



Rôle de la Protéine C, un anticoagulant naturel, dans l'association thrombose et cancer

Samaher Besbes

► **To cite this version:**

Samaher Besbes. Rôle de la Protéine C, un anticoagulant naturel, dans l'association thrombose et cancer. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. <NNT : 2015PA11T048>. <tel-01220590>

HAL Id: tel-01220590

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01220590>

Submitted on 26 Oct 2015

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 PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 418 : DE CANCÉROLOGIE

et

UNIVERSITÉ DE MONASTIR, TUNISIE

Faculté de Pharmacie

THÈSE DE DOCTORAT SUR TRAVAUX

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Samaher BESBES

Rôle de la Protéine C, un anticoagulant naturel, dans
l'association thrombose et cancer

Université Sorbonne Paris Cité
UMR Université Paris 7, INSERM U965
Carcinose, Angiogenèse et Recherche Translationnelle (CART)
Hôpital Lariboisière, Paris, France

Date de soutenance : 30/09/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Dr. Massoud MIRSHAHI	PU (CNRS, INSERM U965, Paris)
Co-directeur de thèse :	Pr. Ibtissem GHEDIRA	PUPH (Hôpital Farhat-Hached, Sousse)
Rapporteurs :	Pr. Isabelle MAHÉ	PUPH (Hôpital Louis Mourier, Paris)
	Pr. Neila BEN ROMDHANE	PUPH (Hôpital La Rabta, Tunis)
Examineurs :	Pr. Christian AUCLAIR	PU (ENS, UMR 8113, Cachan)
	Pr. Nourelhouda TOUMI	PUPH (Hôpital d'enfants, Tunis)

AD ASTRA, PER ASPERA...

À mes parents ...

Remerciements

Nous y voilà enfin !

Au moment de clôturer ce long chemin, j'aimerais commencer par remercier les personnes qui ont cru en moi et soutenue pour arriver au bout de cette thèse.

Mes premiers remerciements vont naturellement à mes directeurs de thèse le Dr. Massoud MIRSHAHI et le Pr. Ibtissem GHEDIRA. Je remercie chaleureusement Dr. Massoud Mirshahi pour tout le temps qu'il a consacré pour m'inculquer son savoir autant en biologie que dans d'autres domaines, de m'avoir encadrée sur des sujets à la fois intéressants et stimulants. J'exprime ma profonde reconnaissance au Pr. Ibtissem Ghedira qui m'a ouvert les portes de cette opportunité extraordinaire de thèse en cotutelle entre la faculté de pharmacie à Monastir et l'école doctorale de cancérologie à Paris. Elle m'a soutenue aux moments difficiles, m'a appris à ne jamais perdre mes objectifs de vue et m'a fait bénéficier de ses connaissances et de son savoir pour progresser.

Je remercie le Pr. Marc POCARD pour son accueil dans l'équipe « Carcinose, angiogénèse et recherche translationnelle » de l'unité U965. Ce fut pour moi un honneur de travailler à ses côtés.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Jeannette SORIA, pour son encadrement attentionné, sa disponibilité et pour m'avoir guidée et encouragée.

J'exprime ma profonde gratitude au Pr. Amu THERWATH pour son soutien, sa présence et ses conseils nombreux et avisés.

Je remercie le Pr. Jean-Pierre MARIE pour m'avoir accueillie au sein de son équipe « Résistance et survie des cellules tumorales » de l'unité U842 et pour les discussions intéressantes que nous avons eues.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma gratitude au Pr. Moncef Jeddi pour ses encouragements, sa sollicitude et ses généreux secours au cours de certains moments difficiles de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Pr. Christian AUCLAIR et au Pr. Nourelhouda TOUMI d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également le Pr. Isabelle MAHE et le Pr. Neila BEN ROMDHANE d'avoir accepté la tâche de rapporteurs de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Dr. Shahsultan MIRSHAHI pour sa bonne humeur débordante qui m'a toujours réconfortée et dynamisée, pour son soutien et sa disponibilité.

Je voudrais dire ma reconnaissance au Dr. Christian BILLARD pour sa générosité, sa joie de vivre et son soutien.

Je remercie le Dr. Fatemeh VALAMANESH pour les entretiens instructifs et les conseils qu'elle a bien voulu me prodiguer au cours de cette thèse.

Je tiens également à adresser un remerciement spécial à Madame Annie MUNISER, avec qui j'ai eu l'occasion de travailler dans le cadre des expériences de cytométrie en flux.

Je remercie le Dr. Brigitte BEAUVOIS pour tout ce qu'elle m'a appris et pour son enthousiasme scientifique.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées tout au long de cette thèse. Je pense particulièrement au Dr. Nicolas VODOVAR pour son soutien et sa disponibilité. Nico, je ne te remercierai jamais assez.

À Hélène, Diana, Rose, Caroline, Mathilde, Gabrielle, Nadia, Marine, Chiara, Selma, Cynthia, Malha, Marion, Sarah, Anaïs, Ingrid, Marie, Amani, Wahiba, Sandrine et Julia. A Haythem, Raphaël, Alex, Jovid, Sahid, Grégoire, Simon, Maxime et Jaime. Merci les djeun's.

À Christine et Karima pour votre soutien et pour cette bonne humeur qui vous anime.

Les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à toute ma famille Besbes et Ben Abdesslem, et en particulier à mamie Kalthoum, à ma tante Mejda, à mon frère Ali Amine, ma sœur Nesrine et mon grand frère de cœur Stéphane qui m'ont tant apporté durant ces années pour réaliser mon rêve.

Toute ma gratitude va à mes parents, Faïza et Ahmed : sans eux, il ne m'aurait pas été possible de mener ce projet à bien tant ils m'ont permis de maintenir mon équilibre entre ma

vie au laboratoire et la vie elle-même. Maman, Papa... merci d'avoir cru en moi, de m'avoir toujours encouragée et m'avoir tant donné pour faire que je sois moi aujourd'hui.

À ma tante de cœur Lilia pour sa générosité, sa grandeur d'âme, pour m'avoir ouvert les portes de sa maison et de son cœur.

À tous mes amis pour m'avoir soutenue jusqu'à la fin. À Amina, Ines, Abir, Farah, Zina, Touta, Eve, Nour, Emna, Amine, Oussama, Mehdi, Kaïs, Anis, Elyes et Walid, pour votre présence de cœur. Merci beaucoup d'être là et d'être vous.

Enfin, une pensée pour mes grands-parents Habiba, Ali et Mohamed. Vous n'êtes pas là aujourd'hui pour voir l'aboutissement de tous ces efforts, mais je suis sûre que vous êtes fiers de mon travail : vous vous dites certainement « elle est vraiment *mel brima* »*.

