de la chirurgie agit sur le système hémostatique qui devient plus actif. Les mécanismes thrombogènes les plus importants proposés sont le traumatisme chirurgical qui provoque l'exposition du facteur tissulaire sous endothélial, la libération de cytokines à activité procoagulante, et l'immobilisation postopératoire qui favorise la stase veineuse, ce qui entraîne des dommages de la paroi endothéliale en raison de la clairance réduite des facteurs de coagulation activés et une hypoxie endothéliale localisée.

- La radiothérapie peut être également thrombogène. Au cours de la radiothérapie ont été montré une lésion de l'endothélium direct et le déclenchement d'une réponse inflammatoire à l'origine des principaux mécanismes d'activation de la coagulation.
- Les cathéters veineux centraux par le traumatisme au niveau du vaisseau lors de leur insertion et par l'altération du flux sanguin local sont les facteurs pathogènes de la thrombose veineuse due aux cathéters veineux centraux.

Au total, une tumeur maligne affecte profondément le système hémostatique conduisant à un état prothrombotique. Les mécanismes impliqués sont multiples et complexes; ils comprennent l'activité coagulante de la tumeur, la réponse inflammatoire de l'hôte, et le traitement du cancer (Figure III- 15).



Figure III-15 : Rôle de la cellule tumorale dans la pathologie thrombotique du cancer

(d'après Dargaud 2012)

Références – Chapitre III

1) De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 50: 87-196.

2) Piccioli A, Prandoni P, Ewenstein BM et al. Cancer and venous thromboembolism. Am Heart J 1996; 132: 850- 5.

3) Hoffman R, Haim N, Brenner B. Cancer and thrombosis revisited. Blood Rev 2001; 15: 61-7.

4) Nicolson GL, Custead SE. Effects of chemotherapeutic drugs on plateletand metastatic tumor cell-endothelial cell interactions as a model for assessing vascular endothelial integrity. Cancer Res 1985; 45: 331- 6.

5) Grignani G, Maiolo A. Cytokines and hemostasis. Haematologica 2000; 85: 967-72.

6) Contrino J, Hair G, Kreutzer DL et al. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. Nat Med 1996; 2: 209-15.

7) Semeraro NN, Colucci M. Tissue factor in health and disease. Thromb Haemost 1997; 78: 759-64.

 8) Falanga A, Marchetti M, Evangelista V et al. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 2000; 96: 4261- 66.

9) Falanga A, Gordon SG. Isolation and characterization of cancer procoagulant: a cysteine proteinase from malignant tissue Biochemistry 1985; 24: 5558-67.

10) Donati MB, Gambacorti Passerini C, Casali C *et al.* Cancer procoagulant in human tumor cells: evidence from melanoma patients. Cancer Res 1986; 46: 6471-74.

11) Loreto MF, De Martinis M, Corsi MP et al. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. *Pathol Oncol Res* 2000; 6 (4): 301-312.

12) Elalamy, E Verdy, G Gerotziafas et al. Physiopathogénie de la maladie thromboembolique veineuse au cours du cancer Pathologie Biologie 2008; 56: 184-194.

13) Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thrornboembolism. Lancet Oncol 2005; 6: 401- 10.

14) Falanga A, Marchetti M, Vignoli A et al. Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. Cin Adv Hematol Oncol 2003; 1: 669-74.

15) Rao LV. Tissue factor as a tumor procoagulant. Cancer Metastasis Rev 1992; 11: 249-66. 16) Ruf W, Disse J, Carneiro-Lobo TC et al. Tissue factor and cell signalling in cancer progression and thrombosis. J Thromb Haemost. 2011; 9 Suppl 1: 306-15.

17) Belting M, Ahamed J, Ruf W. Signalling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. Arterioscler Thromb Vase Biol 2005; 25: 1545- 50.

18) Yu JL, May L, Lhotak V et al. Oncologic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis *Blood* 2005; 105: 1734-41.

19) Lee AY, Levine MN. The thrombophilic state induced by therapeutic agents in the cancer patient. Sernin Thromb Hemost 1999; 25:137-45.

20) Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. Best Pract Res Clin Haematol. 2009; 22: 49- 60.

21) Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. CHEST 2003; 124: 58S- 68S.

22) Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J et al. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. Nat Med 2003; 9: 458-62.

23) Rollin J, Guel Y. Roles of tissue factor in cancer. Hématologie 2012; 18: 37-47.

24) Bogdanov VY. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. J Thromb Haemost 2006; 4 (1): 158-67.

25) Szotowski B. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. Circ Res 2005; 96: 1233-9.

26) Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J et al. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. Nat Med 2003; 9: 458- 62.

27) Szotowski B, Antoniak S, Poller WN et al. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. Circ Res 2005; 96: 1233-9.

28) Hobbs JE, Zakarija A, Cundiff DL et al. Alternatively spliced human tissue factor promotes tumor growth and angiogenesis in a pancreatic cancer tumor model. Thromb Res 2007; 120 (Suppl 2): S13- 21.

29) Censarek P. Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not procoagulant. Thromb Haemost 2007; 97: 11- 4.

30) Signaevsky M. Role of alternatively spliced tissue factor in pancreatic cancer growth and angiogenesis. Semin Thromb Hemost 2008; 34: 161-9.

31) Rollin J, Regina S, Gruel Y. Tumor expression of alternatively spliced tissue factor is a prognostic marker in non-small cell lung cancer. J Thromb Haemost 2010; 8: 607-10.

32) van den Berg YW, van den Hengel LG et al. Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106: 19497- 502.

33) Unruh D, Sagin F, Van Dreden P et al. Levels of alternatively spliced tissue factor in plasma of patients with pancreatic cancer may heil predict aggressive tumor phenotype. Ann Surg Oncol 2015; 3: 1206-11.

34) Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Rev. 2007; 21: 157-171.

35) Burnier L, Fontana P, Kwak BR et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. Thromb Haemost. 2009; 101: 439- 451.

36) Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. Arterioscler Thromb VascBiol. 2011; 31: 27- 33.

37) Del Conde 1, Bharwani LD, Dietzen DJ, et al. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syn-drome. J Thromb Haemost 2007; 5: 70- 4.

38) Aharon A, Brenner B. Microparticles, thrombosis and cancer. Best Pract Res Clin Haematol. 2009; 22 (1): 61- 69.

39) Satta N, Freyssinet JM, Toti F. The significance of human monocyte thrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by lipopolysaccharide. Br J Haematol. 1997; 96: 534- 542.

40) Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D et al. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. Thromb Haemost. 2005; 93: 35- 39.

41) Key NS, Chantrathammachart P, Moody PW et al. Membrane microparticles in VTE and cancer. Thromb Res. 2010; 125 (Suppl 2): S80- 83.

42) Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res. 2009; 15: 6830-40.

43) Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A *et al.* Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. Blood 2007; 110: 2432- 9.

44) Belting M, Dorrell MI, Sandgren S et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. Nat Med. 2004; 10: 502-9.

45) Boulanger CM, Tedgui A. Dying for attention: microparticles and angiogenesis. Cardiovasc Res. 2005; 67: 1- 3. 46) Leroyer AS, Anfosso F, Lacroix R et al. Endothelial-derived microparticles: biological conveyors at the crossrAODof inflammation, thrombosis and angiogenesis. Thromb Haemost. 2010; 104.

47) Rak J. Microparticles in cancer. Semin Thromb Hemost. 2010; 36 (8): 888-906.

48) Date K, Hall J, Greenman J et al. Tumour and microparticle tissue factor expression and cancer thrombosis. Thromb Res. 2013; 131: 109–115.

49) Davila M, Robles-Carrillo L, Unruh D et al. Microparticle association and heterogeneity of tumor-derived tissue factor in plasma: is it important for coagulation activation? J Thromb Haemost. 2014; 12: 186- 196.

50) Korte W. Changes of the coagulation and fibrinolysis system in malignancy: their possible impact on future diagnostic and therapeutic procedures. Clin Chem Lab Med 2000; 38 (8): 679- 692.

51) Nadir Y, Katz T, Sarig G et al. Hemestatic balance on the surface of leukemic cells: the role of tissue factor and urokinase plasminogen activator receptor. Haemacologia 2005; 90 (11): 1549-1556.

52) Zacharski LR, Wojtukiewicz MZ, Costantini V et al. Pathways of coagulation/fibrinolysis activation in malignancy. Semin Thromb Hemost. 1992; 18 (1): 104-16.

53) Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. Cell Mol Life Sci. 2000; 20; 57 (1): 25- 40.

54) Schmitt M, Janicke F. Graeff H. Tumor-associated fibrinolysis: The prognostic relevance of plasminogen activalors uPA and tPA in human breast cancer. Blood Coag Fibrinolysis 1990; 1: 695-702.

55) Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM et al. Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. J Clin Invest 1997; 100: 58- 67.

56) Deng G, CurridGen SA, Hu G et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. J Cell Physiol 2001; 189: 23-33.

57) Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet-cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. Br J Pharmacol 2004; 143: 819-26.

58) Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. Proc Natl Acad Sci USA 1968; 61: 46- 52.

59) Mahalingam M, Ugen KE, Kao KJ et al. Functional role of platelets in experimental metastasis studied with cloned murine fibrosarcoma cell variants. Cancer Res 1988; 48:1460-4.

60) Pearlstein E, Ambrogio C, Karpatkin S. Effect of antiplatelet antibody on the development of pulmonary metastases following injection of CT26 colon adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma, and B16 amelanotic melanoma tumor cells into mice. Cancer Res 1984; 44: 3884-7.

61) Fribourg C, Denis CV. Plaquettes et tumeurs. Hématologie 2006; 12 (6): 400-11.

62) Camerer E, Qazi AA, Duong DN et al. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. Blood 2004; 104: 397-401.

63) Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV et al. Platelets and fibrinogen increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. Blood 2005; 105: 178- 85.

64) Nash GF, Walsh DC, Kakkar AK. The role of the coagulation system in tumour angiogenesis. Lancet Oncol 2001; 2: 608-13.

65) Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Cell Mol Med 2005; 9: 777-94.

66) Thurston G. Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. J Anat 2002; 200: 575- 80.

67) Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M et al. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. Q J Nucl Med 2003; 47: 149- 61.

68) Oleksowicz L, Mrowiec Z, Schwartz E et al. Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. Thromb Res 1995; 79: 261-74.

69) Oleksowicz L, Dutcher JP, Deleon-Fernandez M et al. Human breast carcinoma cells synthesize a protein immunorelated to platelet glycoprotein-Ib alpha with different functional properties. J Lab Clin Med 1997; 129: 337- 46.

70) Chopra H, Timar J, Rong X et al. Is there a role for the tumor cell integrin alpha IIb bêta 3 and cytoskeleton in tumor cell-platelet interaction? Clin Exp Metastasis 1992; 10: 125- 37.

71) Kim YJ, Borsig L, Varki NM et al. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9325- 30.

72) Borsig L, Wong R, Feramisco J et al. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 3352-7.

73) Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. Nat Rev Cancer 2003; 3: 582-91.

74) Boucharaba A, Serre CM, Gres S et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. J Clin Invest 2004; 114: 1714-25.

75) Nierodzik ML, Kajumo F, Karpatkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. Cancer Res 1992; 52: 3267-72.

76) Shi X, Gangadharan B, Brass LF et al. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. Mol Cancer Res 2004; 2: 395-402.

77) Philippe C, Philippe B, Fouqueray B et al. Protection from tumor necrosis factormediated cytolysis by platelets. Am J Pathol 1993; 143: 1713-23.

78) Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B et al. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. Cancer Res 1999; 59: 1295- 300.

79) Ducros E, Mirshahi S, Azzazene D et al. Endothelial protein C receptor expressed by ovarian cancer cells as a possible biomarker of cancer onset. Int J Oncol 2012; 41: 433- 440.

80) Ducros E, Mirshahi SS, Faussat AM et al. Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) is likely a biomarker of cancer-associated hypercoagulability in human hematologic malignancies. Cancer Med 2012; 1: 261- 267.

81) Menschikowski M, Hagelgans A, Tiebel O et al. Expression and shedding of endothelial protein C receptor in prostate cancer cells. Cancer Cell Int. 2011; 11: 4.

82) Liaw PC, Neuenschwander PF, Smirnov MD et al. Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. J Biol Chem 2000; 275: 5447- 5452.

83) Haddad TC, Greeno EW. Chemotherapy-induced thrombosis. Thromb Res. 2006; 118(5): 555-68.

84) Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E et al. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. Blood. 2008; 111: 4902-7.

85) Bertomeu MC, Gallo S, Lauri D et al. Chemotherapy enhances endothelial cell reactivity to platelets. Clin Exp Metastasis. 1990; 8: 511- 8.

Chapitre IV : Rappel sur les anticoagulants en oncologie

IV.1 Introduction

Cancer et maladie thromboembolique veineuse sont deux pathologies étroitement intriquées, un certain nombre de ces thromboses est secondaire au traitement du cancer comme la chimiothérapie, l'hormonothérapie, la chirurgie, d'autres sont directement liées à l'activation de la coagulation par les cellules cancéreuses ou celles du stroma tumoral. Une anticoagulation efficace pour la prévention et le traitement des MTEV est essentielle pour la gestion des patients atteints de cancer, dans le but de réduire la morbidité et la mortalité [1-2]. A l'heure actuelle l'héparine non fractionnée, les héparines de faible poids moléculaire, les antagonistes de la vitamine K et le fondaparinux sont utilisés dans la prévention et le traitement de la MTEV chez les patients atteints de cancer. Cependant de nouveaux agents anticoagulants actifs par voie orales inhibiteurs spécifiques du facteur Xa activé ou de la thrombine sont également en cours d'étude (Figure IV- 1)

Dans la stratégie anti-thrombotique on distingue deux cibles : la thrombine et le facteur Xa qui apparaissent comme deux éléments clés du processushémostatique par leurs nombreuses actions.

La thrombine qui joue un rôle fondamental dans le processus d'hémostase. Il s'agit de l'enzyme clé de la coagulation, issue de l'activation de la prothombine par la thromboplastine. Elle possède plusieurs actions: une activité procoagulante en constituant la dernière étape au cours de la cascade de lacoagulation dont la principale action est le clivage du fibrinogène en fibrine. De plus, elle potentialise les processus procoagulants en activant les facteurs V, VIII, XI et XIII. L'activation du facteur XI permet l'amplification de la formation de la thrombine alors que l'activation du facteur XIII permet un renforcement du caillot de fibrine. La thrombine joue aussi un rôle dans l'activation des plaquettes qui libèrent leurs granules pour recruter d'autres plaquettes. Elle possède également une activité anticoagulante en se liant à la thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales, mais également en activant le TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) et la protéine C, puissant inhibiteur des facteurs Va et du facteur VIIIa.

Le facteur X est une glycoprotéine synthétisée dans le foie et dépendant de la vitamine K, qui joue un rôle important dans la cascade de la coagulation. Pour pouvoir exercer son action, le facteur X doit être activé. Les deux voies d'activation étant soit la voie intrinsèque à partir du complexe tenase formé par l'association dufacteur IX et VIII soit par la voie extrinsèque à partir du complexe [FT-FVII]. Ces deux voies aboutissent à l'activation du facteur X, qui en présence du facteur V, va former le complexe prothrombinase capable d'activer la thrombine. C'est ici que le facteur X joue un rôle important car il va engendrer la formation de thrombine.



Figure IV-1: Cibles des anticoagulants sur la coagulation

L'héparine a été découverte en 1916 par J. MacLean, un étudiant en médecine, qui démontra qu'un extrait de foie de chien prolongeait, *ex vivo*, le temps de coagulation d'un plasma [3]. Sept ans plus tard, son professeur, le Dr. Howell, réussit à isoler et à purifier l'héparine. Il lui donne le nom qu'elle porte encore aujourd'hui, dérivant du grec « hepar » qui signifie foie, rappelant ainsi l'organe dont elle a été extraite pour la première fois [4].

En 1918 Howell en précise la nature chimique [5-6].

En 1930 Brinkhous et al ont démontré que l'héparine est un anticoagulant indirect, nécessitant un cofacteur plasmatique [7].

En 1968 Abildgaard nomma ce cofacteur antithrombine III [8-9]

Des1936, l'héparine fut utilisée pour la première fois chez l'homme comme anticoagulant. A cette époque, l'héparinothérapie n'était fondée que sur des bases empiriques puisqu'il faudra attendre les années 70 pour découvrir le mécanisme précis d'action de l'héparine.

En 1950, les HNF sont utilisées de manière généralisée.



Figure IV-2: Chronologie des anticoagulants

Elles existent sous deux formes: Héparine non fractionnée et Héparine de bas poids moléculaires obtenues par dépolymérisation des HNF. Du fait de l'origine de ces préparations, les héparines présentent une variabilité dans leur composition, donc dans leur activité anticoagulante. Il vaut mieux alors parler des héparines, plutôt que de l'héparine.

Pendant de nombreuses années, les seuls agents anticoagulants disponibles pour la voie parentérale étaient l'héparine non fractionnée (HNF) ou héparine standard et les Héparines de Bas Poids Moléculaires (HBPM).

Les HBPM apparues dans les années 1980 ont connu un engouement croissant de la communauté médicale et une extension rapide de leurs indications, en raison de leur efficacité clinique, de leur facilité d'utilisation et de leur meilleur rapport bénéfice/tolérance. Elles ont ainsi progressivement remplacé l'HNF dans la plupart des indications.

Pour la voie orale, les antagonistes de la vitamine K (AVK) représentaient le seul traitement disponible depuis plus de cinquante ans, jusqu'aux années 2008 ou les nouveaux anticoagulants oraux (N.A.C.O) sont apparus (Figure IV- 2). Désignés au départ sous l'appellation N.A.C.O, ils prennent progressivement la dénomination d'anticoagulants oraux directs (A.O.D).

IV.2 Les héparines

De nombreux travaux se sont attachés à préciser la structure et le mode d'intervention de l'héparine dans la coagulation: la molécule apparaît très hétérogène aussi bien sur le plan physique que chimique. Les héparines sont des mélanges de polysaccharides d'origines animales, extraites de muqueuse intestinale de porc ou de poumon de bœuf.

L'héparine est un polysaccharide sulfaté naturel extrait principalement de la muqueuse intestinale du porc. Le poids moléculaire des chaînes polysaccharidiques de l'héparine non fractionnée (HNF) varie de 3 000 à 30 000 daltons avec un pic maximum de distribution compris entre 13 000 et 15 000 daltons. Sur environ un tiers des chaînes existe un motif de 5 sucres (pentasaccharide) qui permet la liaison à l'antithrombine, le cofacteur plasmatique de l'héparine. En l'absence d'héparine, l'antithrombine est un inhibiteur lent des enzymes générés dans la cascade de la coagulation, notamment le facteur Xa et la thrombine (facteur IIa). L'héparine modifie la conformation de l'antithrombine et accélère 1 000 fois la vitesse d'interaction entre les enzymes et l'inhibiteur. Les deux tiers restant des chaînes d'héparine sont dépourvus de la séquence pentasaccharidique et d'effet anticoagulant [10-12]

L'héparine en se liant à l'antithrombine inhibe la thrombine et les facteurs Xa, IXa, XIa. De par une longue chaîne pentasaccharidique, les HNF inhibent aussi bien le facteur Xa et le facteur IIa de manière équivalente. En effet l'inhibition de la thrombine par le complexe héparine-antithrombine nécessite une longueur de chaîne polysaccharidique suffisante pour que puisse se créer une liaison non spécifique entre l'héparine et la thrombine. Cette longueur critique minimale correspond à un enchaînement de 17 sucres et à un poids moléculaire de 5 400 daltons. L'inhibition du facteur Xa par le complexe héparine-antithrombine est indépendante du poids moléculaire de la chaîne d'héparine. Parce que toutes les chaînes de

l'HNF ont un poids moléculaire supérieur à 5 400, ce médicament inhibe aussi bien la thrombine que le facteurXa, elles ont un rapport d'activité anti-Xa/anti-IIa de 1.

Depuis quelques années, la mise au point d'héparines de bas poids moléculaires a permis de diminuer de façon notable l'activité anticoagulante, tout en conservant une activité antithrombotique comparable à celle des héparines non fractionnées. Les HNF et les HBPM ont des structures différentes, mais elles ont en commun d'être constituées d'une chaine polysaccharidique de longueur variable, au sein de laquelle existe un site de 5 saccharides (pentasaccharide = P) qui a la propriété de se lier à l'antithrombine. Les HBPM sont composées de chaînes dont le poids moléculaire varie de 2 000 à 10 000 daltons avec un pic maximum de distribution aux environs de 5 000 daltons [12-14]. Au cours du processus de dépolymérisation, il peut arriver que la séquence pentasaccharidique soit rompue. Ainsi, l'activité spécifique, c'est-à-dire le nombre d'unités anti-Xa par mg d'héparine, est plus faible pour les HBPM (80 à 120 U/mg) que pour l'HNF (>150 U/mg).

Pour une HBPM, seules les chaînes dont le poids moléculaire est supérieur à 5 400 inhibent la thrombine et le facteur Xa, tandis que les chaînes dont le poids moléculaire est inférieur à 5 400 n'inhibent que le facteur Xa: le rapportanti-Xa/anti-IIa est supérieur à 1. Les méthodes de préparation des HBPM varient selon les fabricants, il en résulte des produits dont la distribution de poids moléculaire est légèrement différente avec notamment une proportion variable de chaînes dont le poids moléculaire est supérieur au seuil critique de 5 400 Da (Figure IV- 3). C'est ainsi que selon l'HBPM, le rapport anti-Xa/anti-IIa varie de 1,8 (Innohep®) à 3,6 (Lovenox®).

Les HNF, riches en chaines longues de polysaccharides sont essentiellement éliminées par le système réticulo-endothélia alors que les HBPM étant des héparines à chaines courtes, elles sont majoritairement éliminées par le rein.

Nous citerons pour exemple ici le lovenox (énoxaparine) héparine utilisée dans notre étude qui est une héparine de bas poids moléculaire dans laquelle les activités antithrombotiques et anticoagulantes de l'héparine standard ont été dissociées. Elle est caractérisée par une activité anti-Xa plus élevée que l'activité anti-IIa ou antithrombinique. Pour l'énoxaparine, le rapport entre ces deux activités est de 3,6.



Figure IV-3 : Héparines, mode d'action

IV.3 Les anti-vitamines K

Les antivitamines K sont des anticoagulants administrables par voie orale et utilisables en traitement de longue durée. On distingue deux groupes en fonction de leur structure chimique:

- les dérivés coumariniques: warfarine (coumadine®), l'acenocoumarol (Sintrom®)

- les dérivés de l'indane - dione tels la fluindione (Préviscan®).

Les AVK ont un effet anticoagulant indirect. Ils empêchent la synthèse des formes actives de plusieurs facteurs de la coagulation, vitamine K dépendants. Les AVK sont des antagonistes compétitifs. Ils sont en compétition avec la vitamine K et se fixent sur les sites d'activation enzymatique de l'oxydo-réductase avec des liaisons covalentes. Ainsi ils empêchent la γ -carboxylation dans laquelle la vitamine K est le cofacteur de la carboxylase. Les AVK inhibent donc l'activation des facteurs vitamine K-dépendants (X, VII, IX, II) et de deux protéines inhibiteurs physiologiques (protéine C et S). La demi-vie des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K, varie de 6 heures (facteur VII, protéine C) à 2 ou 3 jours (facteur X et II). Après administration d'AVK, les lers facteurs dont les activités diminuent sont ceux dont la demi-vie est la plus courte, tandis que les derniers seront ceux

dont la demi-vie est la plus longue. C'est pourquoi l'équilibre d'un traitement par AVK, demande plusieurs jours [16].

L'action anticoagulante peut persister 3 à 4 jours après l'arrêt du traitement.

Les AVK

- ont une résorption digestive complète,

 - subissent une métabolisation hépatique. La fixation aux protéines plasmatiques est importante (> 95 %) et l'élimination est principalement par métabolisme hépatique, ces deux caractéristiques expliquant les nombreuses interactions médicamenteuses rencontrées avec ces médicaments.

- sont éliminés dans les urines.

- ont en moyenne une demi-vie de l'ordre de 30 heures. Ces différents paramètres pharmacocinétiques font que les anti vitamines K se prennent par voie orale à raison de 1 à 2 prises par jour.

IV.4 Le fondaparinux

Le fondaparinux est un nouvel anticoagulant mis sur le marché en 2002. Le motif pentasaccharidique qui permet la liaison de l'héparine à l'antithrombine identifié depuis plus de 20 ans est désormais synthétisé et disponible sous le nom d'Arixtra®. Contrairement aux HBPM d'extraction animale, ce produit est homogène, son poids moléculaire est de 1 750 daltons, son activité spécifique très élevée (700 à 800 unités anti-Xa par mg), et il est totalement dépourvu d'activité anti-IIa, puisque l'inhibition du IIa nécessite des chaines de plus de 18 monosaccharides pour une fixation à l'AT et au FIIa (rapport anti-Xa/anti-IIa infini).

Il est donc spécifique du Xa, il n'inactive pas la thrombine et n'a pas d'effets sur les plaquettes, il est non inhibé par le PF4 contrairement aux HNF ou HBPM. Sa demi-vie est d'environ dix-sept heures. Comme les HBPM, le fondaparinux ne se lie pratiquement pas aux protéines plasmatiques, ce qui se traduit par une pharmacocinétique linéaire et une réponse anticoagulante prévisible. En raison de son excellente biodisponibilité, de sa longue demi-vie et de son action anticoagulante spécifique, le fondaparinux peut être injecté une fois par jour par voie sous-cutanée sans surveillance biologique [17-18].

Son élimination exclusivement par voie rénale sans transformation métabolique le rend contre-indiqué en cas d'insuffisance rénale.

IV.5 Les anticoagulants oraux directs (AOD)

Contrairement aux molécules anticoagulantes comme les héparines, le fondaparinux ou les AVK, les nouvelles molécules agissent de façon spécifique et directe sur les facteurs de la coagulation activés. Deux cibles font l'objet d'une inhibition : la thrombine (facteur IIa) et le facteur X activé (Xa)

Ces nouvelles molécules présentent des caractéristiques communes. Elles ont une action directe, spécifique, compétitive et réversible sur les facteurs de coagulation déjà activés (Xa ou IIa), qu'ils soient libres ou liés au thrombus pour la thrombine, ce qui réduit leur délai d'action comparé aux AVK ou héparines. Les nouveaux anticoagulants oraux exercent pleinement leur activité en l'absence d'antithrombine. Ils ont une action directe. Seuls deux des douze facteurs de la coagulation sont concernés par ces nouvelles molécules: le facteur IIa et le facteur Xa. Ils interviennent donc au carrefour des deux voies de la coagulation (intrinsèque et extrinsèque) permettant ainsi un blocage complet de la cascade de la coagulation.

Les anticoagulants oraux comprennent deux classes :

- les inhibiteurs de la thrombine (affixe de la DCI : « gatran ») comme le dabigatran
- les inhibiteurs du facteur Xa (affixe de la DCI : « xaban ») commme l'apixaban ou le rivaroxaban

Pour exemple, le Dabigatran (Pradaxa®) a une action spécifique sur le facteur IIa (thrombine) tandis que l'apixaban (Eliquis®) ou le rivaroxaban (Xarelto®) ciblent le facteur Xa (Stuart activé). Les AVK quant à eux ne sont pas spécifiques car ils agissent sur plusieurs facteurs de la coagulation en même temps (X, IX, VII, II). De même pour les héparines, elles agissent également sur plusieurs facteurs (XIIa, XIa, IXa, Xa, XIIIa, prékallicréine).

On considère que les AOD ont une action réversible, car ils n'établissent pas de liaisons covalentes à l'inverse des AVK ou des héparines.

Les AOD se caractérisent par une pharmacocinétique dépendante de transporteurs et présentant un métabolisme hépatique sous l'action des cytochromes P450 pour certains d'entre eux. Tous les AOD sont des substrats de la glycoprotéine P. Cette glycoprotéine membranaire appartient à la famille des transporteurs ATP-binding cassette. Elle joue un rôle de pompe d'efflux vis-à-vis de nombreux médicaments et limite leur passage à travers les différentes barrières de l'organisme [19-21]. On la retrouve au niveau intestinal, en particulier, où elle limite l'absorption du dabigatran étexilate, mais aussi au niveau du rein où elle joue un rôle dans l'élimination du rivaroxaban et de l'apixaban (Tableau IV- 1). Contrairement au dabigatran, le rivaroxaban et l'apixaban subissent une dégradation métabolique au niveau hépatique par le CYP3A4/3A5. Le rivaroxaban est aussi métabolisé par le CYP2J2 (cytochrome P450).

	Apixaban	Dabigatran	Rivaroxaban
Pro-drogue	non	Dabigatran	non
		étexilate	
Cible	Xa	IIa	Xa
Demi-vie (h)	8-15	7-17	7-11
Biodisponibilité	50%	7%	>80%
(%)			
Conc. Max (h)	1-3	2-3	2-4
Fixation aux	87%	35%	95%
protéines			
Métabolisme	Hépatique	Hépatique	Hépatique
	CYP3A4		CYP3A4
	Substrat de P-gp	Substrat de P-gp	Substrat de P-gp
Elimination	25% rénale	80% rénale	66% rénale
	75% fécale	20% biliaire	33% hépatique
Interactions	Inhibiteurs et	Inhibiteurs et	Inhibiteurs et
médicamenteuses	inducteurs de	inducteurs de P-gp	inducteurs de
	CYP3A4 et P-gp		CYP3A4 et P-gp

Tableau IV-1 : Principales caractéristiques des OAD

Aujourd'hui, il n'existe pas d'antidote parfaitement validé à ces médicaments. En cas d'interventions chirurgicales programmées, la demi-vie relativement courte de ces nouveaux anticoagulants oraux permet de réaliser une fenêtre thérapeutique (arrêt du traitement) de courte durée. Dans le cas d'hémorragies majeures ou d'interventions chirurgicales, il ne reste que la possibilité de réversion de l'effet anticoagulant (facteurs de la coagulation activés ou inactifs: concentrés de complexes prothrombiniques ou facteur VII activé).

Les molécules utilisées dans ce mémoireet leurs principales caractéristiques sont regroupées dans le Tableau IV- 2 tableau 2 suivant :

- <u>le Fondaparinux</u>



- <u>Le Lovenox</u>



- <u>l'apixaban</u>



	Enoxaparine	Apixaban	Fondaparinux
	(Lovenox)	(Eliquis)	(Arixtra)
Directs ?	Non besoin d'AT	Oui	Non besoin d'AT
Spécifiques ?	Non : multiple	Oui: anti-Xa	Anti Xa
	Xa>>IIa		
Anti Xa libre et/ou	Libre uniquement	Libre et lié	Libre uniquement
lié au caillot			
Réversibles ?	Non	Oui	Non
Compétitifs ?	Non	Oui du Xa	Non
Demi-vie (h)	4	14	17
Elimination rénale	Oui	1/3 par voie rénale et	Oui
		2/3 par voie biliaire	
		(fécale)	
Neutralisation par	Partiellement	non	non
le PF4			
Biodisponibilité	80-90%	50-60%	100%
Administration	SC	Oral	SC

IV.6 Place des anticoagulants dans la thrombose chez le patient cancéreux

On sait que les patients cancéreux ont un risque de développer une MTEV quatre à sept fois supérieur à celui des patients non cancéreux. Un patient atteint de cancer hospitalisé sur sept décède d'embolie pulmonaire. La MTEV est la deuxième cause de décès. Cependant II faut sortir du défaitisme d'études anciennes qui affirmaient que «MTEV et cancer : c'est déjà trop tard ! ». En effet les anticoagulants peuvent avoir des effets positifs. On sait que l'activation de la coagulation par les cellules tumorales participe à la croissance tumorale, à la néoangiogénèse et au développement des métastases. Les cellules tumorales surexpriment le facteur tissulaire qui en stimulant la production de VEGF et en inhibant la thrombospondine favorise l'angiogénèse tumorale [22]. L'héparine et les HBPM augmentent la concentration du TFPI dans le plasma qui va inhiber l'action du complexe facteur tissulaire-facteur VIIa sur l'angiogénèse et donc diminuer l'angiogénése [23-26].

D'autre part, les cellules tumorales circulent en adhérant aux plaquettes activées avec lesquelles elles forment des microthrombus tumoraux et se fixe aux organes par les cellules endothéliales pour former les métastases. Cette fixation se fait par les glycosaminoglycanes de la cellule tumorale et par la P-selectine des plaquettes et de l'endothelium. Les HBPM constituée de glycosaminoglycanes est un ligand pour la P-selectine. Elle bloque l'intéraction de cette dernière avec les cellules tumorales et réduit les métastases [27-28]. Les cellules tumorales dégradent la matrice extracellulaire en sécrétant de la plasmine. Les héparines inhibent l'activité héparanase des cellules tumorales qui participe à la dégradation de la matrice extracellulaire et diminuerait ainsi la formation des métastases [29]. Enfin, les métalloprotéinases et notamment la MMP 2 et la MMP 9 jouent un rôle dans le développement des métastases. Les HBPM inhibent de façon dose dépendante l'adhésion de cellules tumorales à différents constituants de la matrice extracellulaire et réduire la pénétration de cellules tumorales au sein de la matrice extracellulaire et réduisent la croissance des tumeurs. La majorité de ses actions s'exercent à des concentrations compatibles avec les posologies utilisées en clinique humaine [30-31].

Les héparines et les HBPM contrairement au fondaparinux partagent ces actions, en ce qui concerne les nouveaux anticoagulants oraux ces propriétés ne sont pas encore établies.

D'un point de vue thérapeutique, les héparines non fractionnée, l'héparine de faible poids moléculaire, les antagonistes de la vitamine K et le fondaparinux sont utilisés dans la prévention et le traitement de la MTEV chez les patients atteints de cancer. Alors que les héparines et le fondaparinux sont administrés par voie sous cutanée, les AVK sont actifs par voie orale. Alors que le traitement par AVK était le gold standard des MTEV chez les patients cancéreux, l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM) est devenue le traitement de référence. En effet le cancer, ses comorbidités, les traitements associés, les interactions médicamenteuses et alimentaires peuvent rendre l'ajustement de l'INR difficile, et donc jouer sur l'efficacité et la sécurité de ce traitement par AVK. Les études ont montrée qu'il y avait au niveau de l'efficacité 2 fois plus de rechutes et en termes de sécurité 3 fois plus d'évènements hémorragiques qu'avec les HBPM. De plus les HBPM ralentissent l'évolution fatale de la maladie cancéreuse chez les patients sans métastases initiales, avec un taux de décès à un an de 20 % sous HBPM vs 36 % sous AVK [32-35]. Ceci additionné au fait que les AVK pour leur utilisation nécessitent une surveillance de laboratoire régulier et un ajustement de la dose à la différence des HBPM expliquant ainsi pourquoi on utilise de plus en plus les HBPM. Cependant, ces thérapeutiques par HBPM ont l'inconvénient d'être injectables, une des raisons pour laquelle l'industrie a développé les AOD dirigés contre le facteur Xa ou la thrombine sans avoir la nécessité d'ajuster les doses régulières et sans surveillance en laboratoire.

Les nouveaux agents anticoagulants actifs par voie orale pourraient améliorer le traitement anti-thrombotique chez les patients atteints de cancer. Cependant, les AODprésentent des interactions importantes avec les médicaments fréquemment utilisés chez les patients cancéreux, et leur élimination par la voie hépatique et rénale pourrait influencer la pharmacocinétique, compromettant ainsi leur efficacité et la sécurité. De plus, peu de résultats d'essais cliniques conçus spécifiquement pour les patients atteints de cancer existent ce qui est un inconvénient important pour leur utilisation en oncologie. En effet, les études en phase III (EINSTEIN, AMPLIFY et RE-COVER) sur leur utilisation dans la MTEV comprenaient un nombre limité de patients atteints de MTEV et cancer [36-41]. Des petites études commencent à être rapportées dans les congrès mais surtout des études spécifiques sont en cours: SELECT-D (Anticoagulation Therapy in SELECTeD Cancer Patients at Risk of Recurrence of Venous Thromboembolism) qui compare une HBPM et un AOD dans le traitement de la MTEV chez 530 patient cancéreux avec comme critère principal de jugement la survie globale, et comme critères secondaires la survie sans progression et les complications hémorragiques. L'analyse des données de ces essais cliniques permettra l'évaluation de l'efficacité et la sécurité des AOD dans des populations spécifiques de patients atteints de cancer

Références – Chapitre IV

1) G Agnelli. Venous Thromboembolism and cancer: a two-way clinical association. Thromb Haemost 1997; 78: 117- 120.

2) HT Sorensen, L Mellemkjaer, JH Olsen et al. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. N Engl J Med 2000; 343: 1846- 50.

3) McLean J. The thromboplastic action of cephalin. Am J Physiol 1916; 41: 250-7.

4) Howell WH, Holt E. Two new factors in blood coagulation heparin and pro-antithrombin. Am J Physiol 1918; 47: 328-41.

5) Howell WH. The coagulation of the blood. Harvey Lect 1916-1917; 12: 272-323.

6) Howell WH. Heparin, an anticoagulant, preliminary communication. Am J Physiol 1923;63: 434- 5.

7) Brinkhous K, Smith H, Warner E, et al. The inhibition of blood clotting: an unidentified substance, which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion of prothrombin into thrombin. Am J Physiol.1939; 125: 683- 87.

8) Abildgaard U. Highly purified antithrombin 3 with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis. Scand J Clin Lab Invest. 1968 ; 21 (1): 89-91.

9) Lindahl U, Bäckström G, Höök M et al. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76 (7): 3198- 3202.

10) Rosenberg RD, Lam L. Correlation between structure and function of heparin. Proc Natl Acad Sci U S A.1979; 76 (3): 1218- 1222.

11) Hirsh J, Bauer KA, Donati MB, et al. Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition) Chest. 2008; 133 (6suppl): 141S–159S.

12) Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E et al. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin iii and by gel filtration. Thromb Res.1976; 9 (6): 575- 583.

13) Harenberg J. Pharmacology of low molecular weight heparins. Semin Thromb Hemost.1990; 16 (suppl): 12-18.

14) Johnson EA, Kirkwood TB, Stirling Y, et al. Four heparin preparations: anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. Thromb Haemost. 1976; 35(3): 586-591.

15) Elalamy I. Héparines : structure, propriétés pharmacologiques et activités. EMC Hématologie, 13-022-D-10, 2010.

16) Hirsh J, Dalen J, Anderson DR et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range.Chest. 2001; 119 (1 Suppl): 8S- 21S.

17) Bauer KA, Hawkins DW, Peters PC. Fondaparinux, a synthetic pentasaccharide: the first in a new class of antithrombotic agents – the selective factor Xa inhibitors. Cardiovasc Drug Rev. 2002; 20 (1): 37- 52.

18) Samama MM, Gerotziafas GT. Evaluation of the pharmacological properties and clinical results of the synthetic pentasaccharide (fondaparinux). Thromb Res. 2003; 109 (1): 1- 11.

19) Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E et al. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. Drug Metab Dispos 2008 (36).

20) Lang D, Freudenberger C, Weinz C. In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs, and humans. Drug Metab Dispos 2009 (37).

21) Raghavan N, Frost CE, Yu Z, et al. Apixaban metabolism and pharmacokinetics after oral administration to humans. Drug Metab Dispos 2009 (37).

22) Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. Chest 2003; 124 (Suppl. 3): 58S- 68S.

23) Meyer G. Do anticoagulants improve survival in patients with cancer? Pathologie boil. 2008; 56: 233- 38.

24) Mousa SA, Mohamed S. Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anticancer efficacy. Oncol Rep 2004; 12 (4): 683-8.

25) Mousa SA, Mohamed S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. Thromb Haemost 2004; 92 (3): 627-33.

26) Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M et al. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. J Thromb Haemost 2003; 1(9): 1972- 6.

27) Borsig L, Wong R, Feramisco J et al. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, Pselectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 98 (6): 3352-7.

28) Ludwig RJ, Boehme B, Podda M et al. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. Cancer Res 2004; 64 (8): 2743- 50.

29) Vlodavsky I, Mohsen M, Lider O et al. Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. Invasion Metastasis 1994; 14 (1–6): 290- 302.

30) Kenagy RD, Nikkari ST, Welgus HG et al. Heparin inhibits the induction of three matrix metalloproteinases (stromelysin, 92-kD gelatinase, and collagenase) in primate arterial smooth muscle cells. J Clin Invest 1994 ; 93 (5): 1987-93.

31) Pross M, Lippert H, Misselwitz F et al. Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion in vitro, and decreases intraperitoneal growth of colonadenocarcinoma cells in rats after laparoscopy. Thromb Res 2003; 110 (4): 215- 20.

32) Gerotziafas GT, Mahé I, Elalamy. New orally active anticoagulant agents for the prevention and treatment of venous thromboembolism in cancer patients. Ther Clin Risk Manag. 2014; 10: 423- 36.

33) Franchini M, Bonfanti C, Lippi G. Cancer-associated thrombosis: investigating the role of new oral anticoagulants. Thromb Res. 2015; 135 (5): 777-81.

34) Lee AY, Rickles FR, Julian JA et al. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. J Clin Oncol 2005; 23: 2123-9.

35) Hull RD, Pineo GF, Brant RF et al. Long-term low-molecular-weight heparin versus usual care in proximal-vein thrombosis patients with cancer. Am J Med 2006; 119: 1062-72.

36) Bauersachs R, Berkowitz SD, Brenner B et al. EINSTEIN Investigators. Oral rivaroxaban for symptomatic venous thromboembolism. N Engl J Med. 2010; 363 (26): 2499- 2510.

37) Büller HR, Prins MH, Lensin AW et al. EINSTEIN-PE. Oral Rivaroxaban for the Treatment of Symptomatic Pulmonary Embolism. N Engl J Med. 2012; 366 (14): 1287-97.

38) Buller H, Deitchman D, Prins M et al. Botticelli Investigators, Writing Committee. Efficacy and safety of the oral direct factor Xa inhibitor apixaban for symptomatic deep vein thrombosis. The Botticelli DVT dose-ranging study. J Thromb Haemost. 2008; 6 (8): 1313-18.

39) Agnelli G, Buller HR, Cohen A et al. AMPLIFY Investigators. Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism. N Engl J Med. 2013; 369 (9): 799- 808.

40) Agnelli G, Buller HR, Cohen A et al. AMPLIFY-EXT Investigators Apixaban for extended treatment of venous thromboembolism. N Engl J Med. 2013; 368 (8): 699-708.

41) Schulman S, Kakkar AK, Schellong SM et al. A randomized trial of dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism (RE-COVER II); 53rd ASH Annual Meeting and Exposition; 2011; San Diego.

Partie

Expérimentale

Chapitre V : Matériels

et méthode

V.1 Lignées cellulaires adhérentes

Notre choix pour les cellules cancéreuses s'est porté sur les lignées cellulaires adhérentes BXPC3 pour le cancer du pancréas et MCF7 pour le cancer du sein.

Les lignées humaines cellulaires d'adénocarcinome primaire pancréatiques BXPC3 (lot F-11067) proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC; 1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 - USA). Les lignées cellulaires d'adénocarcinome du sein MCF7 (Fondation-7 Michigan Cancer) proviennent de l'ATCC (1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-USA).

L'obtention de cellules témoins non cancéreuses de sein et pancréas étant problématique nous nous sommes donc tournés vers les cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells; Clonetics, San Diego, USA) qui nous servirons de témoin pour nos expériences.

V.2 Réactifs et conditions de cultures

> Milieux de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés; un pour les cellules cancéreuses et un pour les cellules endothéliales.

- Les cellules endothéliales sont cultivées en milieu EBM-2 Endothelial Growth Medium (Clonetics, San Diego, USA). Sa fiche technique est la suivante: milieu qui contient 500 ml d'Endothelial Basal Medium-2 et les facteurs de croissance suivants: 0,5ml épidermique humain Growth Factor (VEGF), 0,5 VEGF, 0,5ml R3-Insulin-like Growth Factor-1 (R3-IGF-1), 0,5ml d'acide ascorbique, 0,2ml Hydrocortisone, 2ml humain Fibroblast Growth Factor-Beta (hFGF-β), 25ml de sérum bovin fœtal (FBS), 0,5ml Gentamicine / Amphotéricine-B (GA).
- Les cellules cancéreuses sont cultivées en milieu RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Ce milieu RPMI est supplémenté avec 5nM de glutamine, 50U/ml de pénicilline-streptomycine
(Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 10% de sérum de veau foetal décomplémenté. Le sérum de veau fœtal est décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes; cela permet d'inactiver le complément qui pourrait détruire les cellules en culture dans le cas où le SVF contiendrait des anticorps pouvant reconnaitre les cellules cultivées.

> Tampon PBS (Phosphate buffered saline)

Le tampon PBS provient de Sigma Aldrich. Sa fiche technique est la suivante:

NaCl 137mM
KCl 2,7mM
Na₂HPO₄ 10mM
KH₂PO₄ 1,4mM
D-glucose 1,0g/L

> Solution de digestion (Trypsine-EDTA)

Pour le détachement des cellules, le milieu suivant a été utilisé: Trypsine- EDTA (0,25%), rouge de phénol (Gibco, BRL, France)

Support de cellules en culture

Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture cellulaire 75cm² (Dutscher, France) et par la suite sur des plaques de culture 96 puits à fond plat (Dutscher, France).

V.1.1 Mises en culture des cellules

> Culture primaire:

Une ampoule de chaque cellules BXPC3, MCF7 et HUVEC est mise à décongeler au bain marie pendant 30 min à 37°C.

Après la décongélation, chaque ampoule contant les cellules est transférée dans un Falcon afin d'éliminer l'agent protecteur le DMSO (Diméthylsulfoxyde) par centrifugation. Un lavage est ensuite réalisé en milieu de culture afin d'éliminer toutes traces de DMSO. Un culot cellulaire est obtenu à la fin de cette étape.

Du milieu de culture adapté et frais est ajouté dans chaque Falcon. Enfin, le milieu de culture contenant les cellules en suspension est transféré dans une boite de culture 75cm^{2.}

Les boites de culture sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C (5% de CO2 et 95% d'air frais).

L'examen au microscope inversé à contraste de phase renseigne sur l'adhésion des cellules au fond de la boîte.

D'une façon générale, les cellules arrivent à confluence au bout de 4-5 jours.

Le milieu de culture est changé tous les deux-trois jours afin de conserver l'action des antibiotiques et de renouveler l'apport en facteurs de croissance et en nutriments.

Passage en subculture ou en culture sur microplaque :

• Détachement des cellules

A confluence, les cellules sont lavées une fois avec 5 mL de tampon PBS. Le détachement des cellules se fait en laissant agir 2-3 mL de la trypsine-EDTA pendant 3 min à 37°C. La digestion est arrêtée par ajout de 5 mL de PBS. La suspension cellulaire est transférée dans un falcon et centrifugée à 400g pendant 10 min. Les cellules sont ensuite remises en suspension soit en RPMI (pour les BXPC3 ou MCF7) soit en DMEM (pour les HUVEC). La numération et l'estimation de la viabilité cellulaire sont alors réalisées.

• Contrôle de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par le test d'exclusion en bleu trypan. Les cellules sont diluées en bleu trypan puis comptées sur une cellule de Malassez.

Les cellules sont utilisables si la viabilité cellulaire est supérieure à 98%.

% de viabilité= Nb total de cellules claires non bleues / (Nb total de cellules claires + Nb total de cellules) X 100

• Comptage cellulaire

La suspension cellulaire est diluée en bleu trypan. Les cellules sont comptées à l'aide d'une microscopique optique.

La concentration cellulaire C qui exprime le nombre de cellules/mL est calculée par la formule suivante:

C = ((N1+N2...+N)/n-1)*l'inverse de la dilution $*10^4$

• Culture sur microplaque

Une fois le comptage réalisé, la suspension cellulaire est diluée en milieu de culture afin d'obtenir une concentration à 50 000 cellules/mL.

 100μ L de cette suspension est déposée dans les 96 puits de la microplaque afin d'obtenir une concentration finale de 50 cellules/ μ L.

Les microplaques sont placées dans l'incubateur à 37°C (5% de CO2 et 95% d'air frais) pendant 24h ou 48h suivant le type d'expérience réalisé.

• Subculture

Le reste de suspension cellulaire est mis dans des flacons de culture et mis dans l'incubateur à 37°C afin que les cellules puissent adhérer de nouveau et ainsi de réaliser de nouvelles expériences.

V.1.2 Purification des MPs à partir des milieux conditionnés

La purification des MPs a été faite d'après les recommandations de La Croix et al [1] à partir des milieux conditionnés (milieux issus de la culture des cellules). Ces milieux contiennent tous les facteurs libérés par les cellules pendant un temps de culture déterminé mais sont appauvris en certaines substances utilisées par les cellules pendant la culture comme le glucose ou certains facteurs de croissance. Cette technique nous a permis de récupérer les différents facteurs libérés par les cellules tumorales exposées ou non à un traitement.

Méthode de préparation

Les microparticules provenant de cellules sont produites à partir du surnageant de culture des lignées de BXCP3, MCF7 et d'HUVEC.

1) Les cellules tumorales sont détachées de leur support de culture par trypsinisation classique.

2) Après numération, les cellules sont ensemencées après dilution en RPMI afin d'obtenir une concentration à 50 000 cellules/mL, 100μ L de cette suspension est déposée dans les 96 puits de la microplaque afin d'obtenir une concentration finale de 50 cellules/ μ L.

3) En parallèle, des boites ne contenant pas de cellules cancereuses mais des HUVEC sont également préparées et traitées dans les mêmes conditions afin d'obtenir les contrôles.

4) Les microplaques sont placées dans l'incubateur à 37°C (5% de CO2 et 95% d'air frais) pendant 24h ou 48h.

6) Après 48 heures ou 72 heures de culture, les milieux de culture des differents puits sont transférés dans des tubes coniques stériles et centrifugés à 1200 g pendant 15 minutes à $+ 4^{\circ}$ C afin d'éliminer d'éventuels débris cellulaires, le surnageant est prélevé jusqu'à 1cm du fond du tube puis remis en suspension. Ce surnageant est ensuite centrifugé 20 min à 10 000g de façon à concentrer les MPs dans un culot.

7) Le culot est resuspendu deux fois par 1mL de PBS afin de laver les microparticules avant une nouvelle centrifugation pour reformer le culot et écarter le surnageant.

8) Le culot final est repris par 1mL de PBS ou par 1ml de milieu de culture suivant son utilisation et est utilisé frais.

Il est préférable de ne pas conserver les échantillons centrifugés plus de 4 heures à température ambiante. L'analyse des microparticules se fera préférentiellementsur échantillons frais; il est cependant possible de conserver les culots pendant 6 mois et à -80°C. L'analyse pourra alors se faire après décongélation.

Le protocole présenté répond aux critères internationaux de préparation des microparticules approuvées par le comité international de standardisation scientifique ISTH [2].

Coculture cellules cancereuses et microparticules

La coculture des cellules cancéreuses et des microparticules a été réalisée de la façon suivante :

- 1) Culture des cellules cancéreuses en RPMI (12ml)
- 2) Récuperation du surnageant total
- 3) Préparation du culot de MPs (comme ci-dessus)
- 4) Reprise du culot par le RPMI (volume identique au protocole initiale : 12ml)
- 5) Culture des cellules cancereuses en présence du RPMI+MPs

V.2 Tests biologiques mis en œuvre

V.2.1 Le CAT (Calibrated Automated Thrombinography)

> Principe:

La génération de thrombine mesure l'activité protéolytique de la thrombine formée après activation de la coagulation par un réactif déclencheur.

La coagulation est déclenchée par recalcification d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) ou riche en plaquettes (PRP), en présence d'une faible concentration de facteur tissulaire recombinant humain (test classique). Un substrat fluorigène de la thrombine Z-Gly-Gly-Arg-AMC est associé pour suivre la concentration de thrombine au cours du temps. Le réactif déclencheur est un substrat synthétique sélectif "lent" (faible affinité, k_{cat} faible). Les réactions sont réalisées dans des plaques 96 puits en polypropylène à fond rond. Les mesures sont réalisées dans le fluorimètre Fluoroskan (Thermolabsystems) à l'aide d'un logiciel dédié

Trombinoscope (Calibrated Automated Thrombogram®). La fluorescence est enregistrée avec une longueur d'onde d'excitation à 390nm et d'émission à 460nm [3-5].

L'activation de la coagulation peut se faire à l'aide de 5 réactifs différents (Diagnostica Stago, France) suivant l'utilisation recherchée:

- PPP Reagent (5pM FT; 4µM PL) → Test classique
- PRP Reagent (1pM FT)
- MP Reagent (4µM PL)
- PPP Low Reagent (1pM FT; 4µM PL)
- PPP High Reagent (20pM FT; 4µM PL)

> Calibration

Hemker a établi qu'il était nécessaire d'avoir recours à un calibrant pour chaque plasma étudié. Un calibrant est donc ajouté au plasma à doser afin de corriger les effets de consommation du substrat, de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma, appareillage, consommables. Il permet de convertir les unités de fluorescence obtenues en concentration molaire de thrombine active. Le calibrant est constitué de thrombine en quantité connue, complexée à de l' α 2- macroglobuline. Ce complexe agit sur le substrat fluorigène sans faire coaguler le plasma.

Courbes de génération de thrombine

La cinétique de la réaction comporte 3 phases:

- la phase d'initiation aboutissant à la formation des premières traces de thrombine.

In Vivo, la coagulation est initiée par le facteur tissulaire (FT) présent dans le sous endothélium. LeFT fixeà la fois le FVII et le FVIIa, à l'état de trace dans le sang circulant (autoactivation en présence du FT du FVII en FVIIa). Le complexe binaire FT-FVIIa active le facteur X. Le facteur Xa, en présence de FVa transforme la prothrombine et génère ainsi les premières traces de thrombine (Figure V- 12).



Figure V-1: Phase d'initiation de la génération de thrombine

(d'après Varadi K. 2006)

- la phase d'amplification

La faible quantité de thrombine générée entraîne:

- l'activation et le recrutement de nouvelles plaquettes
- l'activation des cofacteurs FV et FVIII

- l'activation du FXI (le facteur XIa active le FIX)

Le complexe tenase active le FX à la surface des plaquettes activées. Le FXa, en association au FVa, transforme d'importantes quantités de prothrombine en thrombine, engendrant ainsi un *"pic de thrombine"*. Le "pic de thrombine" provoque la transformation du fibrinogène en fibrine aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine Stable après action du FXII

Figure V- 2).



Figure V- 2: Phase d'amplification de la génération de thrombine (d'après Varadi K. 2006)

- *la phase de terminaison* aboutissant à l'inhibition de la thrombine générée. Cette inhibitiondevient le phénomène exclusif après extinction de la prothrombinase et/ou épuisement de la prothrombine (Figure V- 3).



Figure V- 3: Phase de terminaison de la génération de thrombine (d'après Varadi K 2006)

> Dosages

La génération de thrombine est mesurée selon la méthode de Hemker et al. Dans un puits sont mélangés 80μ L de plasma à tester, 20μ L d'activateur. L'appareil distribue 20μ L de solution déclenchante (substrat fluorigène et Ca²⁺). La mesure de la fluorescence est réalisée toutes les 20 secondes pendant 60 min. Le logiciel Thrombinoscope interprète la fluorescence et en déduit la quantité de thrombine générée en temps réel.

Les paramètres du thrombogramme:

•ETP (potentiel endogène de thrombine en nM x min) est l'aire sous la courbe, elle représente l'ensemble de l'activité de thrombine active présente dans le plasma.

• Peak (concentration maximale de thrombineen nM) qui correspond au maximum de thrombine active générée.

• Lag time (temps de latence en min) représente la phase d'initiation de la génération de thrombine

• ttPeak est le temps nécessaire pour atteindre le Pic (en min.).

• L'index de vélocité (ou Mean Rate Index – MRI) est la vitesse avec laquelle se développe la phase de propagation (nM/min.)

est calculée par la formule: MRI = Peak / ttPeak - temps de latence

Les différents parametres sont représentés dans la Figure V-4.



Figure V- 4: Paramètres du thrombogramme (d'après Hemker HC. 2002)

V.2.2 Détermination des phospholipides procoagulants (méthode chronométrique)

La teneur en microparticules a été appréciée par le test STAProcoag PPL® (Diagnostica STAGO, France) qui est un temps de coagulation réalisable sur les appareils à détection mécanique de coagulation de type STA Compact et STA-R.

Pricncipe : Le principe du test consiste à mesurer, en presence de calcium, le temps de coagulation d'un système où l'addition d'un plasma substrat déplété en phospholipides procoagulants (R1) rend le test dépendant des phospholipides procoagulants contenus dans l'echantillon testé. Le réactif facteur Xa bovin (R2) permet de declancher la coagulation au niveau du facteur Xa, eliminant ainsi l'interaction des facteurs situés en amont de la coagulation (Figure V- 5).

Le raccourcissement du temps de coagulation d'un échantillon est le signe d'une augmentation des PPL [6-7].

Les valeurs usuelles annoncées par le fabriquant pour une concentration supposée «normale » de microparticules sont comprises entre 61 et 83 secondes. Le temps de coagulation est inversement proportionnel à la concentration en microparticules du prélèvement: plus le temps est court, plus il y a de microparticules.



Figure V- 5: Principe du test de coagulation STA ProcoagPPL®

V.2.3 Dosage du facteur tissulaire

Le dosage de l'activité du facteur tissulaire a été réalisé à partir d'un test maison.

> Principe

Le principe de ce test est la détermination de l'activité du facteur tissulaire présent dans un échantillon par son habilité à promouvoir l'activation du facteur X en présence de VII.

Après incubation de l'échantillon dilué en présence d'anticorps anti-TFPI, d'un inhibiteur de la polymérisation et de calcium, la quantité de facteur X activée formée est mesurée par son activité amidolytique sur le substrat synthétique CBS 52.44, la quantité de FXa générée étant proportionnelle à la concentration en FT [8].

Lecture de l'absorbance à 405 nm, entre 6 sec et 600 sec.

> Protocole du test

50 µl	Echantillon dilué au ¹ /3 en tampon TPH-Polybrène-AC
25 µl	Facteur X
25 µl	Facteur VII
50 µl	CaCl ₂
	Incubation 500 sec à 37°C
100 µ1	Substrat CBS 52.44

V.2.4 Dosage du cancer procoagulant

L'activité du CP a été déterminée par un dosage chromogénique.

> Méthode

L'activité du CP a été évaluée en mesurant la conversion de FX purifié en FXa. Après incubation des cellules pendant 30 minutes à 37 ° C en présence d'une solution de CaCl₂ 25mmol/L et de FX bovin (100 mg/ml ; Sigma) en tampon 50 mmol/L de bis-Tris propane, pH 6,7, le substrat chromogène spécifique FXa MAPA-Gly-Arg-pNA (CBS-0244 de Diagnostica Stago, France) est ajouté et l'activité amidolytique mesurée. Les cinétiques du développement de la couleur sont enregistrées à une longueur d'onde de 405 nm (de 0 à 30 minutes). L'activité du CP est exprimée en milliunités/ml (1 unité = quantité d'enzyme responsable de la libération de 1 µmol de p-nitroanilide sur le substrat en 1 minute). Une courbe d'étalonnage est construite en utilisant des concentrations croissantes de RVV (sérine protéase qui active directement le FX ; Diagnostica Stago, France). Le RVV sert de contrôle standard pour calibrer le test. Dans ce test, la formation de thrombine est totalement inhibée par l'ajout aux extraits de cellules d'une solution de MgCL₂ à 1 mmol/L. Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéine. La spécificité du test a été vérifiée par l'ajout dans le système expérimental de l'inhibiteur spécifique des cystéines protéinases E64 (de Sigma St Louis USA) afin de vérifier les possibles interactions non spécifiques.

V.2.5 Détection de l'asTF par méthode ELISA

Le FT "*Alternatively spliced*" (asTF) a été mesurée par méthode ELISA. Les puits d'une plaque sont revêtus d'un anticorps monoclonal anti-asTF. L'échantillon à tester, préalablement dilué 1:1 avec un tampon de dilution a été placé dans le puit contenant l'anticorps. Les molécules d'asTF, si elles sont présentes, se lient aux puits. Après une étape de lavage pour éliminer les produits non liés, un anticorps monoclonal spécifique asTF anti-humaine conjuguée à la peroxydase a été ajouté dans les puits. L'anti-asTF peroxydase se lie à l'asTF lié sur la plaque. Après une étape de lavage pour éliminer l'excès d'anti-asTF-peroxydase, l'enzyme peroxydase liée a été révélée par son action sur une durée déterminée sur le substrat TMB. Après arrêt de la réaction avec un acide fort, l'intensité de la couleur lue à 450 nm est directement proportionnelle à la quantité d'asTF dans l'échantillon à tester [9-10].

V.2.6 Cytométrie en flux

Principe de la cytométrie

La cytométrie en flux est une méthode d'analyse de cellules en suspension, véhiculées à grande vitesse jusqu'à une chambre d'analyse traversée par des faisceaux lasers. L'interaction des cellules avec la lumière permet de caractériser et classifier les cellules selon différents critères tels que la taille, la forme, la complexité ou la présence d'une molécule révélée par un composé fluorescent. L'utilisation de molécules fluorescentes (fluorochromes) couplées à des anticorps, protéines ou molécules permettent la détection spécifique des composants cellulaires ou leur intégration. Les marqueurs fluorescents absorbent l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée et émettent à une longueur d'onde plus élevée (émission > excitation). L'émission de fluorescence est canalisée et véhiculée par fibre optique jusqu'à une série de détecteurs (photomultiplicateurs) placés en aval de filtres (sélection chromatique).

Le cytométre en flux est composé de 3 éléments principaux :

- <u>Le système fluidique</u> constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon. Ce système permet le centrage hydrodynamique des éléments.
- <u>Le système optique composé</u> d'un laser (source optique d'excitation des fluorochromes) et de lentilles pour focaliser le faisceau laser.

Le système optique de réception est constitué d'une lentille pour collecter la lumière émise, de miroirs et de filtres optiques pour diriger les longueurs d'onde spécifiques sur les photomultiplicateurs. Ces derniers permettent deconvertir l'énergie lumineuse en énergie électrique.

- <u>Le système électronique</u> convertit les signaux électriques en signauxnumériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et lesanalyses statistiques [11-14].
- L'ordinateur analyse les données statistiques et représente sous forme d'histogramme ou de « dot plots » (nuages de points) la population cellulaire dont les propriétés sont évaluées. Toutes les expériences sont réalisées à l'aide du cytomètre FACScan avec un laser de longueur d'onde de 488 nm (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) et la fluorescence émise par stimulation du fluorochrome marqueur est analysée par une cellule photoélectrique. Des filtres lumineux et dichroïques permettent l'analyse simultanée de 3 couleurs, en plus de la lumière blanche : FL-1, FL-2, FL-3 (Tableau V- 1). Les données sont traitées et analysées à l'aide du logiciel CellQuest ou ModFit pour le cycle cellulaire (Becton Dickinson, USA).



Figure V-6: Représentation schématique d'un cytomètre de flux

(d'après Brown S. 2001)

Le cytomètre en flux comprend trois parties : (1) un réseau fluidique constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon (ici suspension cellulaire) ; (2) un banc optique avec une ou plusieurs sources lumineuses, des détecteurs du type photodiode (pour la diffusion de la lumière), des photomultiplicateurs et filtres optiques qui permettent de quantifier les diverses fluorescences émises par chaque objet ; (3) un microprocesseur qui convertit les signaux électriques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques. Certains appareils comprennent un dispositif de tri. En polarisant brièvement le jet, on obtient des gouttelettes chargées (+ ou -) qui seront déviées, avec leurs contenus, dans un champ électromagnétique. Les analyses se font à plusieurs milliers d'objets par seconde

Tableau V	-1	: Laser	et filtres	du cytomètr	e en flux	c Becton Dickinson
-----------	----	---------	------------	-------------	-----------	--------------------

Laser	Paramètres	Filtres (nm)	Exemple de Fluorochrome
	FL-1	515/30	FITC
488nm	FL-2	582/42	IP, PE
	FL-3	650	F.Rouge, IP

> Application de la cytométrie de flux

Dans notre étude, la cytométrie de flux a été utilisé pour l'étude des cellules cancéreuses mais également pour l'étude des microparticules relarguées dans le milieu par ces mêmes cellules cancereuses.

- Les récepteurs exprimés à la surface des cellules ou des MVs sont reconnus spécifiquement par un anticorps dirigé spécifiquement contre l'antigène désiré et marqué par un fluorophore. Les cellules ou les microparticules peuvent par exemple exprimer l'annexine V qui se lie spécifiquement aux phospholipides chargés négativement comme la PS, ou exprimer du facteur tissulaire détectable par l'utilisation d'un anticorps anti-FT.
- La cytométrie en flux est la méthode de choix pour l'étude des microparticules. Il s'agit cependant d'une technique délicate car, les MPs mesurant entre 0,1 et 1µm, il faut se placer dans des zones proches de la limite de sensibilité des cytomètres en ce qui concerne la détection de la taille. La zone de taille des MP est définie en utilisant un mélange de billes fluorescentes de diamètres différents. La cytométrie en flux permet de déterminer le nombre d'évènements (forward scatter) ainsi que la densité des évènements (side scatter).

> Marquage des cellules à l'annexine V ou au facteur tissulaire

Il est indispensable de vérifier la propreté du cytomètre afin d'éliminer les impuretés qui pourraient être numérées comme des MP. Avant chaque série, un tube contenant environ 0,5 mL d'eau stérile est analysé au cytomètre afin de réaliser un « blanc échantillon ». Pour commencer la série, le nombre d'évènements au bout d'une minute, doit être inférieur à 5 par seconde. Si ce n'est pas le cas au bout de trois fois, une procédure de nettoyage du cytomètre à l'éthanol dilué à 50% doit être lancé. Cette première étape est très importante et doit être respectée.

• Marquage à l'annexine V

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules ou des MPs sont reconnus spécifiquement par un anticorps dirigé spécifiquement contre l'antigène désiré et marqué par un fluorophore. Le contrôle négatif est un contrôle isotypique: les cellules sont incubées avec un anticorps monoclonal du même isotype que l'anticorps spécifique et également couplé avec le même fluorochrome (Annexine V-FITC réf 556419, BD technologies).

- Marquage des cellules cancéreuses:

 Les cellules cultivées en flasque de culture 75 cm2 sont détachées de leur support par trypsinisation classique, apres centrifugation le culot est repris et puis en suspension dans 4 mL de tampon de liaison annexine-V (BD Pharmingen®, Becton Dickinson, France) préalablement dilué au 1/4 en NaCl.

2) Un comptage est réalisé afin d'obtenir une solution à 10^6 cellules/ml.

3) 500 µL de suspension est transférée dans un tube de 5 mL

4) 5 μL d'annexine V-FITC (Biolegend, San Diego, USA) est ajouté puis vortexé doucement
 Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante dans le noir.

5) Un centrifugation est réalisée et le culot est repris par 500 μ L de tampon de liaison annexine-V dilué.

5) En paralléle un tube contrôle est réalisé en ajoutant 300 μ L de suspension cellulaire avec 5 μ L tampon de liaison annexine-V dilué.

6) Analyse des tubes par cytométrie en flux.

- Marquage des MPs

- Les culots de MPs sont repris par 100µL de tampon annexine-V dilué (BD Pharmingen®, Becton Dickinson, France).
- 2) Des dilutions suivant le protocole ci dessous sont réalisées:

Réactif	Tube 1 (Isotype)	Tube 2 (AnV)
Binding buffer dilué	20 µL	
Annexine V-FITC dilué au		20 µL
1/2 en Binding buffer dilué		•
Surnageant de MPs	30 µL	30 µL
Incubation à l'abri de la	30 min	30 min
lumière		
Binding Buffer dilué	500 μL	500 μL

3) Une centrifugation est réalisée et le culot repris par 500 µL de Binding Buffer dilué.

• Immunomarquage du facteur tissulaire

Le protocole utilisé est le même que pour l'annexine V suivant le protocole ci-dessous:

Dépatif	Tube 1	Tube 2
Keactii	(Isotype)	(FT)
IgG1-FITC	20 µL	
mab mouse anti human FT		20 µL
Surnageant de MPs	30 µL	30 µL
Incubation à l'abri de la	30 min	30 min
lumière		
Alexa Fluo		20 µL
Incubation à l'abri de la	30 min	30 min
lumière		
PBS	500 μL	500 μL

Une centrifugation est réalisée et le culot repris par 500 μ L de PBS.

Les échantillons sont analysés.

Les produits utilisés sont:

- l'anticorps Mab Anti Human TF (réf 4503) : Sekisui Diagnostics
- l'Alexa Fluor (réf A11059) : Life technologies
- IgG1-FITC (réf 400107) : Biolegend

Dénombrement des microparticules par cytometrie enflux

Cette technique par cytométrie en flux permet une numération des MPs basée sur leur taille et les antigénes que les MP expriment à leur surface. De plus, elle présente l'avantage de pouvoir être faite sur des échantillons congelés. En effet, aucun impact majeur de la congélation à -80°C sur la numération des MP n'a été retrouvé dans différentes études. La numération des MPs reste constante après un an de congélation à -80°C (80), et la décongélation des échantillons au bain marie à 37°C avant analyse permet de limiter la génération in vitro des MP [1;15]. Le protocole de dénombrement des microparticules par cytométrie en flux a été décrit en 2007 par Robert et al [16], ce qui a permis de l'adapter à notre laboratoire.

• Calibrage des microparticules

La première étape pour la détection des microparticules consiste às électionner les éléments ayant une taille inférieure à 1 μ m (0,8 à 1,5 μ m en fonction des études). Ceci est possible grâce à l'utilisation de billes fluorescentes de diamètres variés (0,5 μ m, 0,9 μ m et 3 μ m) couvrant la zone de taille des microparticules.Ce réactif est le Mégamix® (Biocytex).

Ces billes permettent de définir de façon standardisée la zone d'analyse des microparticules. Elles assurent également la stabilité des réglages et permettent de compter les microparticules de façon reproductible. Les billes de 0,9 μ m placent la limite haute de détection des microparticules, alors que les billes de 0,5 μ m placent la limite basse en dessous de laquelle la différence avec le bruit de fond n'est plus détectable. De plus, il existe désormais le Mégamix Plus® qui permet d'abaisser le seuil de détection à 0,3 μ m. Pour notre part nous avons utilisé ces billes Mégamix plus (réf 7803) de Biocytex.

• Réglage de la zone d'analyse des MPs

Le réglage de la zone d'analyse des MP sur le cytomètre s'effectue à l'aide d'un mélange de 2 catégories de billes fluorescentes de diamètres variés couvrant la zone de taille des MP (billes de 0,5 et 0,9 μ m). Ce mélange est également calibré en termes de concentration car il contient deux billes de 0,5 μ m pour une bille de 0,9 μ m.

Avant chaque série:

- On vérifie, en position FL1=1 sur le graphe FL1 Log x SS Log, que les billes soient correctement positionnées dans les zones pré-établies. Si ce n'est pas le le cas, on règle le PMT FL1 et/ou SS afin d'y parvenir.
- On vérifie, en position FS1=1 sur l'histogramme FS LOG x Count, que le pourcentage de billes de 0,5 μm est compris entre 48 et 52%. Dans le cas contraire, on modifie le PMT FS comme précédemment. L'ensemble des billes de 0,5 μm permet de définir la limite inférieure de la fenêtre d'analyse des MP.
- Enfin, sur le graphe SS Log x FS Log, on vérifie que l'autogate MP (fin du nuage de billes de 0,9 μm) est toujours correctement positionnée. La limite supérieure de la fenêtre d'étude des MP est délimitée par la fin du nuage de 0,9 μm et doit venir tangenter cette autogate

• Marquage des MPs

Les MPs sont décongelés au bain marie à 37°C puis sont marqués comme indiqué dans le paragraphe précedent.

Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Puis, 500 μ L de tampon et 30 μ L de billes fluorescentes de comptage Flow-Count (Beckman Coulter) sont ajoutés et chaque tube est vortexé plusieurs secondes. Dans la demi-heure suivant le marquage, l'échantillon est analysé sur le cytomètre.

L'acquisition est réalisée à vitesse lente (mode LOW) pendant une minute. L'acquisition est arrêtée au bout d'une minute. La concentration des billes dans le flacon est connue (ex: C=1003 billes/mL) et le nombre d'évènements MP est dénombré par l'appareil. La concentration des MPs est donc déduite par la formule: [MP] = (nombre d'évènements MP x 1003) / nombre de billes. Le principe est le même pour les autres catégories de MP ainsi que pour les MP coexprimant plusieurs antigènes.

V.4 Statistique

Le test paramétrique de Mann-Withney a été appliqué pour contrôler les changements dans les paramètres du thrombinogramme en présence et en l'absence de cellules cancéreuses dans le plasma ainsi que dans les différentes conditions expérimentales décrites ci-dessus. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Le degré de signification statistique a été fixé à 0,05. Le logiciel statistique SPSS a été utilisé pour l'analyse statistique. L'inhibition de la génération de thrombine (TG) a été calculée par l'inhibition de la formule GT = (1 - GT cellules / GT contrôle) %

La Normale Supérieure Limite (UNL) pour chaque paramètre de thrombinogramme a été défini dans le groupe de contrôle comme suit : UNL = moyenne + 2SD.

L'efficacité antithrombotique des composés a été comparée sur la base de la concentration qui réduit de 50% (IC50) du MRI et du peak. L'IC50 a été calculée par extrapolation de la courbe concentration-réponse construite pour chaque composé étudié dans chaque système expérimental. Pour comparer l'impact des cellules BXPC3 ou MCF7 et des plaquettes sur l'activité des composés étudiés, nous avons calculé le rapport de l'IC50 pour le MRI et le peak pour chaqu'un des agents selon les formules (PPP + BXPC3) / PPP et (PRP + BXPC3) / PRP ou (PPP + MCF7) / PPP et (PRP + MCF7) / PRP.

Pour la cytométrie en flux du fait de la grande dispersion des valeurs de MPs, nous avons choisi de travailler avec les valeurs médianes et leurs étendues plutôt qu'avec les valeurs moyennes. Les tests statistiques utilisés sont des tests non paramétriques : Scheffé, Kruskal-Wallis, Spearman, Mann-Whitney, Wilcoxon, courbes ROC. Pour tous ces tests, le seuil de significativité est p=0,05.

Références – Chapitre V

1) Lacroix R, Judicone C, Poncelet P et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. J Thromb Haemost.2012; 10: 437- 46.

2) Lacroix R, Robert S, Poncelet P et al. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. J Thromb Haemost.2010; 8: 2571-74.

3) Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R et al.: The calibrated automatedthrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. Pathophysiol Haemost Thromb 2002; 32: 249- 53.

4) Lecompte T, Wahl D, Régnault V. Thrombinographie. Hématologie 2006; 12: 115-27.

5) Gerotziafas GT. Le test de génération de thrombine. Un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. Bio Tribune Magazine 2007; 24: 37-43.

6) Exner T, Joseph J, Low J, et al. A new activated factor X-based clotting method with improved specificity for procoagulant phospholipid.Blood Coagul Fibrinolysis. 2003; 14: 773-9.

7) Van Dreden P, Rousseau A, Fontaine S et al. Clinical evaluation of a new functional test for detection of plasma procoagulant phospholipids. Blood Coagul Fibrinolysis. 2009; 20: 494-502.

8) Van Dreden P, Rousseau A, Savoure A et al. Plasma thrombomodulin activity, tissue factor activity and high levels of circulating procoagulant phospholipid as prognostic factors for acute myocardial infarction. Blood Coagul Fibrinolysis 2009; 220: 635- 641.

9) Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C et al. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. J Thromb Haemost 2006; 4: 158-167.

10) Unruh D, Sagin F, Van Dreden P et al. Levels of Alternatively Spliced Tissue Factor in the Plasma of Patients with Pancreatic Cancer May Help Predict Aggressive Tumor Phenotype. Ann Surg Oncol. 2015; 22 Suppl 3: S1206-11.

 Brown S, Couchy I, Fraisier V et al. Microscopies, marquages et imageries de la cellule végétale. Dynamique de la Compartimentation Cellulaire Institut des Sciences du Végétal, UPR 2355, 91198 Gif-sur-Yvette Ecole thématique Biologie végétale – 2001; 1- 16.

12) Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ et al. Measuring circulating cellderivedmicroparticles. J Thromb Haemost 2004; 2: 1842- 1843.

13) Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Detection and measurement of microparticles: an evolvingresearch tool for vascular biology. Semin Thromb Hemost 2007; 33: 771-779.

14) Pellegrini C. Evaluation et caractérisation de trois méthodes d'étudedes microparticules procoagulanteschez des patients en phase aiguë de l'AVC ischémique 2012: ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

15) Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. Thromb Haemost. 2010; 105 (3): 396-408.

16) Robert S, Poncelet P, Lacroix R et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? J Thromb Haemost. 2009; 7 (1): 190-7.

Chapitre VI : Validation

du modèle expérimental

Lors de la validation de notre modèle expérimental, nous nous sommes fixés comme critère d'acceptation une déviation inférieure à 15% correspondant à la variabilité de la génération de thrombine.

Chaque expérience a été réalisée entre 3 et 5 fois.

VI.1 Choix et culture des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses

Le type histologique du cancer est l'un des facteurs qui influence le risque de MTEV. Il est donc important d'établir avec un maximum de précision la nature et le degré d'agressivité d'un cancer pour pouvoir comprendre les mecanismes de cette agressivité. Dans ce but, notre premiére approche a été d'étudier l'effet en plasma de differentes lignées afin de selectionner deux lignées une à forte action sur la génération de thrombine et une à faible action. Le contact de différentes cellules cancéreuses avec du PPP normal a donné lieu à une augmentation significative du Peak et du MRI (et une réduction du temps de latence et du ttPeak par rapport à l'essai témoin (PPP normal sans cellule). Une variabilité importante de l'effet de différents types de cellules cancéreuses sur la génération de thrombine dans le plasma humain normal a été observée. A un nombre égal de cellules, les MCF7 ont l'activité procoagulante la moins puissante et les BXPC3 l'activité procoagulante plus forte. Les BXPC3 et MCF7 ont été choisis pour l'étude.

Tableau VI- 1 : Variabilité de l'effet procoagulant des cellules cancéreuses sur la génération de thrombinedans le plasma humain normal.

L'expérience contrôle est constituée de la recalcification du PPP humain normal en absence de cellules (cancer du sein: MD-AMB-231, MCF7, BT20; cancer du colon: HT29, HCT116; cancer des ovaires: IGROV1; cancer du pancréas: BXPC3)

Cancer cell lines	lag-time	tt-Peak	Peak	MRI
	(min)	(min)	(nM)	(nM/min)
MCF7	6.1±0.9	9.6±1.1	121±22	34±6
MD-MBA-231	8.9±0.6	14.5±0.8	76±8	14±3
BT20	2.3±0.4	6.0±1.1	129±6	35±8
HT29	5.36±1.3	11.8±1.9	81±11	13±4
HCT116	4.48±0.3	9.9±0.5	91±12	17±3
IGROV1	2.5±1.4	7.1±2.4	95±10	22±7
BXPC3	4.1±1.1	6.9±1.3	199±13	71±7
contrôle	9.6±1.2	16.3±1.5	118±9	17±4

VI.2 Détermination du nombre de cellules

La mise au point de notre modèle expérimentale a débuté par la recherche du nombre de cellules sur plaque afin d'avoir une génération de thrombine optimale.

Pour cela, les cellules BXPC3 et MCF7 ont été mises sur plaque à différentes concentrations: 0 cellules/ μ l, 30 cellules/ μ l, 50 cellules/ μ l, 100 cellules/ μ l, 200 cellules/ μ l et 600 cellules/ μ l.

Les cellules sont ensuite incubées 24h à 37°C et une génération de thrombine est ensuite réalisée le lendemain.









Figure VI-1 : Variation de la génération de thrombine en fonction du nombre de cellules

D'après les graphiques ci-dessus, nous pouvons observer un plateau à partir de 50 cellules par μ L pour tous les paramètres du thrombographe.

Dans nos prochaines expériences, nous fixons donc la concentration en cellules à 50 cellules/ μ l.

VI.3 Effet du milieu RPMI sur la génération de thrombine

Une génération de thrombine a été réalisée sur du pool additioné de milieu RPMI et du Pool seul (Témoin) afin de s'assurer que le milieu RPMI n'activait pas à lui seul la GT. Pour cela, 80µL de Pool + RPMI et 80µL de Pool ont été ajouté sur la plaque contenant 20µL de PPP Reagent puis la GT a été déclenché par un réactif déclenchant.



Figure VI- 2 Effet du milieu RPMI sur la génération de thrombine

Comme nous pouvons le constater d'après la Figure VI- 2, le milieu RPMI n'a aucune influence sur la GT. En effet, les 2 courbes de GT se superposent.

VI.4 Effet de la trypsine sur la génération de thrombine

Afin de vérifier que la trypsine, lors du décollage des cellules, n'a pas d'effet sur la génération de thrombine, les cellules BXPC3 et MCF7 ont été décollées par de la trypsine et dans une autre expérience par un râteau spécial culture cellulaire.

Dans la première expérience, quand les cellules sont arrivées à 50% - 70% de confluence, ces dernières sont incubées avec la trypsine afin que celles-ci se décollent. Du PBS est ajouté dans la flasque afin d'arrêter l'effet de la trypsine.

Une centrifugation est réalisée et le culot est repris par du RPMI afin de réaliser un comptage.

Dans la seconde expérience, les cellules sont décollées à l'aide d'un râteau. Du milieu RPMI est rajouté dans la flasque afin de faciliter le décollage. Une centrifugation est réalisée et le culot est repris par du RPMI afin de réaliser un comptage.

Aprés dilution, 100μ L de chaque suspension est déposée dans les puits de la microplaque afin d'obtenir une concentration finale de 50 cellules/ μ L.

Les microplaques sont placées dans l'incubateur à 37°C (5% de CO2 et 95% d'air frais) pendant 24h.

20µL de PPP Reagent est ajouté dans les puits de dosage puis 80µL de plasma est ajouté dans chaque puits afin de réaliser une génération de thrombine.

Les résultats sont consignés ci dessous:

Méthode	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI
MCF7 RATEAU	$5{,}35\pm0{,}34$	1353 ± 88	$148,\!11\pm9,\!7$	$9{,}79\pm0{,}78$	$33,\!36\pm8,\!89$
MCF7 TRYPSINE	$5{,}23\pm0{,}44$	1238 ± 103	$142,\!47 \pm 11,\!3$	$9{,}67 \pm 0{,}82$	$32,09 \pm 11,23$

Méthodee	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI
BXPC3 RATEAU	$4,\!13\pm0,\!56$	1987 ± 97	$172,12 \pm 12,5$	$8,\!12\pm0,\!99$	$43,\!14\pm9,\!90$
BXPC3 TRYPSINE	$4{,}01\pm0{,}62$	1918 ± 123	$166{,}76\pm10{,}8$	$8,\!07 \pm 1,\!11$	$41,\!07 \pm 11,\!42$

Comme nous pouvons le voir, la trypsine n'a aucun effet sur la génération de thrombine. Les différences de résultats entre la trypsine et le râteau n'excèdent pas 15% d'erreur.

VI.5 Effet de la durée d'incubation des cellules sur plaque

Les cellules BXPC3 et MCF7 sont incubées à 37°C sur microplaque pendant 5h, 24h, 48h et 72h afin de voir l'effet du temps sur les cellules qui initieront par la suite une génération de thrombine.

Les résultats sont consentis dans le tableau ci-dessous:

		BXPC3			
temps (heurs)	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI
5	$4{,}28\pm0{,}33$	1956 ± 136	166,75	8,11	43,54
24	$4{,}41\pm0{,}45$	1827 ± 167	165,94	8,23	43,44
48	$4,\!19\pm0,\!67$	1777 ± 104	164,67	8,45	38,65
72	$3,\!34\pm0,\!59$	1548 ± 142	136,04	8,65	25,62

		MCF7			
temps (heurs)	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI
5	4,96	1360	151,56	9,83	31,11
24	5,01	1353	150,32	9,53	33,26
48	5,23	1349	142,78	9,23	35,70
72	5,33	1358	137,57	11,29	23,07

A partir de 72 h, nous observons une différence significative de la GT par rapport aux autres temps d'incubation. En effet pour les BXPC3, le MRI à 24h est de 43,44 contre 25,62 à 72h. Pour les MCF7, le MRI à 24h est de 33,26 contre 23,07 à 72h. Les pourcentages d'erreur pour les BXPC3 et les MCF7 sont bien supérieurs à 15%.

Pour un côté pratique pour nos expériences, nous fixons 24h le temps d'incubation des plaques.

VI.6 Effet du lavage de la plaque sur la génération de thrombine

Dans le but d'étudier l'impact du lavage des plaques après culture sur la GT, 100μ L de chaque suspension cellulaire est déposée dans les puits de la microplaque afin d'obtenir une concentration finale de 50 cellules/ μ L.

Les microplaques sont placées dans l'incubateur à 37° C (5% de CO₂ et 95% d'air frais) pendant 24h.

Pour chaque type cellulaire, les microplaques sont lavées soit 1 fois, soit 2 fois en PBS. Une GT est ensuite réalisée sur un Pool de plasma Normaux (PPP).

En paralléle, une GT est lancée sur une plaque qui n'a pas subi de lavage en PBS. Dans ce cas les puits ont juste été vidés de leur surnageant de culture.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous:

Méthode	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI
MCF7 après 1 lavage	5,15	1410	150,11	9,99	31,01
MCF7 après 2 lavages	5,05	1538	148,56	9,56	32,94
MCF7 sans lavage	4,44	1202	133,34	11,44	20,02

Méthode	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI
BXPC3 après 1 lavage	4,32	1867	167,32	8,05	44,85
BXPC3 après 2 lavages	4,44	1945	165,45	8,12	44,95
BXPC3 sans lavage	3,67	1598	149,56	8,56	30,58

Comme nous pouvons le voir, l'absence de lavage influe sur les résultats de la GT. La présence d'un ou deux lavages montre qu'il n'y a pas de différence significative entre un ou deux lavages. En conséquence pour la suite de notre étude, nous avons fixé dans notre modèle expérimental la réalisation d'un lavage en PBS.

VI.7 Effet de la concentration en SVF sur la GT

Ici, nous avons voulu voir l'effet d'une diminution de la concentration en SVF sur la génération de thrombine. Pour cela, le milieu RPMI a été enrichi en SVF à différentes concentrations soit 1%, 5% et 10% de SVF.

Les cellules BXPC3 et MCF7 sont donc cultivées dans des flasques contenant le milieu RPMI à différentes concentrations en SVF.

Comme nous pouvons le voir avec les tableaux ci dessous, le pourcentage d'erreur pour le milieu contenant 1% de SVF dépasse les 15%. Pour les BXPC3, le MRI à 10% de SVF est de 42,96 et passe à 36,33 pour le SVF à 1%.

Pour les MCF7, le MRI à 10% de SVF est de 34,22 et passe à 27,13 pour le SVF à 1%.