* *Top du top*

SOMMAIRE

Résumé.....	1
Abstract	1
Liste des abréviations	1
Liste des tableaux	1
Liste des figures	1
INTRODUCTION	1
Chapitre 1. Cancer et thrombose	3
1. Cancer.....	3
1.1. Définition.....	3
1.2. Epidémiologie	3
2. Thrombose.....	4
2.1. Définition.....	4
2.2. Facteurs de risque.....	4
2.3. Epidémiologie	5
Chapitre 2. Cancer et thrombose – une association forte	7
1. Etat de l'art et épidémiologie	7
2. Traitements anticoagulants dans un contexte tumoral.....	8
3. Facteurs de risque de thrombose chez les patients atteints d'un cancer.....	9
3.1. Localisation	9
3.2. Stade du cancer.....	10
3.3. Histologie	10
3.4. Délai de concomitance des deux pathologies	11
3.5. Hospitalisation.....	11
3.6. Chirurgie et traitements	11
3.7. Récidive.....	12
4. Biomarqueurs et facteurs génétiques.....	13
5. Synthèse et triade de Virchow appliquée au cancer	14
Chapitre 3. Biologie du cancer - le microenvironnement tumoral	17
1. Généralités.....	17
2. Composition du microenvironnement tumoral.....	17
2.1. La composante non inflammatoire	17
2.2. La composante inflammatoire	19
2.3. La matrice extracellulaire	22

2.4. Les Métalloprotéases et leur rôle dans le processus tumoral.....	23
2.5. Angiogenèse tumorale.....	26
Chapitre 4. Biologie de la coagulation.....	28
1. Hémostase primaire.....	28
2. La coagulation.....	28
3. La fibrinolyse.....	31
4. Inhibition de la fibrinoformation.....	32
5. Schéma récapitulatif de la régulation de la coagulation.....	33
Chapitre 5. Biologie de l'association entre cancer et thrombose.....	35
1. Facteur tissulaire, thrombine et acteurs de l'inflammation.....	35
2. Microparticules.....	36
3. Synthèse.....	38
Chapitre 6. Protéine C et son récepteur endothélial.....	40
1. La protéine C : gène et structure.....	40
2. Le récepteur endothélial de la protéine C.....	40
2.1. Propriétés structurales et biochimiques de la protéine.....	40
2.2. Gène et régulation de l'expression.....	42
2.3. Solubilisation de l'EPCR : mécanisme, propriétés et régulation génétique.....	43
3. Fonctions du système PC/EPCR.....	44
3.1. Fonction anticoagulante.....	44
3.2. Fonctions cytoprotectrice et anti-inflammatoire.....	45
3.3. Fonction anti-apoptotique.....	47
3.4. Système PC/EPCR et pathologies.....	47
3.4.1. Système PC/EPCR et thrombose.....	47
3.4.2. Système PC/EPCR et cancer.....	49
Chapitre 7. Thrombopoïétine et plaquettes.....	52
1. La thrombopoïétine.....	52
1.1. Gène et structure protéique.....	52
1.2. Régulation de l'expression du gène et du taux de la thrombopoïétine.....	53
1.3. Thrombopoïétine et isoformes.....	54
2. Régulation de la mégacaryocytopoïèse et la production de plaquettes.....	55
3. Rôle de la thrombopoïétine et des plaquettes dans le cancer et la thrombose.....	57
OBJECTIFS.....	59
ORGANISATION DE L'OUVRAGE.....	61
MATERIELS ET METHODES.....	62
1. Culture cellulaire.....	62

1.1.	Culture de lignées cellulaires.....	62
1.2.	Co-culture cellulaire	62
1.3.	Culture primaire	63
2.	Biologie moléculaire	63
2.1.	Purification des cellules mononucléées.....	63
2.2.	Extraction de l'ADN génomique.....	63
2.3.	Extraction des ARN totaux.....	64
2.4.	Reverse transcription (RT)	64
2.5.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	64
2.6.	Electrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose	64
2.7.	Réaction de polymérisation en chaîne nichée : <i>Nested-PCR</i>	65
2.8.	Génotypage d'un <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> connu	65
2.9.	Séquençage des produits de PCR	65
2.10.	PCR en temps réel	66
3.	Méthodes biochimiques et analytiques.....	66
3.1.	Cytométrie en flux.....	66
3.2.	Test MTT.....	67
3.3.	Immunocytochimie.....	68
3.4.	Immunohistochimie	68
3.5.	Dosage immunologique en ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	68
3.6.	<i>Cytokine array</i>	69
	RESULTATS	70
	ARTICLE N°1	70
	Le polymorphisme nucléotidique 6936A/G comme biomarqueur possible du risque thrombotique chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique	70
	ARTICLE N°2	78
	Production d'une thrombopoïétine fonctionnelle par une lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien	78
	ARTICLE N°3	
	Le récepteur endothélial de la protéine C exprimé par les cellules du cancer de l'ovaire en tant que biomarqueur possible du début de la pathologie cancéreuse.....	103
	ARTICLE N°4	113
	Le récepteur plasmatique endothélial de la protéine C influence la réponse immunitaire innée dans le cancer de l'ovaire en diminuant la population de cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules auxiliaires TH17	113
	ARTICLE N°5	124
	La protéine C activée promeut la migration des cellules de cancer de l'ovaire et limite la coagulabilité dans le microenvironnement tumoral	124

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140
ANNEXES	154
PUBLICATION N°1	155
Stratégies ciblant les protéines d'apoptose pour améliorer la thérapie de la leucémie lymphoïde chronique	155
PUBLICATION N°2	163
Nouvelle dimension dans le ciblage thérapeutique de la famille des protéines BCL-2	163
PUBLICATION N°3	174
Premiers "BH3 mimetics" ciblant MCL-1 comme thérapeutiques potentiels pour viser les traitements du cancer.....	174

Résumé

Il est désormais admis que le caractère invasif d'une tumeur est lié, non seulement, au génotype des cellules cancéreuses, mais aussi à leurs interactions avec le microenvironnement tumoral (MT). Au sein du MT, une déstabilisation de la matrice stromale favorise la progression tumorale et la dissémination métastatique. Le remaniement de la matrice extracellulaire est souvent piloté par des enzymes protéolytiques. En revanche, les effets de l'inhibition de la formation de cette matrice sont peu étudiés. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à la protéine C (PC) et son récepteur endothélial (EPCR) et à leur rôle dans la tumorigenèse des leucémies et des cancers solides.

L'EPCR est exprimé par un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses. Il est aussi détecté dans le compartiment tumoral chez des patients atteints de pathologie tumorale. Son gène est hautement conservé. Il possède cependant plusieurs polymorphismes. Un de ces SNPs (*single nucleotide polymorphism*) - 6936A/G - se traduit par la libération d'une forme soluble circulante de l'EPCR (EPCRs) résultant de la protéolyse de la forme membranaire. Chez des patients leucémiques, une fréquence élevée du SNP 6936A/G est observée et associée à la survenue de thrombose.

D'autre part, l'EPCR est détecté *in situ* dans la majorité des biopsies tumorales testées et sécrété en grande quantité dans les ascites. La fixation de la PC sur l'EPCR et son activation augmentent la survie et le potentiel migratoire des cellules cancéreuses. Aussi, la PCA est capable de moduler, par communication paracrine, la sécrétion de plusieurs interleukines et cytokines. Ainsi, la stimulation de cellules du cancer de l'ovaire par la PCA induit la synthèse d'une thrombopoïétine ovarienne fonctionnelle. Cette cytokine étant régulatrice de la production de plaquettes, la PCA semble être de nouveau à l'interface entre troubles de l'hémostase et pathologie cancéreuse.

L'élucidation du rôle complexe de la PCA et de son récepteur endothélial dans la carcinogenèse permettrait non seulement de dégager de nouvelles approches thérapeutiques, mais aussi de prévenir le risque de thrombose associée au cancer et d'en réduire la morbidité.

Abstract

It is now recognized that the invasiveness of tumor cells is not only related to the genotype of these cells but also to their interaction with tumor microenvironment (TM). Within the TM, stromal matrix destabilization promotes tumor progression and metastatic dissemination. The extracellular matrix remodeling is often driven by proteolytic enzymes. However, few studies have investigated the effects of an impairment of the matrix formation. Given these facts and circumstances, we were interested in protein C (PC) and its endothelial receptor (EPCR), as well as in their role in tumorigenesis in leukemia and solid cancers.

EPCR is expressed by a wide range of cancer cell lines. It is also detected within the tumor compartment in patients with malignant diseases. EPCR gene is highly conserved but nevertheless contains polymorphisms. One of these SNPs (single nucleotide polymorphism) - 6936A/G – reflects – in the release of a soluble circulating form (EPCRs) resulting from the proteolysis of membrane-associated form. In leukemic patients a high incidence of 6936A/G SNP is observed and associated with thrombosis events.

Moreover, EPCR is detected in the majority of tumor biopsies and is abundantly secreted in ascitic fluid. The PC attachment to EPCR and its activation promotes cell survival and migratory potential of tumor cells. Also, APC is able to modulate, by a paracrine manner, interleukins and cytokines secretion. Thus, ovarian cancer cells stimulation by APC induces the synthesis of a functional ovarian thrombopoietin. As this cytokine has a regulatory effect on platelet production, APC may be once again at the interface between hemostasis disorders and coagulation.

The elucidation of the intricate role of APC and its endothelial receptor could permit not only to identify new therapeutic approaches but also to prevent cancer-associated thrombosis risk and to decrease morbidity in cancer patients.

Liste des abréviations

a	activé
AA	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ag	antigène
ApoER2	apolipoprotéine E
ARN	acide ribonucléique
AT	Antithrombine
AVK	anti-vitamines K
BMC	<i>bone-marrow-derived angiogenic cell</i>
CAFs	<i>cancer Associated Fibroblasts</i> / fibroblastes associés au cancer
Cellule Treg	cellule T régulatrice
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
Col-I	collagène de Type I
Col-IV	collagène de Type IV
Col-XVIII	collagène de Type XVIII
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i>
delta Ct	cycle seuil ou Threshold Cycle
dNTP	désoxyribonucléotides
E-Cad	E-cadhérine
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EP	embolie pulmonaire
EPCR	<i>endothelial protein C receptor</i> / récepteur endothélial de la protéine C
EPCRs	EPCR soluble
EPO	érythropoïétine
ERK	<i>extracellular signal regulated Kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FT	facteur tissulaire
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HBPM	héparines de bas poids moléculaire
HIF-1α	<i>hypoxia Inductible Factor-1α</i>
IGF	<i>insuline-like growth factor</i>
IGF-BP	<i>insuline-growth-factor-binding protein</i>
IL	interleukine
IL-2Rα	récepteur α de l'interleukine-2
JAK	Janus Kinase
KASPar	<i>Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system</i>
LAL	leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	leucémie aiguë myéloblastique
Lam-5	lamine-5
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LMC	leucémie myéloïde chronique
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDSC	cellule myéloïde suppressive
MEC	matrice extracellulaire
MM	masse molaire
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i>
MPLV	virus murin de leucémie myéloproliférative
MPM	mésothéliomes pleuraux malins
MPs	microparticules
MRP-1	<i>multidrug resistance protein-1</i>
MTEV	maladie thromboembolique veineuse
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NACO	nouveaux anticoagulants actifs par voie orale
Nested-PCR	réaction de polymérisation en chaîne nichée
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NK	natural killer
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i> / inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PAR	<i>protease-activated receptor</i>
pb	paire de bases
PC	protéine C

PCA	protéine C activée
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
P-gp	<i>P-glycoprotein</i>
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PK	prékallicréine
PKa	kalllicréine
PL	phospholipides
PIGF	<i>placental growth factor</i>
RT	reverse transcription
S1P1	sphingosine-1-phosphate
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>
TACS	<i>tumor-associated collagen signature</i>
TAFI	<i>thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>
TAMs	<i>tumor-associated macrophages</i> / macrophages associés aux tumeurs
TFPI	<i>tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TGF-α	<i>transformin-growth factor-α</i>
TGF-β	<i>transformin-growth factor-β</i>
TM	thrombomoduline
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
t-PA	<i>tissue-Plasminogen Activator</i> / activateur tissulaire du plasminogène
TPO	thrombopoïétine / <i>thrombopoietin</i>
TTIH	thrombopénie/thrombose induites par l'héparine
TVP	thrombose veineuse profonde
u-PA	<i>urokinase-Plasminogen Activator</i> / urokinase
uPAR	<i>urokinase plasminogen activator receptor</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vWF	<i>von Willebrand factor</i> / facteur de von Willebrand
α1-PI	α 1-proteinase inhibitor

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de risque de la thrombose.	5
Tableau 2 : Association entre thrombose veineuse et cancer un an après le diagnostic en fonction de l'organe atteint	10
Tableau 3 : Résumé des facteurs de risque impliqués dans l'association entre cancer et thrombose.....	15
Tableau 4 : Principaux composants de la matrice extracellulaire et leurs fonctions.....	22
Tableau 5 : Principales caractéristiques des facteurs de coagulation.....	30
Tableau 6 : Expression et fonctions des principales isoformes de la thrombopoïétine.....	55

Liste des figures

Figure 1 : Taux de thrombose veineuse (par 1000 patients-années) par type de cancer contre la mortalité relative pour chaque type de cancer à un an.	9
Figure 2 : Incidence cumulée (%) de thrombose veineuse à deux ans par type et stade du cancer	11
Figure 3 : Triade de Virchow appliquée au cancer.	15
Figure 4 : Composante cellulaire du microenvironnement tumoral.....	18
Figure 5 : Différentes facettes de l'inflammation et son rôle dans la tumorigenèse.....	20
Figure 6 : Mise en place d'un microenvironnement suppresseur.	21
Figure 7 : Remodelage des fibres de collagène de la MEC au cours de la tumorigenèse.....	23
Figure 8 : Fonctions des MMPs dans la progression tumorale.	24
Figure 9 : Modèle moderne de l'hémostase basé sur les cellules.....	31
Figure 10 : Mécanismes moléculaires de la fibrinolyse.....	32
Figure 11 : Rôle de la protéine C et son récepteur dans l'inhibition de la fibrinoformation....	33
Figure 12 : Schéma de la coagulation, la fibrinolyse et l'inhibition de la fibrinoformation....	34
Figure 13 : Rôle des microparticules dans la progression tumorale	38
Figure 14 : Interactions des cellules tumorales avec l'hémostase participant à l'hypercoagulabilité, l'angiogenèse et la prolifération tumorale.	39
Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la protéine C	41

Figure 16 : Structure tridimensionnelle de l'EPCR	42
Figure 17 : Structure du gène codant pour l'EPCR et ses haplotypes	44
Figure 18 : Fonction anticoagulante du système PC/EPCR.....	45
Figure 19 : Fonction cytoprotectrice et anti-inflammatoire du système PC/EPCR.	47
Figure 20 : Propriétés et effets de l'EPCRs.	49
Figure 21 : Effets multiples de l'EPCR dans le cancer.....	51
Figure 22 : Illustration schématique du gène humain de la thrombopoïétine	54
Figure 23 : Boucle de régulation thrombopoïétine/plaquettes.	56

INTRODUCTION

En 1823, Jean-Baptiste Bouillaud, un physicien français, publia un premier rapport suggérant l'existence d'un lien entre cancer et thrombose. Les observations fournies par Armand Trousseau, en 1865, furent la deuxième preuve plaidant pour une association forte entre pathologie cancéreuse et thrombose veineuse. Depuis, le nombre de travaux d'études, visant à mieux définir et comprendre cette relation, ne cesse d'augmenter. De nos jours, le lien épidémiologique entre thrombose et cancer est bien établi. D'une part, le cancer constitue un facteur de risque majeur de la maladie thrombo-embolique veineuse (MTEV), d'autre part, la thrombose peut révéler un cancer.