BXPC3						
Concentration	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI	
SVF 1%	4,57	1913	167,49	9,18	36,33	
SVF 5%	4,09	1875	171,93	7,88	45,36	
SVF 10%	3,95	1824	169,50	7,90	42,96	

MCF7						
Concentration	Lagtime_(min)	ETP_(nM•min)	Peak_(nM)	ttPeak_(min)	MRI	
SVF 1%	5,98	1356	135,65	10,98	27,13	
SVF 5%	5,23	1299	146,94	9,68	33,02	
SVF 10%	5,12	1267	154,00	9,62	34,22	

Nos résultats sur l'étude de l'impact de la concentration en SVF entre 1% et 10 % nous ont permis de voir qu'une concentration entre 5 et 10 % n'entrainée pas de variation significative des résultats, nous avons donc pour la suite de cette étude fixé la concentration en SVF à 10 %, concentration usuellement utilisée dans la littérature.

VI.8 Détermination du nombre de plaquettes pour les expériences en plasma riche en plaquettes

Dans le but de valider nos essais de génération de thrombine en plasma riche en plaquettes, nous avons déterminé la concentration en plaquettes nécessaire dans le PRP afin de ne pas avoir d'interférences sur les résultats du au nombre de plaquettes.

Pour cela, 20µl de PRP Reagent a été ajouté dans les puits de la microplaque puis 80µl de PRP à différentes concentrations en plaquettes ont été additionnés.

Le PRP à différentes concentrations en plaquettes a été obtenu de la maniére suivante: Une quantité suffisante de sang est prélevée le jour de l'expérience. Le sang est ensuite centrifugé à 190g pendant 10 min à 20°C.

Le surnageant est récupéré constituant ainsi le PRP et est ajusté à 150G/L en plaquettes à l'aide de plasma pauvre en plaquettes (PPP) autologue obtenu en recentrifugant les tubes de prélevement à 1750g pendant 10min à 20°C.

BXPC3						
Numération plaquettaire (plaquettes/µL)	Lagtime (min)	ETP (nMxmin)	Peak (nM)	ttPeak (min)	MRI (nM/min)	
500 000	3,67	2028	187,8	7,67	46,95	
250 000	3,75	1756	175,64	7,75	43,91	
150 000	3,88	1626	170,56	7,79	43,62	
120 000	4,07	1592	166,48	9,01	33,78	
60 500	4	1571	165,57	9,5	30,10	
30 250	4,17	1651	145,95	10,55	22,88	
15 000	4,5	1555	143,38	11,67	20,00	
7 500	4,67	1475	138,37	13,5	15,67	

MCF7						
Numération plaquettaire (plaquettes/µL)	Lagtime (min)	ETP (nMxmin)	Peak (nM)	ttPeak (min)	MRI (nM/min)	
500 000	7,67	1770	194,9	12,33	41,82	
250 000	7,99	1677,5	187,89	12,5	41,66	
150 000	8,07	1655	154,49	13	31,34	
120 000	8,27	1628	149,73	14,5	24,03	
60 500	8,5	1535	135,85	15,67	18,95	
30 250	8,83	1466,5	129,25	16,5	16,85	
15 000	8,73	1422	119,73	17,87	13,10	
7 500	9,33	1403	105,85	18,17	11,97	

Nous avons donc pour la suite de cette étude fixée la concentration en plaquettes à 150 000, concentration usuellement utilisée dans la littérature.

Chapitre VII :

Résultats

VII.1 Le modèle expérimental

La construction d'un modèle expérimental, et plus particulièrement l'établissement de ses caractéristiques, nécessite de faire des choix, des hypothèses à étudier. En effet, modéliser est par définition traduire en une vision *simplifiée* la réalité. Une telle démarche est pilotée par deux lignes directrices :

1. Explorer les problématiques fixées à étudier.

2. Trouver un bon équilibre sur le modèle: s'il est trop complexe alors il est difficilement exploitable; s'il est trop simpliste alors il ne permet pas d'aboutir à des conclusions pertinentes.

Un modèle est donc établi en vue de répondre à trois questions :

*Question*1. Quel est l'impact du type histologique des cellules cancereuses sur les traitements anticoagulants ?

Question 2 : Quel sont les differents mécanismes procoagulants des cellules cancereuses

Question 3 : Quel est le rôle du microenvironnement sur le pouvoir hypercoagulant de ces cellules cancereuses en fonction de leur type.

Notre but est donc l'élaboration d'un système expérimental qui permet l'étude des capacités procoagulantes des cellules cancéreuses et de ses effets sur la génération de thrombine. La mise au point et la validation de ce modèle expérimental qui consiste à la mise en contacte de cellules cancéreuses avec du plasma humain pauvre ou riche en plaquettes nous a permis d'étudier l'effet de différentes lignées de cellules cancéreuses sur la génération de thrombine (Figure V- 7). En parallèle, nous avons utilisé un spectre de tests qui ont permis l'analyse des molécules qui sont impliquées dans le profil procoagulant de ces cellules.



Figure V-7: Principe du modèle experimental
VII.2 Article 1

VII.1.1 Version anglaise: Cancer cells BXPC3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin.

Author's personal copy

Thrombosis Research 136 (2015) 1273-1279



Contents lists available at ScienceDirect

Thrombosis Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/thromres

Full Length Article

Cancer cells BXPC3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin



Aurélie Rousseau^a, Patrick Van Dreden^b, Elisabeth Mbemba^a, Ismail Elalamy^{a,c}, Annette Larsen^a, Grigoris T. Gerotziafas^{a,c,}

^a INSERM U938, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Université Paris VI, Paris, France

Research and Development, Diagnostica Stago, Gennevilliers, France

Service d'Hématologie Biologique Hópital Tenon, Hópitaux Universitaires Est Parisien, Assistance Publique Hópitaux de Paris, Paris, France

article info

Articlehistory Received 10 March 2015 Received in revised form 13 July 2015 Accepted 16 August 2015 Available online 3 September 2015

Kevwords. Apixaban Cancer Thrombin generation Anticoagulant NOAC Low molecular weight heparin Fondaparinux

abstract

Introduction: Cancer cells may alter the efficiency of the antithrombotic agents. To explore this possibility, the present study compared the capacity of the LMWH enoxaparin and the specific inhibitors of Xa (apixaban and fondaparinux) to inhibit thrombin generation triggered by pancreas adenocarcinoma cells (BXPC3) and human breast carcinoma cells (MCF7).

Materials and methods: Samples of platelet poor (PPP) or platelet rich plasma (PRP) spiked with apixaban, fondaparinux or enoxaparin were added in micro wells carrying cancer cells and assessed for thrombin generation. In the control experiment thrombin generation was triggered with tissue factor reagent.

Results: The three antithrombotics inhibited thrombin generation in a concentration dependent manner. The BXPC3 and MCF7 cells reversed in a different intensity the effect of the studied agents. According to the histological type of the cancer the antithrombotic efficiency of apixaban was preserved or partially reversed. Fondaparinux, was more vulnerable to the presence of cancer cells as compared to apixaban. The effect of BXCP3 or MCF7 cells on the antithrombotic potency of enoxaparin was of similar magnitude as that on apixaban. Conclusions: The type of cancer cells is determinant for the antithrombotic efficiency of the specific factor Xa inhibitors. In contrast it does not significantly influence the potency of enoxaparin. The present study shows that the impact of the type of cancer cells on the antithrombotic activity of the specific Xa inhibitors should not be neglected. This has to be taken into consideration for the design of dose-finding studies of the direct orally active FXa inhibitors in patients with different histological types of cancer.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Effective and safe anticoagulation for prevention and treatment of VTE is corner stone for the management of patients with cancer, aiming to decrease morbidity, improve the quality of life and contribute to the decrease of mortality. According to the international guidelines, the low molecular weight heparins (LMWHs) enoxaparin, dalteparin or tinzaparin and the synthetic pentasaccharide fondaparinux are the first choice drugs for the prevention and treatment of VTE in cancer patients [1-5]. However, in cancer patients treated with LMWH for VTE the rate of recurrence is higher as compared to non-cancer ones [6]. In addition, treatment with LMWHs presents several limitations, negatively affecting the quality of life, such as the need for daily subcutaneous injections and skin hematomas, as well as the frequent monitoring of platelet count due to the risk of heparin induced thrombocytopenia. $Concerns \, on \, the \, management \, of \, treatment \, with \, LMWHs, particularly$

http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2015.08.009 0049-3848/© 2015 Published by Elsevier Ltd.

in cancer patients, stem from the complexity of their mechanism of action and the heterogeneity of their structure and the non specific binding with plasma proteins [7]. Choosing the appropriate antithrombotic agent providing stable anticoagulation non-compromised by bleeding risk or other adverse reaction is important in this high-risk population [8,9]. The non vitamin K dependent orally active anticoagulants (NACO), are expected to improve the quality of the antithrombotic treatment [10,11]. Among the target specific antithrombotic agents only apixaban (a selective, direct, orally active inhibitor of Xa) has been assessed in a phase II clinical trial for VTE prophylaxis in patients with metastatic cancer [12]. The analysis of the subgroup of cancer patients included in the phase III clinical trials which assessed the efficacy and safety of the NACO in prophylaxis and treatment of VTE underlined that the NACO might offer an alternative treatment in cancer patients [13]

Thrombin generation of human plasma, triggered by the human pancreatic cancer cells BXPC3 and breast cancer cells MCF7 is a validated experimental system sensitive to detect the differences of the procoagulant potential of the cancer cell lines [14]. This experimental system is also sensitive to detect the modifications of the

^{*} Corresponding author at: Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, Paris Cedex 20, France. E-mail address: grigorios.gerotziafas@aphp.fr (G.T. Gerotziafas)

antithrombotic potency of the LMWHs and fondaparinux induced by the pancreatic cancer cells BXPC3 [15].

The modelization of the mechanism of action of the NACO in cancer induced hypercoagulability and the comparison with the LMWH could offer experimental data necessary for the optimal design of clinical trials in cancer patients. To this aim, the present study compared the capacity of the LMWH enoxaparin and the specific inhibitors of Xa (apixaban and fondaparinux) to inhibit thrombin generation triggered by two different cancer cell lines BXPC3 and MCF7. We also investigated the combined influence of platelets and cancer cells on the antithrombotic potency of apixaban, fondaparinux and enoxaparin.

1. Materials and methods

1.1. Cancer cell cultures

Adhesive cell lines BXPC3 and MCF7 from pancreatic and breast cancer respectively were used for thrombin generation experiments in human plasma. Human pancreatic primary adenocarcinoma cell line BXPC3 (lot F-11067) was from American Type Culture Collection (ATCC; 1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 - USA). Breast adenocarcinoma cell line MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) was from ATCC (1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-USA). Cells were expanded in RPMI-1640 medium (from Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at 37 °C in 100% humidified atmosphere with 5% CO2. Culture medium was supplemented with 10% (vol/vol) Fetal Calf Serum (FCS) (from Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 5 mM gluta- mine, 50 U/ml penicillin-streptomycin (from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Adhesive cultures were developed on 75 cm² culture flasks. At 50% confluence the cells were incubated with trypsin for 5 min at 37 °C, then PBS was added to neutralize trypsin. Then cells suspensions were centrifuged and then pellets were suspended in RPMI. Thereafter, cells were washed twice in PBS and subsequently, they were suspended in saline. A volume of 100 µl of cell suspension (50 cells/µl) was placed in 96-well plates and cells were cultured and adhered at 37 °C in 100% humidified atmosphere with 5% CO2 for 24 h. In preliminary experiments we found that after 24 h of incubation, the BXPC3 cells were at 70% confluence and the MCF7 cells were at 80% confluence (data non shown). In these conditions the two cancer cell lines gave similar intensity of thrombin generation. Cells were used in the experiments only if the apoptotic cell number was lower that 2% of the whole cells count.

1.2. Antithrombotic agents

Enoxaparin (Lovenox®) was obtained from Sanofi-Aventis (Paris, France). Fondaparinux (Arixtra®), was obtained from GSK (Paris, France). Apixaban (Eliquis®) was obtained from Pfizer (Paris, France).

1.3. Human plasma

Plasma samples for thrombin generation experiments were obtained from 15 healthy volunteers, members of the laboratory staff, who had not taken any medication during the last 30 days. Blood samples were taken by atraumatic antecubital venipuncture and collected in siliconized vacutainer tubes (Becton Dickinson, Meylan, France) containing buffered 0.13 M trisodium citrate (nine parts blood to one part citrate solution; 3.8%). Platelet poor plasma (PPP) was prepared after centrifugation of citrated whole blood for 30 min at 2000 g at room temperature. Platelet rich plasma (PRP) was prepared after centrifugation of citrated whole blood for 10 min at 150 gat room temperature. After centrifugation the supernatant PRP was removed and the platelet count was adjusted at 150×10^9 /L by dilution with autologous PPP obtained after a further centrifugation of the remaining blood for 15 min at 2000 g. The PRP and PPP from 15 donors were spiked with increasing, clinically relevant, concentrations of each one of the studied

compounds. Anti-Xa activity in plasma was measured with the STA Liquid anti-Xa assay (from Diagnostica Stago, Gennevilliers, France).

1.4. Thrombin generation assay

Thrombin generation was studied in vitro using the Calibrated Automated Thrombogram and the respective software (Thrombinoscope b.v., Maastricht, The Netherlands) [16]. In each well of the microtiter plate, 80 µL of PPP or PRP were mixed with 20 µL PPP-Reagent® (5 pM of TF and 4 μM of phospholipids) or PRP-reagent® (5 pM of TF); obtained from Stago, Asnieres, France. Thrombin generation was initiated by adding triggering solution containing CaCl₂(16.7 mM final concentration) and fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 417 µM final concentration). A plate reader fluorometer (Fluoroskan Ascent®, ThermoLabsystems, Helsinki, Finland) and the appropriate software (Thrombinoscope b.v., Maastricht, The Netherlands) were used. Thrombin generation curves were corrected for substrate consumption and inner filter fluorescence effects using a Thrombin Calibrator® (Thrombinoscope b.v., Maastricht, The Netherlands). Among thrombogram parameters we analyzed the maximum concentration of thrombin (Peak) and the mean rate index (MRI) of the propagation phase of thrombin generation [calculated by the formula: Peak / (ttPeak - lag-time)]. Inter-individual and intra-assay variability of thrombogram parameters were assessed in healthy individuals and has been published elsewhere [17-19].

1.5. Thrombin generation experiments induced by cancer cells

The $\operatorname{BXPC3}$ or MCF7 cells were expanded in the wells of microtiter plate suitable for thrombin generation assessment as follows: BXPC3 or MCF7 cells obtained from cell culture flasks were suspended in culture medium to obtain a concentration of 50 cells/ μ l. The concentrations of cells in PPP or PRP were verified by contrast microscopy observation. Observation by contrast microscopy also verified that no aggregates were formed in PRP when it was in contact with the cancer cells. Then, 100 µl of this suspension were spiked in each well of the microtiter plaque (5000 cells/well) and incubated for 48 h at 37 °C in 100% humidified atmosphere with 5% CO_2 . At 50% confluence the BXPC3 or MCF7 plates were washed 3 times with PBS and once with saline. Then, 80 µl of normal PPP or fresh PRP were added in each well and thrombin generation was assessed as described above. In the control experiment, wells were filled with culture medium without cells and treated in the same way as the experiments. Each experiment was repeated 8 times. Thrombin generation was assessed in PPP and PRP spiked with the indicated concentrations of the studied antithrombotic agents or saline, in the presence or not of BXPC3 or MCF7 cells. Thrombin generation was initiated by adding triggering solution containing CaCl₂ (16.7 mM final concentration) and fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 417 μM final concentration). The procoagulant potency of cancer cell lines was assessed by recalcification of plasma being in contact with cells without exogenous addition of TF and phospholipids. In control experiments thrombin generation was assessed in plasma spiked with increasing concentration of lymphocytes from healthy donors and was compared to thrombin generation obtained after recalcification of normal plasma. No significant difference was found between the two experimental procedures (data not shown). In preliminary experiments we also verified that the culture medium (solution of RPMI, glutamine, penicillin streptomycin and fetal calf serum) did not influence thrombin generation process of normal $\ensuremath{\text{PPP}}$ and $\ensuremath{\text{PRP}}$. The effect of the studied antithrombotic agents on thrombin generation triggered in PPP and PRP in the presence of BXPC3 or MCF7 cells was compared to the control experiment performed in normal PPP (PPP/ TF) and PRP (PRP/TF) in which it was added PPP-reagent® or PRPreagent® respectively, as described above.

The solution of the antithrombotic agents were mixed with plasma (in a volume/volume ratio 1/10). The concentrations of enoxaparin

ranged from 0.2 to 1.2 anti-Xa IU/ml. The concentration of fondaparinux ranged from 0.2 to 1.2 µg/ml. The concentration of apixaban ranged from 16.5 to 2000 ng/ml.

1.1. Statistical analysis

The inhibition of thrombin generation by the studied antithrombotic agents was calculated by the formula: Inhibition = $(1 - TG_{drug})$ TG_{control})%. The antithrombotic efficiency of the studied compounds was compared on the basis of the concentration that reduced 50% (IC50) the MRI and the Peak. The IC50 was calculated by extrapolation from the concentration-response curve constructed by each studied compound in each experimental system. To compare the impact of BXPC3 or MCF7 cells and platelets on the activity of the studied compounds we calculated the ratio of the IC50 for MRI and peak for each agent according to the formulas (PPP + BXPC3) / PPP and (PRP + BXPC3)/PRP or (PPP + MCF7)/PPP and (PRP + MCF7)/PRP. Nonparametric Mann-Whitney test was applied to control changes in thrombogram parameters in the presence of cancer cells and the studied antithrombotic agents. Results are shown as mean \pm SD. The level of statistical significance was set at 0.05. SPSS statistical software package was used for statistical analysis.

2 Results

2.1. Inhibition of thrombin generation in PPP by enoxaparin, fondaparinux and apixaban

When thrombin generation was triggered in PPP by addition of physiologically relevant concentration of TF and in PPP (PPP/TF), the Peak was 276.5 \pm 17.2 nM and the MRI was 97.7 \pm 10.3 nM/min. In PPP/TF apixaban, fondaparinux and enoxaparin significantly reduced the Peak (inhibition 85% 45% and 78% respectively) and the MRI (96%, 69%, 98% respectively). In PPP/BXPC3, the Peak was 150.1 ± 15.4 nM and the MRI was 39.7 ± 2.2 nM/min. Apixaban, fondaparinux and enoxaparin significantly reduced the Peak (84%, 23% and 72% respectively) and the MRI (94%, 37% and 90% respectively) (Table 1).

The inhibitory effect of apixaban, fondaparinux and enoxaparin on thrombin generation in PPP/BXPC3 cells was concentration dependent. The IC50 of apixaban for the Peak was 1.60 ± 0.61 folds higher as compared to the PPP/TF (p b 0.001). The IC50 of fondaparinux and enoxaparin for the Peak were respectively 1.18 ± 0.10 folds and 1.91 ± 0.08 folds higher as compared to the respective IC50 in the PPP/TF (pb 0.05). The IC50 of a pixaban for the MRI were 1.62 ± 0.04 folds higher as compared to the PPP/TF (p b 0.05). The IC50 of fondaparinux and enoxaparin for the MRI were 2.70 ± 0.10 and 2.01 ± 0.05 fold higher as compared to the PPP/TF (p b 0.001) (Table 2).

In PPP/MCF7 the Peak was 146.2 \pm 16.2 nM and the MRI was 32.2 \pm $1.9\,\mathrm{nM/min}.$ Apixaban reduced the Peak by 95%, fond aparinux by 37% and enoxaparin by 78%. Apixaban reduced the MRI by 99%, fondaparinux by 43% and enoxaparin by 94% (Table 1).

The inhibitory effect of apixaban, fondaparinux and enoxaparin on thrombin generation in PPP/MCF7 was concentration dependent. The IC50 of apixaban for the Peak was 1.06 ± 0.31 folds higher as compared to PPP/TF (p b 0.001). The IC50 of fondaparinux and enoxaparin for the Peak were respectively 1.91 ± 0.07 folds and 2.23 ± 0.11 folds higher as compared to that in PPP/TF (p b 0.05). The IC50 of apixaban for the MRI was 1.29 ± 0.03 folds higher as compared to that in PPP/TF (p b 0.001). The IC50 of fondaparinux and enoxaparin for the MRI were 1.57 ± 0.09 and 1.32 ± 0.08 fold higher as compared to the PPP/TF (p b 0.001) (Table 2).

Representative thrombograms of the effect of apixaban, fondaparinux and enoxaparin in PPP/TF, in PPP/BXPC3 and in PPP/ MCF7 are shown in Fig. 1.

2.2. Inhibition of thrombin generation in PRP by enoxaparin, fondaparinux and apixaban

When thrombin generation was triggered after addition of physiologically relevant concentration of TF in PRP (PRP/TF), the Peak was 120.6 ± 5.9 nM and the MRI was 15.4 ± 1.2 nM/min. In PRP/TF apixaban, fondaparinux and enoxaparin significantly reduced the Peak (inhibition 84% and 56%, 53% respectively) and the MRI (inhibition $92\%, 66\% \, and \, 83\% \, respectively)$ (Table 3). In PRP/BXPC3 the Peak was 118.6 ± 5.6 nM and the MRI was 13.9 ± 6.0 nM/min. Apixaban reduced the Peak by 73%, fondaparinux by 25% and enoxaparin by 24%, Apixaban reduced the MRI by 86%, fondaparinux by 6% and enoxaparin by 51% (Table 4).

The inhibitory effect of apixaban, fondaparinux and enoxaparin on thrombin generation in PRP/BXPC3 cells was concentration dependent. The IC50 of apixaban for the Peak was 1.48 ± 0.06 folds higher as compared to the PRP/TF (p b 0.05). The IC50 of fondaparinux and enoxaparin for the Peak were 2.06 ± 0.11 and 3.21 ± 0.08 folds higher as compared to the PRP/TF (p b 0.05). The IC50 of apixaban for the MRI was 1.41 ± 0.06 folds higher as compared to the PRP/TF (p b 0.05). The IC50 of fondaparinux and enoxaparin for the MRI were 2.91 ± 0.09 and 3.34 ± 0.11 higher as compared to the PRP/TF (p b 0.001), (Table 4).

In PRP/MCF7, the Peak was 122.0 \pm 7.1 nM and the MRI was 15.1 \pm 2.6 nM/min. Apixaban reduced the Peak by 82%, fondaparinux by 45% and enoxaparin by 47% as compared to the control. Apixaban reduced the MRI by 94%, fond aparinux by 60% and enoxaparin by 67% as compared to the control (Table 4).

The inhibitory effect of apixaban, fondaparinux and enoxaparin on thrombin generation in PRP/MCF7 was concentration dependent. In PRP/MCF7 the IC50 of a pixaban for the Peak was $1.28\pm\,0.07$ folds higher as compared to the PRP/TF (p b 0.05). The IC50 of fondaparinux and enoxaparin for the Peak were 2.25 ± 0.06 and 1.32 ± 0.09 folds higher as compared to the PRP/TF (p b 0.05). The IC50 of apixaban for the MRI was 1.30 \pm 0.05 folds higher as compared to the PRP/

Table 1

Effects of apixaban (125 ng/ml); fondaparinux (0.4 µg/ml) and enoxaparin (0.4 anti-Xa IU/ml) on thrombin generation triggered in PPP in the presence of TF and phospholipids (PPP/TF) or BXPC3 cells (PPP/BXPC3) or MCF7 cells (PPP/MCF7). Results are expressed as mean \pm sd from 8 experiments

	Peak (nM)			MRI (nM/min)		
	PPP/TF	PPP/BXPC3	PPP/MCF7	PPP/TF	PPP/BXPC3	PPP/MCF7
Control	276.5 ± 17.2	150.1 ± 15.4	$146.2 \pm$	97.7 ± 10.3	39.7 ± 2.2	$32.2 \pm$
Apixaban (125 ng/ml)	39.0 ± 5.0	23.3 ± 4.1	7.1 ± 2.1	4.1 ± 1.2	2.4 ± 0.9	$0.4 \pm$
Fondaparinux (0.4 µg/ml)	152.0 ± 12.0	116.2 ± 9.8	92 ± 3.1	30.5 ± 1.9	24.8 ± 1.7	$18.6 \pm$
Enoxaparin (0.4 anti-Xa IU/ml)	60.0 ± 11.1	42.0 ± 10.1	$32.1 \pm$	2.1 ± 1.1	4.1 ± 0.8	1.7 ± 0.7

p b 0.05 as compared to PPP/TF

p b 0.01 as compared to PPP/TF * p b 0.001 as compared to PPP/TF

1275

1276

Table 2

Comparison of the inhibitory potency of apixaban, fondaparinux and encoaparin on thrombogram parameters in PPP. Results are expressed as mean ± sd from 8 experiments.

			MRI ICSO		
PPP/BXPC3	PPP/MCF7	PPP/TF	PPP/BXPC3	PPP/MCF7	
20 31,92 ± 0.07*	$20.72 \pm 0.05^{*}$	13.57 ± 0.05	22.0 ± 3.1	$17.58 \pm 0.03^{*}$	
04 0.76 ± 0.03*	$0.65 \pm 0.05^{*}$	0.21 ± 0.04	$0.58 \pm 0.06^{*}$	$0.33 \pm 0.07^{*}$	
06 0.21 ± 0.02*	0.13 ± 0.04	0.09 ± 0.06	018±0.04**	0.12 ± 0.05	
	PPP/8XPC3 20 31.92 ± 0.07* .04 0.76 ± 0.03* .06 0.21 ± 0.02*	PPP/BXPC3 PPP/MCF7 20 31.92 ± 0.07* 20.72 ± 0.05* .04 0.76 ± 0.03* 0.65 ± 0.05* .06 0.21 ± 0.02* 0.13 ± 0.04	PPP/BXPC3 PPP/MCF7 PPP/TF 20 $31.92 \pm 0.07^*$ $20.72 \pm 0.05^*$ 13.57 ± 0.05 .04 $0.76 \pm 0.03^*$ $0.65 \pm 0.05^*$ 0.21 ± 0.04 .06 $0.21 \pm 0.02^*$ 0.13 ± 0.04 0.09 ± 0.06	PPP/BXPC3 PPP/MCF7 PPP/TF PPP/BXPC3 20 $31.92 \pm 0.07^*$ $20.72 \pm 0.05^*$ 13.57 ± 0.05 22.0 ± 3.1 .04 $0.76 \pm 0.03^*$ $0.65 \pm 0.05^*$ 0.21 ± 0.04 $0.58 \pm 0.06^*$.06 $0.21 \pm 0.02^*$ 0.13 ± 0.04 0.09 ± 0.06 $0.18 \pm 0.04^{**}$	

1C50; concentration that decreased by 50% the indicated parameter of the thrombogram.

* p < 0.001 as compared to PPP/IF. ** p < 0.01 as compared to PPP/IF.

TF (p < 0.05). The ICSO of fondaparinux and enoxaparin for the MRI were 1.21 \pm 0.06 and 1.55 \pm 0.07 higher as compared to the PRP/ TF (p < 0.001) (Table 4).

Representative thrombograms of the effect of apixaban, fondaparinux and enoxaparin in PRP/TF, in PRP/BXPC3 and in PRP/ MCF7 are depicted in Fig. 1.



Fig. 1. Inhibition of thrombin generation by apixaban (125 ng/ml), fondaparinux (0.4 µg/ml) and enoxaparin (0.4 anti-Xa RJ/ml) in PPP (frames A, B, C) and in PRP (frames D, E, F) in the presence of BXPC3 cells (frames B and E) and MCF7 cells (frames C and F). Representative thrombograms of one out 8 experiments.

Table 3

Effects of apixaban (125 ng/ml); fondaparinux (0.4 µg/ml) and enoxaparin (0.4 anti-Xa IU/ml) on thrombin generation in PRP triggered in the presence of TF and phospholipids (PRP/TF) or BXPC3 cells (PRP/BXPC3) or MCF7 cells (PRP/MCF7). Results are expressed as mean ± sd from 8 experiments.

	Peak (nM)			MRI (nM/min)		
	PRP/TF	PRP/BXPC3	PRP/MCF7	PRP/TF	PRP/BXPC3	PRP/MCF7
Control	120.6 ± 5.9	118.6 ± 5.6	122 ± 7.1	15.4 ± 1.2	13.9 ± 6.0	15.1 ± 2.6
Apixaban (125 ng/ml)	18.9 ± 1.9	31.6 ± 2.1	$20.9 \pm$	1.1 ± 0.7	1.9 ± 0.9	0.9 ± 0.2
Fondaparinux (0.4 µg/ml)	52.5 ± 1.4	88.3 ± 1.6	67.2 ± 1.6	5.1 ± 0.6	13 ± 2.1	$6 \pm$
Enoxaparin (0.4 anti-Xa UI/ml)	56.3 ± 2.1	89.5 ± 1.7	65 ± 2.1	2.6 ± 0.2	6.8 ± 1.1	5.0 ± 0.9

* p b 0.001 as compared to PRP/TF.

p b 0.01 as compared to PRP/TF

p b 0.05 as compared to PRP/TF

Table 4

Comparison of the inhibitory potency of apixaban, fondaparinux and enoxaparin on thrombogram parameters in PRP. Results are expressed as mean ± SD from eight experiments

	Peak IC50	Peak IC50			MRI IC50		
	PRP/TF	PRP/BXPC3	PRP/MCF7	PRP/TF	PRP/BXPC3	PRP/MCF7	
Apixaban (ng/ml)	45.47 ± 3.5	67.18 ± 2.3	58.02 ± 5.2	20.96 ± 1.8	29.47 ± 1.9	27.29 ± 2.6	
Fondaparinux (µg/ml)	0.32 ± 0.05	1.03 ± 0.04	$0.72 \pm$	0.29 ± 0.05	0.97 ± 0.05	$0.35 \pm$	
Enoxaparin (anti-XaIU/ml)	$0.31 {\pm} 0.03$	0.64 ± 0.05	$0.41 \pm$	$0.11 {\pm} 0.06$	0.32 ± 0.05	$0.17 \pm$	

IC50, concentration that decreased by 50% the indicated parameter of the thrombogram p b 0.001 as compared to PRP/TF

p b 0.05 as compared to PRP/TF

1.1. A nalysis of the impact of platelets and cancer cells on the antithrombotic potency of apixaban, fondaparinux and enoxaparin

The IC50 of apixaban for the MRI was not significantly different when thrombin generation was triggered in PPP the presence of BXPC3 cells or MCF7 cells. The addition of platelets did not significantly modify the difference between the two cancer cell lines (Fig. 2)

The IC50 of fondaparinux for the MRI was significantly different in the presence of BXPC3 and MCF7 cells. The presence of platelets resulted in a significant increase of the difference between BXPC3 and MCF7 (Fig. 2).

The IC50 of enoxaparin for the MRI was not significantly different when thrombin generation was triggered in the presence of BXPC3 or MCF7. The addition of platelets resulted in significant increase of the difference between BXPC3 and MCF7 (Fig. 2).



Fig. 2. Alterations of the IC50 of apixaban, fondaparinux and enoxaparin on the MRI of thrombin generation in PPP or PRP in the presence of BXPC3 or MCF7 cells. Values are means \pm sd of the ratio IC50_{BXPC3}/IC50_{MCE7}, of 8 experiments.

2. Discussion

In the present study we investigated the impact of adenocarcinoma pancreatic cells BXPC3 and breast cancer cells MCF7 on the potency of the specific FXa inhibitors (apixaban and fondaparinux) and the LMWH enoxaparin to inhibit thrombin generation.

Enoxaparin is multi-targeted anticoagulant agent exerting its antithrombotic effect primarily via the binding of the pentasaccharide domain on antithrombin (AT). Due to the presence of the pentasaccharide domain in about 30% of the polysaccharide chains, enoxaparin down-regulates thrombin generation by accelerating the AT-dependent inhibition of FXa and to a lesser extent by the inhibition of thrombin [20]. The anti-Xa/anti-IIa ratio of enoxaparinis 3.9. By activating AT, enoxaparin preferentially potentiates the inhibition of free FXa rather than the inhibition of prothrombinase bound FXa [21]. The synthetic pentasaccharide fondaparinux specifically inhibits FXa in an AT-dependent manner. Fondaparinux similarly to enoxaparin, inhibits in an antithrombin dependent manner free but not prothrombinase bound FXa [22-24]. Apixaban is an orally active, direct, reversible, competitive and selective inhibitor of FXa. It inhibits free and prothrombinase bound FXa resulting in inhibition of thrombin generation in a concentration dependent manner $[24\ 25]$

Both types of cancer cells principally trigger blood coagulation via TF expression but each one disposes additional distinct procoagulant mechanisms [14]. Apixaban, fondaparinux and enoxaparin were initially used at concentrations situated in the middle of the usual therapeutic range in patients with venous thromboembolism. They significantly inhibited thrombin generation in the presence of $\rm BXPC3$ or MCF7 cells as well as in the control experiment where thrombin generation was triggered by a physiologically relevant concentration of TF. However, the inhibitory potency of each compound varied in a different degree in the presence of cancer cells as compared to that observed in the control experiment. It varied also in function of the cancer cell type. When fixed concentrations of the studied compounds were compared, the presence of BXPC3 cells did not alter the inhibitory strength of either apixaban or enoxaparin on thrombin generation as compared to that observed on thrombin generation in the presence of TF. In contrast,

BXPC3 decreased significantly the potency of fondaparinux to inhibit thrombin generation. Similarly, MCF7 cells did not significantly alter the inhibitory potency of apixaban and enoxaparin on thrombin generation but significantly reversed the efficiency of fondaparinux.

Subsequently, we explored in details the variations of the inhibitory potency of apixaban, fondaparinux and enoxaparin by comparing the IC50 for the Peak and the MRL obtained when cancer cells were present versus the control experiment. This comparison revealed that each one of the two types of cancer cells reversed the antithrombotic effect of the studied agents in a different intensity. The $\mathrm{IC50}\,\mathrm{of}\,\mathrm{apixaban}\,\mathrm{for}\,\mathrm{the}\,\mathrm{Peak}$ as well as for the MRI increased by 1.5 fold in the presence of BXPC3 whereas it slightly increased in the presence of MCF7 cells. Thus we conclude that according to the histological type of the cancer cells and their procoagulant potential the antithrombotic efficiency of the direct and specific FXa inhibitor apixaban can be preserved or partially reversed. In contrast to apixaban, the antithrombin-dependent specific inhibitor of FXa, fondaparinux, was significantly more vulnerable to the presence of cancer cells as compared to apixaban. The BCPX3 cells significantly reversed the inhibitory effect of fondaparinux on thrombin generation. These data allow to conclude that the AT-dependent specific inhibition of FXa by fondaparinux is more vulnerable than the direct inhibition of FXa by the small molecule of apixaban. This difference might stem from the distinct capacity of the two agents to inhibit prothrombinase bound FXa. Indeed, previous studies have shown that AT bound to the synthetic pentasaccharide fondaparinux fails to inhibit prothrombinase bound FXa [21-23]. In contrast, the direct inhibitors of FXa such as apixaban inhibit both free FXa and prothrombinase bound FXa [23,24]. Probably the capacity to inhibit prothrombinase bound FXa in addition to free FXa offers an advantage to apixaban to preserve its antithrombotic potency when thrombin generation is triggered by cancer cells. The effect of BXCP3 or MCF7 cells on the antithrombotic potency of enoxaparin was of similar magnitude as that on apixaban. Thus we conclude that the presence of traces of anti-IIa activity in enoxaparin compensate the loss of the specific AT-dependent anti-Xa activity.

The differences observed between the two types of cells in PPP was strongly reduced in the presence of platelets. This may be explained by the platelet activating properties of MCF7 cells [26]. In these experimental conditions activated platelets are a sustained source of procoagulant material, which enhanced prothrombinase formation. In addition, activated platelets secrete platelet factor 4 (PF4) which neutralizes the enoxaparin chains with higher molecular weight and negative charge [27]. This leads to the hypothesis that the interference of platelets might modify the capacity of AT-dependent antithrombotic agents, like the LMWH enoxaparin and the synthetic pentasaccharide fondaparinux to inhibit thrombin dependent activation of platelets.

The co-existence of BXCP3 or MCF7 and platelets had a weaker impact on the antithrombotic potency of apixaban than on that of fondaparinux or enoxaparin. In order to interpret this phenomena the following hypothesis merits to be discussed. First of all the three anticoagulants have different structural characteristics and mechanism of action. Taking into consideration the structural characteristics and the mechanism of action of each one of the three studied antithrombotic agents we hypothesize that the reversal of the antithrombotic potency of fondaparinux and enoxaparin which is induced by the cancer cells BXPC3 or MCF7 is related with the capacity of these cells to trigger thrombin generation in TF dependent manner and to enhance the formation of prothrombinase.

Consequently, the indirect inhibitors of FXa such as enoxaparin and fondaparinux have lower efficiency than the direct ones such as apixaban. The possible enhancement of prothrombinase formation, via the expression of proteases that directly activate FX (i.e. a cancer procoagulant like protease activity) [28] by BXPC3 or MCF7 cells is under investigation. Some additional pathways leading to boosting of prothrombinase formation should be explored. The activation of the contact pathway of blood coagulation by cancer cells and hypercoagulability linked to heparinase activity could be an alternative mechanism

[29.30]. More specifically, the expression of membrane heparin binding receptors and/or heparanases might breakdown polysaccharide chains of enoxaparin and the pentasaccharide chain of fondaparinux [31,32]. Finally, the differences of the studied antithrombotic agents regarding the binding to platelet factor 4 (PF4) is an additional factor which could implicated in the reversal of enoxaparin's antithrombotic potency by platelets. [33].

In conclusion, the heterogeneity in prothrombotic potential among different malignancies probably underlies the observed differences in the benefits and risks of anticoagulation in patients with different cancer types. The procoagulant activity of cancer cells could alter the efficacity of antithrombotic agents. The comprehension of the mechanism of action of the antithrombotic agents in cancer induced hypercoagulability might help to optimize the antithrombotic treatment.

Authors' contributions

AR has made substantial contributions to study design and organization, acquisition, analysis and interpretation of data, has been involved in drafting the manuscript.

PVD has made substantial contributions to interpretation of data, has been involved in drafting the manuscript.

 ${
m EM}$ has carried out the cultures of cancer cells BXPC3 and MCF7 and has made substantial contribution in drafting the manuscript.

IE has made substantial contribution to design and interpretation of data.

GG has made substantial contributions to conception and design of the study, analysis and interpretation of data, has been involved in drafting the manuscript has given final approval of the version to be published, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgment

The authors wish to acknowledge Mme Hayat Mokrani for her skillful technical assistance. The study was financially supported by the "Association de Recherche sur la Thrombose et l'Evaluation de son Risque".

References

- S.R. Kahn, W. Lim, A.S. Dunn, M. Cushman, F. Dentali, E.A. Akl, D.J. Cook, A.A. Balekian, R.C. Klein, H. Le, S. Schulman, M.H. Murad, American College of Chest Physicians, Prevention of VTE in nonsurgical patients: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence Based Clinical Practice Guidelines, Chest 141 (Suppl. 2) (2011) p1954-auß Producte
 A.N. Nicolaides, J. Fareed, A.K. Kakkar, A.J. Comerota, S.Z. Goldhaber, R. Hull, K.
- Myers, M. Samama, J. Fletcher, E. Kalodiki, D. Bergqvist, J. Bonnar, J.A. Caprini, C Carter, J. Conard, B. Eklof, I. Elalamy, G. Gerotziafas, G. Geroulakos, A. Giannoukas et al., Prevention and treatment of venous thromboembolism-International Connsus Statement, Int. Angiol. 32 (2013)111-260.
- [3] D. Farge, P. Debourdeau, M. Beckers, C. Baglin, R.M. Bauersachs, B. Brenner, D. Brilhante, A. Falanga, G.T. Gerotzafias, N. Haim, A.K. Kakkar, A.A. Khorana, R. Lecumberri, M. Mandala, M. Marty, M. Monreal, S.A. Mousa, S. Noble, I. Pabinger, P. Prandoni, et al., International clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer, J. Thromb. Haemost. 11 (2013) 56-70.
- [4] C. Kearon, E.A. Akl, A.J. Comerota, P. Prandoni, H. Bounameaux, S.Z. Goldhaber, M.E. Nelson, P.S. Wells, M.K. Gould, F. Dentali, M. Crowther, S.R. Kahn, American College of Chest Physicians, Antithrombotic therapy for VTE disease: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines, Chest 141 (Suppl. 2) (2012) e419S-494S
- [5] N.M. Kuderer, G.H. Lyman, Guidelines for treatment and prevention of veno thromboembolism among patients with cancer, Thromb. Res. 133 (Suppl. 2) (2014) S122–S127.
- [6] A.Y. Lee, Thrombosis in cancer: an update on prevention, treatment, and surviv benefits of anticoagulants, Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Programs 2010 (2010) 144–149.
 [7] H.C.Hemker, S. Béguin, The mode of action of heparins in vitro and in vivo, Adv. Exp.
- [8] M. Monreal, C. Falgá, M. Valdés, C. Suárez, F. Gabriel, C. Tolosa, J. Montes, Riete investigators: fatal pulmonary embolism and fatal bleeding in cancer patients with

ous thromboembolism: findings from the RIETE registry, J. Thromb. Haemost. 4 (2006) 1950-1956.

- [9] D. Imberti, G. Agnelli, W. Ageno, M. Moia, G. Palareti, R. Pistelli, R. Rossi, M. Verso, M.A.S.T.E.R. Investigators, Clinical characteristics and management of cancer associated acute venous thromboembolism: findings from the MASTER Registry,
- Hassochteu acute venous infommoennomsin infuings from the MASTER Registry, Haematologica 93 (2008) 273–278.
 [10] J. Douketis, A.D. Bell, J. Eikelboom, A. Liew, Approach to the new oral anticcagulants in family practice: part 1: comparing the options, Can. Fam. Physician 60 (2014) 989-995.
- [11] A. Pudusseri, R. Shameem, A.C. Spyropoulos, A new paradigm shift in antithrombotic therapy, Front. Pharmacol. 4 (2013) 133. [12] M.N. Levine, C. Gu, H.A. Liebman, C.P. Escalante, S. Solymoss, D. Deitchman, L.
- Ramirez, J. Julian, A randomized phase II trial of apixaban for the prevention of thromboenholism in patients with metastatic cancer, J. Thromb. Haemost. 10 (2012) 807–814.
- [13] G.T. Gerotziafas, I. Mahé, I. Elalamy, New orally active anticoagulant agents for the prevention and treatment of venous thromboembolism in cancer patients, Ther. Clin. Risk Manag. 10 (2014) 423–436.
- CH. Risk Manag. 10 (2014) 423–436.
 G.T. Gerotziafas, V. Calea, E. Mbemba, A. Khaterchi, M. Sassi, H. Bacouche, C. Prengel, P. van Dreden, M. Hatmi, J.F. Bernaudin, I. Elalamy, Tissue factor over expression by human pancreatic cancer cells BXPC3 is related to higher prothrombotic potential as compared to breast cancer cells MCF7, Thromb. Res. 129 (2012) 779–786.
 G.T. Gerotziafas, V. Galea, E. Mbemba, M. Sassi, M.P. Roman, A. Khaterchi, P. Van
- Dreden, M. Japcowitz, J.P. Lotz, J.F. Bernaudin, J. Fareed, M. Hatmi, I. Elalamy, Effect of low molecular weight heparins and fondaparinux upon thrombin generation triggered by human pancreatic cancer cells BXPC3, Curr. Vasc. Pharmacol. 12 802 002
- [16] H.C. Hemker, G.M. Willems, S. Beguin, A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay rocesses, Thromb. Haemost. 56 (1986) 9-17.
- [17] G.T. Gerotziafas, F. Depasse, J. Busson, L. Leflem, I. Elalamy, M.M. Samama, Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram
- Thrombinoscope assay, Thromb. J. 3 (2005) 16. [18] H.M. Spronk, A.W. Dielis, E. De Smedt, R. van Oerle, D. Fens, M.H. Prins, K. Hamulyák, H. ten Cate, Assessment of thrombin generation II: validation of the calibrated auto mated thrombogram in platelet-poor plasma in a clinical laboratory, Thromb. Haemost. 100 (2008) 362-364.
- [19] Y. Dargaud, R. Luddington, E. Gray, T. Lecompte, T. Siegemund, T. Baglin, J. Hogwood, V. Regnault, A. Siegemund, C. Negrier, Standardisation of thrombin generation

test—which reference plasma for TGT? An international multicentre study, Thromb. Res. 125 (2010) 353–356.