En effet, la thrombose est une complication fréquente de la pathologie cancéreuse. Elle représente la deuxième cause de décès chez les patients atteints d'un cancer.

Le traitement de la MTEV, dans un contexte tumoral, est compliqué, puisque le risque hémorragique induit par les anticoagulants est souvent augmenté par les traitements anticancéreux. De plus, les patients atteints d'un cancer ne partagent pas tous le même risque de développer une thrombose.

L'identification de marqueurs biologiques s'avère cruciale pour prédire la survenue de thrombose chez les patients atteints d'un cancer et proposer un traitement ciblé et personnalisé en fonction du profil de chaque patient.

Nous détaillons, dans cette partie, les différents aspects qui caractérisent l'association entre thrombose et cancer.

En premier lieu, nous définissons chacune des deux pathologies et proposons une synthèse de leurs données épidémiologiques descriptives respectives. Nous donnons une vue d'ensemble sur l'association entre cancer et thrombose et rappelons les facteurs étiologiques de cette relation.

Ensuite, nous nous intéressons à la biologie de la pathologie cancéreuse, au microenvironnement tumoral et aux différents processus impliqués dans le développement de la maladie. Puis, nous détaillons les différents axes de la coagulation et ses diverses composantes biologiques.

Dans la suite, nous expliquons, d'une manière plus profonde, le lien entre cancer et hypercoagulabilité. Nous décortiquons les mécanismes impliqués dans cette association et les différents facteurs moléculaires concernés.

Dans ce contexte, nous détaillons, dans un chapitre séparé, le système protéine C et son récepteur endothélial, et son rôle dans l'association entre thrombose et cancer, qui est la base de ce travail.

Enfin, nous examinons les différentes caractéristiques de la thrombopoïétine, un deuxième pilier de cette thèse.

Chapitre 1. Cancer et thrombose

1. Cancer

1.1. Définition

Le cancer est un terme général utilisé dans le cadre d'une maladie caractérisée par une division cellulaire anormale et incontrôlée. Tous les cancers sont liés à l'acquisition d'un nombre de changements survenant au niveau de la séquence d'ADN du génome d'une cellule. Ces changements génétiques s'accumulent au cours du temps. Les facteurs génétiques héréditaires et les agents mutagènes d'origine exogène ou endogène constituent la principale cause de la division anarchique de la cellule cancéreuse (Stratton et al, 2009). Les cellules du cancer dérivent toutes d'une cellule initiatrice, dite cellule clone, et peuvent former une tumeur maligne. Ce processus est appelé cancérogenèse et peut être décrit en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. Lors de l'étape d'initiation, des modifications génétiques irréversibles sont à l'origine de la transformation de la cellule initiatrice. Ensuite, la cellule initiée se développe d'une manière incontrôlée et prolifère en formant un groupe de cellules identiques qui constituent les cellules pré-néoplasiques. Au cours de la progression tumorale, le phénotype néoplasique est acquis à travers des mécanismes génétiques et épigénétiques (Shacter and Weitzman, 2002).

Les foyers pré-cancéreux, démunis en partie de leur caractère différencié et dotés de propriétés invasives, se développent localement pour former la tumeur puis se propagent *via* le sang ou la lymphe vers d'autres tissus et organes pour former les métastases (Oliveira et al, 2007). En effet, la progression tumorale est caractérisée par une irréversibilité, une instabilité génétique et des modifications au niveau des caractéristiques biochimiques, métaboliques et morphologiques des cellules (Pitot and Dragan, 1991 ; Klaunig et al, 2000 ; Dixon and Koprass, 2004). La tumeur devient indépendante des signaux prolifératifs, insensible aux mécanismes de la régulation de la croissance, capable d'esquiver les voies de l'apoptose, de se diviser d'une manière infinie et d'induire l'angiogenèse. Toutes ces propriétés acquises favorisent l'invasion des cellules tumorales et la formation des métastases (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.2. Épidémiologie

Le cancer est un problème majeur de santé publique. Cette pathologie est à l'origine de 7,6 millions de décès en 2008, soit 13% de la mortalité mondiale. Selon *GLOBOCAN* 2012, la base de données en ligne du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC),

l'incidence de la pathologie cancéreuse a atteint 14,1 millions de nouveaux cas et à 8,2 millions de décès, par rapport à 12,7 millions et 7,6 millions en 2008, respectivement. Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, ce chiffre ne cessera de croître pour dépasser les 11 millions de décès d'ici 2030. Les taux de mortalité les plus importants, par type de cancer, sont retrouvés dans les cancers du poumon, de l'estomac, du foie, du colon et du sein (Bray et al, 2013 ; Ferlay et al, 2015).

2. Thrombose

2.1. Définition

La thrombose est le processus pathologique qui aboutit à formation d'un caillot de sang (thrombus) par l'interaction de la paroi vasculaire avec les plaquettes et la fibrine. La formation du clou hémostatique a pour conséquence l'entrave de la circulation sanguine dans une veine (thrombose veineuse) ou une artère (thrombose artérielle). La thrombose artérielle est associée à une rupture d'une monocouche de cellules endothéliales. Cela résulte en l'exposition des cellules sub-endothéliales, la sécrétion des facteurs procoagulants, l'activation et l'agrégation des plaquettes. Le système vasculaire est à débit rapide et l'accumulation des plaquettes et le dépôt de fibrine mènent à la formation d'un thrombus intravasculaire riche en plaquettes (Wolberg et al, 2012). La thrombose artérielle peut être à l'origine d'une ischémie. Au contraire la thrombose veineuse, est associée à une hypercoagulabilité du plasma et serait déclenchée par des facteurs procoagulants exprimés par un tissu intact. Elle est caractérisée par un flux sanguin à débit ralenti et la formation d'un thrombus riche en fibrine et en globules rouges. Elle se base sur l'activation de la machinerie de la coagulation et peut provoquer une stase veineuse et mener à une phlébite. Dans les deux cas, le terme embolie désigne le détachement du caillot et sa circulation dans le sang vers d'autres organes. Le caillot peut obstruer la circulation au niveau du poumon (embolie pulmonaire), du cerveau (accident vasculaire cérébrale) ou conduire à un infarctus du myocarde (Lowe, 2003).

2.2. Facteurs de risque

Au XIX^{ème} siècle, Rudolf Virchow était le premier à proposer une triade regroupant les facteurs de prédisposition à la formation d'un thrombus (Lip et al, 2000). La triade de Virchow est souvent évoquée pour expliquer les mécanismes pathophysiologiques impliqués dans l'apparition d'une thrombose. Elle se base sur les perturbations liées au flux sanguin (stase veineuse), à la composition du sang (hypercoagulabilité) et à la paroi vasculaire (atteinte endothéliale). Elle a été faite sur la base d'observations dans le cas d'une thrombose

veineuse, mais le même schéma a été appliqué dans le cadre d'une thrombose artérielle. (Jerjes-Sanchez, 2005).

La triade de Virchow révisée fait, aussi, la distinction entre facteurs de risque acquis, génétiques, ou mixtes. Une synthèse des facteurs de risque prédisposant à une thrombose est représentée dans le tableau suivant :

Thrombose	
Veineuse	Artérielle
Facteurs génétiques & héréditaires :	Facteurs génétiques (Rader, 2015)
- Déficience en antithrombine III	- Variations de loci génétiques
- Facteur V Leiden	Chromosome 9p21.4
- Déficience en Protéine C	Gène CXCL12
- Déficience en Protéine S	Gène HDAC9 (Histone désacétylase 9)
- Mutation du gène de la prothrombine	Gène LPA (Lipoprotéine A)...
- Anomalies de la fibrinolyse	Maladies de la paroi artérielle :
Facteurs acquis	- Athérosclérose, vascularites
- Stase due à :	- Diabète sucré, hypertension
Immobilisation/alitement prolongés	Hyperactivité plaquettaire
Etat post-opératoire	- Induction par l'héparine
Grossesse et période post-partum	- Thrombopénie/thrombose (TTIH)
- Cancer	- Syndromes myéloprolifératifs
- Syndrome néphrotique	Anticorps antiphospholipides
- Syndromes myéloprolifératifs	Hyperhomocystéinémie
- Anticorps antiphospholipides	Tabagisme chronique
- Maladie intestinale inflammatoire	Contraception orale
- Age, obésité...	Age, obésité...

Tableau 1 : Facteurs de risque de la thrombose (Rumbaut and Thiagarajan, 2010).

La thrombose veineuse et l'athérombose ont été généralement considérées comme deux processus très distincts – et ce, d'un point de vue mécanistique et clinique. Cela dit, plusieurs études épidémiologiques suggèrent l'existence d'une association entre les deux pathologies (Andrei and Andercou, 2014). Si différents mécanismes biologiques semblent être impliqués dans cette association, des facteurs de risque communs entre les deux types de thrombose pourraient, aussi, jouer un rôle majeur dans ce lien (Lowe, 2008).

2.3. Epidémiologie

Les principales manifestations pathologiques d'une thrombose sont la cardiopathie ischémique (angine de poitrine, infarctus du myocarde), l'accident vasculaire cérébral

ischémique et la maladie thromboembolique veineuse (MTEV : thrombose veineuse profonde (TVP) et embolie pulmonaire (EP)).

L'Organisation Mondiale de la santé, dans son rapport d'étude sur la charge de morbidité dans le monde en 2010 (*The Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study* (GBD 2010)), déclare que la cardiopathie ischémique et l'accident vasculaire cérébral, à eux deux, sont à l'origine de près d'un décès sur 4 dans le monde (ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day, 2014).

Malheureusement, les données concernant la thrombose veineuse sont peu disponibles et moins claires et tous les rapports publiés constituent la synthèse de travaux de recherche effectués sur des populations données et des régions précises du monde (Liao et al, 2014).

Une étude, effectuée par Cohen et al (Cohen et al, 2007), donne une estimation sur l'incidence de MTVE dans l'union européenne en 2004 (population de 454.4 millions de personnes). Les résultats rapportés indiquent que 684 019 cas de TVP et 434 723 cas d'EP sont enregistrés au cours de cette année. Le nombre de décès causés par la MVTE, dans cette population, concerne 543 454 personnes.

Chapitre 2. Cancer et thrombose – une association forte

1. Etat de l'art et épidémiologie

L'association entre cancer et thrombose est connue depuis plus d'un siècle et demi. Le médecin français Jean-Baptiste Bouillaud fut le premier à présenter un rapport évoquant l'hypothèse d'un lien entre le cancer et la thrombose (Bouillard and Bouillaud, 1823). En 1865, un clinicien français, Armand Trousseau, rapporta les premières observations mettant en évidence l'association entre cancer gastrique et thrombose veineuse (Trousseau, 1865). L'ironie du sort a fait que Trousseau se fut auto-diagnostiqué cette association et y succomba quelques mois après, en 1867. L'association entre cancer et thrombose a été appelée, par la suite, syndrome de Trousseau.

Les observations de Trousseau en 1865, décrivant le lien étroit entre pathologie néoplasique et thrombose veineuse, ont été validées ultérieurement par des études cliniques prospectives (Zwicker et al, 2007 ; Timp et al, 2013). Ces études ont fait de la pathologie cancéreuse un modèle d'hypercoagulabilité acquise. En effet, il s'agit d'une relation bilatérale puisque le cancer prédispose à la survenue d'une thrombose et la thrombose peut révéler un cancer. Le risque de MTEV est important chez le patient atteint d'un cancer. Il est multiplié par un facteur de risque relatif variant de 4 à 7 par rapport à la population générale (Timp et al, 2013) et doublé en cas de chimiothérapie associée (Chew et al, 2006). Le diagnostic d'un cancer est associé à la survenue inopinée d'une MVTE dans 20 à 30% des cas d'un premier épisode thrombotique (Timp et al, 2013). Aujourd'hui, la thrombose constitue la deuxième cause de décès chez les patients atteints d'un cancer (après la pathologie cancéreuse elle-même). De plus, la survenue de thrombose, dans un contexte néoplasique, affecte significativement la qualité de vie des patients. En effet, la MVTE nécessite un traitement d'anticoagulants à long terme. En outre, les patients atteints d'un cancer et d'une MTEV présentent un risque accru de récurrence de MTEV – qui peut atteindre les 21% même en cas de traitement anticoagulant – et aussi de complications hémorragiques majeures (environ 12% des cas) (Khorana, 2012).

Le cancer peut prédisposer à une thrombose inopinée, mais aussi la survenue de thrombose peut révéler un cancer occulte dans 10 à 25 % des cas. Le risque de découverte d'un cancer est multiplié par un facteur de 2 à 3 fois au cours de la première année d'une thrombose veineuse profonde sans diagnostic connu de cancer. Le risque de découverte d'une

néoplasie est multiplié par 10 en cas de récurrence de MVTE (Prandoni et al, 1992 ; Lee and Levine, 2003).

En ce qui concerne l'incidence de thrombose artérielle dans le cancer, et contrairement à la thrombose veineuse, il existe très peu de données épidémiologiques. En plus, les études réalisées sont souvent à l'origine de résultats conflictuels (Blann and Dunmore, 2011). Mettre en évidence une telle association est difficile, d'autant plus que les mécanismes d'hypercoagulabilité paranéoplasiques sont très complexes, caractérisés par une importante variabilité interindividuelle et non complètement élucidés (Schwarzbach et al, 2012).

2. Traitements anticoagulants dans un contexte tumoral

L'utilisation prolongée des héparines de bas poids moléculaire (HBPM) est considérée comme étant le traitement curatif de référence chez les patients atteints d'un cancer. L'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé – appelée maintenant Agence nationale de sécurité du médicament – souligne dans un rapport publié en 2009 l'efficacité des HBPM dans la prévention de la récurrence de la MVTE chez les patients cancéreux; et ce, sans majoration du risque hémorragique. Cette efficacité est multipliée d'un facteur de deux dans le cas d'un traitement par les HBPM par rapport aux anti-vitamines K (AVK). Malheureusement, les recommandations internationales quant à l'utilisation des HBPM ne sont respectées que dans 50% des cas, pour diverses raisons incluant le mode d'administration de l'anticoagulant (injection sous-cutanée pour les HBPM et voie orale pour les AVK), le coût ou encore l'habitude de prescrire les AVK dans la pratique médicale (Mahé et Chidiac, 2014). Pourtant, les AVK sont connus pour leur efficacité thérapeutique limitée, leurs possibles interactions alimentaires et médicamenteuses, outre la nécessité d'assurer un contrôle régulier des effets du traitement et d'ajuster sa dose.

Au cours des dernières années, une nouvelle génération d'anticoagulants actifs par voie orale a émergé. Il existe deux types de nouveaux anticoagulants actifs par voie orale (NACO): les inhibiteurs spécifiques du facteur Xa (rivaroxaban, edoxaban et apixaban) et les inhibiteurs de la thrombine (dabigatran). Il était attendu que les NACO améliorent le traitement antithrombotique, notamment chez les patients atteints d'un cancer. Mais leurs interactions pharmacologiques avec les médicaments anti-tumoraux rendent leur utilisation compromettante et remettent en question leur efficacité et la sécurité de leur administration (Gerotziapas et al, 2014). Toutefois, il semble indispensable de réaliser des études comparatives entre les HBPM et les NACO sur des populations de patients atteints de cancer,

pour une meilleure évaluation de l'efficacité et la sécurité de ces traitements (Franchini et al, 2015).