- [20] J. Fareed, D.A. Hoppensteadt, R.L. Bick, An update on heparins at the beginning of the
- [20] J. Fareed, D.A. Hoppensteau, R.L. Bick, An update on neparms at the beginning of the new millennium, Semin. Thromb. Hemost. 26 (Suppl. 1) (2000) 5–21.
 [21] T.W. Barrowcliffe, S.J. Havercroft, G. Kemball-Cook, U. Lindahl, The effect of Ca2+, phospholipid and factor V on the anti-(factor Xa) activity of heparin and its highaffinity oligosaccharides, Biochem. J. 243 (1987) 31–37.
- [22] H. Speijer, D. Billy, G. Willems, H.C. Hemker, T. Lindhout, Inhibition of Prothermbinase by antithrombin-heparin at a macroscopic surface, Thromb. Haemost. 73 (1995) 648-653.
- [23] J.P. Herault, A. Bernat, A.M. Pflieger, J.C. Lormeau, J.M. Herbert. Comparative effects
- [23] J.P. Herault, A. Bernat, A.M. Pflieger, J.C. Lormeau, J.M. Herbert, Comparative effects
 of two direct and indirect factor Xa inhibitors on free and clot-bound
 prothrombinase, J. Pharmacol. Exp. Ther. 283 (1997) 16–22.
 [24] G. Jourdi, V. Siguret, A.C. Martin, J.L. Golmard, A. Godier, C.M. Samama, P. Gaussem, I.
 Gouin-Thibault, B. Le Bonniec, Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban, Thromb. Haemost. 114 (2015) 78–86.
- dynamics of apixaban and Twaroxaban, Inromo. fraemost. 114 (2015) 76-86.
 [25] J.M. Luettgen, R.M. Knabb, K. He, D.J. Pinto, A.R. Rendina, Apixaban inhibition offactor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in purified protein systems and in human plasma, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 26 (2011) 514-526.
 [26] L. Lian, L. Wei, L. Zhen-Yu, Y.X. Mao, Y.T. Zhang, Y.M. Zhao, K. Chen, W.M. Duan, M. Tao, Inhibition of MCF7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs, Oncol. Lett. 5 (2013) 675-680.
- [27] L. Zuckerman, J.M. Ramstack, J.P. Vagher, J.A. Caprini, L.F. Mockros, Neutralization of heparin by cellular blood elements, Thromb. Res. 7 (1975) 149–159.
- Repartin by Central block elements, Inform. Res. (1370) 110 100.
 R. ten Cate, A. Falanga, Overview of the posthated mechanisms linking cancer and thrombosis, Pathophysiol, Haemost. Thromb. 36 (2008) 122–130.
 M. Marchetti, E. Diani, H. ten Cate, A. Falanga, Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography, Haematologica 97 (2012) 1173-1180.
- M. Matan, E. Axelman, B. Brenner, Y. Nadir, Heparanase procoagulant activity is elevated in women using oral contraceptives, Hum. Reprod. 28 (2013) 2372–2380.
 A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharma-
- [32] U. Barash, V. Cohen-Kaplan, I. Dowek, R.D. Sanderson, N. Ilan, I. Vlodavsky, Proteo-glycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor pro-gression and metastasis, FEBS J. 277 (2010) 3890–3903.

[33] J. Fareed, J.M. Walenga, D. Hoppensteadt, X. Huan, A. Racanelli, Comparative study on the in vitro and in vivo activities of seven low-molecular-weight heparins, Haemostasis 18 (Suppl. 3) (1988) 3-15

VII.1.2 Version francaise: Les cellules cancéreuses BXPC3 et MCF7 inhibent de manière différente la génération de thrombine par apixaban, le fondaparinux et énoxaparine

Aurélie Rousseau^a, Patrick Van Dreden^b, Elisabeth Mbemba^a, IsmailElalamy^{a,c}, AnnetteLarsen^a,

GrigorisT.Gerotziafas^{a,c,}□

^aINSERMU938, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Université ParisVI, Paris, France ^bResearch and Development, Diagnostica Stago, Gennevilliers, France ^cService d'Hématologie Biologique Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

Abstract

Introduction: Les cellules cancéreuses peuvent modifier l'efficacité des agents antithrombotiques. Pour explorer cette possibilité, cette étude a comparé la capacité de l'HBPM l'énoxaparine et les inhibiteurs spécifiques du Xa (apixaban et fondaparinux) a inhiber la génération de thrombine déclenchée par les cellules d'adénocarcinome du pancréas (BXPC3) et les cellules humaine d'adénocarcinome du sein (MCF7).

Matériels et méthodes: Les plasmas pauvres en plaquettes (PPP) ou riches en plaquettes (PRP) surchargés en apixaban, fondaparinux ou énoxaparine ont été ajoutés dans les micropuits d'une plaque contenant les cellules cancéreuses afin de doser la génération de thrombine. Dans l'expérience témoin, la génération de thrombine a été déclenchée par ajout d'un réactif contenant du facteur tissulaire.

Résultats: Les trois antithrombotiques ont inhibé la génération de thrombine de façon concentration dépendante. Les cellules MCF7 et BXPC3 ont réduit à des intensités différentes l'effet des agents étudiés. Selon le type histologique du cancer, l'efficacité antithrombotique de l'apixaban a été concervée ou partiellement réduite. Le fondaparinux est plus sensible à la présence des cellules cancéreuses en comparaison à l'apixaban. L'effet des cellules MCF7 ou BXCP3 sur le potentiel antithrombotique de l'énoxaparine a été comparable à celui de l'apixaban.

Conclusions: Le type de cellules cancéreuses est déterminant sur l'efficacité antithrombotique des inhibiteurs spécifiques du facteur Xa. En revanche, aucune influence significative n'est observée en ce qui concerne l'efficacité de l'énoxaparine. Cette étude

montre que l'impact du type de cellules cancéreuses sur l'activité antithrombotique des inhibiteurs spécifiques du Xa ne doit pas être négligé. Ceci doit être pris en considération lors de la conception des études dose-réponses des inhibiteurs oraux directs du FXa chez les patients atteints de différents types histologiques de cancer.

1. Introduction

Une anticoagulation efficace et sûre dans la prévention et le traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse (MTEV) est la base essentielle de la gestion des patients atteints de cancer, visant ainsi à réduire la morbidité, à améliorer la qualité de vie, et à contribuer à la diminution de la mortalité. Selon les lignes directrices internationales, les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) énoxaparine, daltéparine ou tinzaparine et le fondaparinux, pentasaccharide synthétique, sont les médicaments de premier choix dans la prévention et le traitement de la thrombose embolique veineuse (TEV) du cancer [1-5]. Cependant, chez les patients cancéreux traités par HBPM, le taux de récidive de TEV est élevé par rapport aux patiens non cancéreux [6]. En outre, le traitement par HBPM présente plusieurs limites, il affecte négativement la qualité de vie par la nécessité quotidienne d'injections sous-cutanées, par les hématomes cutanés, ainsi que par la surveillance fréquente de la numération plaquettaire en raison du risque de thrombopénie induite par l'héparine. Les difficultés dans la gestion du traitement par HBPM, chez les patients cancéreux, sont imputables à la complexité de leur mécanisme d'action, à l'hétérogénéité de leur structure et à leur liaison non spécifique aux protéines plasmatiques [7]. Choisir l'agent antithrombotique approprié, provoquant une anticoagulation stable, non compromise par des risques de saignement ou autres réactions indésirables est important dans cette population à haut risque [8,9]. Les anticoagulants actifs par voie orale (OAD) non vitamine K dépendants devraient permettre l'amélioration de la qualité du traitement antithrombotique [10,11].

Parmi les agents antithrombotiques à cibles spécifiques seul l'apixaban (un inhibiteur direct spécifique du FXa, actif par voie orale) a été évalué dans un essai clinique de phase II dans la prophylaxie de la TEV chez les patients avec un cancer métastatique [12]. L'analyse du sousgroupe de patients cancéreux inclus dans l'essai clinique de phase III qui a évalué l'efficacité et la sécurité des AOD dans la prophylaxie et le traitement de la TEV a souligné que les AOD pourraient offrir une alternative dans le traitement des patients atteints de cancer [13].

La génération de thrombine en plasma humain, déclenchée par les cellules humaines du cancer du pancréas BXPC3 et les cellules du cancer du sein MCF7 est un système expérimental validé, capable de détecter les différences de potentiel procoagulant des lignées

de cellules cancéreuses [14]. Ce système expérimental est également sensible aux modifications de l'activité antithrombotique des HBPMs, ou du fondaparinux induisent par les cellules du cancer du pancréas BXPC3 [15].

La modélisation du mécanisme d'action des AOD dans l'hypercoagulabilité induit par le cancer et sa comparaison au l'HBPM pourrait procurer des données expérimentales nécessaires à l'optimisation de la conception des essais cliniques chez les patients cancéreux. Dans ce but, cette étude a comparé la capacité de l'énoxaparine (HBPM) et les inhibiteurs spécifiques du FXa (apixaban et fondaparinux) à inhiber la génération de thrombine déclenchée par deux lignées de cellules cancéreuses BXPC3 et MCF7. Nous avons également étudié l'influence combinée des plaquettes et des cellules cancéreuses sur le potentiel antithrombotique de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine.

2. Matériels et méthodes

2.1 Culture des cellules cancéreuses

Des lignées cellulaires adhérentes BXPC3 et MCF7 du cancer du pancréas et du sein ont été utilisées dans les expériences de génération de thrombine avec le plasma humain. Les lignées humaines cellulaires d'adénocarcinome primaire pancréatiques BXPC3 (lot F-11067) proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC; 1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 - USA). Les lignées cellulaires d'adénocarcinome du sein MCF7 (Fondation-7 Michigan Cancer) proviennent de l'ATCC (1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-USA). Les cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 100% avec 5% de CO₂. Le milieu de culture a été complété avec 10% (volume/volume) de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 5 mM glutamine, 50 U/ml pénicillinestreptomycine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les cellules adhésives ont été cultivées dans des flasques de 75 cm². A 50% de confluence, les cellules ont été incubées avec de la trypsine pendant 5 minutes à 37 °C, puis du PBS a été ajouté pour neutraliser la trypsine. Ensuite, les cellules en suspension ont été centrifugées et le culot cellulaire a été resuspendu dans du milieu RPMI. Un comptage est réalisé et un volume de 100 µl de suspension cellulaire (50 cellules/µl) a été ajouté dans des plaques à 96 puits. Les cellules se sont multipliées, ont adhérée à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 100% avec 5% de CO2 pendant 24 h. Dans des expériences préliminaires, les résultats ont montré qu'après 24h

d'incubation, les cellules BXPC3 étaient à 70% de confluence et les cellules MCF7 étaient à 80% de confluence (données non présentées). Dans ces conditions, les deux lignées de cellules cancéreuses ont donné la même génération de thrombine. Les cellules ont été utilisées dans les expériences uniquement si le nombre de cellules apoptotiques était inférieur à 2% par rapport aux cellules viables comptées.

2.2 Agents antitrombotiques

L'enoxaparine (Lovenox) a été obtenue de Sanofi- Aventis (Paris, France). Le fondaparinux (Arixtra ®) a été obtenu de GSK (Paris, France). L'apixaban (Eliquis®) a été obtenu de Pfizer (Paris, France).

2.3 Plasma humain

Les échantillons de plasma pour les expériences de génération de thrombine ont été obtenus à partir de 15 volontaires en bonne santé, membres du personnel du laboratoire, qui n'avaient pris aucun médicament pendant les 30 derniers jours. Les échantillons de sang ont été prélevés par ponction veineuse au niveau du coude et recueillis dans des tubes Vacutainer iconized SIL (Becton Dickinson, Meylan, France) contenant un tampon citrate trisodique à 0,13M (neuf volumes de sang pour un volume de solution citraté; 3,8%). Le plasma pauvre en plaquettes (PPP) a été préparé après centrifugation du sang total citraté pendant 30 min à 2000 g à température ambiante. Le plasma riche en plaquettes (PRP) a été préparé après centrifugation, le surnageant du PRP a été éliminé et le nombre de plaquettes a été ajustée à $150 \times 10^9 / L$ par dilution dans en PPP autologue obtenu après une nouvelle centrifugation de 15 min à 2000 g. Les plasmas riches et pauvres en plaquettes de 15 donneurs sains ont été surchargés par les différents composés étudiés à des concentrations cliniquement pertinentes. L'activité anti-Xa dans le plasma a été mesurée par le kit STA Liquide anti Xa (Diagnostica Stago, Gennevilliers, France).

2.4 Test de génération de thrombine

La génération de thrombine a été étudiée in vitro en utilisant le Calibrated Thrombogram avec son logiciel respectif (Thrombinoscope BV, Maastricht, Pays-Bas) [16]. Dans chaque

puits de la plaque de microtitrage, 80 µl de PRP ou PPP ont été mélangés avec 20 µl de PPP-Reagent® (5 pM de FT et 4 µM de phospholipides) ou de PRP-Reagent® (5 pM de FT); obtenu de Stago, (Asnières, France). La génération de thrombine a été initiée par addition d'une solution déclenchante contenant du CaCl₂ (16,7 mM en concentration finale) et un substrat fluorogénique (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 417 pM en concentration finale). Un lecteur de plaque: fluorimétre (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems, Helsinki, Finlande) et le logiciel approprié (Thrombinoscope BV, Maastricht, Pays-Bas) ont été utilisés. Les courbes de génération de thrombine ont été corrigées de la consommation du substrat et des effets du filtre interne fluorescent à l'aide d'un Calibrator® thrombine (Thrombinoscope BV, Maastricht, Pays-Bas). Parmi les paramètres du thrombinogramme, nous avons analysé la concentration maximale de la thrombine (Peak) et l'indice du débit moyen (MRI) de la phase de propagation de la génération de thrombine [calculée par la formule: Peak / (ttPeak - temps de latence)]. La variabilité inter-individuelle et intra-dosage des paramètres du thrombinogramme a été évaluée chez des individus sains et a été publiée par ailleurs [17-19].

2.5 Génération de thrombineinduite par les cellules cancéreuses

Les cellules BXPC3 ou MCF7 ont été cultivées dans des puits de plaque de microtitration adaptée pour l'évaluation de la génération de thrombine comme suit: les cellules BXPC3 ou MCF7 obtenues à partir de flasques de culture de cellules ont été mis en suspension dans un milieu de culture afin d'obtenir une concentration de 50 cellules/µl. Les concentrations de cellules en PPP ou PRP ont été vérifiées par observation en microscopie de contraste. L'observation par microscopie de contraste permet également de vérifier qu'aucun agrégat n'a été formé dans le PRP quand il était en contact avec les cellules cancéreuses. 100 µl de cette suspension ont été déposées dans chaque puits de la plaque de microtitration (5000 cellules/puits) et incubés pendant 48h à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 100% avec 5% de CO₂. A 50% de confluence, les plaques contenant les cellules BXPC3 ou MCF7 ont été lavées 3 fois avec du PBS et une fois avec une solution saline. Puis, 80 µl de PPP normal ou de PRP frais ont été ajoutés dans chaque puits et la génération de thrombine a été évaluée comme décrit ci-dessus. Dans l'expérience contrôle, les puits étaient remplis de milieu de culture sans cellules et traités de la même manière que les expériences. Chaque expérience a été répétée 8 fois.

La génération de thrombine a été évaluée en PPP et PRP surchargé par les agents antithrombotiques aux concentrations indiquées ou par une solution saline, en présence ou non de cellules BXPC3 ou MCF7. Cette génération de thrombine a été initiée par addition d'une solution déclenchante contenant du CaCl₂ (concentration finale de 16,7mM) et le substrat fluorogenique (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, concentration finale de 417 μ M). L'activité procoagulante des lignées de cellules cancéreuses a été évaluée par recalcification du plasma en contact avec des cellules sans addition exogène de TF ou de phospholipides. Dans une expérience contrôle, la génération de thrombine d'un plasma surchargé par des concentrations croissantes en lymphocytes de donneurs sains a été comparée à la génération de thrombine obtenue après recalcification d'un plasma normal. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les deux expériences (résultats non présentés).

Dans les expériences préliminaires, nous avons également vérifié que le milieu de culture (milieu RPMI contenant de la glutamine, de la pénicilline, de la streptomycine et du sérum de veau foetal) n'avait pas d'influence sur le processus de génération de thrombine en PPP et PRP. L'effet des agents antithrombotiques étudiés sur la génération de thrombine déclenchée en PPP et PRP en présence de cellules BXPC3 ou MCF7 a été comparé au témoin effectué en PPP normale (PPP / TF) et PRP (PRP / TF) auquel a été ajouté du PPP-Reagent® ou du PRP Reagent® respectivement, comme décrit ci-dessus.

Les solutions contenant les agents antithrombotiques ont été mélangées avec du plasma (dans un ratio 1/10 volume/volume). Les concentrations d'enoxaparine variaient de 0,2 à 1,2 UI anti-Xa/ml. La concentration de fondaparinux variait de 0,2 à 1,2 μ g/ml. La concentration d'apixaban variait de 16,5 à 2000 ng/ml.

2.6 Analyse statistique

L'inhibition de la génération de thrombine par les agents antithrombotiques étudiées a été calculée par la formule: inhibition = (1 - TGdrug / TGcontrol) %.

L'efficacité antithrombotique des composés a été comparée sur la base de la concentration qui réduit de 50% (IC50) le MRI et le peak. L'IC50 a été calculée par extrapolation de la courbe concentration-réponse construite pour chaque composé étudié dans chaque système expérimental. Pour comparer l'impact des cellules BXPC3 ou MCF7 et des plaquettes sur l'activité des composés étudiés, nous avons calculé le rapport de l'IC50 pour le MRI et du peak pour chaque agent selon les formules (PPP + BXPC3) / PPP et (PRP + BXPC3) / PRP ou (PPP + MCF7) / PPP et (PRP + MCF7) / PRP.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour contrôler les changements des paramètres du thrombinogramme en présence de cellules cancéreuses et d'agents

antithrombotiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Le niveau de signification statistique a été fixé à 0,05. Le logiciel statistique SPSS a été utilisé pour l'analyse statistique.

3. Résultats

3.1 Inhibition de la génération de thrombine en PPP par l'énoxaparine, le fondaparinux et l'apixaban

Quand la génération de thrombine est déclenchée par addition de FT à une concentration physiologiquement pertinente en PPP (PPP / TF), le peak était de 276,5 \pm 17,2 nM et le MRI était de 97,7 \pm 10,3 nM / min. En PPP / TF, l'apixaban, le fondaparinux et l'énoxaparine ont réduit significativement le Peak (inhibition de 85% à 45% et 78% respectivement) et le MRI (96%,69%, 98%, respectivement).

En PPP / BXPC3, le peak était de 150,1 \pm 15,4 nM et le MRI était de 39,7 \pm 2,2 nm / min. L'apixaban, le fondaparinux et l'énoxaparine ont réduit significativement le Peak (84%, 23% et 72% respectivement) et le MRI (94%, 37% et 90% respectivement) (tableau 1).

L'effet inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine sur la génération de thrombine en PPP / BXPC3 était concentration dépendante. L'IC50 de l'apixaban pour le peak était de 1,60 \pm 0,61 fois plus élevé que celui en PPP / TF (p< 0,001). L'IC50 du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le peak a été respectivement de 1,18 \pm 0,10 et 1,91 \pm 0,08 fois supérieur aux IC50 correspondanst en PPP / TF (p<0,05). L'IC50 de l'apixaban pour le MRI était de 1,62 \pm 0,04 fois supérieur par rapport a l'IC50 en PPP / TF (p< 0,05). L'IC50 du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le MRI étaient de 2,70 \pm 0,10 et 2,01 \pm 0,05 fois plus élevé en comparaison a l'IC50 en PPP / TF (p<0,001) (tableau 2). En PPP / MCF7, le peak était de 146,2 \pm 16,2 nM et le MRI était de 32,2 \pm 1,9 nM / min. L'apixaban réduisait le peak de 95%, le fondaparinux de 37% et l'énoxaparine de 78%. L'apixaban réduisait le MRI de 99%, le fondaparinux de 43% et l'énoxaparine de 94% (tableau 1).

L'effet inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine sur la génération de thrombine en PPP / MCF7 était concentration dépendante. L'IC50 de l'apixaban pour le peak était de 1,06 \pm 0,31 fois plus élevé que l'IC50 en PPP / TF (p<0,001). L'IC50 du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le Peak est respectivement de 1,91 \pm 0,07 et 2,23 \pm 0,11 fois plus élevé par rapport au PPP / TF (p<0,05). L'IC50 de l'apixaban pour le MRI était de 1,29 \pm 0,03 fois plus élevé par rapport à celui en PPP / TF (p< 0,001). L'IC50 du

fondaparinux et de l'énoxaparine pour le MRI était de 1,57 \pm 0,09 et 1,32 \pm 0,08 fois plus élevée en comparaison à celui en PPP / TF (p<0,001) (tableau 2).

Les thrombinogrammes représentatifs de l'effet de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine en PPP / TF, en PPP / BXPC3 et en PPP / MCF7 sont présentés dans la figure 1.

3.2 Inhibition de la génération de thrombine en PRP par l'énoxaparine, le fondaparinux et l'apixaban

Quand la génération de thrombine est déclenchée par addition de FT à une concentration physiologiquement pertinente en PRP (PRP / TF), le peak était de $120,6 \pm 5,9$ nM et le MRI de $15,4 \pm 1,2$ nm / min. En PRP / TF, l'apixaban, le fondaparinux et l'énoxaparine ont réduit significativement le Peak (inhibition de 84% 56% et 53%, respectivement) et le MRI (inhibition de 92%, 66% et 83% respectivement) (tableau 3). En PRP / BXPC3, le peak était de 118,6 ± 5,6 nM et le MRI était de 13,9 ± 6,0 nM / min. L'apixaban réduit le peak de 73%, le fondaparinux de 25% et l'énoxaparine de 24%. L'apixaban réduit le MRI de 86%, le fondaparinux de 6% et l'énoxaparine de 51% (tableau 4).

L'effet inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine sur la génération de thrombine en PRP / BXPC3 était dépendant de la concentration. L'IC50 de l'apixaban pour le peak était de 1,48 \pm 0,06 fois plus élevé que celui en PRP / TF (p<0,05). L'IC50 du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le peak était de 2,06 \pm 0,11 et 3,21 \pm 0,08 fois supérieur au PRP / TF (p<0,05). L'IC50 de l'apixaban pour le MRI était de 1,41 \pm 0,06 fois plus élevé qu'en PRP / TF (p<0,05). L'IC50 du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le MRI était de 1,41 \pm 0,06 fois plus élevé qu'en PRP / TF (p<0,05). L'IC50 du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le MRI était de 2,91 \pm 0,09 et 3,34 \pm 0,11 fois plus élevé par rapport au PRP / TF (p<0,001) (tableau 4).

En PRP / MCF7, le peak était 122,0 \pm 7,1 nM et le MRI était de 15,1 \pm 2,6 nM / min. L'apixaban réduit le peak de 82%, de 45% pour le fondaparinux et de 47% pour l'énoxaparine par rapport au témoin. L'apixaban réduit le MRI de 94%, de 60% pour le fondaparinux et de 67% pour l'enoxaparine comparativement au témoin (tableau 4).

L'effet inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine sur la génération de thrombine en PRP / MCF7 était dépendant de la concentration. En PRP / MCF7, l'IC50 de l'apixaban pour le peak était de $1,28 \pm 0,07$ fois plus élevé que celui dePRP / TF (p<0,05). L'IC50 du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le peak étaient de $2,25 \pm 0,06$ et $1,32 \pm 0,09$

fois supérieur par rapport au PRP / TF (p<0,05). L'IC50 de l'apixaban pour le MRI était de $1,30 \pm 0,05$ fois plus élevé que celui du PRP / TF (p<0.05). L'IC50 du fondaparinux et de l'enoxaparine pour le MRI était de 1.21 ± 0.06 et 1.55 ± 0.07 fois supérieur par rapport au PRP/TF (p<0.001) (tableau4).

Tableau 1 : Effets de l'apixaban (125 ng / ml);du fondaparinux (0,4 ug / ml) et de l'énoxaparine (0,4 Ul anti-Xa / ml)sur la génération de thrombine déclenchées en PPP en présence de FT et de phospholipides (PPP / TF) ou decellules BXPC3 (PPP / BXPC 3) ou de cellules MCF7 (PPP / MCF7).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type de 8 expériences.

	Peak(nM)			MRI(nM/min)		
	PPP/FT	PPP/BXPC3	PPP/MCF7	PPP/FT	PPP/BXPC3	PPP/MCF7
Controle Apixaban (125ng/ml) Fondaparinux (0.4µg/ml) Enoxaparine (0.4 anti-XalU/ml)	276.5±17.2 39.0±5.0 152.0±12.0 60.0±11.1	150.1±15.4 23.3±4.1 116.2±9.8 42.0±10.1	146.2±16.2□ 7.1±2.1□ 92 ±3.1□ 32.1±12.1□	97.7±10.3 4.1±1.2 30.5±1.9 2.1±1.1	39.7±2.2□ 2.4±0.9□□□ 24.8±1.7□ 4.1±0.8□	32.2±1.9 0.4±0.1 18.6±1.2 1.7±0.7

□□□p<0.05comparé auPPP/TF.

□ p<0.01comparé auPPP/TF.

* p<0.001 comparé auPPP/TF.

Tableau 2 : Comparaison du potentiel inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'enoxaparine surles paramétres du thrombogramme en PPP.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type de 8 expériences.

	PeakIC50	PeakIC50			MRIIC50		
	PPP/FT	PPP/BXPC3	PPP/MCF7	PPP/FT	PPP/BXPC3	PPP/MCF7	
Apixaban(ng/ml) Fondaparinux(µg/ml) Enoxaparine (anti-XaIU/ml)	19.4 ± 0.20 0.34 ± 0.04 0.11 ± 0.06	$31.92\pm0.07^{\Box}$ $0.76\pm0.03^{\Box}$ $0.21\pm0.02^{\Box}$	$20.72\pm0.05^{\Box}$ $0.65\pm0.05^{\Box}$ 0.13 ± 0.04	13.57±0.05 0.21±0.04 0.09±0.06	22.0±3.1 0.58±0.06 [□] 0.18±0.04 ^{□□}	$17.58\pm0.03^{\Box}$ $0.33\pm0.07^{\Box}$ 0.12 ± 0.05	

IC50:concentration qui diminue de 50% le paramètre indiqué du thrombinogramme.

* p<0.001 comparé au PPP/FT.

□□p<0.01comparé au PPP/FT.

Tableau 3 : Effets de l'apixaban (125 ng / ml);du fondaparinux (0,4 ug / ml) et de l'énoxaparine (0,4 Ul anti-Xa / ml) sur la génération de thrombine déclenchées en PRP en présence de FT et de phospholipides (PRP / TF) ou de cellules BXPC3 (PRP / BXPC 3) ou de cellules MCF7 (PRP / MCF7).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type de 8 expériences.

	Peak(nM)			MRI(nM/min)		
	PRP/FT	PRP/BXPC3	PRP/MCF7	PRP/FT	PRP/BXPC3	PRP/MCF7
Control Apixaban (125ng/ml) Fondaparinux (0.4µg/ml) Enoxaparine (0.4 anti-XaUI/ml)	120.6 ± 5.9 18.9 ± 1.9 52.5 ± 1.4 56.3 ± 2.1	118.6 ± 5.6 $31.6\pm2.1^{\Box}$ $88.3\pm1.6^{\Box}$ $89.5\pm1.7^{\Box}$	122 ± 7.1 $20.9\pm1.4^{}$ $67.2\pm1.6^{}$ $65\pm2.1^{}$	15.4 ± 1.2 1.1 ± 0.7 5.1 ± 0.6 2.6 ± 0.2	13.9 ± 6.0 1.9 ± 0.9 $13\pm2.1^{\Box}$ $6.8\pm1.1^{\Box}$	15.1 ± 2.6 0.9 ±0.2 6 5.0±0.9

□□□p<0.05comparé auPRP/TF.

□□p<0.01comparé auPRP/TF.

* p<0.001 comparé auPRP/TF.



Fig. 1: Inhibition de la génération de thrombine par l'apixaban (125 ng / ml), le fondaparinux (0,4 ug / ml) et l'énoxaparine (0,4 UI anti-Xa / ml) en PPP (cadres A, B, C) et en PRP (cadres D, E, F) en présence de cellules BXPC3 (cadres B et E) et des cellules MCF7 (cadres C et F).

Représentation d'un thrombinogramme sur les 8 expériences.

Tableau 4 : Comparaison du potentiel inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'enoxaparine sur les paramétres du thrombogramme en PRP.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type de 8 expériences.

	PeakIC50			MRIIC50		
	PRP/FT	PRP/BXPC3	PRP/MCF7	PRP/FT	PRP/BXPC3	PRP/MCF7
Apixaban(ng/ml) Fondaparinux(µg/ml) Enoxaparine (anti-XaIU/ml)	45.47 ± 3.5 0.32 ± 0.05 0.31 ± 0.03	$67.18\pm2.3^{\Box}$ $1.03\pm0.04^{\Box}$ $0.64\pm0.05^{\Box}$	$58.02\pm5.2^{\Box}$ $0.72\pm0.05^{\Box}$ $0.41\pm0.06^{\Box}$	20.96±1.8 0.29±0.05 0.11±0.06	$29.47 \pm 1.9^{\Box}$ $0.97 \pm 0.05^{\Box}$ $0.32 \pm 0.05^{\Box}$	$27.29\pm2.6^{$

IC50:concentration qui diminue de 50% le paramètre indiqué du thrombinogramme.

* p<0.001 comparé au PRP/FT.

3.2 Analyse de l'impact des plaquettes et des cellules cancéreuses sur la puissance antithrombotique de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine

L'IC50 de l'apixaban pour le MRI n'était significativement pas différent lorsque la génération de thrombine a été déclenchée en PPP en présence de cellules BXPC3 ou de cellules MCF7. L'ajout de plaquettes statistiquement ne modifie pas la différence entre les deux lignées cellulaires cancéreuses (Fig. 2).

L'IC50 du fondaparinux pour le MRI était significativement différent en présence de cellules BXPC3 et de cellules MCF7. La présence de plaquettes a entraîné une augmentation significative de la différence entre les cellules BXPC3 et MCF7 (Fig. 2).

L'IC50 de l'énoxaparine pour le MRI n'a pas été significativement différent lorsque la génération thrombine a été déclenchée en présence de cellules BXPC3 ou de MCF7. L'ajout de plaquettes a entraîné une augmentation significative de la différence entre les BXPC3 et les MCF7 (Fig. 2).



Fig. 2 : Altération de l'IC50 de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine pour le MRI de la génération de thrombine en PPP ou en PRP en présence de cellules BXPC3 ou MCF7.

Les valeurs sont des moyennes ± sd du ratio IC50 BXPC 3 / IC50 /MCF7, de 8 expériences.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons étudié l'impact des cellules d'adénocarcinome pancréatiques BXPC3 et des cellules cancéreuses du sein MCF7 sur le potentiel inhibiteurs des anti-Xa spécifiques (apixaban et fondaparinux) et sur une HBPM (l'énoxaparine) a inhiber la génération de thrombine.

L'énoxaparine est un anticoagulant à cibles multiples exerçant son effet antithrombotique principalement par la liaison du son domaine pentasaccharidique présent dans 30% des chaînes polysaccharidiques à l'antithrombine (AT). Cette HBPM diminue la production de thrombine en accélérant l'inhibition AT-dépendante du facteur Xa et dans une moindre mesure l'inhibition de la thrombine [20]. Le rapport anti-Xa / anti-IIa de l'énoxaparine est de 3.9. Par sa liaison à l'ATIII, l'énoxaparine potentialise préférentiellement l'inhibition du FXa libre plutôt que l'inhibition du FXa lié à la prothrombinase [21]. Le fondaparinux pentasaccharide synthétique tant qu'à lui inhibe spécifiquement le FXa de manière AT-dépendante le FXa libre, mais pas le FXa lié à la prothrombinase [22-24]. L'apixaban est un inhibiteur direct actif par voie oral compétitif et sélectif du FXa. II inhibe le FXa libre et le FXa lié à la prothrombinase ayant pour caractéristique une inhibition de la génération de thrombine concentration dépendante [24,25].

Les deux types de cellules cancéreuses étudiées déclenchent la coagulation du sang essentiellement via le FT mais disposent chacunes de mécanismes procoagulants additionnels distincts [14]. L'apixaban, le fondaparinux et l'énoxaparine ont d'abord dans cette étude été utilisés à des concentrations situées dans le milieu de la fourchette thérapeutique habituelle des patients souffrant de maladie thromboembolique veineuse. En présence de cellules BXPC3 ou MCF7, ces trois molécules ont inhibé significativement la génération de thrombine tout comme dans l'expérience témoin où la génération de thrombine a été déclenchée par une concentration physiologique en FT. Cependant, le degré de l'activité inhibitrice de chaque composé a varié en présence de cellules cancéreuses en comparaison de l'expérience contrôle. Elle varie en fonction du type de cellules cancéreuses. Lorsque des concentrations fixes des composés étudiés ont été comparés, la présence des cellules BXPC3 ne modifiait pas le degré d'inhibition de l'énoxaparine ou de l'apixaban sur la génération de thrombine en comparaison de celle observée sur la génération de thrombine en présence de FT. En revanche, les BXPC3 diminuaient significativement le pouvoir du fondaparinux à inhiber la génération de thrombine. De même, les cellules MCF7 n'ont significativement pas

modifié la puissance inhibitrice de l'apixaban et de l'énoxaparine sur la génération de thrombine mais ont réduites significativement l'efficacité du fondaparinux.

Pour aller plus loin et approfondir ces résultats, nous avons étudié les variations du degré inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine en comparant les IC50 du peak et du MRI en présence des cellules cancéreuses en comparaison de l'expérience témoin sans cellules. Cette comparaison a montré que les deux types de cellules cancéreuses réduisent l'effet antithrombotique des agents à des degrés différents. L'IC50 du peak et du MRI a augmenté de 1,5 fois en présence des cellules BXPC3 pour l'apixaban alors qu'il n'a que légèrement augmenté en présence des cellules MCF7. Nous pouvons donc en conclure que selon le type histologique et le potentiel procoagulant des cellules cancéreuses, l'efficacité antithrombotique de l'inhibiteur direct et spécifique du FXa, l'apixaban, peut être conservée ou partiellement diminuée. Contrairement à l'apixaban, le fondaparinux inhibiteur spécifique du FXa antithrombine-dépendant, était significativement plus sensible à la présence des cellules cancéreuses. Les cellules BXPC3 ont en effet significativement diminué l'effet inhibiteur du fondaparinux sur la génération de thrombine. Cette différence pourrait provenir de la capacité distincte des deux agents à inhiber le FXa lié à la prothrombinase. En effet, des études antérieures ont montré que l'AT liée au fondaparinux pentasaccharide synthétique ne parvient pas à empêcher la prothrombinase de se lier au FXa [21-23]. En revanche, les inhibiteurs directs du facteur Xa, tels que l'apixaban inhibent à la fois le FXa libre et le FXa lié à la prothrombinase [23,24]. Il semble donc que la capacité d'inhiber le FXa lié à la prothrombinase en plus du FXa libre offre à l'apixaban l'avantage de conserver son activité antithrombotique sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. L'effet des cellules BXPC3 ou MCF7 sur l'activité antithrombotique de l'énoxaparine a été similaire à celle sur l'apixaban. Nous en concluons donc que la présence de traces d'activité anti-IIa de l'énoxaparine compense la perte spécifique de l'actvité anti-Xa AT- dépendante. Les différences observées entre les deux types de cellules en PPP ont été fortement réduites en présence de plaquettes. Ceci peut être expliqué par la propriété des cellules MCF7 à activer les plaquettes [26]. Les plaquettes activées sont une source de matière procoagulante, ce qui renforce la formation du complexe prothrombinase. En outre, les plaquettes activées sécrètent le facteur plaquettaire 4 (PF4) qui neutralise les chaînes d'un poids moléculaire élevé [27]. Les plaquettes pourraient modifier la capacité des agents antithrombotiques ATdépendants, comme pour l'HBPM énoxaparine ou le pentasaccharide synthétique fondaparinux à inhiber l'activation des plaquettes thrombine dépendante.

La coprésence des cellules BXCP3 ou MCF7 et des plaquettes a eu un impact plus faible sur l'activité antithrombotique de l'apixaban que sur celui de fondaparinux ou de l'énoxaparine. L'hypothèse possible de cette différence résulte tout d'abord des caractéristiques structurelles différentes ainsi que des mécanismes d'action différents. L'hypothèse pour expliquer que l'activité antithrombotique du fondaparinux et de l'énoxaparine est réduite par les cellules cancéreuses BXPC3 ou MCF7 est liée à la capacité de ces cellules à déclencher la génération de thrombine (FT dépendante) et donc de renforcer la formation de la prothrombinase ce qui explique que les inhibiteurs indirects du FXa tels que l'énoxaparine et le fondaparinux ont moins d'efficacité que les inhibiteurs directs tels l'apixaban en présence de cellules. Un renforcement éventuel de la formation de la prothrombinase, via l'expression de protéases qui activent directement le FX (comme le cancer procoagulant) [28] par les cellules BXPC3 ou MCF7 est en cours d'étude. De possibles voies supplémentaires pouvant mener à la formation de la prothrombinase devraient être également explorées. L'activation de la voie de contact de la coagulation par les cellules cancéreuses, l'hypercoagulabilité liée à une possible activité héparinase pourrait être également un mécanisme alternatif jouant un rôle [29,30]. Plus spécifiquement, l'expression de récepteurs membranaires de liaison à l'heparine et / ou d' héparanases pourraient modifier la répartition des chaines polysaccharidique de l'énoxaparine et de la chaîne pentasaccharidique du fondaparinux [31,32]. Enfin, la différence de liaison au facteur plaquettaire 4 (PF4) des agents antithrombotiques étudiées pourrait être un facteur impliquée dans la réduction du pouvoir antithrombotique de l'énoxaparine par les plaquettes [33].

En conclusion, l'hétérogénéité du potentiel prothrombotique des différentes cellules cancereuses est probablement à la base des différences observées concernant les bénéfices et les risques de l'anticoagulation chez les patients atteint de différents types de cancer. L'activité procoagulante des cellules cancéreuses pourrait modifier l'éfficacité des agents antithrombotiques. La compréhension du mécanisme d'action des agents antithrombotiques dans les cancers induisant l'hypercoagulabilité pourrait aider à optimiser le traitement antithrombotique.

Contributions des auteurs

AR a apporté une contribution importante à l'étude sur la conception et l'organisation, l'acquisition, l'analyse et l'interprétation des résultats et a été impliqué dans la rédaction du manuscrit.

PVD a apporté une contribution importante à l'interprétation des résultats, a été impliqué dans la rédaction du manuscrit.

EM a procédé à des cultures de cellules cancéreuses BXPC3 et MCF7 et a apporté une contribution substantielle à la rédaction du manuscrit.

IE a apporté une contribution substantielle à la conception et l'interprétation des résultats.

GG a apporté une contribution substantielle à la conception de l'étude, l'analyse et l'interprétation des résultats, a été impliqué dans la rédaction du manuscrit, a donné l'approbation finale de la version à être publié, a accepté d'être responsable de tous les aspects du travail en veillant à ce que les questions liées à l'exactitude ou à l'intégrité d'une partie des travaux soient dûment examinées et résolues.

Remerciement

Les auteurs tiennent à remercier Mme Hayat Mokrani pour son aide technique. L'étude a été financée par l'«Association de Recherche sur la Thrombose et l'Evaluation de son Risque".

Références

- [1] S.R. Kahn, W. Lim, A.S. Dunn, M. Cushman, F. Dentali, E.A. Akl, D.J. Cook, A.A. Balekian, R.C. Klein, H. Le, S. Schulman, M.H. Murad, American College of Chest Physicians, Prevention of VTE in nonsurgical patients: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence- Based Clinical Practice Guidelines, Chest 141 (Suppl. 2) (2012) e195S–e226S.
- [2] A.N. Nicolaides, J. Fareed, A.K. Kakkar, A.J. Comerota, S.Z. Goldhaber, R. Hull, K. Myers, M. Samama, J. Fletcher, E. Kalodiki, D. Bergqvist, J. Bonnar, J.A. Caprini, C. Carter, J. Conard, B. Eklof, I. Elalamy, G. Gerotziafas, G. Geroulakos, A. Giannoukas, et al. Prevention and treatment of venous thromboembolism—International Consensus Statement, Int. Angiol. 32 (2013) 111–260.

- [3] D. Farge, P. Debourdeau, M. Beckers, C. Baglin, R.M. Bauersachs, B. Brenner, D. Brilhante, A. Falanga, G.T. Gerotzafias, N. Haim, A.K. Kakkar, A.A. Khorana, R. Lecumberri, M. Mandala, M. Marty, M. Monreal, S.A. Mousa, S. Noble, I. Pabinger, Prandoni, et al. International clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer, J. Thromb. Haemost. 11 (2013) 56–70.
- [4] C. Kearon, E.A. Akl, A.J. Comerota, P. Prandoni, H. Bounameaux, S.Z. Goldhaber, M.E. Nelson, P.S. Wells, M.K. Gould, F. Dentali, M. Crowther, S.R. Kahn, American College of Chest Physicians, Antithrombotic therapy for VTE disease: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines, Chest 141 (Suppl. 2) (2012) e419S– e494S.
- [5] N.M. Kuderer, G.H. Lyman, Guidelines for treatment and prevention of venous thromboembolism among patients with cancer, Thromb. Res. 133 (Suppl. 2) (2014) S122–S127.
- [6] A.Y. Lee, Thrombosis in cancer: an update on prevention, treatment, and survival benefits of anticoagulants, Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Programs 2010 (2010) 144–149.
- [7] H.C. Hemker, S. Béguin, The mode of action of heparins in vitro and in vivo, Adv.Exp. Med. Biol. 313 (1992) 221–230.
- [8] M. Monreal, C. Falgá, M. Valdés, C. Suárez, F. Gabriel, C. Tolosa, J. Montes, Riete inves- tigators: fatal pulmonary embolism and fatal bleeding in cancer patients with venous thromboembolism: findings from the RIETE registry, J. Thromb. Haemost. 4 (2006) 1950–1956.
- [9] D. Imberti, G. Agnelli, W. Ageno, M. Moia, G. Palareti, R. Pistelli, R. Rossi, M. Verso, M.A.S.T.E.R. Investigators, Clinical characteristics and management of cancerassociated acute venous thromboembolism: findings from the MASTER Registry, Haematologica 93 (2008) 273–278.
- [10] J. Douketis, A.D. Bell, J. Eikelboom, A. Liew, Approach to the new oral anticoagulants in family practice: part 1: comparing the options, Can. Fam. Physician 60 (2014) 989– 995.
- [11] A. Pudusseri, R. Shameem, A.C. Spyropoulos, A new paradigm shift in antithrombotic therapy, Front. Pharmacol. 4 (2013) 133.