3. Facteurs de risque de thrombose chez les patients atteints d'un cancer

Le risque de thrombose n'est pas le même chez tous les patients atteints d'un cancer. Il existe des facteurs de risque habituels de la thrombose comme l'âge, l'obésité, l'hospitalisation et l'immobilité prolongée, la chirurgie. La deuxième série de facteurs est spécifique aux patients cancéreux comme le type du cancer et son stade, la chimiothérapie et la thérapie hormonal. Dans la partie qui suit, nous détaillons certains de ces facteurs.

3.1. Localisation

Plusieurs études montrent qu'il existe un lien entre la thrombose et le cancer en fonction de l'organe atteint (Tableau 2). Cela dit, les résultats varient en fonction de l'étude (Figure1), probablement à cause de la non-standardisation des méthodologies utilisées. Et même si certains cancers semblent être fortement associés à la survenue de thrombose, il est à noter que finalement, les tumeurs les plus associées restent celles qui sont les plus fréquentes dans la population étudiée.

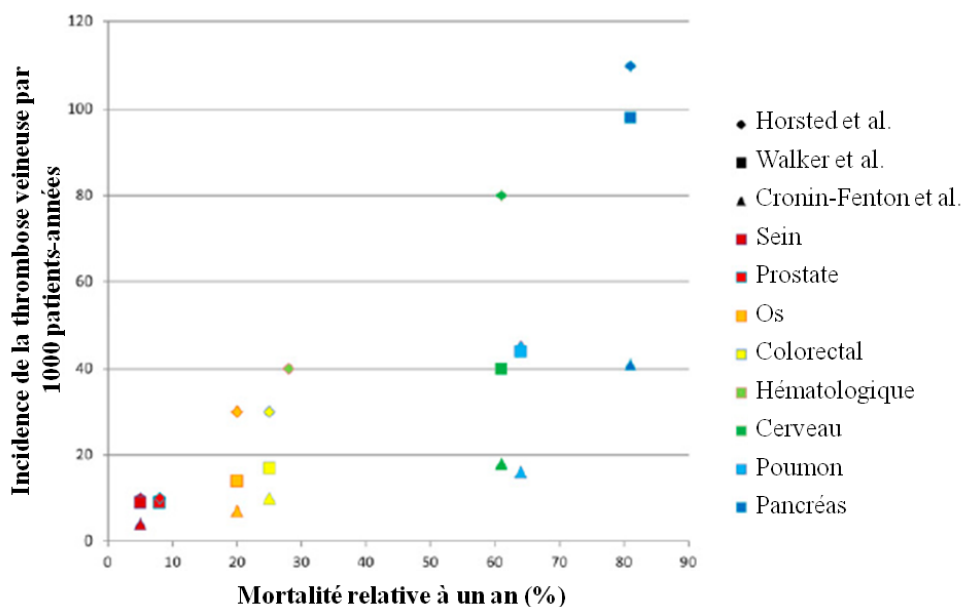


Figure 1 : Taux de thrombose veineuse (par 1000 patients-années) par type de cancer (Horsted et al, 2012 ; Walker et al, 2013 ; Cronin-Fenton et al, 2010) contre la mortalité relative pour chaque type de cancer à un an (Timp et al, 2013).

Cancer	N	TVP à 1 an Incidence cumulée (%)	TVP à 1 an Tous stades/100 patients-années (%)	TVP à 1 an Avec métastases/100 patients-années (%)
Pancréas	6524	5,3	14	28,3
Gliome	3775	6,9	11,1	6,1
LAM	2292	3,7	7,4	7,4
Estomac	5766	4,5	7,4	16,7
Oesophage	2491	3,6	5,8	10,4
Rein	4891	3,5	4,3	12,1
Poumon	44 497	2,4	4,3	7,4
Ovaire	5707	3,3	4,2	5,5
Foie	2312	1,7	4,1	7,2
Lymphome	9003	2,8	3,7	3,9
LLC	2023	2,7	3,1	2,8
LAL	1058	2,6	3,1	3,3
Colôn	32 611	2,3	2,7	5,7
LMC	951	1,5	1,8	1,6
Vessie	7138	1,5	1,7	1,6
Utérus	8721	1,6	1,7	9,3
Prostate	51 362	0,9	1	1,3
Sein	44 707	0,9	0,9	3,8
Mélanome	9497	0,5	0,5	5,3

Tableau 2 : Association entre thrombose veineuse et cancer un an après le diagnostic en fonction de l'organe atteint (White et al, 2007).

3.2. Stade du cancer

Le risque de survenue de thrombose est d'autant plus important, quand le stade de la pathologie cancéreuse est avancé. Quel que soit le type du cancer, le risque est multiplié d'un facteur de 1,4 à 21,5 dans les cancers métastatiques par rapport au stade localisé (Figure 2) (Chew et al, 2006).

3.3. Histologie

Selon une étude autopsique, les patients atteints d'un adénocarcinome sont les plus touchés par le risque thrombotique. En effet, parmi 147 patients suivis, 23% des patients atteints d'un adénocarcinome ont développé au moins un épisode d'embolie pulmonaire, contre 9% de patients présentant une autre histologie (Shen and Pollak, 1980).

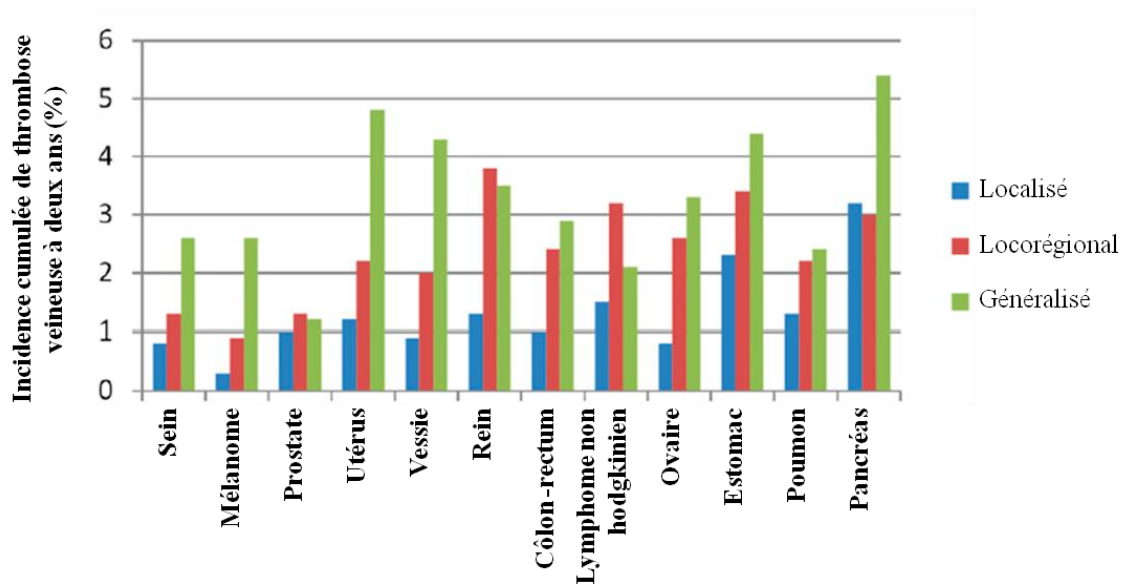


Figure 2 : Incidence cumulée (%) de thrombose veineuse à deux ans par type et stade du cancer (Timp et al, 2013 ; Chew et al, 2006)

3.4. Délai de concomitance des deux pathologies

L'association entre thrombose et cancer dépend également de l'intervalle de temps entre la découverte du cancer et la survenue de thrombose. Cette association est plus forte lorsque la thrombose survient trois mois avant que le cancer soit diagnostiqué. En revanche, le risque de découverte d'un cancer diminue après le sixième mois de l'apparition d'un épisode thrombotique chez le patient. En effet, après un délai de six mois, le risque d'apparition d'un cancer est le même que chez des patient n'ayant pas développé de thrombose. Aussi, le risque de survenue de thrombose est plus élevé au début de la pathologie cancéreuse (Blom et al, 2005).