- [12] M.N. Levine, C. Gu, H.A. Liebman, C.P. Escalante, S. Solymoss, D. Deitchman, L. Ramirez, J. Julian, A randomized phase II trial of apixaban for the prevention of thromboembolism in patients with metastatic cancer, J. Thromb. Haemost. 10 (2012) 807–814.
- [13] G.T. Gerotziafas, I. Mahé, I. Elalamy, New orally active anticoagulant agents for the prevention and treatment of venous thromboembolism in cancer patients, Ther. Clin. Risk Manag. 10 (2014) 423–436.
- [14] G.T. Gerotziafas, V. Galea, E. Mbemba, A. Khaterchi, M. Sassi, H. Bacouche,
 C. Prengel, P. van Dreden, M. Hatmi, J.F. Bernaudin, I. Elalamy, Tissue factor overexpression by human pancreatic cancer cells BXPC3 is related to higher
 prothrombotic potential as compared to breast cancer cells MCF7, Thromb. Res.
 129 (2012) 779–786.
- [15] G.T. Gerotziafas, V. Galea, E. Mbemba, M. Sassi, M.P. Roman, A. Khaterchi, P. Van Dreden, M. Japcowitz, J.P. Lotz, J.F. Bernaudin, J. Fareed, M. Hatmi, I. Elalamy, Effect of low molecular weight heparins and fondaparinux upon thrombin generation triggered by human pancreatic cancer cells BXPC3, Curr. Vasc. Pharmacol. 12 (2014) 893–902.
- [16] H.C. Hemker, G.M. Willems, S. Beguin, A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes, Thromb. Haemost. 56 (1986) 9–17.
- [17] G.T. Gerotziafas, F. Depasse, J. Busson, L. Leflem, I. Elalamy, M.M. Samama, Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram- Thrombinoscope assay, Thromb. J. 3 (2005) 16.

[18] H.M. Spronk, A.W. Dielis, E. De Smedt, R. van Oerle, D. Fens, M.H. Prins, K.
Hamulyák, H. ten Cate, Assessment of thrombin generation II: validation of the calibrated auto- mated thrombogram in platelet-poor plasma in a clinical laboratory, Thromb.
Haemost. 100 (2008) 362–364.

[19] Y. Dargaud, R. Luddington, E. Gray, T. Lecompte, T. Siegemund, T. Baglin, J. Hogwood, V. Regnault, A. Siegemund, C. Negrier.
Standardisation of thrombin generation test-which reference plasma for TGT? An international multicentre study. Thromb. Res.125 (2010) 353-356.

[20] J. Fareed, D.A. Hoppensteadt, R.L. Bick, An update on heparins at the beginning of the new millennium, Semin. Thromb. Hemost. 26 (Suppl. 1) (2000) 5–21.

- [21] T.W. Barrowcliffe, S.J. Havercroft, G. Kemball-Cook, U. Lindahl, The effect of Ca2+, phospholipid and factor V on the anti-(factor Xa) activity of heparin and its high- affinity oligosaccharides, Biochem. J. 243 (1987) 31–37.
- [22] H. Speijer, D. Billy, G. Willems, H.C. Hemker, T. Lindhout, Inhibition of prothrombinase by antithrombin–heparin at a macroscopic surface, Thromb. Haemost. 73 (1995) 648–653.
- [23] J.P. Herault, A. Bernat, A.M. Pflieger, J.C. Lormeau, J.M. Herbert, Comparative effects of two direct and indirect factor Xa inhibitors on free and clot-bound prothrombinase, J. Pharmacol. Exp. Ther. 283 (1997) 16–22.
- [24] G. Jourdi, V. Siguret, A.C. Martin, J.L. Golmard, A. Godier, C.M. Samama, P. Gaussem,I. Gouin-Thibault, B. Le Bonniec, Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban, Thromb. Haemost. 114 (2015) 78–86.
- [25] J.M. Luettgen, R.M. Knabb, K. He, D.J. Pinto, A.R. Rendina, Apixaban inhibition of fac- tor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in purified protein sys- tems and in human plasma, J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 26 (2011) 514–526.
- [26] L. Lian, L. Wei, L. Zhen-Yu, Y.X. Mao, Y.T. Zhang, Y.M. Zhao, K. Chen, W.M. Duan, M. Tao, Inhibition of MCF7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a com- bination of antiplatelet drugs, Oncol. Lett. 5 (2013) 675–680.
- [27] L. Zuckerman, J.M. Ramstack, J.P. Vagher, J.A. Caprini, L.F. Mockros, Neutralization of heparin by cellular blood elements, Thromb. Res. 7 (1975) 149–159.
- [28] H. ten Cate, A. Falanga, Overview of the postulated mechanisms linking cancer and thrombosis, Pathophysiol. Haemost. Thromb. 36 (2008) 122–130.
- [29] M. Marchetti, E. Diani, H. ten Cate, A. Falanga, Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography, Haematologica 97 (2012) 1173–1180.
- [30] M. Matan, E. Axelman, B. Brenner, Y. Nadir, Heparanase procoagulant activity is elevated in women using oral contraceptives, Hum. Reprod. 28 (2013) 2372–2380.
- [31] A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, G.N. Tzanakakis, N.K. Karamanos, Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting, FEBS J. 277 (2010) 3904–3923.

- [32] U. Barash, V. Cohen-Kaplan, I. Dowek, R.D. Sanderson, N. Ilan, I. Vlodavsky, Proteo- glycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor pro- gression and metastasis, FEBS J. 277 (2010) 3890–3903.
- [33] J. Fareed, J.M. Walenga, D. Hoppensteadt, X. Huan, A. Racanelli, Comparative study on the in vitro and in vivo activities of seven low-molecular-weight heparins, Haemostasis 18 (Suppl. 3) (1988) 3–15.

VII.2 Article 2: article accepté, en attente de publication

VII.2.1 Version anglaise: Distinct roles of tissue factor and intrinsic pathway of blood coagulation in thrombin generation triggered by pancreatic cancer and breast cancer cells.

Aurélie Rousseau ^{1,2}, Patrick Van Dreden², Annette Larsen¹, Michele Sabah¹, Ismail Elalamy^{1,3}, Grigoris T Gerotziafas¹Paris, France

² Clinical Research, Diagnostica Stago, Gennevilliers, France

³Service d'Hématologie Biologique Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

Abstract

Background: Cancer cells trigger thrombin generation (TG). In the present study we dissected the mechanisms responsible for the procoagulant activity of pancreas adenocarcinoma cells (BXCP3) and the breast cancer cells (MCF7) cells.

Methods: TG of normal plasma added in wells carrying cancer cells was assessed by the Thrombinoscope (CAT®). TG was assessed in plasma depleted of clotting factors, in plasma spiked with tissue factor (TF) and/or procoagulant phospholipids, in plasma spiked with an anti-TF monoclonal antibody or corn trypsin inhibitor (CTI). Alternatively spliced TF (asTF), TF activity (TFa) and cancer procoagulant (CP) were also assessed.

Results: The TFa and asTF were abundantly expressed by BXCP3 cells compared to MCF7 cells. The CP levels were higher in MCF7 cells. The BXPC3 cells had a higher effect than MCF7 cells on TG. The anti-TF had more important inhibitory effect on TG triggered by BXCP3. The CTI had more pronounced inhibitory effect on TG triggered by MCF7. TG enhancement by BXPC3 and MCF7 was mediated by FVII and intrinsic tenase. FXII and FXI were more important for TG enhancement by MCF7.

Conclusion: Enhancement of TG by BXPC3 cells was driven mainly by the TF pathway. The enhancement of TG by MCF7 cells was also driven by FXII activation. Hypercoagulability is the resultant of the combination of the inherent procoagulant properties of the cancer cells with the presence of adequate amounts of TF and procoagulant phospholipids in the plasma microenvironment.

Running title: Mechanisms of thrombin generation induced by cancer cells

Keywords: cancer, thrombin generation, hypercoagulability, tissue factor, factor XII

Abbreviation list VTE: venous thromboembolism TF: tissue factor CP: cancer procoagulant MCF7: Michigan Cancer Foundation 7, human breast cancer cells BXPC3: Human primary pancreatic adenocarcinoma FVII: coagulation factor VII FXII: coagulation factor XII FXI: coagulation factor XI FIX: coagulation factor IX FVIII: coagulation factor VIII FX: coagulation factor X FV: coagulation factor V FII: coagulation factor II TFa: tissue factor activity asTF: Alternatively spliced TF **RVV: Russel Viper Venom** PPP: platelet poor plasma MRI: mean rate index HUVEC: Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells CTI: corn trypsin inhibitor TG: thrombin generation UNL: Upper Normal Limit ttPeak: time to Peak

Introduction

Blood hypercoagulability is a common systemic alteration in patients with cancer [1-3]. It is well established that the risk of venous thromboembolism (VTE) in patients with malignancies varies according to the histological type of the cancer [4-6]. Cancer cells are directly involved in the pathogenesis of thrombosis through the triggering and enhancement of thrombin generation [7,8]. According to the cell based model of blood coagulation, triggering of thrombin generation occurs by direct contact of tissue factor (TF) bearing cells with plasma factors VII (FVII) and VIIa (FVIIa) which is amplified by the presence of procoagulant phospholipids (PPL) offered by cell derived microparticles [9-11]. The TF/FVIIa complex generates activated facotr X (FXa) that induces initial generation of trace amount of thrombin leading to activation of platelets, factor V (FV) and factor VIII (FVIII). In the presence of ionized calcium intrinsic tenase (FIXa/FVIIIa/procoagulant phospholipids) and prothrombinase (FXa/FVa/procoagulant phospholipids) formation leads to a burst of thrombin generation [12-14]. The activation of the contact system which induces FXII activation and the generation of FXIa, by FXIIa and thrombin, are additional pathways that lead thrombin generation [15, 16]. The contact system is considered of secondary importance as compared to the TF-pathway. However, it attracts the interest of recent research especially in cancer-induced hypercoagulability [17, 18]. Cancer cells from some poorly differentiated tumors express the cancer procoagulant (CP) factor, a 68 kDa protease that directly activates FX, which is considered as an additional pathway in cancer induced hypercoagulability [19,20].

Recent studies from our group showed that the contact of human plasma pancreas adenocarcinoma cells (BXPC3) or breast cancer cells Michigan Cancer Foundation 7 (MCF7) enhances thrombin generation [21]. Similarly Marchetti at all using cells showed than cells from hematological malignancies also enhance thrombin generation [22]. The comparison of BXPC3 with the MCF7 showed that they enhance thrombin generation but they have different procoagulant potential [21]. Using an original and validated experimental system that allows to study thrombin generation triggered directly by cancer cells we investigated the mechanisms by which cancer cells trigger blood coagulation, the role of the TF-pathway and intrinsic clotting system in thrombin generation. The conditions of plasma microenvironment which are necessary for induction of hypercoagulability. To this purpose thrombin generation was assessed in different experimental conditions of TF and procoagulant phospholipids in

plasma as well as in plasma selectively deficient in factor VII (FVII), factor XII (FXII), factor XI (FXI), factor IX (FIX), factor VIII (FVIII), factor X (FX), factor V (FV), factor II (FII). The amount of TF released by cancer cells in their microenvironment was also studied.

Materials and Methods

Cell cultures

Adhesive cell lines from pancreatic cancer (BXPC3), breast cancer (MDA-MB-231, MCF7, BT20), colon cancer (HT29, HCT116) and ovarian cancer (IGROV1) were used for thrombin generation experiments in human plasma. After the initial screening, the two cancer cell lines employed in this study were selected because they were from different organs (pancreas and breast) and induced significantly different intensity of thrombin generation. Human pancreatic primary adenocarcinoma cell line BXPC3 (lot F-11067) was from American Type Culture Collection (ATCC; 1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852- USA). Breast adenocarcinoma cell line MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) was from ATCC (1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-USA). For technical reasons it was not possible to obtain cells from healthy pancreatic or breast tissue. So we used primary human umbilical vein cells (HUVEC) as normal control experiment.

Cells were expanded and cultured as described elsewhere [21] A volume of 100 μ l of cell suspension (50 cells/ μ l) was placed in 96-well plates and cells were cultured and adhered at 37°C in 100% humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24h which was optimal. In preliminary experiments we found that after 24h of incubation, the BXPC3 cells were at 70% confluence and the MCF7 cells were at 80% confluence. In these conditions the two cancer cell lines gave similar intensity of thrombin generation. We also ruled out any potential interference of trypsin and on cell activity by performing thrombin generation either with cells, which were moved by the flasks mechanically, or by exposure to trypsin. We also confirmed that the concentration of foetal bovin serum (ranging from 1% to 10%) and the incubation time of cells in the plaque (ranging from 5 to 72 hours) did not significantly influence their procoagulant potential on thrombin generation. For the studied cancer cell lines, a plateau effect on thrombin generation was observed at cell numbers equal or higher than 50 cells/ μ L (data are shown in a supplementary Tables). Cells were used in the experiments only if the apoptotic cell number was lower that 2% of the whole cells count. HUVEC were obtained from Clonetics (San Diego, CA) and cultured in endothelial cell

growth media EGM-2 (Clonetics) containing 2% of foetal bovine serum and supplements.

Cells of 2^{nd} passage were used in the experiments. Adhesive cultures were developed on 25 cm² culture flasksand adhered at 37°C in 100% humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were used for experiments when they reached confluence 80%. For transfer to the 96-well plates HUVEC (a suspension of 50 cells/µl) were treated with the same protocol as that described above for BXPC3 and MCF7 cells.

Normal human plasma

Samples of normal platelet poor plasma (PPP) for thrombin generation experiments were purchased from Diagnostica Stago (Ref 00539) in compliance with Helsinki Declaration. Plasma samples for thrombin generation experiments in platelet rich plasma (PRP) were obtained from healthy volunteers, members of the laboratory staff, who had not taken any medication during the last 30 days. Blood samples were taken by atraumatic antecubital venipuncture and collected in siliconized vacutainer tubes (Becton Dickinson, Meylan, France) containing buffered 0.13 M trisodium citrate (nine parts blood to one part citrate solution; 3.8%). Platelet rich plasma was prepared after centrifugation of citrated whole blood for 10 min at 150 g at room temperature. After centrifugation the supernatant PRP was removed and the platelet count was adjusted at $150 \times 109/L$ by dilution with autologous PPP obtained after a further centrifugation of the remaining blood for 15 min at 2000 g.

Specific TF activity and concentration of alternatively spliced TF

The BXPC3 and MCF7 cells were obtained from adhesive cultures as described above. After three washing cycles with PBS cells were suspended in distilled water (at final concentrations adjusted between 50 and 200 cells/µl) and incubated at 4°C for 30 minutes. Then samples were centrifuged for 30 min at $1000 \times g$. afterwards, supernatants were collected and kept frozen at -80°C until measurement of TF activity.

Tissue factor activity (TFa) was measured in normal plasma, the same which was used for thrombin generation experiments; in which cancer cells were suspended. Tissue factor activity (TFa) was assessed with an in-house chromogenic method as described elsewhere [23-25]. Alternatively spliced TF (asTF) was measured by a specific enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The wells of a micro-ELISA plate are coated with an anti-asTF monoclonal antibody. The test sample, pre-diluted 1:1 with the sample dilution buffer was placed into the coated well. The asTF molecules, if present, bind to the well. After

a washing step to remove the unbound material, specific anti-human asTF peroxidaseconjugated monoclonal antibody was added to the wells. The anti-asTF peroxidase bind to asTF bound on the plate. Following a washing step to remove excess anti asTF–peroxidase, the bound enzyme peroxidase was revealed by its action over a fixed time on the TMB substrate. After stopping the reaction with a strong acid, the intensity of the color read at 450 nm was directly proportional to the amount of asTF in the plasma sample.

Cancer procoagulant assay

The CP activity was determined using an in-house chromogenic assay. The activity of CP was evaluated by measuring the conversion of purified FX to FXa after incubation of cells for 30 min at 37°C in presence of CaCl₂ solution (50 mmol/L in bis-Tris propane buffer, pH 6.7). Then the FXa specific chromogenic substrate MAPA-Gly-Arg-pNA (CBS-0244 from Diagnostica Stago, France) was added and the amidolytic activity was measured. Kinetics of color development were recorded in a wave length of 405 nm (from 0 to 30 minutes). The CP activity was expressed as mUnits/ml (1 Unit = the amount of enzyme responsible for releasing 1 μ mol of p-nitroanilide from the substrate in 1 minute). A calibration curve was constructed using increasing concentrations of Russel Viper Venom (RVV); a serine proteinase that activates FX (from Diagnostica Stago, France). The RVV was the standard control to calibrate the assay. Thrombin formation is totally inhibited by incubation of cells extracts with 1mmol/L HgCL₂. Results are expressed as mU/mg of protein. The specific cysteine proteinase inhibitor E64 (from Sigma St Louis USA) was added in the experimental system exclude possible non-specific interactions.

Calibrated Automated Thrombogram assay

In each well of the micro-plate, 80 μ l of PPP samples were mixed with saline (20 μ l). Thrombin generation was initiated by adding 20 μ l triggering solution containing CaCl₂ (16.7 mM final concentration) and fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 417 μ M final concentration). Thrombin generation was assessed with the Calibrated Automated Thrombogram assay (Thrombinoscope b.v., Maastricht, The Netherlands) as described elsewhere [26].Among thrombogram parameters we analyzed the mean rate index (MRI), which reflects the rate of the propagation phase of thrombin generation [calculated by the formula MRI=Peak/ (ttPeak – lag-time)]. This parameter includes lag-time, the time to Peak (ttPeak) and the Peak. These parameters of thrombogram as shown in previous studies, reflect

the biological activity of cancer cells on thrombin generation, better than the endogenous thrombin potential.

Procoagulant potential of cancer cells assessed with the calibrated automated thrombogram assay

The BXPC3 or MCF7 cells as well as the HUVEC (control experiment) were expanded in the wells of microtiter plates suitable for thrombin generation assessment (as described above). Then, 80 μ l of normal platelet poor plasma (PPP) were added in each well and thrombin generation was assessed as described above. In the control experiments, wells were filled with culture medium without cells and treated in the same way as the experiments. Each experiment was repeated several times. Saline (20 μ l) was used in the control experiment. In additional control experiments, thrombin generation was assessed in plasma spiked with increasing concentration of lymphocytes from healthy donors and was compared to thrombin generation obtained after calcification of normal plasma. No significant difference was found between the two experimental procedures (data not shown). In preliminary experiments, we also verified that the culture medium (solution of RPMI, glutamine, penicillin, streptomycin and fetal calf serum) did not influence thrombin generation process of normal PPP. Thrombin generation was initiated and recorded as described above.

Thrombin generation in the presence of an anti-TF antibody

In separate experiments, 50 μ l of the working suspension of BXPC3 or MCF7 cells (in a volume yielding count of 100 cells/ μ l) were mixed with 50 μ l of a solution containing an anti-TF mouse monoclonal antibody 4509 (American Diagnostica, Neuville-sur-Oise, France) or anti human TF9-10H10 of mouse origin (AbD Serotec, Bio Rad, France). An isotype mouse IgG1 (100 μ g/ml) or saline were used in control experiments. Cells were incubated with the anti-TF antibody or the isotype IgG1 for 15 min at 37°C and then 20 μ l of this suspension were mixed with 180 μ l of PPP. The number of BXPC3 and MCF7 cells in plasma assessed for thrombin generation was 50 per μ l. The experimental conditions were defined after conducting preliminary experiments on thrombin generation, with variable concentrations of the cells and the anti-TF monocolonal antibody. Cells were used at the lower active concentration the anti-TF antibody completely inhibited the effect of high TF

concentrations on thrombin generation. Impact of anti-TF antibody on thrombin generation were triggered in normal PPP by BXPC3 or MCF7 cells triggered in presence of MP-Reagent® to eliminateany interactions of the phospholipid concentration.

Impact of exogenous TF and phospholipids on the procoagulant potency of cancer cells

To evaluate the contribution of the microenvironment on the procoagulant potency of cancer cells, thrombin generation in the presence or in the absence of the studied cancer cells was assessed in the following experimental conditions: (a) in the presence of optimal concentrations of TF (5 pM) and procoagulant phospholipids (4 μ M) using the PPP-Reagent® [27] (b) in the presence of 1 pM TF and 4 μ M procoagulant phospholipids (PPP-Reagent low[®]), (c) in the presence of 5 pM TFwithout any addition of exogenous procoagulant phospholipids (PRP-Reagent[®]), (d) in the presence of 4 μ M of procoagulant phospholipids without any exogenous TF (MP-Reagent®) and (e) without any exogenous addition of TF and/or procoagulant phospholipids which represents the baseline thrombin generation triggered by cancer cells. For simplicity, the comparisons of thrombin generation produced in the various experimental systems were performed on the basis of MRI, a parameter stemming from an equation that includes the other major parameters of thrombogram. The reagents PPP-Reagent®, PRP-Reagent®, MP-Reagent® were purchased from Diagnostica Stago Gennevilliers France.

Thrombin generation after inhibition of the contact system of blood coagulation

To evaluate the impact of FXII activation by cancer cells, PPP spiked with 20 μ g/ml of corn trypsin inhibitor (CTI, Merck Chemicals, Nottingham, UK) was incubated for one hour at 37 °C. Then, PPP was added into the micro-plate wells containing BXPC3 and MCF7 cells and thrombin generation was assessed as described above. Preliminary experiments showed that CTI concentrations equal or higher that 20 μ g/ml significantly increased the lag-time as compared to the control. No significant differences were observed higher than 20 μ g/ml CTI concentration. No significant difference of thrombin generation was found between plasma obtained from blood collected in tubes prefilled with CTI and addition of CTI after plasma preparation (data not shown). To estimate the relative contribution of TF and contact system activation by cancer cells on thrombin generation, PPP spiked with 20 μ g/ml of CTI and 25 μ g/ml of anti-TF monoclonal antibody was incubated for one hour at 37 °C.

Thrombin generation in clotting factor deficient plasma

Immunodepleted lyophilised plasmas deficient of clotting factors (FVII, FIX, FX, FII, FVIII, FXI, FXII) or protein C were from by Diagnostica Stago, (Gennevilliers, France). Clotting factor deficient plasmas were reconstituted according to the manufaturer's instructions. Clotting factor deficient plasma and normal PPP were added in the wells of the micro-plate containing cancer cells. Subsequently, thrombin generation was assessed as described above.

Statistical analysis

Non-parametric Mann-Withney test was applied to control changes in thrombogram parameters in the presence and in the absence of cancer cells in plasma as well as in the different experimental condition described above. Results are shown as mean \pm SD. The level of statistical significance was set at 0.05. SPSS statistical software package was used for statistical analysis. The inhibition of thrombin generation (TG) was calculated by the formula Inhibition of TG = (1-TGcells / TG control) %

The Upper Normal Limit (UNL) for each parameter of thrombogram was defined in the control group as follows: UNL= mean + 2SD.

Results

Enhancement of thrombin generation by BXPC3 and MCF7

The contact of cancer cells with normal PPP resulted in a significant increase of the Peak and the MRI and a reduction of the lag time and ttPeak as compared to the control experiment (normal PPP without cell) (Table 1). A similar effect of cancer cells was observed when the same experiment was performed in PRP (Figure 1 fames A and B). A significant variability of the effect of the different types of cancer cells on thrombin generation of normal human plasma was observed. At equal numbers of cells the MCF7 had the less potent procoagulant activity and the BXPC3 had the stronger procoagulant activity. The parameters of thrombogramme assessed in the presence of HUVEC were not significantly different as compared to the control experiments (PPP or PRP without cells) in the same conditions (Figure 1 frames A and B).
The BXPC3 and MCF7 were selected to further investigation of the mechanism of cancer cell induced hypercoagulability.

Tissue Factor expression expressed by BXPC3 and MCF7 cells

Both BXPC3 and MCF7 cells expressed significantly higher levels of TFa as compared to the normal plasma (0.20 ± 0.05 pM; p < 0.05) and to the normal HUVEC (0.23 ± 0.02 pM). The BXPC3 cells expressed significantly higher levels of TFa as compared to the MCF7 cells (1.42 ± 0.10 pM versus 0.82 ± 0.08 pM respectively; p<0.05). The levels of TFa increased in function of the number of cells (Table 2). In each studied concentration of BXPC3 cells, the levels of TFa were significantly higher as compared to those expressed by equal concentrations of MCF7 cells.

The levels of asTF were significantly higher in the presence of BXPC3 or MCF7 cells as compared to those observed in normal plasma (0.02 ± 0.01 ng/ml; p<0.05) or HUVEC cells (0.03 ± 0.02 ng/ml; p<0.05). The levels of asTF were significantly increased in plasma incubated with BXPC3 cells as compared to those found in plasma incubated with MCF7 cells (0.35 ± 0.09 ng/ml versus 0.05 ± 0.02 ng/ml respectively; p<0.05) (Table 2). For each concentration of BXPC3 or MCF7 cells, the levels of asTF in plasma followed the concentration of TFa.

Impact of anti-TF monoclonal antibodies on thrombin generation triggered by BXCP3 or MCF7 cells

The addition of anti-TF monoclonal antibodies in PPP with BXPC3 cells or MCF7 cells, significantly prolonged the lag-time and ttPeak and decreased the MRI and the Peak of thrombin generation as compared to the experiment without any anti-TF antibody. In the presence of BXPC3 cells, the inhibition of thrombin generation by the anti-TF antibody was partial since it remained higher as compared to the control experiment. The anti-TF antibody also partially reversed thrombin generation triggered by the MCF7 cells but with less pronounced manner (Table 3). The anti-TF antibodies did not significantly modify thrombin generation triggered in the presence of the HUVEC.

Expression of cancer procoagulant activity by BXPC3 and MCF7 cells

Both BXPC3 and MCF7 cells expressed cancer procoagulant activity. The MCF7 cells expressed significantly higher cancer procoagulant activity as compared to the BXPC3 cells (220 ± 35 mU/mg versus 60 ± 15 mU/mg respectively; p<0.05). Addition of the cystein protease inhibitor E64 resulted in significant inhibition of FXa activity in the presence of BXPC3 cells (91% inhibition) or MCF7 cells (84% inhibition) (Table 4).

Influence of contact phase activation on thrombin generation triggered by BXPC3 or MCF7 cells

In the control experiment (PPP without cells) the addition of CTI resulted in prolongation of the lag-time by 1.7 ± 0.9 fold as compared to that observed in the absence of CTI. In normal PPP with BXPC3 or MCF7 cells spiked with CTI, the lag-time increased by 1.8 ± 1.3 fold and 2.6 ± 1.2 fold respectively as compared to the experiment without CTI (Figure 2). The increase of the lag-time induced by the CTI was significantly less important in PPP with HUVEC cells (1.6 ± 1.1 fold). Concomitant addition of CTI and anti-TF increased the lag-time 2.3-fold in the presence of BXCP3 cells, 1.3-fold in the presence of MCF7, 1.23-fold in the presence of HUVEC cells, and 1.21-fold with PPP without cells.

Thrombin generation triggered in the presence of BXCP3 and MCF7 cells in clotting factor deficient plasma

The interaction of cancer cells with the clotting factors was investigated by assessing thrombin generation in clotting factor deficient plasmas in the presence of BXPC3 or MCF7 cells or with cells in normal pool (control experiment).

Thrombin generation in plasma deficient of clotting factors VII, IX, XII, XI, VIII, in the presence of BXCP3 or MCF7 cells, was significantly reduced as compared to that observed in normal PPP with cells. In the presence of BXPC3 cells or MCF7 cells, the decrease of thrombin generation was different in each clotting factor deficient plasma (Table 5).

In FVII deficient plasma, the lag-time increased 2.7-fold in the presence of BXCP3 cells and 1.7-fold in the presence of MCF7 cells as compared to the experiment in normal PPP (p<0.001). The Peak and the MRI decreased by 79% and 95% respectively in the presence of BXCP3 cells and by 59% and 45% in the presence of MCF7 cells (p<0.05).

In FXII deficient plasma, the lag-time increased 2.7-fold for BXCP3 and 1.6 fold for MCF7 as compared to the experiment in normal PPP (p<0.05). The Peak and the MRI

decreased by 26% and 55% respectively in the presence of BXCP3 and by 55% and 81% respectively in the presence of MCF7 cells (p<0.05).

In FXI deficient plasma, the lag-time increased 2.2-fold for BXCP3 and 1.9 fold for MCF7 as compared to the experiment in normal PPP (p>0.05). The Peak and the MRI decreased by 55% and 74% respectively in the presence of BXCP3 and by 70% and 79% respectively in the presence of MCF7 cells (p<0.05).

In FIX deficient plasma, the lag-time increased 1.4-fold for BXCP3 and 2.5-fold for MCF7 as compared to the experiment in normal PPP (p<0.05). The Peak and the MRI decreased by 78% and 94% respectively in the presence of BXCP3 and by 92% and 96% respectively in the presence of MCF7 cells (p<0.05).

In FVIII deficient plasma, the lag-time was not modified for either BXCP3 or MCF7 cells as compared to the experiment in normal PPP. The Peak and the MRI decreased by 73% and 94% respectively in the presence of BXCP3 and by 84% and 96% respectively in the presence of MCF7 cells (p<0.05).

In FX, FV and FII deficient plasma, neither the BXPC3 cells nor the MCF7 cells induced any detectable thrombin generation.

In protein C deficient plasma, the Peak and the MRI increased 1.3-fold and 1.6-fold respectively in the presence of BXCP3 and 1.9-fold and 4.7-fold respectively in the presence of MCF7 cells (p<0.05). The lag-time increased 0.7-fold for BXCP3 and 0.9-fold for the MCF7cells as compared to the experiment in normal PPP (p<0.05).

Impact of Tissue Factor and procoagulant phospholipids on procoagulant capacity of BXPC3, MCF7 cells and HUVEC

In the control experiment thrombin generation varied in function of the presence of TF and procoagulant phospholipids (PPL) and also in function of the concentration of TF. Detailed data are presented in Table 6 and Figure3.

In the presence of optimal TF concentration and procoagulant phospholipids (TF $5pM/PPL 4\mu M$) the BXPC3 and the MCF7 cells increased the MRI by 52% and 44% respectively as compared to that obtained in the presence of TF $5pM/PPL 4\mu M$ and PPP alone (control). In these conditions, thrombin generation in the presence of BXPC3 or MCF7 cells was higher as compared to the UNL of normal plasma.

When no TF and procoagulant phospholipids were added in plasma with BXPC3, MCF7 or HUVEC cells, the MRI and peak were significantly lower as compared to the TF 5pM/PPL 4µM. Both BXPC3 and MCF7 cells and HUVEC cells induced significantly lower

MRI with a reduction of 75% and 81% respectively in the presence of BXCP3 and MCF7, and 90% for HUVEC cells and control without cells (Table 6).

In plasma with BXPC3 or MCF7 cells without any addition of TF and with optimal concentration of procoagulant phospholipids, the MRI significantly decreased as compared to the experiment performed in the presence TF 5pM/PPL 4 μ M. Both BXPC3 and MCF7 cells induced significantly lower thrombin generation as compared to that observed in the presence of TF 5pM/ PPL 4 μ M (Table 6). The MRI decreased of 31% and 77% respectively in the presence of BXCP3 and MCF7, of 53% and 68% for HUVEC cells and control without cells.

In plasma with BXPC3 or MCF7 cells without any addition of procoagulant phospholipids and in the presence of optimal TF concentration, the MRI significantly decreased as compared to the TF 5 pM/PPL 4 μ M. Both BXPC3 and MCF7 cells induced significantly lower thrombin generation as compared to that observed in the presence of TF 5 pM/PPL 4 μ M (Table 6). The MRI decreased of 36% and 73% respectively in the presence of BXCP3 and MCF7, of 92% and 81% for HUVEC cells and control without cells

In plasma with BXPC3 or MCF7 cells and in the presence of suboptimal concentration of TF and optimal concentration of procoagulant phospholipids, the MRI significantly decreased as compared to the TF 5pM/PPL 4 μ M. The MRI decreased of 23% and 35% respectively in the presence of BXCP3 and MCF7, of 65% and 47% for HUVEC cells and control without cells (Table 6).

The impact of TF and procoagulant phospholipids in plasma with the BXPC3 and MCF7 cells on the MRI is depicted in Figure 3.

Discussion

The present study addressed three issues related with hypercoagulability induced by cancer: (i) the identification of the most important procoagulant elements expressed by two different lines of cancer cells; (ii) the evaluation of the role of the TF-pathway and the intrinsic pathway in thrombin generation process triggered by cancer cells; (iii) the contribution of the TF and procoagulant phospholipids present in plasma micro-environment on thrombin generation triggered by the cancer cells.

It is well established that cancer cells express TF, the major trigger of blood coagulation [28-30]. We have previously demonstrated that the pancreas adenocarcinoma cells BXPC3 express significantly higher amounts of TF as compared to the breast cancer cells MCF7 and to HUVEC cells. The levels of TF expressed by each type of cancer cells are

correlated with their effect on thrombin generation [21]. The present study demonstrates that the activity of TF (TFa) expressed by the BXPC3 cells was significantly higher than that expressed by the MCF7 cells. The number of BXPC3 or MCF7 cells tended to correlate with the TFa at the difference of normal HUVEC. The levels of asTF were correlated with the number of BXPC3 or MCF7 cells. The TF isoform described as alternatively spliced TF (asTF) is expressed by tumour cell lines and tissue specimens from cancer patients [31]. Since its discovery, the procoagulant activity of asTF has been debated [32-34]. The asTF was expressed in abundant amounts by BXPC3 cells. A fainter expression of asTF was observed in MCF7 cells and HUVEC cells The levels of asTF expressed by both types of cancer cells increased in parallel with the number of cells and are correlated with the release of TFa in the cellular environment. However, the experimental design of the present study does not allow the exploration of any potential relationship between the procoagulant activity of cancer cells and the levels of asTF.

The progoagulant effect of BXPC3 and MCF7 cells on thrombin generation was partially reversed by the presence of a monoclonal anti-TF antibody, unlike HUVEC cells. Two principal hypotheses rise from this finding. The first was that the concentration of the anti-TF antibody was not high enough to completely neutralize the activity of TF. However, this hypothesis was ruled out by the experimental design of the study. A high concentration of the anti-TF antibody was used which completely inhibited thrombin generation triggered by high TF concentrations (data not shown).

The second hypothesis was that thrombin generation is driven by an alternative pathway - independent of TF. The expression of the cancer procoagulant activity and the activation of the intrinsic system of blood coagulation are two pathways investigated in this study. Both BXPC3 and MCF7 cells expressed CP and directly activate FX in a cystein dependent manner. Cancer procoagulant activity expressed by the MCF7 cells was about 4-fold higher as compared to that expressed by the BXPC3 cells.

The capacity of cancer cells to activate the intrinsic pathway of blood coagulation was studied using the CTI, which selectively inhibits FXIIa [35-36]. Inhibition of FXIIa resulted in a significant prolongation of the initiation phase of thrombin generation triggered by the BXPC3 and MCF7 cells. This experiment documented that both types of cancer cells induced thrombin generation via activation of FXII.But hasdifferentdegreesMCF7were more affected.

We also evaluated the role of each one of the clotting factors on thrombin generation triggered by cancer cells. This series of experiments showed that FVII was of major importance for the initiation and propagation phase of thrombin generation triggered by the

BXPC3 cells. The binding of VII to TF is considered to be the principal pathway of FX activation in normal coagulation [14]. Indeed, thrombin generation triggered by the BXPC3 cells in FVII deficient plasma thrombin collapsed. In contrast, thrombin generation triggered by MCF7 cells in FVII deficient plasma persisted. This finding leads to the conclusion that the MCF7 cells triggered thrombin generation via an alternative pathway that compromised the deficiency of FVII. The experiments with the CTI suggested that MCF7 cells could trigger thrombin generation through the activation of FXII. The experiments with the FXII deficient plasma confirmed this assumption since thrombin generation in the presence of the MCF7 cells was almost completely abrogated. The FXII is activated following pre-kallikrein and high molecular weight kininogen activation. The FVII and thrombin are also among the activators of FXII. In our experimental conditions, in the presence of either BXPC3 or MCF7 cells, the levels of both FVII and FII were normal. Consequently, we assume that when coagulation was triggered by the MCF7 cells, the deficiency of FXII interrupted the activation pathway leading to FXIa generation and to intrinsic tenase formation. In BXPC3 this pathway was secondary as compared to the TF. The experiments with FXI deficient plasma further supported the importance of the intrinsic pathway activation by the MCF7 cells.

Thrombin generation triggered by BXPC3 or MCF7 cells was abrogated in FVIII or FIX deficient plasma confirming that the formation of the intrinsic tenase is of major importance in the amplification of the propagation phase of thrombin generation in the presence of cancer cells. In addition, this experiment demonstrated the weak procoagulant efficiency of the CP. In the presence of either BXPC3 or MCF7 cells in plasma deficient of FX, or FV or FII, thrombin generation was abolished. Thus, the possibility of a "prothrombinase-like" or a "thrombin like" activity expressed by the cancer cells was eliminated. Finally, the experiments with the protein C deficient plasma showed that the down-regulation of thrombin generation by the protein C pathway was significantly more important for the MCF7 cells as compared to the BXPC3 cells.

The last part of the study demonstrated that the procoagulant activity of the cancer cells was not sufficient to induce hypercoagulability; i.e thrombin generation higher than the upper normal limit, as defined in normal plasma by the addition of physiologically relevant concentrations of TF and procoagulant phospholipids [37-38]. Subsequently, we investigated if the presence of procoagulant elements in plasma could amplify the procoagulant efficiency of cancer cells. In plasma enriched with an optimum concentration of procoagulant phospholipids, the presence of BXPC3 cells resulted in almost normalization of thrombin

generation. In the presence of MCF7 cells and procoagulant phospholipids thrombin generation remained significantly lower as compared to the normal levels of optimal conditions. We also examined the impact of exogenous TF (without any exogenous addition of procoagulant phospholipids) on thrombin generation triggered by cancer cells. We found that procoagulant phospholipids are essential for the enhancement of thrombin generation induced by cancer cells event if the microenvironment is rich in TF. In contrast to cancer cells, the normal cells (HUVEC) had no effect on thrombin generation.

Finally, we studied the impact of the association of TF and procoagulant phospholipids on thrombin generation triggered by cancer cells. This experiment showed that hypercoagulability induced by cancer cells is the resultant of the combination of the procoagulant properties of cancer cells with procoagulant elements of the plasma microenvironment which consist of (a) an optimum concentration of procoagulant phospholipids and (b) TF at concentration higher than a threshold of 1 pM.

Conclusion

The ensemble of the data presented here in demonstrate that cancer cells BXPC3 and MCF7 trigger and enhance thrombin generation by both the TF-pathway and the intrinsic pathway of blood coagulation. The TF-pathway is dominant. However the intrinsic system should not be neglected. The impact of each of the two pathways role varies in function of the cancer cell type. The formation of the intrinsic tenase and prothrombinase are of major importance for thrombin generation triggered by cancer cells. To the best of our knowledge, the present study showed for the first time that the inherent procoagulant properties of cancer cells are not sufficient to induce hypercoagulability and documents that procoagulant elements of the microenvironement, namely TF and phospholipids, are necessary elements for cancer induced hypercoagulability.

Authors' contribution

A.R. did the experiments, has made substantial contributions to study design and organization, acquisition, analysis and interpretation of data, has been involved in drafting the manuscript. P.V.D. has made substantial contribution to the design of the study, the interpretation of the data, the writing and editing of the paper. M.S. has been involved in the cultures of the cancer cells and the interpretation of the data. I.E. critically reviewed the manuscript. G.T.G. has made substantial contributions to conception and design of the study,

analysis and interpretation of data, has been involved in drafting the manuscript has given final approval of the version to be published, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Competing interests

The authors have no financial or non-financial competing interests to declare in relation to this manuscript.

Acknowledgement

The authors wish to acknowledge Mme Hayat Mokrani and Mr Matthieu Gusse, for her skillful technical assistance. The study was financially supported by an unrestricted grand from Stago France and by the "Association de Recherche sur la Thrombose et l'Evaluation de son Risque".

References

- Trousseau A. Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris. 1865 Vol 3. 2nd ed. JB Baillière, Paris, France 654–712.
- Falanga A, Russo L, Milesi V. The coagulopathy of cancer. Curr Opin Hematol. 2014; 21: 423-9.
- Khorana AA, Francis CW, Culakova E et al. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. J Thromb Haemost 2007; 5: 632–634.
- Chew HK, Wun T, Harvey D et al. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. Arch Intern Med 2006;166: 458–464.
- Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. Lancet Oncol 2005; 6:401.
- Y. Lee and M. N. Levine. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. Circulation 2003; 107; I17–I21.

- 7. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GY et al. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. Neoplasia 2002; 4: 465-73.
- De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 50: 187-96.
- Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. Semin Thromb Hemost. 2006; 32 Suppl 1:32-8.
- Amin C, Mackman N, Key NS. Microparticles and cancer. Pathophysiol Haemost Thromb 2008; 36: 177-83.
- Davila M, Amirkhosravi A, Coll E et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. J Thromb Haemost 2008; 6: 1517-24.
- 12. Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. Curr Opin Hematol 2000; 7: 273-7.
- Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor activity and function in blood coagulation. Thromb Res 2008; 122 (Suppl 1): S42-6
- Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. Anesth Analg 2009; 108: 1447-52.
- 15. Mutch NJ. Emerging roles for factor XII in vivo. J Thromb Haemost 2011; 9: 1355-8.
- 16. Müller F, Renné T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. Curr Opin Hematol 2008; 15: 516-21.
- Thomassen MC, Heinzmann AC, Herfs L et al. Tissue factor-independent inhibition of thrombin generation by tissue factor pathway inhibitor-α. J Thromb Haemost 2015; 13: 92-100.
- Nickel KF, Ronquist G, Langer F et al. The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. Blood. 2015. pii: blood-2015-01-622811
- 19. Gordon S, Mielicki WP. Cancer procoagulant: a factor X activator, tumor marker and growth factor from malignant tissue. Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8: 73-86.
- 20. Donati MB, Gambacorti-Passerini C, Casali et al. Cancer procoagulant in human tumor cells: evidence from melanoma patients. Cancer Res 1986; 46: 6471-4.
- 21. Gerotziafas GT, Galea V, Mbemba E et al. Tissue factor over-expression by human pancreatic cancer cells BXPC3 is related to higher prothrombotic potential as compared to breast cancer cells MCF7. Thromb Res 2012; 129: 779-86.

- 22. Marchetti M, Diani E, ten Cate H et al. Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography. Haematologica 2012; 97: 1173-80.
- 23. Van Dreden P, Rousseau A, Savoure A et al. Plasma thrombomodulin activity, tissue factor activity and high levels of circulating procoagulant phospholipid as prognostic factors for acute myocardial infarction. Blood Coagul Fibrinolysis 2009; 220: 635-641.
- 24. Rousseau A, Favier R, Van Dreden P. Elevated circulating soluble thrombomodulin activity, tissue factor activity and circulating procoagulant phospholipids: new and useful markers for pre-eclampsia? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 146: 46-9.
- 25. Schneider P, Van Dreden P, Rousseau A et al. Increased levels of tissue factor activity and procoagulant phospholipids during treatment of children with acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2010; 148: 582-92.
- 26. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. Pathophysiol Haemost Thromb. 2002; 32: 249-53.
- 27. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Le Flem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. Thromb J. 2005; 3:16.
- 28. Tilley RE, Holscher T, Nieva J et al. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. Thromb Res 2008; 122: 604-9.
- 29. Key NS, Chantrahammachart P, Moody PW. Membrane microparticles in VTE and cancer. Thrombosis Research 2010;Supp 2: S80-S83.
- 30. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D et al. Tumor-derived tissue factor bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res 2009; 15: 6830-40.
- 31. Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C et al. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. J Thromb Haemost 2006; 4: 158–167.
- 32. Böing AN, Hau CM, Sturk A et al. Human alternatively spliced tissue factor is not secreted and does not trigger coagulation. J Thromb Haemost 2009; 7: 1423–1426.
- Szotowski B, Antoniak S, Rauch U. Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. Trends Cardiovasc Med 2006; 16: 177– 182.

- 34. Censarek P, Bobbe A, Grandoch M et al. Alternatively spliced human tissue factor (asTF) is not pro-coagulant. Thromb Haemost 2007; 97: 11–14.
- 35. Spronk HM, Dielis AW, Panova-Noeva M, van Oerle R, Govers-Riemslag JW, Hamulyák K, Falanga A, Cate HT. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? Thromb Haemost. 2009 Jun; 101 (6): 1156-62.
- 36. van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC et al. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombingeneration measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. Blood Coagul Fibrinolysis 2008; 19: 183-9.
- 37. Parhami-SerenB, Butenas S, Krudysz-Amblo J, Mann K. Immunologic quantification of tissue factors. J Thromb Haemost 2006; 4: 1747-55.
- 38. Bentrop E, Salvagno GL. Standardisation and clinical utility of thrombin generation assays. Semin Thromb Haemost 2008; 34: 670-82.



Figure 1: Representative thrombograms depicting the effect of BXPC3, MCF7 cells, and HUVEC cells (50 cells/µl) on thrombin generation of normal PPP (Frame A) or PRP (Frame B) compared to the control experiment (without cells).



Figure 2: Variation of the lag-time after addition of CTI alone and after addition of an anti-TF antibody (4509) in combination with CTI in plasma in the presence of BXCP3, MCF7 or HUVEC. Results represent the mean \pm SD of 3 experiments. (MP reagent = PPL:4 μ M).



Figure 3 : Alterations of the MRI in the presence of BXPC3, MCF7 cells and HUVEC and various concentrations of TF and PPL.

Results represent the mean \pm SD of 8 experiments.

*p< 0.001 versus control in PPP reagent TF 5pM/PPL 4µM)

PPL: procoagulant phospholipids

Table 1: Variability of the pro-coagulant effect of cancer cells on thrombin generation of normal human plasma.

	lag-time (min)	tt-Peak (min)	Peak	MRI
			(nM)	(nM/min)
MCF7	6.1±0.9	9.6±1.1	121±22	34±6
MDAMB231	8.9±0.6	14.5±0.8	76±8	14±3
HT29	5.36±1.3	11.8±1.9	81±11	13±4
HCT116	4.48±0.3	9.9±0.5	91±12	17±3
IGROV1	2.5±1.4	7.1±2.4	95±10	22±7
BT20	2.3±0.4	6.0±1.1	129±6	35±8
BXPC3	4.1±1.1	6.9±1.3	199±13	71±7
control	9.6±1.2	16.3±1.5	118±9	17±4

Table 2: Levels of TFa and asTF in the supernatant of BXPC3, MCF7and HUVEC cells and in normal plasma.

Values are the mean \pm SD of 5 experiments.

*p<0.05 versus HUVEC

^{\$}p<0.05 versus PPP without cell

[£]p<0.05versus MCF7

			50000 cells/µ	ıl	200000 cells/µl				
	PPP without cell	HUVEC	BXPC3	MCF7	HUVEC	BXPC3	MCF7		
TF (pM)	0.20±0.05	0.23±0.0 2	1.42±0.1* ^{\$£}	0.82±0.08* ^{\$}	0.26±0.02	2.65±0.05* ^{\$£}	1.21±0.05* ^{\$}		
asTF (ng/ml)	0.02±0.01	0.03±0.0 2	0.35±0.09* ^{\$£}	0.05±0.02 ^{\$}	0.04±0.01	0.65±0.02* ^{\$£}	0.12±0.01* ^{\$}		

Table 3: Impact of anti-TF antibody (4509) and anti-Human CD142 on thrombin generation triggered in normal PPP (control) and by BXPC3, MCF7, or HUVEC cells, in presence of MP-Reagent®.

Values are the mean \pm SD of 5 experiments

***p<0.001,**p<0.01,*p<0.05 comparison of thrombin generation in presence or absence of anti-TF antibody

Thrombogram	Control				BXPC3			MCF7				HUVEC				
parameters	PPP	isotype	anti-TF	CD142	PPP	isotype	anti-TF	CD142	PPP	isotype	anti-TF	CD142	PPP	Isotype	anti-TF	CD142
		IgG				IgG				IgG				IgG		
Lagtime (min)	8.8±0.7	9.9±0.7	10.8±1.2	11.7±0.9	4.1±0.7	4.2±0.1	6.9±0.3***	9.6±1.1***	5.5±0.3	5.5±0.2	6.6±0.3***	7.9±0.4***	7.2±0.8	7.4±0.7	8.1±0.6	8.7±0.6
tt Peak (min)	14.6±0.6	15.8±1.1	19.2±5.1	20.1±4.1	5.9±1.1	6.1±0.2	10.8±0.2***	16.2±1.6***	8.2±0.2	8.8±0.4	10.2±1.2**	12.5±2.3***	10.8±0.9	10.1±1.2	12.1±1.0	13.3±1.1
Peak (nM)	136±14	119±12	118±11	115.3±10	358±11	348±10	169±12***	95.6±11***	192±11	188±12	151±8*	126±10**	171±11	169±12	168±10	160±12
MRI (nM/min)	24±11	20±13	14±8	13±6	198±12	183±9	44±8***	15±7***	66±8	57±7	42±2**	26±8**	49±9	48±8	43±9	35±8

Table 4: Comparison of the expression of cancer pro-coagulant (CP) by the MCF7 and BXPC3 cells

	CP (mU/mg)	Inhibition by E64 (%)
MCF7	220 ± 35	84%
BXPC3	60 ± 15	91%

Table 5: Parameters of thrombin generation triggered with MP reagent in the presence of BXCP3 and MCF7 cells in normal PPP and in plasma selectively depleted of the indicated clotting factor. Values are the means ± SD of 4 experiments.

* p< 0.05 **p<0.001 as compared to normal PPP

	lag-time (min)		tt-Peal	k (min)	Peak	(nM)	MRI (nM/min)		
	BXPC3	MCF7	BXPC3	MCF7	BXPC3	MCF7	BXPC3	MCF7	
normal PPP	4.0 ± 0.6	5.2 ± 0.1	5.9 ± 1.2	8.1 ± 1.3	320 ± 12.6	194 ± 10	188 ± 7	67 ± 2	
FVII deficiency	11.2± 0.9**	9.1±0.2**	$20.1 \pm 0.9 **$	$11.2\pm1.2*$	66 ± 11 **	79±9 **	$9\pm2^{**}$	$37 \pm 3^{**}$	
FIX deficiency	$5.9\pm0.8*$	$13\pm0.8^{**}$	$12.2\pm2.0*$	$12.1\pm1.3^*$	$70 \pm 12^{**}$	$15 \pm 2^{**}$	$12 \pm 3^{**}$	$2.3 \pm 4^{**}$	
FXII deficiency	$11.2\pm0.2^{**}$	8.3±1.5*	$14.3\pm0.8*$	$16.3 \pm 1.4 **$	192± 8**	88±7**	$64 \pm 8^{**}$	$13 \pm 2^{**}$	
FXI deficiency	$9.3 \pm 1.2^{\ast\ast}$	$10.3\pm1.2^{**}$	$12.5\pm2.4*$	$14.8\pm1.6^{**}$	$145\pm10^{**}$	$58\pm6^{\ast\ast}$	$48 \pm 3^*$	$14 \pm 5^{**}$	
FVIII deficiency	4.8 ± 1.2	5.1 ± 0.9	$13.1\pm1.2^*$	$17.2 \pm 2.1 **$	$86\pm7^{\ast\ast}$	$30 \pm 3^{**}$	$11 \pm 6^*$	$2.8 \pm 3^{**}$	
PC deficiency	3.1 ± 0.9	4.9 ± 1.1	$4.4\pm0.8*$	6.2 ± 1.2	$410\pm14^{**}$	$380 \pm 12^{**}$	$310 \pm 15^{\ast\ast}$	$314 \pm 14**$	

Table 6: Thrombin generation in the presence of BXCP3, MCF7 and HUVEC cells triggered in different conditions.

Values are the means \pm SD of 8 experiments.

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p< 0.001 versus control in PPP reagent TF 5pM/PPL $4\mu M$

PPL : procoagulant phospholipids

			TF 1 pM/PPL 4 μM				TF 5 pM/ no PPL					
	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP without	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP without cells
				without				cells				
				cells								
Lagtime (min)	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.4	2.9 ± 0.7	4.5 ± 0.7***	2.6 ± 0.8	2.8 ± 1.1	$3.9\pm0.8*$	$6.1\pm0.1^{**}$	$3.7\pm0.8^{***}$	$4.7 \pm 0.6^{***}$	$5.8 \pm 1.0^{***}$
ttPeak (min)	4.7 ± 0.5	3.6 ± 0.6	4.0 ± 0.4	4.9 ± 0.6	8.5±0.8***	4.4 ± 0.9	$4.7\pm0.5^{\ast\ast}$	$6.5\pm1.5^{\ast}$	$14.7 \pm 1.1^{***}$	$4.9 \pm 1.1 \ast$	$7.2 \pm 1.3^{***}$	$10.3 \pm 1.1^{***}$
Peak (nM)	297 ± 10	435 ± 11	411 ± 13	380 ± 14	$170 \pm 11^{***}$	399 ± 11***	$334\pm11^{***}$	$260\pm12^{***}$	$76\pm13^{**}$	$220\pm11^{***}$	$180\pm10^{***}$	$160 \pm 13^{***}$
MRI (nM/min)	123 ± 12	290 ± 12	274 ± 18	190 ± 11	$42\pm12^{***}$	221 ± 13***	$177\pm13^{***}$	$99\pm6^{***}$	$9\pm2^{***}$	$183\pm12^{***}$	$72\pm5^{\ast\ast\ast}$	35 ± 4 ***
									_			
		no TF/PPI	Δ4 μΜ		Without TF and PPL							
	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP witho	ut HUVE	C BXPO	C3 MCF7	PPP without				
				cells				cells				
Lagtime (min)	$7.2\pm0.8^{\ast\ast\ast}$	$4.0 \pm 0.7^{***}$	5.2 ±	$8.8 \pm 1.5^{**}$	** 8.6 ± 1.1	*** 4.1 :	± 6.1 ±	$9.6 \pm 1.2^{***}$	_			
			0.9^{***}			1.1**	0.9***					
ttPeak (min)	$10.2 \pm 1.2^{***}$	$5.8 \pm 1.1 *$	$8.2 \pm$	$14.6 \pm 1.3^{\circ}$	*** 15.2 ± 1.4	l*** 6.9 :	± 9.6 ±1.1**	** 16.3 ± 1.5***				
			1.0^{***}			1.3**	**					
Peak (nM)	$171\pm13^{***}$	$360 \pm 11^{***}$	$190 \pm$	$136\pm11^{\ast}$	** 86 ± 11*	*** 199	± 121 ±	$118\pm9^{\ast\ast\ast}$				
			12***			14**	* 10***					
MRI (nM/min)	$57 \pm 11^{***}$	$200\pm14^{***}$	$63\pm6^{***}$	$24\pm9^{***}$	13 ± 4*	** 71±7	7^{***} 34 ± 6 ^{***}	$17\pm4^{***}$				

VII.2.2 Version francaise : Rôle du facteur tissulaire et de la voie intrinsèque de la coagulation sanguine dans la génération de thrombine déclenchée par des cellules cancéreuses du sein et du pancréas.

Aurélie Rousseau ^{1,2}, Patrick Van Dreden², Annette Larsen¹, Michele Sabah¹, Ismail Elalamy^{1,3}, Grigoris T Gerotziafas^{1,3}

¹INSERM U938, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Université Paris VI, Paris, France

² Clinical Research, Diagnostica Stago, Gennevilliers, France

³Service d'Hématologie Biologique Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

Abstract

Contexte: Les cellules cancéreuses déclenchent la génération de thrombine (GT). Dans cette étude, nous avons analysé les mécanismes responsables de l'activité procoagulante des cellules d'adénocarcinome du pancréas (BXPC3) et des cellules du cancer du sein (MCF7).

Méthode: La GT d'un plasma normal a été évaluée par le Thrombinoscope (CAT®) dans des puits contenant des cellules cancéreuses adhérentes. La GT a été évaluée dans des plasmas déficients en facteurs de coagulation, dans un plasma enrichi en facteur tissulaire (TF) et/ou phospholipides procoagulants, dans un plasma en présence d'un anticorps monoclonal anti-TF ou en présence de corn trypsine inhibitor (CTI). La forme épissée alternative du FT (l'aSTF), l'activité du FT (FTa) et le cancer procoagulant (CP) ont également été évalués.

Résultats: Le FTa et l'asTF ont été exprimés abondamment par les BXPC3 par rapport aux MCF7. Le CP était plus élevé pour les cellules MCF7. Les cellules BXPC3 activent plus fortement la GT que les MCF7. L'anti-FT a un effet inhibiteur plus important sur la GT quand cette dernière est déclenchée par les BXCP3. La CTI a un effet inhibiteur plus

prononcé sur la GT quand celle-ci est déclenchée par les MCF7. L'augmentation de la GT par les BXPC3 et les MCF7 est véhiculée par le FVII et par la tenase intrinsèque. Le FXII et FXI étaient plus importants pour l'augmentation de la GT par les MCF7.

Conclusion: L'augmentation de la GT par les BXPC3 était principalement du à la voie du FT. L'augmentation de la GT par des cellules MCF7 a été également portée par l'activation du FXII. L'hypercoagulabilité est la résultante de la combinaison des propriétés coagulantes intrinsèques des cellules cancéreuses et de la présence de quantités suffisantes de FT et de phospholipides procoagulants dans le plasma du microenvironnement.

Introduction

L'hypercoagulabilité sanguine est une altération systémique fréquente chez les patients atteints de cancer [1-3]. Il est bien établi que le risque de thromboembolie veineuse (TEV) chez les patients atteints de cancers varie selon le type histologique du cancer [4-6]. Les cellules cancéreuses sont directement impliquées dans la pathogenèse de la thrombose par le déclenchement et l'augmentation de la génération de thrombine [7,8]. D'après les modèles basés sur la coagulation sanguine, le déclenchement de la génération de thrombine se fait par le contact direct des cellules porteuses du facteur tissulaire (FT) avec des facteurs plasmatiques VII (FVII) et VIIa (FVIIa), amplifiée par la présence de phospholipides procoagulants (PPL) et des microparticules dérivant des cellules [9-11]. Le complexe FVIIa/FT génère du facteur X activé (FXa) qui induit la production des premières traces de thrombine conduisant à l'activation des plaquettes, du facteur V (FV) et du facteur VIII (FVIII). La présence de calcium, la production du complexe tenase intrinsèque (FIXa / FVIIIa / phospholipides procoagulant) et du complexe prothrombinase (facteur Xa / FVa / phospholipides procoagulant) conduit a l'explosion de la génération de thrombine [12-14]. L'activation de la phase contact, qui induit l'activation de FXII et la génération de FXIa par le FXIIa et la thrombine, sont des voies additionnelles qui entraînent la génération de thrombine [15, 16]. Le système de la phase contact est considéré comme secondaire par rapport à la voie du FT. Cependant, il est source d'intéressement dans la recherche en particulier dans l'hypercoagulabilité induite par le cancer [17, 18]. Les cellules cancéreuses provenant de certaines tumeurs peuvent exprimer le cancer procoagulant (CP), une protéase de 68 kDa qui active directement le FX et qui est considéré comme une voie supplémentaire induisant hypercoagulabilité dans le cancer [19,20].

Les études récentes de notre équipe ont montré que le contact du plasma avec les cellules humaines de l'adénocarcinome du pancréas (BXPC3) ou les cellules du cancer du sein (MCF7) augmente la génération de thrombine [21]. De même, Marchetti et al. ont montré que des cellules de tumeurs malignes hématologiques augmentent la génération de thrombine [22]. La comparaison des BXPC3 et des MCF7 a montré que ces cellules augmentaient la génération de thrombine mais avec des potentiels procoagulants différents [21]. En réalisant un système expérimental original qui permet d'étudier la production de thrombine déclenchée directement par les cellules cancéreuses, nous avons étudié ; les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses déclenchent la coagulation, le rôle de la voie du FT et du système intrinsèque de la coagulation dans la génération de thrombine. Les conditions du microenvironnement du plasma nécessaires pour l'induction de l'hypercoagulabilité ont également été étudiées. A cette fin, la génération de thrombine a été évaluée dans des conditions expérimentales différentes, en concentration en FT, en phospholipides procoagulants dans le plasma, ainsi qu'en plasmas déficients en facteur VII (FVII), facteur XII (FXII), facteur XI (FXI), facteur IX (FIX), facteur VIII (FVIII), facteur X (FX), facteur V (FV) et facteur II (FII). La quantité de FT libérée par les cellules cancéreuses dans leur microenvironnement a également été étudiée.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les lignées de cellules adhésives, du cancer du pancréas (BXPC3), du cancer du sein (MDA-MB-231, MCF7, BT20), du cancer du colon (HT29, HCT116) et du cancer des ovaires (IGROV1) ont été utilisées pour les expériences de génération de thrombine en plasma humain. Après ce dépistage initial, les deux lignées de cellules des cancers retenus dans cette étude ont été choisies parce qu'elles provenaient d'organes différents (pancréas et sein) et parce qu'elles produisaient des générations de thrombine significativement différentes. Les lignées cellulaires pancréatiques primaires d'adénocarcinome Humain BXPC3 (lot F-11067) provenaient de l'American Type Culture Collection (ATCC; 1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852- USA). Les lignées cellulaires d'adénocarcinome du sein MCF7 (Fondation-7 Michigan Cancer) provenaient de l'ATCC (1201 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-USA). Pour des raisons techniques, il n'a pas été possible d'obtenir des cellules de pancréas ou d'un tissu mammaire saines. Nous avons donc utilisé les cellules primaires de la veine ombilicale humaines (HUVEC) dans les expériences de contrôle

normal.

Les cellules ont été mises en culture comme décrit précédemment [21]. Un volume de 100µl de suspension cellulaire (50 cellules/µl) ont été placées dans des plaques à 96 puits, les cellules ont été cultivées dans des conditions optimales d'adhésions à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 100% avec 5% de CO₂ pendant 24 h. Dans des essais préliminaires, nous avons observé qu'après 24 heures d'incubation, les cellules BXPC3 étaient à 70% de confluence et les cellules MCF7 à 80% de confluence. Dans ces conditions, les deux lignées de cellules cancéreuses ont donné les mêmes générations de thrombine. Nous avons également écarté toute interférence potentielle de la trypsine sur la génération de thrombine en effectuant la génération de thrombine, soit en décollant les cellules mécaniquement par un râteau soit par la trypsine. Nous avons également confirmé que la concentration en sérum de veau fœtal (variant de 1% à 10%) et le temps d'incubation des cellules sur la plaque (allant de 5 à 72 heures) n'avaient pas d'influence significative sur leur potentiel procoagulant en génération de thrombine. Pour les deux lignées étudiées, un effet de plateau de la génération de thrombine a été observé à partir d'un nombre de cellules égales ou supérieures à 50 cellules/µl (les données sont présentées dans un tableau supplémentaire). Les cellules ont été utilisées dans nos essais uniquement si le nombre de cellules apoptotiques était inférieur à 2% lors du comptage.

Les cellules HUVEC ont été obtenues auprès de Clonetics (San Diego, CA) et mises en culture dans le milieu pour cellules endothéliales EGM-2 (Clonetics) contenant 2% de sérum de veau fœtal ainsi que des facteurs de croissance. Pour les essais, les cellules du deuxième passage ont été utilisées, les cellules adhérentes ont été cultivées dans des flasques de 25 cm² et incubées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 100% avec 5% de CO₂. Les cellules ont été utilisées lorsque la confluence atteignait 80%. Pour le transfert sur plaque à 96 puits, les HUVEC (suspension de 50 cellules/µl) ont été traités suivant le même protocole que celui décrit ci-dessus pour les cellules BXPC3 et MCF7.

Plasma normal humain

Les échantillons de plasma normal pauvre en plaquettes (PPP) pour des essais de génération de thrombine proviennent de Diagnostica Stago (Réf. 00539) en conformité avec la Déclaration d'Helsinki. Les échantillons de plasma pour des expériences de génération de thrombine en plasma riche en plaquettes (PRP) ont été obtenus à partir de volontaires sains, membres du personnel de laboratoire, qui n'avaient pas pris de médicaments au cours des 30 derniers jours. Les échantillons de sang ont été prélevés par ponction veineuse antécubital

atraumatique et recueillis dans des tubes Vacutainer siliconées (Becton Dickinson, Meylan, France) contenant du tampon du citrate trisodique 0,13 M (neuf volumes de sang citrate pour 1 volume de solution citrate : 3,8%). Le plasma riche en plaquettes a été préparé après centrifugation du sang total citraté pendant 10 min à 150 g à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant du PRP a été receuilli et le nombre de plaquettes a été ajustée à 150×10^9 / L par dilution avec du PPP autologue obtenu après une nouvelle centrifugation du sang restant pendant 15 min à 2000 g.

Activité spécifique du FT et concentration de l'asTF

Les cellules BXPC3 et MCF7 ont été obtenues à partir de cultures adhésives comme décrites ci-dessus. Après trois lavages en PBS, les cellules ont été mises en suspension dans de l'eau physiologique (à des concentrations finales ajustées entre 50 et 200 cellules/µl) et incubées à 4 ° C pendant 30 minutes. Les échantillons ont été centrifugés pendant 30 min à 1000g, les surnageant ont été recueillis et conservés congelés à -80 ° C jusqu'à la mesure de l'activité du FT.

L'activité du facteur tissulaire (FTa) a été mesurée dans le plasma normal, le même plasma, dans lequel les cellules cancéreuses ont été mises en suspension a été utilisé pour les essais de génération de thrombine. Le FTa a été dosé par une méthode chromogénique comme décritepar ailleurs [23-25].

L'asTF a été mesuré par une méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Les puits de la plaque ELISA sont revêtus d'un anticorps monoclonal anti-asTF. L'échantillon à tester, préalablement dilué au 1:1 en tampon de dilution, a été placé dans les puits. L'asTF, s'il est présent dans l'échantillon, se lie aux puits coatés. Après une étape de lavage pour éliminer les éléments non liés, un anticorps monoclonal spécifique del'asTF conjugué à la peroxydase a été rajouté aux puits. L'anti-asTF peroxydase se lie à l'asTF lié sur la plaque. Après une étape de lavage pour éliminer l'excès d'anti-asTF peroxydase, l'enzyme peroxydase liée a été révélée par son action sur le substrat TMB. Après arrêt de la réaction avec un acide fort, l'intensité de la coloration lue à 450 nm est directement proportionnelle à la quantité d'asTF présente dans l'échantillon de plasma.

Dosage du cancer procoagulant

L'activité du CP a été déterminée en utilisant un dosage chromogénique maison. Cette

activité a été évaluée en mesurant la conversion du FX en FXa après incubation des cellules pendant 30 min à 37 ° C en présence d'une solution de CaCl₂ (50 mmol / L dans du tampon Bis-Tris propane, pH 6,7). Le substrat chromogénique MAPA-Gly-Arg-pNA spécifique du FXa (CBS 0244, Diagnostica Stago, France) a été ajoutée et l'activité amidolytique mesurée. La révélation de l'activité se fait à une longueur d'onde de 405 nm (de 0 à 30 minutes). L'activité du CP est exprimée en mUnités/ml (1 unité = la quantité d'enzyme responsable de la libération de 1 µmol de p-nitroanilide de substrat en 1 minute). Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant des concentrations croissantes de venin de vipère Russel (RVV); une sérine protéinase qui active directement le FX (Diagnostica Stago, France). Le RVV est le contrôle standard pour calibrer le test. La formation de thrombine est totalement inhibée par incubation des extraits de cellules dans 1 mmol/L d'HgCl2. Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéine. L'inhibiteur de cystéine protéinase spécifique E64 (Sigma, St Louis, USA) a été ajouté dans le système expérimental afin d'exclure d'éventuelles interactions non spécifiques.

Test de génération de thrombine

Dans chaque puits de la microplaque, 80 μ l d'échantillons de PPP ont été mélangés avec une solution saline (20 μ l). La génération de thrombine a été initiée en ajoutant 20 μ l de solution de CaCl₂ (concentration finale 16,7 mM) et le substrat fluorogène (Z- Gly- Arg -AMC, a laconcentration finale de 417 pM). La génération de thrombine a été évaluée par le Calibrated Automated Thrombogram assay (Thrombinoscope B.V., Maastricht, Pays-Bas) comme décrit par ailleurs [26]. Parmi les paramètres du thrombinogramme, nous avons analysé l'indice de viscosité moyen (MRI) de la phase de propagation de la génération de thrombine [calculée par la formule: Peak / (ttPeak - temps de latence)]. Ce paramètre, comme montré dans les études antérieures, reflète l'activité biologique des cellules cancéreuses sur la génération de thrombine, mieux que le potentiel endogène de thrombine.

Evaluation du potentiel procoagulant des cellules cancéreuses par le CAT

Les cellules MCF7, BXPC3, ainsi que les HUVEC ont été mises en culture dans les puits des plaques de microtitration pour évaluation de la génération de thrombine (comme décrit cidessus). 80 µl de plasma pauvre en plaquettes (PPP) ont été ajoutés dans chaque puits et la génération de thrombine a été évaluée comme décrit ci-dessus. Dans les expériences témoins, les puits ont été remplis de milieu de culture sans cellules et traitées de la même manière que les essais. Chaque expérience a été répétée plusieurs fois. Une solution saline (20 µl) a été utilisée pour l'essai témoin. Dans des essais complémentaires, la génération de thrombine a été évaluée dans un plasma surchargé d'une concentration croissante en lymphocytes provenant de donneurs sains et a été comparé à la génération de thrombine obtenue après la calcification du plasma normal. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux procédures expérimentales (données non présentées). Dans des expériences préliminaires, nous avions également vérifié que le milieu de culture (milieu RPMI contenant de la glutamine, de la pénicilline, de la streptomycine et du sérum de veau fœtal) n'avait pas d'influence sur le processus de génération de thrombine en PPP. La génération de thrombine a été initiée et conduite comme décrit ci-dessus.

Génération de thrombine en présence d'un anticorps anti-FT

Dans des essais séparés, 50 μ l de suspension cellulaire contenant les cellules de BXPC3 ou de MCF7 (suspension à 100 cellules/ul) ont été mélangés avec 50 μ l d'une solution contenant un anticorps monoclonal de souris anti-FT (American Diagnostica, Neuville-sur -Oise, France, produit 4509) ou un anticorps humain TF9-10H10 provenant de souris (AbD Serotec, Bio Rad, France). Un isotype IgG1 de souris (100 μ g/ml) ou de sérum physiologique ont été utilisés dans les expériences de contrôle. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-FT ou l'isotype IgG1 pendant 15 min à 37 ° C, puis 20 μ l de cette suspension ont été mélangées avec 180 μ l de PPP. Le nombre de cellules BXPC3 et MCF7 dans le plasma pour la génération de thrombine était de 50 cellules/ μ l. Les conditions expérimentales ont été définies après avoir procédé à des expériences préliminaires de génération de thrombine avec des concentrations variables de cellules et d'anticorps monoclonal anti-FT. La concentration en anticorps utilisée à été de 25 μ g/ml. A cette concentration, l'anticorps anti-FT sur la génération de thrombine a été étudié en utilisant le MP-Reagent® en présence de BXPC3 ou

de MCF7 en pool normal, afin d'éliminer toutes les intéractions dues à la concentration en phospholipides.

Impact du FT et des phospholipides exogènes sur l'activité procoagulante des cellules cancéreuses

Afin d'évaluer la contribution du microenvironnement sur l'activité procoagulante des cellules cancéreuses, la génération de thrombine en présence ou en l'absence de cellules cancéreuses a été évaluée dans des conditions expérimentales suivantes: (a) en présence de concentrations optimales de FT (5 pM) et de phospholipides procoagulants (4 µM) en utilisant le PPP Reagent® [27] (b) en présence de 1pM de FT et 4 µM de phospholipides procoagulants (PPP Low® reagent), (c) en présence uniquement de 5 pM de FT (PRP Reagent®), (d) en présence uniquement de 4 µM de phospholipides procoagulant (MP Reagent®) et (e) sans aucune addition exogène de FT et / ou de phospholipides procoagulants qui représente une génération de thrombine de base induite par les cellules cancéreuses. Pour simplifier, la comparaison des générations de thrombine produite dans les différents systèmes expérimentaux, le MRI a été choisie, ce paramètre issu d'une équation englobe les autres paramètres importants du thrombinogramme. Les réactifs PPP Reagent®, PRP Reagent®, MP Reagent® proviennent de Diagnostica Stago Gennevilliers France.

Génération de thrombine après inhibition de la phase contact

Pour évaluer l'impact de l'activation du FXII par les cellules cancéreuses, au PPP est ajouté 20 μ g/ml de corn trypsine inhibitor (CTI, Merck Chemicals, Nottingham, Royaume-Uni) suivi d'une incubation d'une heure à 37 ° C. Le PPP est ensuite rajouté dans les puits de microplaques contenant des cellules MCF7 et BXPC3 et la génération de thrombine est évaluée comme décrit ci-dessus. Des essais préliminaires ont montré que des concentrations en CTI égales ou supérieures à 20 μ g/ml n'augmentaient pas de manière significative le temps de latence en comparaison au témoin. Aucune différence significative sur la génération de thrombine n'a été observée entre un plasma obtenu à partir du sang recueilli dans des tubes pré-additionnés de CTI et un plasma où la CTI est ajoutée après préparation du plasma (données non présentées). Pour estimer la contribution de la voie du FT et de l'activation du système de la phase contact par les cellules cancéreuses sur la génération de thrombine, 20

 μ g/ml de CTI a été ajouté dans du PPP et 25 μ g/ ml d'anticorps monoclonal anti -TF y ont été également ajouté suivi d'une incubation d'une heure à 37 ° C.

Génération de thrombine en plasmas déficients en facteur de la coagulation

Les plasmas lyophilisés immunodéplétés / déficients en facteurs de coagulation (FVII, FIX, FX, FII, FVIII, FXI, FXII) ou en protéine C ont pour origine Diagnostica Stago, (Gennevilliers, France). Les plasmas déficients en différents facteurs ont été reconstitués selon les instructions du fabricant. Les plasmas déficients et le PPP normale ont été ajoutés dans les puits de la microplaque contenant les cellules cancéreuses. La génération de thrombine a été évaluée comme décrit ci-dessus.

Analyse statistique

Le test paramétrique de Mann-Withney a été appliqué pour l'étude des paramètres du thrombinogramme en présence et en l'absence de cellules cancéreuses dans le plasma, dans les différentes conditions expérimentales décrites ci-dessus. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Le degré de signification statistique a été fixé à 0,05. Le logiciel statistique SPSS a été utilisé pour l'analyse statistique. L'inhibition de la génération de thrombine (TG) a été calculée la formule GT = (1 - GT cellules / GT contrôle) % La Limite Normale Supérieure (UNL) pour chaque paramètre de thrombinogramme a été défini dans le groupe contrôle comme suit : UNL = moyenne + 2SD.

Résultats

Effet des BXPC3 et des MCF7 sur de la génération de thrombine

Le contact des cellules cancéreuses avec du PPP normale a donné lieu à une augmentation significative du peak et du MRI et à une réduction du temps de latence et du ttPeak par rapport à l'essai témoin (PPP normal sans cellule) (tableau 1). Un effet identique de cellules cancéreuses a été observée lorsque la même expérience a été réalisée dans du PRP (figure 1 cadres A et B). Une variabilité importante de l'effet des différents types de cellules

cancéreuses sur la génération de thrombine, en plasma humain normal a été observée. À un nombre égal de cellules, les MCF7 ont une activité procoagulante moins importante que les cellules BXPC3. Les paramètres de thrombogramme dans les mêmes conditions évalués en présence d'HUVEC ne diffèrent pas significativement en comparaison des expériences de (PPP PRP cellules) (Figure contrôle ou sans 1 cadres Α **B**). et Les BXPC3 et les MCF7 ont été choisis pour l'analyse plus approfondie du mécanisme d'hypercoagulabilité induite par les cellules cancéreuses.

Expression du facteur tissulaire par les cellules MCF7 et BXPC3

Les deux types de cellules BXPC3 et MCF7 ont exprimé des taux significativement plus élevés de FTa en comparaison au plasma normal sans cellule $(0,20 \pm 0,05 \text{ pM}; \text{ p} < 0,05)$ et des HUVEC $(0,23 \pm 0.02\text{pM})$. Les cellules BXPC3 ont exprimé des taux significativement plus élevés de FTa par rapport aux cellules MCF7 (respectivement $1,42 \pm 0,82$ versus $0.82 \pm 0.08\text{pM}; \text{ p} < 0,05)$. Les taux de FTa ont augmenté en fonction du nombre de cellules (tableau 2). Pour chaque concentration de cellules étudiée, les taux de FTa étaient significativement plus élevés pour les BXPC3 par rapport à ceux exprimés par des concentrations égales de cellules MCF7.

Les taux de asTF étaient significativement plus élevées en présence de cellules BXPC3 ou MCF7 en comparaison à ceux observées dans un plasma normal ($0,02 \pm 0,01$ ng/ml; p <0,05) ou chez les cellules HUVEC ($0,03 \pm 0,02$ ng/ml; p <0,05). Les taux d'asTF ont été significativement augmentés dans les plasmas mis en incubation avec les cellules BXPC3 par rapport à ceux trouvés dans les plasmas mis en incubation avec les cellules MCF7 (respectivement $0,35 \pm 0,09$ ng/ml contre $0,05 \pm 0,02$ ng/ml, p <0,05). (Tableau 2). Pour chaque concentration de cellules BXPC3 ou MCF7, les taux d'asTF dans les plasmas suivaient les concentrations en FTa.

Impact sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3 ou MCF7 d'un anticorps monoclonal anti-FT.

L'addition d'un anticorps monoclonal anti-FT dans le PPP en présence de cellules BXPC3 ou de cellules MCF7, a prolongé de façon significative le temps de latence et le ttPeak avec une diminution du MRI et du peak de thrombine en comparaison à l'essai sans anticorps anti-FT.

En présence des cellules BXPC3, l'inhibition de la production de thrombine par l'anticorps anti-TF est partielle; en effet cette production est restée plus élevée par rapport à l'essai témoin sans anticorps. L'anticorps anti-FT a également partiellement inversée la génération de thrombine déclenchée par les cellules MCF7 mais ceci de manière moins prononcée (tableau 3). L'anticorps anti-FT n'a pas modifié significativement la génération de thrombine en présence de cellules HUVEC.

Expression de l'activité cancer procoagulant par les cellules MCF7 et BXPC3

Les deux types de cellules BXPC3 et MCF7 ont exprimé une activité cancer procoagulant. Les cellules MCF7 ont exprimé une activité cancer procoagulant significativement plus élevée que les cellules BXPC3 (respectivement, 220 ± 35 mU/mg versus à 60 ± 15 mU/mg; p <0,05). L'addition de l'inhibiteur de cystéine protéase E64 a entraîné une inhibition significative de l'activité FXa, en présence de cellules BXPC3 (91% d'inhibition) ou des cellules MCF7 (84% d'inhibition) (Tableau 4).

Influence de l'activation de la phase contact sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3 ou les cellules MCF7

Dans l'essai témoin (PPP sans cellules), l'addition de CTI a donné lieu à une prolongation du temps de latence de $1,7 \pm 0,9$ fois en comparaison du temps de latence observée en l'absence de CTI. Dans le PPP normal enrichi en CTI et en présence des cellules BXPC3 ou MCF7, le temps de latence a augmenté de $1,8 \pm 1,3$ fois et de $2,6 \pm 1,2$ fois, respectivement pour les BXCP3 et les MCF7 en comparaison de l'essai sans CTI (figure 2). L'augmentation du temps de latence induit par la CTI était significativement moins importante en PPP en présence des cellules HUVEC ($1,6 \pm 1,1$ fois). L'addition concomitante de CTI et d'anti-FT a augmenté le temps de latence de 2,3 fois en présence de cellules BXCP3, de 1,3 fois en présence de MCF7, de 1,2 fois en présence de cellules HUVEC, et de 1,21 fois avec le PPP sans cellules.

Génération de thrombine déclenchée par les cellules MCF7 et BXPC3 en plasmas déficients en facteurs de coagulation.

L'interaction des cellules cancéreuses BXPC3 ou MCF7 avec les facteurs de la coagulation a été étudiée en évaluant la génération de thrombine dans des plasmas déficients en facteurs de coagulation en comparaison de la génération de thrombine dans un pool normal (expérience témoin).

La génération de thrombine en présence de cellules MCF7 ou BXPC3, dans les plasmas déficients en facteurs VII, IX, XII, XI, VIII, a été significativement réduite en comparaison à celle observée dans le PPP normal en présence de cellules. La diminution de la génération de thrombine est différente pour chaque plasma déficient en facteur de coagulation en présence de cellules BXPC3 ou de cellules MCF7, (tableau 5).

Dans le plasma déficient en FVII plasma, le temps de latence a augmenté de 2,7 fois, en présence de cellules BXPC3 et de 1,7 fois en présence de cellules MCF7 en comparaison au PPP normal en présence de cellules (p < 0,001). Le peak de thrombine et le MRI ont diminué respectivement de 79% et 95%, en présence de cellules BXPC3 et de 59% et 45% en présence de cellules MCF7 (p < 0,05).

Dans le plasma déficient en facteur XII, le temps de latence a augmenté de 2,7 fois pour les cellules BXPC3 et de 1,6 fois pour les cellules MCF7 en comparaison au PPP normal en présence de cellules (p < 0,05). Le peak de thrombine et le MRI ont diminué respectivement de 26% et 55%, en présence de cellules BXCP3 et de 55% et 81%, en présence de cellules MCF7 (p < 0,05).

Dans le plasma déficient en facteur XI le temps de latence a augmenté de 2,2 fois pour cellules BXPC3 et de 1,9 fois pour les cellules MCF7 par rapport à l'expérience en PPP normal (p>0,05). Le peak de thrombine et le MRI ont diminué respectivement de 55% et 74%, en présence de cellules BXPC3 et de 70% et 79% en présence de cellules MCF7 (p<0,05).

Dans le plasma déficient en facteur FIX, le temps de latence a augmenté de 1,4 fois pour les cellules BXPC3 et de 2,5 fois pour les cellules MCF7 par rapport à l'expérience de PPP normal (p < 0,05). Le peak de thrombine et le MRI ont diminué respectivement de 78% et 94%, en présence de cellules BXPC3 et de 92% et 96% en présence de cellules MCF7 (p < 0,05).

Dans le plasma déficient en facteur FVIII plasma, le temps de latence n'a pas été modifié pour les cellules BXPC3 ou les cellules MCF7 par rapport à l'expérience de PPP normal. Le

peak de thrombine et le MRI ont diminué respectivement de 73% et 94%, en présence de cellules BXPC3 et de 84% et 96% en présence de cellules MCF7 (p < 0.05).

Dans les plasmas déficients en FX, ou FV et dans le plasma déficient en FII, ni les cellules BXPC3 ni les cellules MCF7 n'induisent une génération de thrombine détectable.

Dans le plasma déficient en protéine C, le peak de thrombine et le MRI ont augmenté de 1,3 fois et 1,6 fois respectivement en présence de cellules BXPC3 et de 1,9 fois et 4,7 fois, en présence de cellules MCF7 (p <0,05). Le lag-time a augmenté de 0,7 fois pour les cellules BXPC3 et de 0,9 fois pour les cellules MCF7 par rapport à l'expérience en PPP normal (p <0,05).

Impact du facteur tissulaire et des phospholipides procoagulants sur la capacité procoagulante des cellules BXPC3, des cellules MCF7 et des cellules HUVEC

Dans l'essai témoin la génération de thrombine varie en fonction de la présence du FT et en fonction des phospholipides procoagulants (PPL), mais également en fonction de la concentration en FT. Les données détaillées sont présentées dans le tableau 6 et la Figure3.

En présence d'une concentration en FT et en phospholipides procoagulants optimal (FT 5pM / PPL 4 μ M) les cellules BXPC3 et les cellules MCF7 présentaient une augmentation du MRI respectivement de 52% et 44%, par rapport à celle obtenue en présence de FT 5pM / PPL 4 μ M et PPP seul (témoin). Dans ces conditions, la génération de thrombine en présence de cellules BXPC3 ou de cellules MCF7 était plus élevée par rapport à la limite supérieure normale (UNL) d'un plasma normal.

En l'absence de FT et de phospholipides procoagulantes ajoutés dans le plasma en présence de cellules BXPC3, MCF7 ou HUVEC, le MRI et le peak de thrombine étaient significativement plus faibles par rapport au FT 5pM / PPL 4 μ M. Les cellules BXPC3, les cellules MCF7 et les cellules HUVEC induisent un MRI significativement plus faible, avec une réduction du MRI respectivement de 75% et 81%, en présence des BXPC3 et des MCF7, et de 90% pour les cellules HUVEC ainsi que pour le contrôle sans cellules (tableau 6).

Dans le plasma en présence de cellules MCF7 ou de cellules BXPC3 sans addition de FT et en présence d'une concentration optimale en phospholipides procoagulants, le MRI a significativement diminué par rapport à l'expérience réalisée en présence de FT 5pM / PPL 4 μ M. Les deux types de cellules BXPC3 et MCF7 induisent une génération de thrombine significativement plus faible par rapport à celle observée en présence de FT 5pM / PPL 4 μ M (Tableau 6). Le MRI a diminué respectivement de 31% et 77%, en présence de BXPC3 et de

MCF7, et de 53% et 68% respectivement pour les cellules HUVEC et le contrôle sans cellules.

Dans le plasma en présence de cellules MCF7 ou de cellules BXPC3 sans addition de phospholipides procoagulants et en présence d'une concentration optimale de FT, le MRI a significativement diminué par rapport à l'expérience réalisée en présence de FT 5pM / PPL 4 μ M. Les deux types de cellules BXPC3 et MCF7 induisent une génération de thrombine significativement plus faible par rapport à celle observée en présence de FT 5pM / PPL 4 μ M (Tableau 6). Le MRI a diminué respectivement de 36% et 73%, en présence de BXPC3 et de MCF7, et de 92% et 81% respectivement pour les cellules HUVEC et pour le contrôle sans cellules.

Dans le plasma en présence de cellules MCF7 ou de cellules BXPC3 en présence d'une concentration sous-optimale de FT et d'une concentration optimale de phospholipides procoagulants, le MRI a significativement diminué par rapport à l'expérience réalisée en présence de FT 5pM / PPL 4 μ M. Le MRI a diminué respectivement de 23% et 35% en présence de BXPC3 et de MCF7, et de 65% et 47% pour les cellules HUVEC et pour le control sans cellules. (Tableau 6).

L'impact du FT et des phospholipides procoagulants sur le MRI dans le plasma en présence de cellules BXPC3 et de cellules MCF7 est représenté dans la figure 3.