3.5. Hospitalisation

L'hospitalisation augmente le risque de thrombose chez les patients atteints d'un cancer, particulièrement dans le cas de chimiothérapie associée ; et cela, par rapport à des patients hospitalisés sans cancer. La mortalité au sein des patients cancéreux hospitalisés est également augmentée (Khorana et al, 2006).

3.6. Chirurgie et traitements

Le risque de développer une MTEV post-opératoire est multiplié par deux par rapport aux patients sans cancer. Également, une embolie pulmonaire post-opératoire peut être quatre fois plus meurtrière chez les personnes atteintes d'un cancer par rapport aux patients non

cancéreux. L'âge avancé du patient, la complexité et la durée de la procédure chirurgicale, ainsi que l'immobilisation post-opératoire prolongée peuvent, aussi, majorer le risque de thrombose dans un contexte néoplasique (Haddad and Greeno, 2006).

La pose d'un cathéter veineux central (CVC) peut favoriser la survenue de thrombose. Trente à 60% de poses de cathéter sont suivis par la formation d'un thrombus. Seulement, 5% de ces thromboses sont symptomatiques (Debourdeau et al, 2008).

Le risque de thrombose est, également, augmenté en cas de thérapie antinéoplasique (thérapie hormonale, chimiothérapie, radiothérapie). Plusieurs études cliniques mettent en évidence la relation causale entre les thérapeutiques antinéoplasiques et la thrombose chez les femmes atteintes du cancer du sein. Au premier stade, moins de 1% de ces patientes développent une thrombose. Ce taux augmente jusqu'à 2-10% en cas de chimiothérapie associée. Une étude prospective révèle que les femmes, atteintes du cancer du sein au deuxième stade et traitées par chimiothérapie, présentent un risque de thrombose allant jusqu'à 17% (Haddad and Greeno, 2006).

Aussi, la variabilité du risque de thrombose en fonction du type de la molécule constitue une évidence, même si les mécanismes sont mal connus pour certains traitements. Toujours chez les femmes atteintes du cancer du sein, l'incidence de thrombose dans le cadre d'un traitement par le Cyclophosphamide, le Methotrexate et le Fluorouracile associés au Tamoxifène est de 13,6% contre 2,6% dans le cas d'un traitement par le Tamoxifène seul (Cuzick et al, 2003). Chez les patients atteints de myélome, la combinaison entre Thalidomide et Dexaméthasone améliore la réponse thérapeutique (50% *versus* 30% si le traitement se base sur le Thalidomide seul). Cela dit, cette association peut être à l'origine d'une hypercoagulabilité de l'ordre de 10 à 20% contre 3%, si le Thalidomide est utilisé seul. Plus flagrant, l'incidence de thrombose passe à 20-40% en cas d'association entre le Thalidomide et le Doxorubicine (Accaoui et al, 2007).

Enfin, les facteurs de croissance, comme l'érythropoïétine recombinante, le *granulocyte-macrophage colonystimulating factor* et le *granulocyte colonystimulating factor*, peuvent aussi majorer le risque de thrombose chez les patients atteints d'un cancer (Bokemeyer et al, 2004).

3.7. Récidive

Dans un contexte néoplasique, le risque de récurrence de MTVE, considéré comme un échec de traitement, est augmenté d'environ 3 fois par rapport à des patients sans cancer. Ce risque est doublé chez les patients traités par chimiothérapie par rapport à ceux non traités

(Schulman et al, 2015). La récurrence de la MTVE, chez des patients ayant un cancer évolutif, dépend, également, du type du cancer et de son stade puisqu'elle est nettement plus importante au cours de la dissémination métastatique (Prandoni et al, 2002). Pour résumer, la récurrence de MTVE demeure un problème majeur chez les patients atteints d'un cancer; et cela, même au cours du traitement anticoagulant.

Inversement, et comme il s'agit d'une relation bilatérale, il est intéressant de noter que le risque relatif de diagnostic de cancer est multiplié par 2,6 pour les patients avec récurrence de MTVE par rapport aux patients sans récurrence (Prandoni et al, 2002).

4. Biomarqueurs et facteurs génétiques

Outre les facteurs de risque épidémiologiques et les traitements, certains facteurs biologiques –biomarqueurs – peuvent être associés à un risque élevé de thrombose chez les patients atteints d'un cancer et permettent d'identifier les patients à haut risque.

La prédisposition génétique à la thrombose est relativement prédominante dans la population générale. L'interaction des gènes de thrombophilie hérités avec le cancer constitue donc un fait possible et un facteur pertinent dans la majoration du risque thrombotique (Wun and White, 2009). Une étude sur une population néerlandaise, sous traitement anticoagulant, montre que le risque de thrombose est plus élevé chez les patients porteurs de mutations génétiques du facteur V de Leiden (traduite par la résistance à la protéine C activée, un anticoagulant naturel) et de la prothrombine par rapport à des patients non porteurs de ces mutations (Blom et al, 2005).

Kohrana et son équipe, dans une étude clinique (Khorana et al, 2008a), montrent que le comptage plaquettaire ou leucocytaire peut constituer un facteur prédictif de thrombose chez les patients atteints d'un cancer. En effet, si le dosage des plaquettes excède une valeur de 350×10^9 plaquettes/litre ou une valeur de 11×10^9 leucocytes/litre, le risque de thrombose chez les patients atteints d'un cancer est augmenté.

Également, un taux élevé des D-dimères (produits de dégradation de la fibrine) peut être associé à un risque élevé de cancer chez les patients ayant développé une MVTE (Wun and White, 2009). En effet, les D-dimères sont le produit de dégradation extravasculaire de la fibrine et sont capables de diffuser facilement dans la circulation sanguine, en raison de leur faible poids moléculaire. Cela explique, le taux élevé des D-dimères chez les patients atteints de pathologie cancéreuse ou de maladie inflammatoire aiguë (Mirshahi et al, 1992 ; Dirix et al, 2002). En outre, le dosage plasmatique des D-dimères est, essentiellement, utilisé comme

biomarqueur d'exclusion de la MVTE – grâce à sa valeur prédictive négative élevée (Wells et al, 2001). Il est, toutefois, intéressant de noter qu'un dosage combiné des D-dimères et de la fibrine soluble (biomarqueur de l'activation de la coagulation intravasculaire) peut constituer un outil performant et spécifique pour un diagnostic rapide de la MVTE et un suivi des effets d'une thérapie anticoagulante, notamment chez les patients atteints d'un cancer (Mirshahi et al, 2014).

La Sélectine P, une importante molécule d'adhésion des plaquettes fortement impliquée dans les interactions cellule-cellule, joue aussi un rôle dans la survenue de thrombose chez les patients cancéreux.