Discussion

Les objectifs de cette étude qui a porté sur trois questions liées à l'hypercoagulabilité induite par le cancer étaient: (i) l'identification des principaux facteurs procoagulant exprimées par deux lignés différentes de cellules cancéreuses; (ii) l'évaluation du rôle de la voie du facteur tissulaire et de la voie intrinsèque de la coagulation dans le processus de génération de thrombine initié par les cellules cancéreuses; (iii) l'estimation de la contribution du FT et des phospholipides procoagulants présents dans le microenvironnement plasmatique sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses.

Il est bien établi que les cellules cancéreuses expriment du FT, le principal déclencheur de la coagulation sanguine [28-30]. Nous avons précédemment démontré que les cellules d'adénocarcinomes du pancréas (BXPC3) expriment du FT en quantités significativement plus élevées que les cellules du cancer du sein (MCF7) ou les cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC). Il existe une corrélation entre les taux d'expression

du FT par chaque type de cellules cancéreuses et leurs effets sur la génération de thrombine [21]. Nous montrons ici que l'activité du FT (FTa) exprimé par les cellules BXPC3 était significativement plus élevée que celle exprimée par les cellules MCF7. Le nombre de cellules BXPC3 ou MCF7 est en corrélation avec les taux de FTa à la différence des cellules normales d' HUVEC. Les taux de asTF étaient corrélés aux nombres de cellules BXPC3 ou MCF7. L'isoforme du FT, le FT épissé (asTF) est exprimée par les lignées cellulaires tumorales et les échantillons de tissus provenant de patients atteints de cancer [31]. Depuis sa découverte, l'activité procoagulante de l'asTF fait l'objet de débats [32-34]. L'asTF a été exprimé en quantités abondantes par les cellules BXPC3. Une expression plus faible de l'asTF a été observée pour les cellules MCF7 et les cellules HUVEC. Les taux d'asTF exprimées par les deux types de cellules cancéreuses augmentent parallèlement aux nombres de cellules et sont corrélés à l'activité du FT dans l'environnement cellulaire. Cependant, le modèle expérimental de notre étude par sa conception ne permet pas l'exploration de toute relation potentielle entre l'activité procoagulante des cellules cancéreuses et leur taux d'asTF.

L'effet procoagulant des cellules BXPC3 et des cellules MCF7 sur la génération de thrombine a été partiellement réduit par la présence d'un anticorps monoclonal anti-FT, effet non retrouvé sur les cellules HUVEC. Cette constatation autorise deux hypothèses principales: la première est que la concentration de l'anticorps anti-FT n'était pas assez élevée pour neutraliser complètement l'activité du FT, hypothèse qui peut être écartée par la conception expérimentale de l'étude, en effet une concentration élevée de l'anticorps anti-FT a été utilisée, concentration qui dans des essais préliminaires a complètement inhibé la production de thrombine engendrée par des concentrations élevées en FT (données non représentées). La seconde hypothèse est que la génération de thrombine est dûe à une voie alternative indépendante du FT. L'expression de l'activité du cancer procoagulant (CP) et l'activation de la voie du système intrinsèque de la coagulation ont été étudiées dans cette étude. Les cellules BXPC3 et les cellules MCF7 ont exprimé du CP en activant de façon cystéine dépendant le FX. L'activité cancer procoagulante était environ 4 fois plus élevée pour les cellules MCF7 que pour les cellules BXPC3.

La capacité des cellules cancéreuses à activer la voie intrinsèque de la coagulation a été étudiée en utilisant la CTI, qui inhibe sélectivement le FXIIa [35-36]. L'inhibition du FXIIa a engendré une prolongation significative de la phase d'initiation de la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3 et les cellules MCF7. Cette expérience a prouvé que les deux types de cellules cancéreuses induisent une génération de thrombine via l'activation du FXII à des degrés différents, les cellules MCF7 étant les plus sensibles.

Nous avons également évalué le rôle de chaque facteur de la coagulation sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. Cette série d'expériences a montré que le FVII joue un rôle majeur dans les phases d'initiation et de propagation de la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3. La liaison de FVII au FT est considérée comme la principale voie d'activation du FX dans une coagulation normale [14]. En effet, la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3 en plasma déficient en FVII est effondrée. En revanche, la génération de thrombine déclenchée par les cellules MCF7 en plasma déficient en FVII persiste. Cette constatation conduit à la conclusion selon laquelle les cellules MCF7 ont déclenché la génération de thrombine par l'intermédiaire d'une voie alternative qui contournerait la carence en facteur VII. Les expériences en présence de CTI ont suggéré que les cellules MCF7 pourraient déclencher la génération de thrombine via l'activation du FXII. Les expériences en présence de plasma déficient FXII ont permis de confirmer cette hypothèse, en effet la génération de thrombine en présence des cellules MCF7 et de déficient en FXII a été presque complètement abrogée. Le FXII est activé par la pré-kallicréine et le kininogéne de haut poids moléculaire. Le FVII et la thrombine font également parmi des activateurs du FXII. Dans nos conditions expérimentales, en présence soit de cellules BXPC3 soit de cellules MCF7, les taux de FVII et de FII sont normaux. Par conséquent, on peut supposer que lorsque la coagulation est déclenchée par les cellules MCF7, le défaut de FXII bloque la génération de thrombine par la voie d'activation du FXIa et de la tenase intrinsèque. Pour les BXPC3, cette voie reste secondaire par rapport à la voie du FT. Les expériences en plasma déficient en FXI ont renforcées l'importance de l'activation de la voie intrinsèque pour les cellules MCF7.

La génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3 ou les MCF7 a été abrogée en présence de plasmas déficients en FVIII ou FIX confirmant l'importance majeure de la formation de la ténase intrinsèque dans l'amplification de la phase de propagation de la génération de thrombine en présence de cellules cancéreuses. De plus, cette expérience a montré la faible implication du cancer procoagulante. La génération de thrombine a été supprimée en présence des cellules MCF7 ou des cellules BXPC3 en plasmas déficients en FX, en FV ou en FII. Ainsi, l'implication d'une activité d'une «thrombine-like" ou "prothrombinase-like" par les cellules cancéreuses a été éliminé. Enfin, les expériences en plasma déficient protéine C ont montré que la baisse de la production de thrombine due a la voie de la protéine C était significativement plus importante pour les cellules MCF7, que pour les cellules BXPC3.

La dernière partie de cette étude a démontré que l'activité procoagulante des cellules cancéreuses n'a pas été suffisante pour induire un état d'hypercoagulabilité c.à.d. une génération de thrombine supérieure à la limite supérieure de la normale, telle que définie dans le plasma normal après addition des concentrations physiologiquement pertinentes de FT et de phospholipides procoagulants [37-38]. Afin de poursuive, nous avons étudié si la présence d'éléments procoagulants dans le plasma pourrait amplifier l'efficacité procoagulante des cellules cancéreuses. Dans un plasma enrichi par une concentration optimale de phospholipides procoagulants, la génération de thrombine en présence de cellules BXPC3 (seules) a donné lieu à une presque normalisation de la génération de thrombine. En présence de cellules MCF7 les concentrations optimales en phospholipides procoagulant ont induit une génération de thrombine significativement plus faible par rapport aux niveaux normaux dans ces conditions optimales. Nous avons également examiné l'impact du FT exogène (sans addition exogène de phospholipides procoagulants) sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. Nous avons montré que les phospholipides procoagulants sont essentiels pour l'augmentation de la production de thrombine induite par des cellules cancéreuses, quand bien même si le microenvironnement est riche en FT. Contrairement aux cellules cancéreuses, les cellules normales (HUVEC) n'ont eu aucun effet sur la génération de thrombine. Enfin, nous avons étudié l'impact de l'association du FT et des phospholipides procoagulants sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. Cette expérience a montré que l'hypercoagulabilité induite par les cellules cancéreuses est la résultante de la combinaison des propriétés procoagulantes des cellules cancéreuses avec les éléments procoagulants plasmatique du microenvironnement. Ce qui consiste en: (a) une concentration optimale de phospholipides procoagulants et (b) à une concentration en FT plus élevée que le seuil de 1µM.

Conclusion

L'ensemble des données présentées ici démontrent que les cellules cancéreuses de BXCP3 et de MCF7 déclenchement et renforcent la génération de thrombine à la fois par la voie du FT et par la voie intrinsèque de la coagulation sanguine. La voie du FT est dominante. Cependant, le système intrinsèque ne doit pas être négligé. L'impact du rôle de chacune des deux voies varie en fonction de la nature des cellules cancéreuses. La formation de la tenase intrinsèque et de la prothrombinase sont majeures pour la génération de thrombine
déclenchée par les cellules cancéreuses. A notre connaissance, cette étude pour la première fois a montré que les propriétés coagulantes inhérentes des cellules cancéreuses ne sont pas suffisantes pour induire l'hypercoagulabilité et montre que les éléments procoagulants du microenvironnement, à savoir la FT et les phospholipides, sont des éléments nécessaires pour que le cancer induise un état d'hypercoagulabilité.

References

- Trousseau A. Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris. 1865 Vol 3. 2nd ed. JB Baillière, Paris, France 654–712.
- Falanga A, Russo L, Milesi V. The coagulopathy of cancer. Curr Opin Hematol. 2014; 21: 423-9.
- Khorana AA, Francis CW, Culakova E et al. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. J Thromb Haemost 2007; 5: 632–634.
- Chew HK, Wun T, Harvey D et al. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. Arch Intern Med 2006; 166: 458–464.
- Prandoni P, Falanga A, Piccioli A. Cancer and venous thromboembolism. Lancet Oncol 2005; 6: 401.
- Y. Lee and M. N. Levine. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. Circulation 2003; 107; I17–I21.
- 7. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GY et al. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. Neoplasia 2002; 4: 465-73.
- De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 50: 187-96.
- Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. Semin Thromb Hemost. 2006; 32 Suppl 1:32-8.
- Amin C, Mackman N, Key NS. Microparticles and cancer. Pathophysiol Haemost Thromb 2008; 36: 177-83.
- Davila M, Amirkhosravi A, Coll E et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. J Thromb Haemost 2008; 6: 1517-24.

- 12. Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. Curr Opin Hematol 2000; 7: 273-7.
- 13. Butenas S, Orfeo T, Mann KG. Tissue factor activity and function in blood coagulation. Thromb Res 2008; 122 (Suppl 1): S42-6
- Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. Anesth Analg 2009; 108: 1447-52.
- 15. Mutch NJ. Emerging roles for factor XII in vivo. J Thromb Haemost 2011;9:1355-8.
- 16. Müller F, Renné T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. Curr Opin Hematol 2008; 15: 516-21.
- Thomassen MC, Heinzmann AC, Herfs L et al. Tissue factor-independent inhibition of thrombin generation by tissue factor pathway inhibitor-α. J Thromb Haemost 2015; 13: 92-100.
- Nickel KF, Ronquist G, Langer F et al. The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. Blood. 2015. pii: blood-2015-01-622811
- 19. Gordon S, Mielicki WP. Cancer procoagulant: a factor X activator, tumor marker and growth factor from malignant tissue. Blood Coagul Fibrinolysis 1997; 8: 73-86.
- 20. Donati MB, Gambacorti-Passerini C, Casali et al. Cancer procoagulant in human tumor cells: evidence from melanoma patients. Cancer Res 1986; 46: 6471-4.
- 21. Gerotziafas GT, Galea V, Mbemba E et al. Tissue factor over-expression by human pancreatic cancer cells BXPC3 is related to higher prothrombotic potential as compared to breast cancer cells MCF7. Thromb Res 2012; 129: 779-86.
- 22. Marchetti M, Diani E, ten Cate H et al. Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography. Haematologica 2012; 97: 1173-80.
- 23. Van Dreden P, Rousseau A, Savoure A et al. Plasma thrombomodulin activity, tissue factor activity and high levels of circulating procoagulant phospholipid as prognostic factors for acute myocardial infarction. Blood Coagul Fibrinolysis 2009; 220: 635-641.
- 24. Rousseau A, Favier R, Van Dreden P. Elevated circulating soluble thrombomodulin activity, tissue factor activity and circulating procoagulant phospholipids: new and useful markers for pre-eclampsia? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2009; 146: 46-9.

- 25. Schneider P, Van Dreden P, Rousseau A et al. Increased levels of tissue factor activity and procoagulant phospholipids during treatment of children with acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 2010; 148: 582-92.
- 26. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. Pathophysiol Haemost Thromb. 2002; 32: 249-53.
- 27. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Le Flem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. Thromb J. 2005; 3:16.
- 28. Tilley RE, Holscher T, Nieva J et al. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. Thromb Res 2008; 122: 604-9.
- 29. Key NS, Chantrahammachart P, Moody PW. Membrane microparticles in VTE and cancer. Thrombosis Research 2010;Supp 2: S80-S83.
- 30. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D et al. Tumor-derived tissue factor bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res 2009; 15: 6830-40.
- 31. Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C et al. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. J Thromb Haemost 2006; 4: 158–167.
- 32. Böing AN, Hau CM, Sturk A et al. Human alternatively spliced tissue factor is not secreted and does not trigger coagulation. J Thromb Haemost 2009; 7: 1423–1426.
- 33. Szotowski B, Antoniak S, Rauch U. Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. Trends Cardiovasc Med 2006; 16: 177– 182
- 34. Censarek P, Bobbe A, Grandoch M et al. Alternatively spliced human tissue factor (asTF) is not pro-coagulant. Thromb Haemost 2007; 97: 11–14.
- 35. Spronk HM, Dielis AW, Panova-Noeva M, van Oerle R, Govers-Riemslag JW, Hamulyák K, Falanga A, Cate HT. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? Thromb Haemost. 2009 Jun; 101(6):1156-62.
- 36. van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC et al. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombingeneration measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. Blood Coagul Fibrinolysis 2008; 19: 183-9.

- 37. Parhami-SerenB, Butenas S, Krudysz-Amblo J, Mann K. Immunologic quantification of tissue factors. J Thromb Haemost 2006; 4:1747-55.
- 38. Bentrop E, Salvagno GL. Standardisation and clinical utility of thrombin generation assays. Semin Thromb Haemost 2008; 34: 670-82.



Cadre B

Cadre A

Figure 1: Représentation des thrombinogrammes illustrant l'effet de cellules BXPC3, des cellules MCF7 et des cellules HUVEC (50 cellules /µl) sur la génération de thrombine d'un PPP normal (cadre A) ou d'un PRP (Cadre B) par rapport à l'essai témoin (sans cellules).



Figure 2: Variation du temps de latence après l'addition de la CTI seul et après l'addition d'un anticorps anti-TF (4509) en combinaison avec la CTI dans le plasma en présence de cellules BXCP3, MCF7 ou de cellules HUVEC. Les résultats représentent la moyenne \pm écart type de 3 expériences. (Réactif MP = PPL: 4 uM).



Figure 3: Altérations du MRI, en présence de cellules BXPC3, de cellules MCF7 et des cellules HUVEC à diverses concentrations en TF et PPL. Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type de 8 expériences. * P <0,001 par rapport au témoin en PPP et réactif TF 5pM / PPL 4 μ M) PPL: phospholipides procoagulants

	lag-time (min)	tt-Peak (min)	Peak	MRI
			(nM)	(nM/min)
MCF7	6.1±0.9	9.6±1.1	121±22	34±6
MDAMB231	8.9±0.6	14.5±0.8	76±8	14±3
HT29	5.36±1.3	11.8±1.9	81±11	13±4
HCT116	4.48±0.3	9.9±0.5	91±12	17±3
IGROV1	2.5±1.4	7.1±2.4	95±10	22±7
BT20	2.3±0.4	6.0±1.1	129±6	35±8
BXPC3	4.1±1.1	6.9±1.3	199±13	71±7
control	9.6±1.2	16.3±1.5	118±9	17±4

Valeurs etant la moyenne \pm SD de 5 experiences.

*p<0.05 versus HUVEC

^{\$}p<0.05 versus PPP sans cellules

[£]p<0.05versus MCF7

			50 000 cells/µ	ıl	200 000 cells/µl			
	PPP without cell	HUVEC	BXPC3	MCF7	HUVEC	BXPC3	MCF7	
TF (pM)	0.20±0.05	0.23±0.02	1.42±0.1* ^{\$£}	$0.82 \pm 0.08 *$	0.26 ± 0.02	$2.65 \pm 0.05^{\text{s}}$	1.21±0.05* ^{\$}	
asTF (ng/ml)	0.02±0.01	0.03±0.02	0.35±0.09* ^{\$£}	0.05±0.02 ^{\$}	0.04±0.01	$0.65 \pm 0.02^{*}$	0.12±0.01* ^{\$}	

Tableau 3: Impact d'anticorps anti-FT (4509) et anti-Human CD142 sur la génération de thrombine on thrombin déclanchée en PPP normal (contrôle) et par les cellules de BXPC3, MCF7, ou d'HUVEC, en présence de MP-Reagent®.

Les valeurs sont la moyenne \pm SD de 5 experiences

***p<0.001,**p<0.01,*p<0.05 comparaison de la generation de thrombine en presence ou absence d'anticorps anti-FT

Thrombogram		С	ontrol				BXPC3				MCF7			Н	UVEC	
parameters	PPP	isotype	anti-FT	anti-human	PPP	isotype	anti-FT	anti-human	PPP	isotype	anti-FT	anti-human	PPP	Isotype	anti-FT	anti-human
		IgG		CD142		IgG		CD142		IgG		CD142		IgG		CD142
Lagtime (min)	8.8±0.7	9.9±0.7	10.8±1.2	11.7±0.9	4.1±0.7	4.2±0.1	6.9±0.3***	9.6±1.1***	5.5±0.3	5.5±0.2	6.6±0.3***	7.9±0.4***	7.2±0.8	7.4±0.7	8.1±0.6	8.7±0.6
tt Peak (min)	14.6±0.6	15.8±1.1	19.2±5.1	20.1±4.1	5.9±1.1	6.1±0.2	10.8±0.2***	16.2±1.6***	8.2±0.2	8.8±0.4	10.2±1.2**	12.5±2.3***	10.8±0.9	10.1±1.2	12.1±1.0	13.3±1.1
Peak (nM)	136±14	119±12	118±11	115.3±10	358±11	348±10	169±12***	95.6±11***	192±11	188±12	151±8*	126±10**	171±11	169±12	168±10	160±12
MRI (nM/min)	24±11	20±13	14±8	13±6	198±12	183±9	44±8***	15±7***	66±8	57±7	42±2**	26±8**	49±9	48±8	43±9	35±8

Tableau 4: Comparison de l'expression du cancer pro-coagulant (CP) par les cellules MCF7 et BXPC3.

	CP (mU/mg)	Inhibition by E64 (%)
MCF7	220 ± 35	84%
BXPC3	60 ± 15	91%

Tableau 5: Paramétres de la géneration de thrombine déclenchée par le MP reagent en presence de cellules BXCP3 ou MCF7 en PPP normal et en plasmas selectivements déficients en facteur de la coagulation.

Les valeurs sont la moyenne \pm SD de 4 experiences

* p< 0.05 **
p<0.001 en comparaison à un PPP normal

	lag-time (min)		tt-Peak (min)		Peak (nM)		MRI (nM/min)	
	BXPC3	MCF7	BXPC3	MCF7	BXPC3	MCF7	BXPC3	MCF7
normal PPP	4.0 ± 0.6	5.2 ± 0.1	5.9 ± 1.2	8.1 ± 1.3	320 ± 12.6	194 ± 10	188 ± 7	67 ± 2
FVII deficiency	11.2± 0.9**	9.1±0.2**	$20.1 \pm 0.9 **$	$11.2\pm1.2*$	$66 \pm 11^{**}$	79±9 **	$9 \pm 2^{**}$	$37 \pm 3^{**}$
FIX deficiency	$5.9\pm0.8*$	$13\pm0.8^{**}$	$12.2\pm2.0*$	$12.1\pm1.3^*$	$70 \pm 12^{**}$	$15 \pm 2^{**}$	$12 \pm 3^{**}$	$2.3 \pm 4^{**}$
FXII deficiency	$11.2\pm0.2^{**}$	8.3±1.5*	$14.3\pm0.8*$	$16.3\pm1.4^{**}$	192± 8**	88± 7**	$64 \pm 8^{**}$	$13 \pm 2^{**}$
FXI deficiency	$9.3 \pm 1.2^{\ast\ast}$	$10.3\pm1.2^{**}$	$12.5\pm2.4*$	$14.8 \pm 1.6^{\ast\ast}$	$145\pm10^{**}$	$58\pm6^{\ast\ast}$	$48 \pm 3^*$	$14 \pm 5^{**}$
FVIII deficiency	4.8 ± 1.2	5.1 ± 0.9	$13.1\pm1.2^*$	$17.2\pm2.1^{\ast\ast}$	$86\pm7^{\ast\ast}$	$30 \pm 3^{**}$	$11 \pm 6^*$	2.8 ± 3**
PC deficiency	$3.1{\pm}0.9$	4.9 ± 1.1	$4.4\pm0.8^{\ast}$	6.2 ± 1.2	$410\pm14^{**}$	$380\pm12^{**}$	$310\pm15^{**}$	$314 \pm 14^{\ast\ast}$

Tableau 6: Génération de thrombine en présence de cellules de BXCP3, MCF7 et HUVEC declanchée dans différentes conditions.

Les valeurs sont la moyenne \pm SD de 8 experiences

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p< 0.001 versus contrôle en PPP reagent (TF 5pM/PPL 4 μ M)

PPL: procoagulants phospholipides

		TF 5pM/PPL	4 μΜ			TF 1 pM/	PPL 4 µM			TF 5 pN	∕l∕ no PPL	
	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP without	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP without cells
				without				cells				
				cells								
Lagtime (min)	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.4	2.9 ± 0.7	4.5 ± 0.7***	2.6 ± 0.8	2.8 ± 1.1	$3.9\pm0.8*$	$6.1\pm0.1^{**}$	$3.7\pm0.8^{***}$	$4.7 \pm 0.6^{***}$	$5.8\pm1.0^{\ast\ast\ast}$
ttPeak (min)	4.7 ± 0.5	3.6 ± 0.6	4.0 ± 0.4	4.9 ± 0.6	8. 5±0.8***	4.4 ± 0.9	$4.7\pm0.5^{\ast\ast}$	$6.5\pm1.5^*$	$14.7 \pm 1.1^{***}$	$4.9 \pm 1.1 *$	$7.2 \pm 1.3^{***}$	$10.3 \pm 1.1^{***}$
Peak (nM)	297 ± 10	435 ± 11	411 ± 13	380 ± 14	170 ± 11***	399 ± 11***	$334 \pm 11^{***}$	$260\pm12^{***}$	$76 \pm 13^{**}$	$220\pm11^{***}$	$180\pm10^{***}$	$160 \pm 13^{***}$
MRI (nM/min)	123 ± 12	290 ± 12	274 ± 18	190 ± 11	42 ± 12***	221 ± 13***	$177\pm13^{***}$	$99\pm6^{***}$	$9\pm2^{***}$	183 ± 12***	$72\pm5^{\ast\ast\ast}$	$35 \pm 4^{***}$
	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP witho	ut HUVEC	C BXPO	C3 MCF7	PPP without				
	HUVEC	BXPC3	MCF7	PPP witho	ut HUVEC	C BXPC	C3 MCF7	PPP without				
				cells	** 0 < 1 1	which d d		cells	_			
Lagtime (min)	$7.2 \pm 0.8^{***}$	$4.0 \pm 0.7^{+++}$	5.2 ±	8.8 ± 1.5	8.6 ± 1.1*	*** 4.1 :	± 6.1 ±	9.6 ± 1.2^{-11}				
			0.9		***	1.1**	0.9	*				
ttPeak (min)	$10.2 \pm 1.2^{***}$	$5.8 \pm 1.1^{*}$	8.2 ±	$14.6 \pm 1.3^{\circ}$	$15.2 \pm 1.4^{\circ}$	*** 6.9 :	± 9.6 ±1.1**	16.3 ± 1.5				
			1.0***			1.3**	**					
Peak (nM)	171 ± 13***	$360 \pm 11^{***}$	190 ±	$136 \pm 11^{**}$	** 86 ± 11**	** 199	± 121 ±	$118 \pm 9^{***}$				
			12***			14**	* 10***					
MRI (nM/min)	$57\pm11^{***}$	$200\pm14^{***}$	$63\pm6^{***}$	$24\pm9^{***}$	13 ± 4**	** 71 ± 7	$34 \pm 6^{***}$	$17 \pm 4^{***}$				

VII.3 Approche du rôle du microenvironnement sur le pouvoir procoagulant des cellules cancereuses.

VII.3.1 Marquage des cellules cancéreuses par cytométrie en flux

Marquage à l'annexine V

Le marquage des cellules cancéreuses à l'annexine V ne nous a pas permis de détecter des phospholipides à la surface des cellules que ce soit pour les BXPC3 ou les MCF7, de même nous n'avons pas pu mettre en évidence les phospholipides sur les cellules témoin HUVEC. L'étude par un test fonctionnel (STA Procoag PPL) n'a pas permis de détecter des phospholipides sur ces trois types de cellules.

> Marquage par un anti facteur tissulaire

Le marquage des cellules par un anti-TF par cytométrie en flux nous a permis de mettre en évidence la présence de FT sur la membrane des cellules cancéreuses. L'intensité fluorogénique est significativement plus forte sur les cellules BXPC3 que sur les cellules MCF7 (MIF= mean index of fluorescence). La même expérience sur des cellules témoin HUVEC n'a permis que de détecter des traces de FT. La proportion de cellules portant le FT est légèrement supérieure chez les BXPC3 que les MCF7 (n=3).

Céllules	Isotype IgG (MIF)	Anti –FT IgG (MIF)	% des cellules marquées
BXPC3	1.5 ±0.4	395±132	95±13
MCF7	1.2 ±0.6	95±20	78±10
HUVEC	1.0 ± 0.5	5±10	10±2



Figure 1 : Profils du marquage des cellules par un anti-TF pour les cellules BXPC3, MCF7 en cytometrie de flux

VII.3.2 Marquage des microparticules par cytométrie en flux

Marquage à l'annexine V

La cytométrie de flux par marquage à l'annexine V a permis de mettre en évidence la présence de phospholipides à la surface des microparticules de BXPC3 et de MCF7.

La MIF reste cependant faible et est proche pour les BXPC3 et les MCF7. Nous n'avons pas détecté de phospholipide à la surface des microparticules de cellules témoin HUVEC par la même méthode. Le pourcentage de microparticules porteuses de phosphatidylsérine étant le même pour les BXPC3 et les MCF7 (n=3).

origine des microparticules	Isotype IgG (MIF)	Anti –FT IgG (MIF)	% des MP marquées
BXPC3	1.9 ±0.5	30±4	56±3
MCF7	1.1 ±0.3	49 ±6	57±5
HUVEC	/	/	/

> Marquage par un anti facteur tissulaire

La cytométrie de flux par marquage par un anti-FT a permis de mettre en évidence la présence de facteur tissulaire à la surface des microparticules de BXPC3 et de MCF7.

La moyenne des index de fluorescence (MIF) est supérieure pour les BXPC3 par rapport au MCF7, cependant pas de façon significative. Seul des traces de facteur tissulaire sont mise en évidence à la surface des microparticules de cellules témoin HUVEC. La proportion de cellules porteuses est identique pour les MCF7 et les BXPC3 (n=3).

origine des microparticules	Isotype IgG (MIF)	Anti –FT IgG (MIF)	% des MP marquées
BXPC3	2.6 ± 0.8	491±24	78±6
MCF7	3.1 ±0.9	378 ± 25	84±9
HUVEC	3.9 ±0.7	8 ±2	11±4

VII.3.3 Impact des microparticules sur la génération de thrombine, effet sur le pouvoir procoagulant

Effet de la coculture des cellules en presence des MPs sur la génération de thrombine

La génération de thrombine par les cellules cancéreuses en présence des MPs provenant du même type de cellule en PPP normal a donné lieu à une augmentation significative du peak et du MRI, ainsi qu'une réduction du temps de latence et du ttPeak par rapport au témoin (PPP normal sans microparticule) (Tableau 1). Une variabilité importante de l'effet des MPs des différents types de cellules cancéreuses sur la génération de thrombine, en plasma humain normal a été observée. À un nombre égal de cellules, les MPs de MCF7 ont une activité procoagulante moins forte que les MPs de BXPC3. Dans les mêmes conditions les paramètres du thrombogramme en présence d'HUVEC ne présentent pas de différences significatives par rapport aux expériences témoins sans cellules ou en présence de MPs.

Tableau 1 : Impact de la présence des MPs sur la génération de thrombine en présence de cellules en PPP(n=5)

			()						
Parametres du	Génératio	Génération de thrombine des cellules + MPs déclenchée par du MP reagent sur PPP							
thrombogramme	Pool	HUVEC	BXPC3	MCF7	HUVEC +MPs	BXPC3 +MPs	MCF7 +MPs		
Lag-time (min)	8.9±1.6	7.7±0.9	4.8±0.6	7.5±0.7	7.9±0.9	1.2±0.5***	5.1±0.7***		
tt-Peak (min)	14.6±1.3	12.1±0.9	5.7±0.8	9.3±1.0	11.7±0.9	2.6±0.6***	6.9±1.1**		
Peak (nM)	136±11	150±11	220±12	179±11	166±10*	410±12***	220±10***		
MRI (nM/min)	24±9	35±10	244±13	99±12	45±10	294±11***	120±12*		

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 cellules sans MPs versus cellules +MPs

> Effet des MPs sur la generation de thrombine d'un plasma normal

L'addition de MPs de BXPC3 ou de MCF7 à un plasma normal (PPP) engendre une augmentation significative du peak de génération de thrombine et du MRI, ainsi qu'une réduction du temps de latence et du ttPeak par rapport au témoin (PPP normal sans MPs), et ceci en l'absence de cellule (Tableau 2). Cet effet est plus prononcé pour les BXPC3 que les MCF7.

Tableau 2 : Impact de la présence des MPs sur	la génération de thrombine d	'un PPP sans cellule (n=5)
---	------------------------------	----------------------------

Parametres du	Generation de thrombine sur PPP en présence de MPs déclanchée par duMP reagent							
thrombogramme	Pool	Pool +MPs(BXPC3)	Pool +MPs(MCF7)					
Lag-time (min)	8.9±1.6	2.2±0.6***	6.1±0.4**					
tt-Peak (min)	14.6±1.3	3.3±0.4***	8.2±0.8***					
Peak (nM)	136±11	380±14***	210±11***					
MRI (nM/min)	24±9	247±14***	100±13***					

***p<0.001 Pool + MPs versus Pool seul.

> Détermination de l'expression du FTa par les microparticules

Les taux d'expression du FTa par les microparticules étaient nettement supérieurs aux résultats obtenus sur les cellules cancéreuses elles-mêmes. Les taux de FTa retrouvés pour les microparticules de BXPC3 et de MCF7 etaient respectivement de 43pM et 4.6pM. En ce qui concerne les HUVEC ce taux était de 0.34pM.

Génération de thrombine en plasmas déficients en facteurs de coagulation après addition de MPs de cellules cancéreuses MCF7 ou BXPC3, et de MPs d'HUVEC

L'interaction des MPs de BXPC3, MCF7 ou d'HUVEC avec les facteurs de la coagulation a été étudiée en évaluant la génération de thrombine dans des plasmas déficients en facteurs de coagulation en comparaison à la génération de thrombine dans un pool normal (expérience témoin).

La génération de thrombine en présence de MPs de MCF7, BXPC3, ou d'HUVEC dans les plasmas déficients en facteurs VII, XII a été significativement réduite en comparaison à celle observée dans le PPP normal en présence de MPs. La diminution de la génération de thrombine est différente dans chaque plasma déficient en facteur de coagulation en fonction de l'origine des MPs. (Tableau 3).

Dans le plasma déficient en FVII, le temps de latence a augmenté de 6,4 fois, en présence des MPs de cellules BXPC3, de 2,2 fois en présence des MPs de cellules MCF7 et de 1.3 fois pour les MPs de HUVEC en comparaison au PPP normal en présence des MPs (p <0,001). Le peak de thrombine a diminué respectivement de 90%, 66%, et 19% en présence des MPs deBXPC3, MCF7 et HUVEC. Le MRI a diminué respectivement de 96%, 75%, et 88% en présence des MPs de BXPC3, MCF7 et HUVEC.

Dans le plasma déficient en facteur XII, le temps de latence a augmenté de 1.6 fois pour les MPs de BXPC3, de 1,3 fois pour les MPs de MCF7 et de 1,4 pour les MPs de HUVEC en comparaison au PPP normal en présence de MPs. Le peak de thrombine a diminué respectivement de 12%, 40%, et 63% en présence des MPs de BXPC3, MCF7 et HUVEC. Le MRI à a diminué respectivement de 16%, 41%, et 2% en présence des MPs de BXPC3, MCF7 et HUVEC.

Tableau 3: Génération de thrombine déclanchée par le MP reagent en presence de MPs de BXPC3, ouMCF7 ou HUVEC en PPP normal et en plasmas selectivements deficients en facteur de la coagulation (n=5)

	Génération de thrombine d'un pool + MPs en plasmas deficients declenchée par du MP reagent											
	Lag-time (min)			tt-Peak (min)			Peak (nM)			MRI (nM/ml)		
	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7
Pool	11.1±0.9	2.2±0.6	6.1±0.4	17.1±0.9	3.3±0.4	8.2±0.8	146±11	380±14	210±11	35±10	247±11	100±13
FVII deficiency	15.1±1.2**	14.2±0.9**	13.1±0.7**	26.1±0**.	19.1±0.5**	16.3±1.2**	28±12**	39±12**	70±12**	4±2**	10±6**	25±9**
FXII deficiencv	16.3±1.2**	3.6±0.8*	8.2±1.1*	18.9±2.3	5.2±0.9*	11.3±1.2*	92±12**	333±13	125±15**	34±4	208±15*	41±8**

*p<0.05, **p<0.001 Pool normal + MPs versus Plasma déficients + MPs

L'impact sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules MPs de BXPC3, MCF7 ou HUVECen présence d'un anticorps monoclonal anti-FT.

L'addition d'un anticorps monoclonal anti-FT dans le PPP en présence de MPs de BXPC3, de MPs de MCF7, ou de MPs de HUVEC a prolongé de façon significative le temps de latence et le ttPeak avec une diminution du MRI et du peak de thrombine en comparaison de l'essai sans anticorps anti-FT. En présence des MPs de BXPC3, l'inhibition de la production de thrombine par l'anticorps anti-TF est de 74% par rapport à l'expérience témoin sans anticorps. L'anticorps anti-FT a également partiellement inversée la génération de thrombine déclenchée par les cellules MCF7 mais ceci de manière moins prononcée 42%, et que de 10% pour les HUVEC (Tableau 4).

Tableau 4: Effet d'un anticorps anti-TF sur la génération de thrombine en presence de MPs de BXPC3,MCF7 et HUVEC (n=3)

	Génération de thrombine en presence anti-TF déclanchée par du MP reagent											
	Lag-time (min)			tt-Peak(min)			Peak (nM)			MRI (nM/ml)		
	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7	MPs de HUVEC	MPs de BXPC3	MPs de MCF7
Pool	11.1±0.9	2.2±0.6	6.1±0.4	17.1±0.9	3.3±0.4	8.2±0.8	146±11	380±14	210±11	35±10	247±11	100±13
Pool + TF9- 10H10	14.2±1.3	9.2±1.0	8.7±0.7	20.3±0.9	12.3±0.9	13.6±1.8	132±12	98±10	121±12	22±8	31±9	26±7

(TF9-10H10: anti-human-TF antibody)

VII.4 Liste des présentations et des posters sur ce travail par notre groupe

- Markers of Hypercoagulability in Breast Cancer: What Is Their Clinical Relevance? (ASH 2012)
- Distinct Roles of Antithrombin-Dependent Antithrombotic Agents (Lovenox, Fondaparinux) and Direct Anti-Xa Anti-Coagulant (Apixaban) On the Inhibition of Thrombin Generation Induced By Human Pancreatic (BXPC3) and Human Breast (MCF7) Cells (ASH 2013)
- The influence of breast cancer stage, time from diagnosis and chemotherapy on plasma and cellular biomarkers of hypercoagulability (ASH 2014)
- Differential Influence of Lung Cancer Stage, Time from Diagnosis and Chemotherapy on Plasma and Cellular Biomarkers of Hypercoagulability. The Roadmap Study (ASH 2014)
- Use of Thrombin Generation Assay as Tool for the Evaluation of the Antithrombotic Samenesse of Enoxaparine (ASH 2014)
- Inhibition of thrombin generation by antithrombin-dependent antithrombotic agents (Lovenox, Fondaparinux) and direct anti-Xa anti-coagulant (Apixaban) on human pancreatic (BXPC3) and human breast cancer cells (MCF7). (7th ICTHIC. Bergamo, 2014)
- In vitro characterization of the antithrombotic fingerprint of the branded and copies of the LMWH enoxaparin (CiTH 2014)
- Modélisation de l'interaction entre les cellules cancéreuses BXPC3 et MCF7 et les mécanismes de la coagulation, rôle du facteur tissulaire et du facteur tissulaire alternativement epissé sur l'hypercoagulabilité exprimée par ces cellules.(GEHT Rouen 2014)
- Comparaison de l'efficacité antithrombotique des agents anti-Xa (fondaparinux, apixaban) et d'une HBPM (lovenox) sur la génération de thrombine en présence de cellules d'adénocarcinome humain (BXCP3) et de cellules du cancer du sein (MCF7) (GEHT Rouen 2014)

- Acquision of Resistance to Doxorubicin by Breast Cancer Cells MCF7 Enhances Their Procoagulant Properties and Alters the Efficacy of Antithrombotic Agents to Inhibit Thrombin Generation (ASH 2015)
- Newly Diagnosed Multiple Myeloma Is Associated with Enhanced TF Pathway Activation, Thrombin Generation and Increased Concentration of Procoagulant Microparticles (ASH 2015)
- Cancer cells BXPC3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin (ISTH 2015)
- Modelisation of the procoagulant properties of adenocarcinoma pancreatic cells (BXPC3) and breast cancer cells (MCF7) and analysis of their specific interactions with the coagulation system (ISTH 2015)
- Modelisation of cancer related risk of VTE and cancer specific RAM (VAS Meeting-Como 2015)
- Prospective evaluation of risk assessment models and biological markers of hypercoagulability for the identification of high vte risk patients with lung adenocarcinoma. The roadmap study. (ISTH 2015)
- Developpment of a new Risk Assessment Model for VTE specific for ambulatory patients with lung adenocarcinoma on chemotherapy. The ROADMAP study. (SCC *ISTH Montpellier 2016*)
- Biomarkers of hypercoagulability and clinical variable related with VTE risk in ambulatory patients with lung adenocarcinoma on chemotherapy. The ROADMAP study. (SCC *ISTH Montpellier 2016*)
- Contribution of modelling of procoagulant properties of cancer cells in the understanding of their mechanisms of action and the effectiveness of anticoagulant agents (SCC *ISTH Montpellier 2016*)
- Evaluation in ambulatory patients with lung adenocarcinoma on chemotherapy. The ROADMAP study (ASCO 2016)
- Prospective evaluation of risk assessment models and biological markers of hypercoagulability for the identification of high VTE risk patients with lung adenocarcinoma. The ROADMAP study (8th ICTHIC. Bergamo, 2016)
- Modelisation of the procoagulant properties of cancer cells and their capacity to alter the antithrombotic efficiency of LMWHs and specific inhibitors of factor Xa (8th ICTHIC. Bergamo, 2016)

- Doxorubicin-induced MDR1/P-GP in MCF-7 breast cancer cells was associated with tissue factor overexpression and thrombin generation (BICT Istambul 2016)
- Selection of biological markers of hypercoagulability for the identification of high vte risk patients with lung adenocarcinoma. The roadmap study. (BICT Istambul 2016)
- A new risk assessment model for VTE in ambulatory patients with lung adenocarcinoma on chemotherapy. (BICT Istambul 2016)
- Branded and copies of the low molecular weight enoxaparin. Are they same? (BICT Istambul 2016)
- Impact of breast cancer stage, time from diagnosis and chemotherapy on plasma and cellular biomarkers of hypercoagulability. (BMC Cancer. 2014)
- Characterization of the Antithrombotic Fingerprint of the Branded and Copies of the Low-Molecular-Weight Enoxaparin Using Thrombin Generation Assay. (Clin Appl Thromb Hemost. 2015)
- Cancer cells BXPC3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin. (Thrombosis Research. 2015)

Discussion générale

Le lien entre le cancer et la thrombose est connu depuis le 19^{ème} siècle. De nombreux aspects de l'interaction entre le cancer et la coagulation sanguine ont été élucidés par des études expérimentales, cliniques et épidémiologiques. Chez les patients atteints de cancer le risque de maladie thromboembolique veineuse est environ 7 fois plus élevé par rapport aux patients non cancéreux. Cette hypercoagulabilité sanguine est une altération systémique fréquente chez les patients atteints de cancer [1-3]. Il est bien établi que le risque de maladie thromboembolique veineuse chez les patients atteints de cancers varie selon le type histologique du cancer [4]. Les cellules cancéreuses sont directement impliquées dans la pathogenèse de la thrombose par le déclenchement et l'augmentation de la génération de thrombine [5]. En effet, la cellule cancéreuse en relation avec les éléments sanguins est considérée comme le déclencheur de réactions cellulaires et plasmatiques qui aboutissent à l'activation plaquettaire, à la génération de thrombine et à la formation de fibrine. Certains auteurs, ont même suggéré que ce processus protègerait les cellules cancéreuses de l'offensive du système immun et faciliterait leur dissémination métastatique. Le dialogue entre la cellule cancéreuse, les plaquettes et les autres éléments cellulaires au niveau sanguin et vasculaire (i.e. les cellules endothéliales et monocytes) aboutit à la formation des microparticules qui possèdent des propriétés procoagulantes, prométastatiques et proangiogéniques.

Face à ce risque, une anticoagulation efficace et sûre pour la prévention et le traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse est la base essentielle pour la gestion des patients atteints de cancer, visant ainsi à réduire la morbidité, à l'amélioration de la qualité de vie et à contribuer à la diminution de la mortalité. Les héparines de bas poids moléculaire et le pentasaccharide synthétique le fondaparinux sont les agents antithrombotiques recommandés dans la prévention de la maladie thromboembolique veineuse chez les patients atteints de cancer [6-7]. Cependant, la fréquence de l'échec thérapeutique du traitement antithrombotique est significativement plus élevée chez les patients atteints de cancer par rapport aux autres [8]. A titre d'exemple chez les patients atteints de cancer, la fréquence de la MTEV récidivante monte à 9% - 17% pendant la période de l'administration du traitement anticoagulant recommande. En revanche le risque la recidive de la MTEV pendant la période du traitement par HBPM présente plusieurs limites, il affecte négativement la qualité de vie, tels que la nécessité quotidienne d'injections sous-cutanées de la peau et des hématomes ainsi que la surveillance fréquente de la numération plaquettaire en raison du risque de thrombopénie

induite par l'héparine. Les inquiétudes sur la gestion du traitement par HBPM, en particulier chez les patients cancéreux, est imputable à la complexité de leur mécanisme d'action et l'hétérogénéité de leur structure et de la liaison non spécifique aux protéines plasmatiques [9]. Choisir l'agent antithrombotique approprié prévoyant une anticoagulation stable non compromise par des risques de saignement ou autres réactions indésirables est important dans cette population à haut risque. Les AOD devraient permettre l'amélioration de la qualité du traitement antithrombotique [10]. Parmi les AOD tel que l'apixaban (un inhibiteur du FXa sélectif, direct, actif par voie oral) a été évalué dans un essai clinique de phase II dans la prophylaxie de la TEV chez les patients avec un cancer métastatique [11]. L'analyse du sous-groupe de patients cancéreux inclus dans les essais cliniques de phase III qui ont évalué l'efficacité et la sécurité des AOD dans la prophylaxie et le traitement de la TEV a souligné que les AOD pourraient offrir une alternative de traitement chez les patients atteints de cancer [12]. Ces données cliniques révèlent la nécessité d'une amélioration du traitement antithombotique chez les patients atteints de cancer.

L'identification des mécanismes d'hypercoagulabilité qui sont en relation avec la masse tumorale est un véritable challenge compte tenu de la complexité des interactions cellulaires et plasmatiques qui conduisent à la thrombogénèse déclenchée par la cellule cancéreuse. Ces interactions complexes et dynamiques pourrait influencer l'efficience des agents antithrombotiques : héparines de bas poids moléculaire et inhibiteurs spécifiques du facteur X activé , dans la modulation de l'hypercoagulabilité liée au cancer, en effet les HBPM sont des agents antithrombotiques extrêmement hétérogènes tant au niveau structurel qu'au niveau fonctionnelles, les inhibiteurs spécifiques du FXa sont également hétérogènes compte tenu de leur mécanisme d'action mais également de leur effet distinct sur l'activité du FXa lié à la prothrombinase.

Le développement de modèles animaux de cancers est indispensable pour la réalisation d'essais thérapeutiques pré-cliniques. On est obligé d'intégrer pour les études thérapeutiques le fait que ces cellules se développent dans un organisme; elles interagissent fortement avec cet organisme, elles se modifient, s'adaptent, se diffusent....Au niveau fondamental, ces modèles ont apporté d'importantes connaissances sur les relations entre les cellules tumorales et les tissus normaux, notamment le système immunitaire. Enfin, ces modèles ont permis de comprendre, particulièrement en chimiothérapie, la résistance au traitement des cellules tumorales.

L'utilisation de modèles animaux chez lesquels une tumeur a eté greffée a également contribué à la compréhension de la deuxième cause de mortalité dans le cancer: la survenue

d'une maladie thromboembolique veineuse. Les mécanismes par lesquels ces thromboses veineuses surviennent mais également récidivent sous traitement anticoagulant sont des éléments importants à comprendre d'un point de vue physiopathologique, afin de pouvoir développer des outils de prédiction du risque thrombotique mais également des potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

Principalement trois modèles de cancer ont été étudiés, chez la souris: par induction tumorale ectopique ou orthoptiques, ou métastase expérimentale par injection intraveineuse de cellules tumorales [13-15]. Le cancer du pancréas est le modèle animal le plus utilisé, en raison de la MTEV associée à ce cancer, ce qui a contribué dans notre travail a comparé une lignée de cellules de cancer du pancréas, les BXPC3, que nous avons comparé à la lignée MCF-7 de cancer du sein, moins thrombogène.

En accord avec les résultats que nous présentons, sur des données *in vitro*, toutes ces études ont rapporté que les MPs présentes dans le plasma, et dérivées de cellules tumorales, peuvent favoriser la formation et la croissance du thrombus. L'implication de la phosphatidylsérine portée par les MPs d'origines tumorales a également été impliquée dans la TEV associée au cancer [16]. Nous suggérons donc que la mesure des microparticules procoagulantes pourrait peut-être constituer un facteur prédictif de MTEV plus performant que le score de Khorana actuel. Peu d'études se sont intéressées à cet aspect, à l'exception du travail de Zwicker *et al* [17] qui a permis de montrer que les patients qui avaient un taux élevé de microparticules exprimant du FT avaient une fréquence plus élevée de thromboses (27,3%) que ceux qui ne présentaient qu'un taux faible de MP (7,2% de MTEV). Dans cette étude, il faut souligner que différents types de cancer ont été regroupés (pancréas, colo-rectal, ovarian, plumonaire à non petites cellules) et que les effectifs sont limités. Nos résultats montrant une grande hétérogénéité de potentiel thrombogène des cellules cancéreuses, des études ultérieures concentrées sur un type de cancer donné permettraient sans doute de mieux appréhender le risque thrombogène associé à la tumeur.

Cette étude a permis de montrer que le traitement par enoxaparine permettait de diminuer le risque thrombotiques des patients ayant un taux élevé de microparticules, puisque la fréquence des MTEV chez les patients traités par enoxaprine n'était que de 5,6 %, sur un suivi de 2 mois. Ces résultats sont encourageants et prometteurs, mais confirment qu'un certain nombre de patients font des TVP alors qu'ils reçoivent un traitement anticoagulant. Notre travbail a permis de montrer que l'efficacité des traitements anticoagulants était grandement influencée par le type de tumeur, et la présence ou non de plaquettes dans le plasma. Les modèles murins ont identifié l'implication des plaquettes. Il a été montré dans

une étude que les microparticules de tumeurs pancréatiques sont capables d'activer des plaquettes *in vitro* et *in vivo*. Les plaquettes peuvent contribuer au processus thrombotique du cancer et surtout pourraient être la cible de médicaments antiplaquettaires qui permettraient de diminuer le risque de thrombose [18-21]. Les auteurs ont ainsi constaté que les microparticules exprimant le facteur tissulaire issues de 2 lignées pancréatiques induisaient l'activation des plaquettes humaines, leur agrégation *in vitro* par mécanisme dépendant de la thrombine et du facteur tissulaire. De plus, l'injection de ces MPs déclenche l'activation des plaquettes *in vivo* et la thrombose dans deux modèles murins de thrombose veineuse. Le clopidogrel (médicament antiplaquettaire bloquant le récepteur P2Y12 plaquettaire) présente une action anti-tumorale et limite la formation de thromboses dans ces modèles murins ce qui suggère que l'activation des plaquettes a été nécessaire pour la thrombose, ce qui permet d'envisager l'inhibition de l'activation plaquettaire dans le traitement et la prévention des thromboses chez les patients avec cancer.

Tous ces modèles mettent l'accent sur la mesure de l'activité du FT des MPs plutôt que sur l'activité FT des cellules cancéreuses. Cependant, les niveaux d'activité du FT des MPs peuvent représenter la pointe de l'iceberg en termes d'activité procoagulante associée au FT présent étant donné que l'activité procoagulante peut être liée également à d'autres entités comme les cellules cancéreuses elles-mêmes, que cette activité peut être liée au type de cellules. Dans ce but, le modèle que nous proposons permet de disséquer les activités procoagulantes propres aux cellules cancéreuses et à leur production de MPs dans leur environnements afin d'établir le pouvoir procoagulant qui leur est associé. Ces études devraient pour chaque tumeur, permettre d'envisager le(s) anticoagulant(s) le(s) plus approprié(s) pour prévenir la MTEV.....

Dans le but de l'approfondissement de la compréhension du mécanisme de la thrombogénèse liée au cancer et de l'amélioration de la prévention et du traitement de la maladie thromboembolique chez les patients atteints d'un cancer nous avons organisé nos recherches sur trois axes interconnectés :

 La modélisation des capacités procoagulantes des cellules cancéreuses et de leurs effets sur l'activité antithrombotiques des HBPM et des inhibiteurs spécifiques du FXa. Pour ce faire nous nous sommes orientés vers l'analyse du mode d'action des agents antithrombotiques en présence des cellules cancéreuses.

- Un approfondissement de la compréhension du mécanisme de l'induction de l'état d'hypercoagulabilité par les cellules cancéreuses qui pourraient révéler l'efficacité biologique du traitement antithrombotique chez les patients atteints de cancer.
- Une estimation du rôle du microenvironnement sur le pouvoir hypercoagulant des cellules cancéreuses; notamment le rôle des microparticules relarguées par ces cellules sur la génération de thrombine.

En effet compte tenu de l'impact de la génération de thrombine au niveau du risque thrombotique et au niveau de la modulation de la prolifération des cellules cancéreuses la connaissance du mécanisme de l'activation de la coagulation par les cellules cancéreuses pourrait mener à une amélioration du traitement antithrombotique, concernant le choix de l'agent antithrombotique et de l'intensité de l'hypocoagulation les mieux adaptées et donc à l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblées qui incorporaient des agents antithrombotiques dans les traitements proprement anticancéreux. L'approfondissement de la compréhension du mécanisme d'hypercoagulabilité pourrait tant qu'à elle permettre l'évaluation du risque thrombotique via les biomarqueurs d'hypercoagulabilité couplés aux caractéristiques cliniques du patient.

L'élaboration d'un système expérimental qui permet l'étude des capacités procoagulantes des cellules cancéreuses et de ses effets sur la génération de thrombine a été la première étape dans la modélisation de l'empreinte procoagulante des cellules cancéreuses. La mise au point et la validation de ce modèle expérimental qui consiste à la mise en contact de cellules cancéreuses avec du plasma humain pauvre ou riche en plaquettes nous a permis d'étudier l'effet de différentes lignées de cellules cancéreuses sur la génération de thrombine. En parallèle ce système expérimental nous a permis une modélisation du mécanisme de l'action des AOD sur les cellules cancéreuses en comparaison avec l'HBPM. Dans ce but, nous avons comparé la capacité de l'énoxaparine pour l'HBPM et les inhibiteurs spécifiques du Xa (apixaban et fondaparinux) pour les nouveaux anticoagulants à inhiber la génération de thrombine déclenchée par deux lignées de cellules cancéreuses.

Selon des études épidémiologiques, les cancers du pancréas et du sein sont liés à un risque thrombotique essentiellement différent. L'adénocarcinome du pancréas est significativement plus thrombogène par rapport à l'adénocarcinome du sein. Les données cliniques permettent de supposer que le risque thrombotique est inhérent aux caractéristiques

des cellules cancéreuses. Ces caractéristiques peuvent varier d'un type à l'autre. L'hypothèse que le type histologique du cancer détermine son potentiel procoagulant nous a mené à choisir pour notre étude deux lignées de cellules cancéreuses différentes qui proviennent de cancers humains de risque thrombotique différent:

- les cellules BXPC3 de l'adénocarcinome du pancréas
- les cellules MCF7 de l'adénocarcinome du sein.

Une première étape dans la perspective de l'optimisation du traitement antithrombotique est l'investigation de l'influence des cellules cancéreuses sur l'efficience des antithrombotiquenous, pour cela nous avons comparé l'effet de l'énoxaparine (HBPM) et du fondaparinux (inhibiteur indirect du FXa) versus celui de l'apixaban (inhibiteur direct du FXa) sur la génération de thrombine induite par les cellules BXPC3 et MCF7 en PPP et en PRP.

Pour la réalisation de cette première partie de notre étude, les trois agents antithrombotiques sélectionnées présentent des caractéristiques différentes.

L'énoxaparine est un anticoagulant à cibles multiples exerçant son effet antithrombotique principalement par la liaison de son domaine pentasaccharidique présent dans 30% des chaînes polysaccharidiques à l'antithrombine (AT). Cette HBPM diminue la générarion de thrombine en accélérant l'inhibition AT-dépendante du facteur Xa et dans une moindre mesure l'inhibition de la thrombine [12]. Le rapport anti-Xa / anti-IIa de l'énoxaparine est de 3.9. Par sa liaison à l'AT, l'énoxaparine potentialise préférentiellement l'inhibition du FXa libre plutôt que l'inhibition du FXa lié à la prothrombinase [22]. Le fondaparinux pentasaccharide synthétique tant qu'à lui inhibe spécifiquement le FXa de manière AT-dépendante le FXa libre, mais pas le FXa lié à la prothrombinase [23,24].

L'apixaban est un inhibiteur direct compétitif et sélectif du FXa, actif par voie oral. Il inhibe le FXa libre et le FXa lié à la prothrombinase ayant pour caracteristique une inhibition de la génération de thrombine concentration dépendante [25,26].

L'apixaban, le fondaparinux et l'énoxaparine ont d'abord dans cette étude été utilisés à des concentrations situées dans le milieu de la fourchette thérapeutique habituelle des patients souffrant de maladie thromboembolique veineuse. En présence de cellules BXPC3 ou MCF7, ces trois molécules ont inhibé significativement la génération de thrombine tout comme dans l'expérience témoin où la génération de thrombine a été déclenchée par une concentration

physiologiquement en FT. Cependant, le degré de l'activité inhibitrice de chaque composé a varié en présence de cellules cancéreuses en comparaison de l'expérience contrôle. Elle varie en fonction du type de cellules cancéreuses. Lorsque des concentrations fixes des composés étudiés à ont été comparés, la présence des cellules BXPC3 ne modifiait pas le degré d'inhibition de l'énoxaparine ou de l'apixaban sur la génération de thrombine en comparaison de celle observée sur la génération de thrombine en présence de FT. En revanche, les BXPC3 diminuaient significativement le pouvoir du fondaparinux à inhiber la génération de thrombine. De même, les cellules MCF7 n'ont significativement pas modifié la puissance inhibitrice de l'apixaban et de l'énoxaparine sur la génération de thrombine mais ont réduites significativement l'efficacité du fondaparinux.

Pour aller plus loin et approfondir ces résultats, nous avons étudié les variations du degré inhibiteur de l'apixaban, du fondaparinux et de l'énoxaparine en comparant les IC50 du peak et du MRI en présence des cellules cancéreuses en comparaison de l'expérience témoin sans cellules. Cette comparaison a montré que les deux types de cellules cancéreuses réduisent l'effet antithrombotique des agents à des degrés différents. L'IC50 du peak et du MRI a augmenté de 1,5 fois en présence des cellules BXPC3 pour l'apixaban alors qu'il n'a que légèrement augmenté en présence des cellules MCF7. Nous pouvons donc en conclure que selon le type histologique et le potentiel procoagulant des cellules cancéreuses, l'efficacité antithrombotique de l'inhibiteur direct et spécifique du FXa, l'apixaban peut être conservé ou partiellement diminuée. Contrairement à l'apixaban le fondaparinux, inhibiteur spécifique du FXa antithrombine-dépendant, était significativement plus sensible à la présence des cellules cancéreuses. Les cellules BXPC3 ont significativement diminué l'effet inhibiteur du fondaparinux sur la génération de thrombine. Cette différence pourrait provenir de la capacité distincte des deux agents à inhiber le FXa lié à la prothrombinase [21-24]. Il semble donc que la capacité d'inhiber le FXa lié à la prothrombinase ainsi que le FXa libre offre à l'apixaban l'avantage de conserver son activité antithrombotique sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. L'effet des cellules BXPC3 ou MCF7 sur l'activité antithrombotique de l'énoxaparine a été similaire à celle de l'apixaban. Nous en concluons donc que la présence de traces d'activité anti-IIa de l'énoxaparine compense la perte spécifique de l'actvité anti-Xa AT- dépendante. Les différences observées entre les deux types de cellules en PPP ont été fortement réduites en présence de plaquettes. Ceci peut être expliqué par la propriété des cellules MCF7 à activer les plaquettes [26-27]. Les plaquettes activées sont une source de matière procoagulante, ce qui renforce la formation du complexe prothrombinase. En outre, les plaquettes activées sécrètent le facteur plaquettaire 4 (PF4) qui

neutralise les chaînes d'un poids moléculaire élevé [28]. Les plaquettes pourraient modifier l'effet des agents AT-dépendants (énoxaparine ou fondaparinux) sur la génération de thrombine.

La coprésence des cellules BXPC3 ou MCF7 et des plaquettes a eu un impact plus faible sur l'activité de l'apixaban que sur celui de fondaparinux ou de l'énoxaparine. L'hypothèse possible d'explication de cette différence résulte tout d'abord des caractéristiques structurelles différentes ainsi que des mécanismes d'action différents. Ce phénomène est lié à la capacité de ces cellules à déclencher la génération de thrombine et donc de renforcer la formation de la prothrombinase, ce qui explique que les inhibiteurs indirects du FXa tels que l'énoxaparine et le fondaparinux ont moins d'efficacité que les inhibiteurs directs tels l'apixaban en présence de cellules.

L'étude du rôle du cancer procoagulant (activateur direct du FX), de l'activation de la phase contact de la coagulation par les cellules cancéreuses, ou une hypercoagulabilité liée à une possible activité "*héparanase-like*", sont également des pistes à explorer. Plus spécifiquement, l'expression de récepteurs membranaires de liaison à l'heparine et / ou d' héparanases pourraient modifier la répartition des chaines polysaccharidiques de l'énoxaparine et de la chaîne pentasaccharidique du fondaparinux [29-30].

Enfin, la différence de liaison au facteur plaquettaire 4 (PF4) des agents antithrombotiques étudiées pourrait être un facteur impliquée dans la réduction du pouvoir antithrombotique de l'énoxaparine par les plaquettes [31].

Cette étude a montré que l'apixaban est un inhibiteur plus puissant que le fondaparinux quand les deux molécules sont comparées à des concentrations thérapeutiques. De plus son activité inhibitrice sur la génération de thrombine n'est pas modifiée par la présence des cellules BXPC3 ou MCF7 ni par la coexistence des cellules avec les plaquettes. Ces résultats montrent la différence entre les inhibiteurs indirects AT-dépendants du FXa (fondaparinux) et les inhibiteurs directs (apixaban).

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons voulu comprendre les mécanismes d'activation de la coagulation par les cellules BXPC3 et MCF7 et tenter de comprendre leurs différences. Pour cela nous avons cherché à identifier les principaux facteurs procoagulants exprimées par les deux lignés de cellules cancéreuses; à évaluer le rôle de la voie du facteur tissulaire et de la phase contact; à estimer la contribution du FT et des phospholipides procoagulants présents dans le microenvironnement plasmatique sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses.

Dans une première étape, nous avons comparé les cellules BXPC3 et MCF7 sur la base de leur impact sur le processus de la génération de thrombine d'un plasma humain normal pauvre en plaquettes, évitant ainsi les variables comme les taux des facteurs et des inhibiteurs physiologiques de la coagulation sur l'interaction entre la cellule cancéreuse et son milieu plasmatique (les taux de ces protéines sont normaux dans les échantillons du plasma utilisé). Les deux types de cellules cancéreuses induisent une potentialisation significative de la génération de thrombine par rapport au contrôle sans cellules. Cette expérience a confirmé la capacité procoagulante inhérente des cellules cancéreuses, avec cependant des potentiels procoagulants différents entre les deux lignées de cellules cancéreuses. Nous avons pu montrer que les variables influençant ce potentiel procoagulant sont essentiellement, le nombre des cellules cancéreuses et l'origine du cancer. Les cellules de BXPC3 ont un effet significatif sur la génération de thrombine à des concentrations dix fois plus faible que les cellules de MCF7 (5 cellules/ μ l et 50 cellules/ μ l respectivement). L'effet maximal des cellules BXPC3 sur la génération de thrombine se manifeste à la concentration de 100 cellules/µL versus 600 cellules/µL pour les MCF7. L'origine du cancer est un élément déterminant sur la propriété procoagulante des cellules cancéreuses, la comparaison de l'effet procoagulant de deux lignées cellulaires sur la base de leurs concentrations qui se situent au plateau de l'amplification maximale de la génération de thrombine, a révélé que les cellules BXPC3 sont jusqu'à 10 fois plus puissantes par rapport aux cellules MCF7. L'analyse des paramètres du thrombogramme a montré que les cellules BXPC3 et MCF7, raccourcissent significativement la phase d'initiation de la génération de thrombine. Au niveau de la phase de propagation (MRI) ainsi que sur la concentration maximale de thrombine générée (Peak), les cellules BXPC3 induisent des modifications significatives à partir de la plus faible concentration étudiée tandis les cellules MCF7 n'induisent pas de modifications significatives au niveau du MRI et du Peak, même aux concentrations les plus élevées. En résumé, les cellules BXPC3 accélèrent les phases d'initiation et de propagation de la génération de thrombine. En revanche, l'effet des cellules MCF7 se localise principalement au niveau de la phase d'initiation de la génération de thrombine. Sachant qu'il est bien établi que les cellules cancéreuses expriment du FT, le principal déclencheur de la coagulation sanguine [32-34], l'expression du FT par les cellules cancéreuses et son rôle dans l'accélération et l'amplification de la génération de thrombine induite par ces cellules étaient la première cible de notre recherche sur l'identification de leur «empreinte procoagulante». Afin de démontrer la liaison entre la synthèse et l'expression du FT par les cellules BXPC3 et MCF7 et leur potentiel procoagulant correspondant, nous avons évalué l'activité du FT

exprimé par ces cellules. Nous avons également étudié l'impact de l'inhibition du FT par un anticorps monoclonal anti-FT qui inhibe de manière spécifique son activité.

Nous avons démontré que le FT exprimé par les cellules BXPC3 et MCF7 est fonctionnel et possède une activité procoagulante qui est proportionnelle à la concentration de cellules cancéreuses. Les deux lignées cellulaires présentent une activité de FT significativement différente. La synthèse, l'expression de l'activité spécifique du FT est significativement supérieure chez les cellules BXPC3 par rapport aux MCF7, l'activité de ce FT chez les BXCP3 et les MCF7 est nettement supérieure aux HUVEC. Le nombre de cellules BXPC3 ou MCF7 est en corrélation avec les taux de FTa à la différence des cellules normales d'HUVEC. L'incubation de cellules cancéreuses avec l'anticorps anti-FT inhibe partiellement leur effet potentialisateur sur la génération de thrombine, effet moins prononcé sur les cellules HUVEC.

Cette constatation nous a fait penser à l'hypothèse que la génération de thrombine est due à une voie alternative à celle du FT.

L'expression de l'activité du cancer procoagulant (CP), la présence du FT épissé (asTF) et l'activation de la phase contact de la coagulation ont été étudiées.

Les cellules BXPC3 et les cellules MCF7 ont exprimé du CP. L'activité cancer procoagulante était environ 4 fois plus élevée pour les cellules MCF7 que pour les cellules BXPC3.

L'asTF a été exprimé en quantités abondantes par les cellules BXPC3. Une expression plus faible de l'asTF a été observée pour les cellules MCF7 et les cellules HUVEC. Les taux d'asTF exprimées par les deux types de cellules cancéreuses augmentent parallèlement aux nombres de cellules et sont corrélés à l'activité du FT dans l'environnement cellulaire. Cependant, notre modèle expérimental ne nous permet d'établir une relation potentielle entre l'activité procoagulante des cellules cancéreuses et leur taux asTF. L'asTF est exprimé par les lignées cellulaires tumorales et les échantillons de tissus provenant de patients atteints de cancer [35], cependant depuis sa découverte, l'activité procoagulante de l'asTF fait l'objet de débats [36-38].

L'étude de la capacité des cellules cancéreuses à activer la voie intrinsèque de la coagulation a été réalisée en utilisant de la CTI un inhibiteur sélectivement du FXIIa [39-40]. L'inhibition du FXIIa a engendré une prolongation significative de la phase d'initiation de la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3 et les cellules MCF7. Cette expérience a prouvé que les deux types de cellules cancéreuses induisent une génération de thrombine via l'activation du FXII avec cependant des degrés différents, les cellules MCF7 étant beaucoup plus sensibles. L'augmentation du temps de latence induit par la CTI était significativement moins importante en PPP en présence des cellules HUVEC. L'addition concomitante de CTI et d'anti-FT a augmenté le temps de latence en présence de cellules BXCP3, qu'en présence de MCF7, et seulement en faible proportion pour les HUVEC, ou le PPP sans cellules. Ces expériences ont suggéré que les cellules MCF7 pourraient déclencher la génération de thrombine via l'activation du FXII.

Afin d'évaluer le rôle de chaque facteur de la coagulation sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. La génération de thrombine dans des plasmas déficients en facteurs de coagulation en comparaison de la génération de thrombine dans un pool normal (expérience témoin) a été réalisée. La génération de thrombine en présence de cellules MCF7 ou BXPC3, dans les plasmas déficients en facteurs VII, IX, XII, XI, VIII, a été significativement réduite en comparaison à celle observée dans le PPP normal en présence de cellules. La diminution de la génération de thrombine est différente dans chaque plasma déficient en facteur de coagulation en présence de cellules BXPC3 ou de cellules MCF7. Cette série d'expériences a montré que le FVII joue un rôle majeur dans les phases d'initiation et de propagation de la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3. La liaison de FVII au FT est considérée comme la principale voie d'activation du FX dans une coagulation normale. En effet, la génération de thrombine déclenchée par les cellules BXPC3 en plasma déficient en FVII est effondrée. En revanche, la génération de thrombine déclenchée par les cellules MCF7 en plasma déficient en FVII persiste. Cette constatation conduit à la conclusion selon laquelle les cellules MCF7 ont déclenché la génération de thrombine par l'intermédiaire d'une voie alternative qui contourne le déficite en facteur VII. Les expériences en présence de plasma déficient en FXII ont permis de confirmer cette hypothèse, en effet la génération de thrombine en présence des cellules MCF7 et de déficient en FXII a été presque complètement abrogée. Le FVII et la thrombine font également parmi des activateurs du FXII. Dans nos conditions expérimentales, en présence soit de cellules BXPC3 ou de cellules MCF7, les taux de FVII et de FII sont normaux. Par conséquent, on peut supposer que lorsque la coagulation est déclenchée par les cellules MCF7, le défaut de FXII bloque la génération de thrombine par la voie d'activation du FXIa et de la tenase intrinsèque. Pour les BXPC3 cette voie reste secondaire par rapport à la voie du FT. Les expériences en plasma déficient en FXI renforcées l'importance de l'activation de la voie intrinsèque pour les cellules MCF7. La génération de thrombine déclenchée par les cellules

BXPC3 ou MCF7 a été abrogée en présence de plasmas déficients en FVIII ou FIX confirmant l'importance majeure de la formation de la ténase intrinsèque dans l'amplification de la phase de propagation de la génération de thrombine en présence de cellules cancéreuses. De plus, cette expérience a montré la faible implication du cancer procoagulante. La génération de thrombine a été supprimée en présence des cellules MCF7 ou des cellules BXPC3 en plasmas déficients en FX, en FV ou en FII. Ainsi, l'implication d'une activité «thrombine-like" ou "prothrombinase-like" par les cellules cancéreuses a été éliminé. Enfin, les expériences en plasma déficient en protéine C ont montré que la baisse de la production de thrombine du à la voie de la protéine C était significativement plus importante pour les cellules BXPC3.

L'ensemble des résultats obtenu a démontré que l'activité procoagulante des cellules cancéreuses n'a pas été suffisante pour induire un état d'hypercoagulabilité. Effectivement, les cellules cancéreuses seules induisent une génération de thrombine inférieure à celle observée observé quand la coagulation est déclenchée par une concentration dite physiologique de FT et des phospholipides procoagulants.

Nous avons donc pour poursuivre estimé la contribution du FT et des phospholipides procoagulants présents dans le microenvironnement plasmatique sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. Dans un plasma enrichi par une concentration optimale de phospholipides procoagulants, la génération de thrombine en présence de cellules BXPC3 (seules) a donné lieu à une presque normalisation de la génération de thrombine (génération de thrombine en présence d'une concentration optimal en PPL). En présence de cellules MCF7 les concentrations optimales en phospholipides procoagulant ont induit une génération de thrombine significativement plus faible par rapport aux niveaux normaux dans ces conditions optimales.

Nous avons également examiné l'impact du FT exogène (sans addition exogène de phospholipides procoagulants) sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. Les deux types de cellules (BXPC3 et MCF7) induisent une génération de thrombine significativement plus faible par rapport à celle observée en présence de concentrations optimales. Nous avons donc montré que les phospholipides procoagulants sont essentiels à l'augmentation de la génération de thrombine induite par des cellules cancéreuses, quand bien même si le microenvironnement est riche en FT.

Contrairement aux cellules cancéreuses, les cellules normales (HUVEC) n'ont eu aucun effet sur la génération de thrombine.

Enfin, nous avons étudié l'impact de l'association du FT et des phospholipides procoagulants sur la génération de thrombine déclenchée par les cellules cancéreuses. Cette expérience a montré que l'hypercoagulabilité induite par les cellules cancéreuses est la résultante de la combinaison des propriétés procoagulantes des cellules cancéreuses avec les éléments procoagulants plasmatiques du microenvironnement. Ce qui pourrait consister en une concentration optimale en phospholipides procoagulants et en une concentration en FT plus élevée par rapport à la normale. Une des possibilités de l'apport de ces facteurs pouvant être la formation des microparticules procoagulantes à partir de la membrane de cellules cancéreuses.

Dans une dernière partie et dans le but d'étudier cette possibilité et donc d'estimer la part du rôle des microparticules dans le mécanisme procoagulant, nous avons déjà isolé les microparticules issus des deux lignés des cellules cancéreuses et des cellules normales (HUVEC). Sur ces microparticules, nous avons dans un premier temps étudié par la méthode de cytométrie en flux l'expression de phospholipides procoagulants et du FT à l'aide de l'annexine V et d'un anticorps anti-FT. Nous avons également déterminé l'expression de l'activité du facteur tissulaire par un test fonctionnel. Par la suite, nous avons étudié la génération de thrombine sur des co-cultures de cellules BXPC3 ou MCF7 en présence de microparticules produites par ces mêmes cellules dans leur milieu conditionné dans des proportions identique de volume de milieux de culture. Enfín nous avons exploré l'impact de la génération de thrombine de ces microparticules en plasma normal et en plasmas déficients en facteur VII et XII.

La phosphatidylsérine est présente sur la surface des microparticules d'origine cancéreuses contrairement aux cellules cancéreuses elles-mêmes. Les MPs issues de cellules BXPC3 présentent un pourcentage de marquage significativement plus important que celles issues de MCF7. Les MCF7 exposent ainsi plus faiblement la phosphatidylsérine comparativement aux BXPC3 (les caractéristiques membranaires des deux types de MPs semblent donc être différentes). Les HUVEC n'expriment pas de phospholipides procoagulants à leur surface.

Les deux lignées cellulaires ont été également comparées sur la base de l'expression membranaire du FT par la méthode de cytométrie en flux Les deux types de cellules cancéreuses (BXPC3 et MCF7) expriment des quantités abondantes de FT. Cependant, la densité en FT au niveau de la membrane des cellules BXPC3 et des microparticules BXPC3 est significativement plus importante par rapport à celle au niveau de la membrane des cellules et microparticules de MCF7. Cette différence est en corrélation directe avec la différence de la puissance procoagulante des cellules BXPC3 et MCF7 au niveau de l'accélération et de l'amplification de la génération de thrombine. La détermination de l'expression de l'activité du FT par méthode fonctionnelle sur les microparticules comme attendu, a montré que l'expression du FTa par les cellules BXPC3 est significativement supérieure par rapport aux cellules MCF7. Les taux d'expression du FTa par les microparticules étaient nettement supérieurs aux résultats obtenus sur les cellules cancéreuses elles-mêmes, dans un rapport d'environ 30 pour les BXPC3 et de 5 pour les MCF7; cette activité étant beaucoup plus faible pour les HUVEC.

En résumé, les MPs apportent à la fois des phospholipides procoagulants et une quantité importante de FT actif permettant le déclenchement et l'amplification de la génération de thrombine.

La co-culture des cellules cancéreuses avec leurs microparticules a donné lieu à une augmentation significative du Peak de génération de thrombine et du MRI, ainsi qu'une réduction du temps de latence et du ttPeak par rapport au témoin (PPP normal avec cellules et sans microparticule). À un nombre égal de cellules, les MPs de MCF7 ont une activité procoagulante moins forte que les MPs de BXPC3. Les taux de thrombine obtenu par les BXPC3 en présence de leurs MPs sont compatibles avec un état d'hypercoagulabilité. Dans les mêmes conditions, les paramètres du thrombogramme en présence d'HUVEC ne présentent pas de différences significatives par rapport aux expériences de contrôle.

Les microparticules quand elles sont sans cellules présentes dans le plasma engendrent une augmentation significative de la génération de thrombine par rapport au témoin (PPP normal sans MPs). Cet effet est plus prononcé pour les BXPC3 que les MCF7 phénomène que nous pouvons rattacher à l'expression du facteur tissulaire.

Comme attendu, la génération de thrombine en présence de MPs de MCF7, BXPC3, ou d'HUVEC dans les plasmas déficients en facteurs VII, XII, a été significativement réduite en comparaison à celle observée dans le PPP normal en présence de MPs. La diminution de la génération de thrombine est différente en fonction de l'origine des MPs. Dans le plasma déficient en FVII, le temps de latence a augmenté 3 fois plus, en présence des MPs de cellules BXPC3 qu'en présence MPs de cellules MCF7. La génération de thrombine en plasma deficient en FVII n'a que légèrement modifié le lagtime en comparaison au PPP normal en présence des MPs d'HUVEC. Le peak de thrombine et le MRI ont diminué également dans les mêmes proportions en présence des MPs de BXPC3, MCF7. Dans le
plasma déficient en facteur XII, le MRI diminue fortement pour les MCF7 par rapport aux BXPC3 alors qu'il n'a pas bougé de façon significative pour les HUVEC.

L'ensemble de ces données montre que

- 1. Les cellules cancéreuses par elle même ne possèdent pas une puissance suffisante pour engendrer un état d'hypercoagulabilité.
- 2. Les cellules cancéreuses "emploient" des voix d'activation de la coagulation différentes
- Les cellules cancéreuses "enrichissent" le microenvironnement avec des éléments procoagulants notamment des microparticules procoagulantes qui expriment à la fois du FT et des phospholipides procoagulants.
- 4. Les microparticules générés par les cellules cancéreuses possèdent un pouvoir procoagulant et activent à la fois la voix du FT et la phase contact.
- 5. L'association cellules cancéreuses-microparticules est nécessaire à un état d'hypercoagulabilité.
- 6. L'intensité de cette hypercoagulabilité dépend du type histologique des cellules cancéreuses.

Références – Discussion générale

1) Trousseau A. Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris. 1865 Vol 3. 2nd ed. JBBaillière, Paris, France 654–712.

 Falanga A, Russo L, Milesi V. The coagulopathy of cancer. Curr Opin Hematol. 2014; 21: 423-9.

3) Khorana AA, Francis CW, Culakova E et al. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. J Thromb Haemost 2007; 5:632–634.

4) Chew HK, Wun T, Harvey D et al. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. Arch Intern Med 2006; 166: 458–464.

5) De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 50: 187-96.

6) Farge D, Debourdeau P, Beckers M et al. International clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer. J Thromb Haemost 2013; 11: 56–70.

7) Kuderer NM, Lyman GH, Guidelines for treatment and prevention of venous thromboembolism among patients with cancer. Thromb Res 2014; 133: S122–S127.

8) Lee AY. Thrombosis in cancer: an update on prevention, treatment, and survival benefits of anticoagulants. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ 2010; 144–149.

9) Hemker HC, Béguin S. The mode of action of heparins in vitro and in vivo. Adv. Exp. Med. Biol. 1992; 313: 221–230.

10) Douketis J, Bell, AD, Eikelboom J et al. Approach to the new oral anticoagulants in family practice: part 1: comparing the options. Can. Fam. Physician. 2014; 60: 989–995.

11) Levine MN, Gu C, Liebman HA et al. A randomized phase II trial of apixaban for the prevention of thromboembolism in patients with metastatic cancer. J. Thromb. Haemost. 2012; 10: 807–814.

12) Gerotziafas GT, Mahé I, Elalamy, I. New orally active anticoagulant agents for the prevention and treatment of venous thromboembolism in cancer patients. Ther. Clin. Risk Manag. 2014; 10: 423–436.

13) Davila M, Amirkhosravi A, Coll E et al. Tissue factor bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation.J. Thromb. Haemost. 2008; 6: 1517-1524.

14) Wang JG, Geddings JE, Aleman MM et al. Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. Blood. 2012; 119: 5543-5552.

15) Mezouar S, Darbousset R, Dignat-George F et al. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. Int. J. Cancer. 2015; 13: 462-475.

16) Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ et al. Tumor derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. Cancer Lett. 2009; 283: 168-175.

17) Zwicker JI, Liebman HA, Bauer KA et al. Prediction and prevention of thromboembolic events with enoxaparin in cancer patients with elevated tissue factor-bearing microparticles: a randomized-controlled phase II trial (the Microtec study). Br J Haematol. 2013; 160: 530-7.
18) Geddings JE, Hisada Y, Boulaftali Y et al. Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. J Thromb Haemost. 2016: 153-66.
19) Mezouar S, Darbousset R, Dignat-George F et al. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. Int. J. Cancer. 2015; 136: 462-475.

20) Megea D, Mezouara S, Dignat-George F et al. Microparticles and cancer thrombosis in animal models Thrombosis Research 140S1 2016: S21-S26.

21) Barrowcliffe TW, Havercroft SJ, Kemball-Cook G et al. The effect of Ca2+, phospholipid and factor V on the anti-(factor Xa) activity of heparin and its high-affinity oligosaccharides. Biochem. J. 1987; 243: 31–37.

22) H. Speijer, D. Billy, G. Willems, et al. Inhibition of prothrombinase by antithrombin–heparin at a macroscopic surface. Thromb Haemost. 1995; 73: 648–653.
23) Herault JP, Bernat A, Pflieger AM et al. Comparative effects of two direct and indirect factor Xa inhibitors on free and clot-bound prothrombinase. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997; 283: 16–22.

24) Jourdi G, Siguret V, Martin AC et al. Association rate constants rationalise the pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban. Thromb. Haemost. 2015; 114: 78–86.

25) Luettgen JM, Knabb RM, He K et al. Apixaban inhibition of factor Xa: microscopic rate constants and inhibition mechanism in purified protein systems and in human plasma. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2011; 26: 514–526.

26) Lian L, Wei L, Zhen-Yu L et al. Inhibition of MCF7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs. Oncol. Lett. 2013; 5: 675–680.

27) Zuckerman L, Ramstack JM, Vagher JP et al. Neutralization of heparin by cellular blood elements. Thromb. Res. 1975; 7: 149–159.

28) Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN et al. Proteoglycansinhealth and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and theirpharma-cological targeting, FEBS J 2010; 277: 3904–3923.

29) Barash U, Cohen-Kaplan V, Dowek I et al. Proteo-glycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumorpro-gression and metastasis, FEBS J 2010; 277: 3890–3903.

30) Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt D et al. Comparative study on the in vitro and in vivo activities of seven low-molecular-weight heparins. Haemostasis. 1988; 18: 3–15.

31) Tilley RE, Holscher T, Nieva J et al. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. Thromb Res 2008; 122: 604-9.

32) Key NS, Chantrahammachart P, Moody PW. Membrane microparticles in VTE and cancer. Thrombosis Research 2010; Supp 2: S80- S83.

33) Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D et al. Tumor-derived tissue factor bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res 2009; 15: 6830- 40.

34) Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C et al. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. J Thromb Haemost 2006; 4: 158–167.

35) Böing AN, Hau CM, Sturk A et al. Human alternatively spliced tissue factor is not secreted and does not trigger coagulation. J Thromb Haemost 2009; 7: 1423–1426.

36) Szotowski B, Antoniak S, Rauch U. Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. Trends Cardiovasc Med 2006; 16: 177–182

37) Censarek P, Bobbe A, Grandoch M et al. Alternatively spliced human tissue factor (asTF) is not pro-coagulant. Thromb Haemost 2007; 97: 11– 14.

38) Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. Anesth Analg 2009; 108: 1447- 52.

39) Spronk HM, Dielis AW, Panova-Noeva M et al. Monitoring thrombin generation: is addition of corn trypsin inhibitor needed? Thromb Haemost. 2009; 101 (6): 1156- 62.

40) van Veen JJ, Gatt A, Cooper PC et al. Corn trypsin inhibitor in fluorogenic thrombingeneration measurements is only necessary at low tissue factor concentrations and influences the relationship between factor VIII coagulant activity and thrombogram parameters. Blood Coagul Fibrinolysis 2008; 19: 183-9.

Conclusion

En conclusion, notre étude in vitro montre que l'apixaban à des concentrations thérapeutiques, induit une inhibition significative de la génération de thrombine et son effet est moins influencé par les cellules cancéreuses par rapport à l'énoxaparine et le fondaparinux. Cependant nous avons montré que l'hétérogénéité du potentiel prothrombotique des différentes cellules cancéreuses joue un rôle sur l'efficacité des agents antithrombotiques. Une des explications possibles repose sur le mode d'activation de la coagulation par les cellules cancéreuses. En effet, nous avons démontré que les cellules BXPC3 et MCF7 déclenchent et renforcent la génération de thrombine à la fois par la voie du FT et par l'activation de la phase contact de la coagulation; la voie du FT étant dominante. Les données expérimentales obtenues montrent que la surexpression du FT est la base moléculaire commune de l'activité procoagulante des cellules cancéreuses BXPC3 et MCF7 et conduit à une initiation accélérée de la génération de thrombine.

Des différences quantitatives au niveau de l'expression du FT déterminent en grande partie l'empreinte procoagulante des cellules cancéreuses en fonction de leur type histologique. La différence au niveau de la synthèse et de l'expression du FT par chacune des lignées cellulaires étudiées est corrélée avec le potentiel procoagulant correspondant qui se manifeste au niveau de l'accélération de la phase d'initiation et de l'amplification de la phase de propagation de la génération de thrombine. Cependant, l'activation de la phase contact ne doit pas être négligée. L'impact du rôle de chacune des deux voies varie en fonction de la nature des cellules cancéreuses.

A notre connaissance, cette étude pour la première fois a montré que les propriétés procoagulantes inhérentes des cellules cancéreuses ne sont pas suffisantes pour induire l'hypercoagulabilité et montre que les éléments procoagulants du microenvironnement, à savoir le FT porté par les microparticules et d'autres éléments procoagulants, sont des éléments nécessaires pour que le cancer induise un état d'hypercoagulabilité.

En conclusion, nous avons mis au point et validé un modèle expérimental qui permet l'évaluation du potentiel procoagulant inhérent des cellules cancéreuses par leur capacité à induire la génération de thrombine. Ce modèle expérimental permet l'identification de l'empreinte procoagulante de diverses lignées cellulaires. Ces travaux apportent des données expérimentales permettant de concrétiser la notion de l'hypercoagulabilité liée au cancer. Ils nous conduisent également à préciser le lien entre l'expression des propriétés procoagulantes par les cellules cancéreuses, (dominées par l'expression du FT) sur le processus de la génération de thrombine.

Perspectives

Parmi les perspectives de nos études figure l'amélioration du modelé expérimental en introduisant d'autres éléments cellulaires comme les plaquettes et les globules blancs. Cette recherche pourrait s'articuler sur

- l'étude des mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses induisent la formation des microparticules procoagulantes d'origine plaquettaire.
- l'analyse de l'intéraction entre cellules cancéreuses et plaquettes pouvant contribuer à la compréhension du rôle des plaquettes dans la modulation de l'angiogénése et le potentiel métastatique des cellules canéreuses.
- l'exploration des nouveaux mécanismes de thrombogénése dans le cancer, comme l'étude de la relation entre les cellules cancéreuses, les neutrophiles et la formation de Neutrophile Extracellular Traps (NETs) qui sont composés principalement par le DNA.
- L'étude de la contribution du FT alternativement épissé (asTF) sur l'hypercoagulabilité induite par le cancer.
- La recherche de la synthèse et de l'expression par les cellules cancéreuses du FVIIa endogéne qui serait capable de soutenir et amplifier l'activité catalytique du facteur tissulaire et du TFPI qui serait capable de moduler in situ cette activité.

Comme la présente étude a mis en évidence que les cellules cancéreuses induisent une subtile génération de thrombine aboutissant à un réseau de fibrine autours de la cellule cancéreuse, il serait interessant d'estimer son rôle dans la résistance aux traitements anticancéreux.

Nos recherches ont montré que les cellules cancéreuses exercent un effet inhibiteur sur l'activité antithrombotique des HBPM, cette observation associée à la fréquence augmentée de l'échec du traitement par HBPM chez les patients atteints de cancer évoque la nécessité d'étudier le phénomène de la résistance biologique par la clarification du mécanisme de l'inhibition des antithrombotiques par les cellules cancéreuses.