Les microparticules (MPs), également, constituent un facteur pronostique dans l'association thrombose et cancer. Dans un contexte tumoral, un taux élevé de MPs est associé à un risque accru de thrombose chez les patients atteints d'un cancer (Wun and White, 2009).

Enfin, plusieurs études montrent que les tumeurs sont impliquées dans l'activation de la coagulation en exprimant un taux élevé de facteur tissulaire (FT). Dans un contexte non tumoral, le FT n'est exprimé que suite à une induction par les cytokines inflammatoires ou par les lipopolysaccharides bactériens. Cependant, dans les tumeurs, le FT est exprimé d'une manière constitutive (Elyamany et al, 2014). Kakkar et al montrent, dans une étude clinique (Kakkar et al, 1995), que le taux de certains facteurs procoagulants est élevé – tout particulièrement celui du FT et du facteur VII activé – chez les patients atteints d'un cancer par rapport à ceux sans pathologie tumorale.

Les mécanismes par lesquels agissent ces biomarqueurs seront détaillés dans une section ultérieure.

5. Synthèse et triade de Virchow appliquée au cancer

Une vue d'ensemble des différents facteurs de risque impliqués dans l'association entre cancer et thrombose est présentée dans le Tableau 3.

Ainsi, les mêmes composantes de la triade de Virchow, définie en 1863, sont appliquées aux patients atteints d'un cancer. La triade de Virchow révisée est illustrée dans la Figure 3.

Caractéristiques du patient	Facteurs associés à la tumeur	Facteurs associés au traitement	Marqueurs biologiques
Sexe féminin	Site de la tumeur	Chirurgie majeure	Expression élevée du FT par cellules tumorales
Age avancé	Histologie de la tumeur	Hospitalisation	Nombre de plaquettes avant chimiothérapie > 350000/mm
Race (ethnie noire)	Stage de cancer avancé	Thérapie contre le cancer	Nombre de leucocytes avant chimiothérapie > 11000/mm
Comorbidités communes : Diabète sucré, obésité, antécédents de TVE, athérosclérose, inflammation, autres	Période initiale après diagnostic du cancer	Agents de stimulation de l'érythropoïèse	Taux de D-Dimères élevé
Mutations prothrombotiques héritées	-	Cathéters veineux centraux	Concentration plasmatique élevée de: FT, sélectine P,...

Tableau 3 : Résumé des facteurs de risque impliqués dans l'association entre cancer et thrombose (Elyamany et al, 2014).

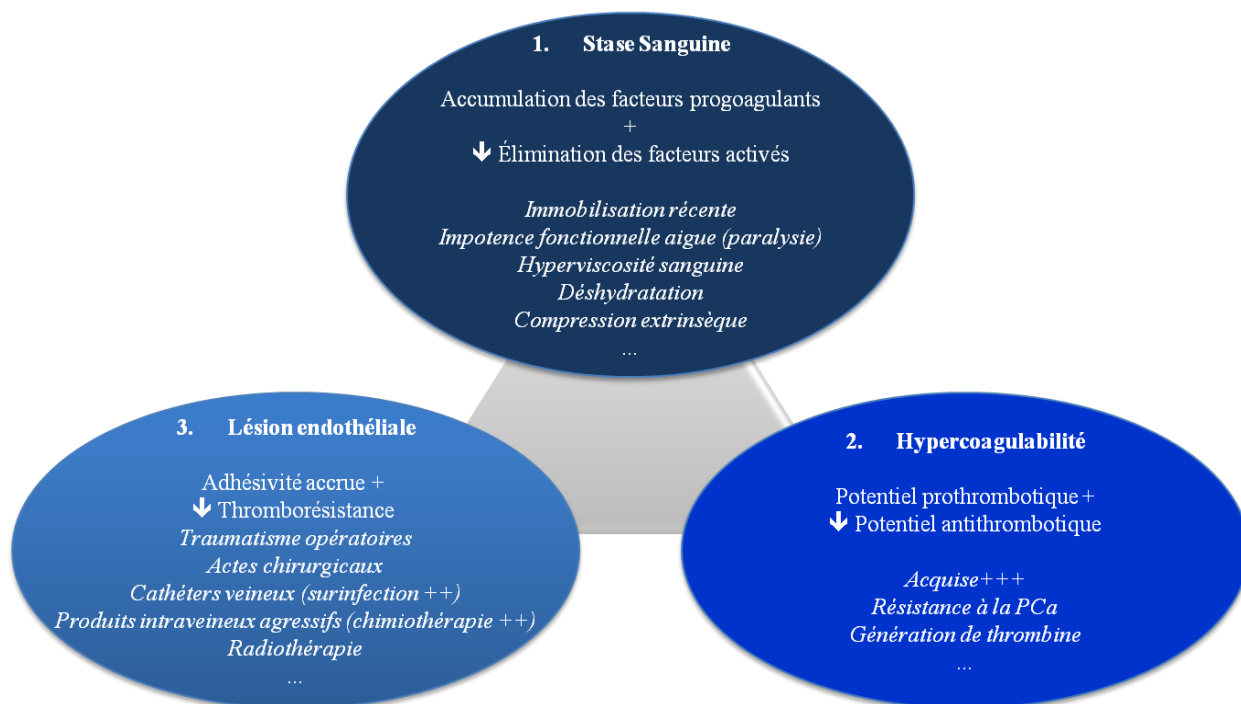


Figure 3 : Triade de Virchow appliquée au cancer (Elalamy et al, 2008).

* La stase veineuse : elle peut être liée à une obstruction veineuse par compression vasculaire extrinsèque provoquée par la tumeur elle-même ou encore à une adénopathie satellite (De Cicco, 2004). Elle peut être, également, induite par d'autres phénomènes comme l'hyperviscosité due au syndrome inflammatoire, la dysprotéïnémie, la leucémie aigüe ou le syndrome myéloprolifératif. D'autres facteurs peuvent, également, être à l'origine de la stase veineuse comme l'immobilisation et l'alitement des patients à cause d'une asthénie profonde.

* L'altération endothéliale : l'endothélium vasculaire peut être endommagé par la chimiothérapie ou par des interventions chirurgicales, ou encore par la pose de cathéters veineux. A l'échelle microscopique, les lésions endothéliales peuvent être provoquées par la libération de cytokines et de molécules d'adhésion par les cellules tumorales, favorisant ainsi un état prothrombotique.

* L'hypercoagulabilité induite par le cancer : elle est orchestrée par des interactions nombreuses et complexes à la fois. Elle est d'origine plurifactorielle. Certains facteurs sont liés à la tumeur ; d'autres sont plutôt associés à l'hémostase (Pavic et al, 2006).

La survenue d'une thrombose dans un contexte néoplasique peut être, ainsi, expliquée par l'accumulation de plusieurs particularités biologiques qui concernent essentiellement (Elalamy et al, 2008) :

- * le déséquilibre de la balance homéostatique de la coagulation ;
- * la libération de facteurs procoagulants ;
- * le déséquilibre de la fibrinolyse ;
- * la libération importante de cytokines pro-inflammatoires ;
- * les interactions intercellulaires intenses (cellules tumorales, endothéliales, plaquettes, monocytes. .) ;
- * la progression tumorale *via* l'angiogenèse et la dissémination métastatique ;
- * l'hypercoagulabilité iatrogène liée au traitement physique ou chimique antitumoral.

Chapitre 3. Biologie du cancer - le microenvironnement tumoral

1. Généralités

Le microenvironnement tumoral est un terme utilisé pour désigner les éléments de la tumeur à l'exclusion des cellules tumorales elles-mêmes. En effet, la croissance de la tumeur dépend de cette structure complexe dite aussi stroma tumoral. Le microenvironnement tumoral comprend donc une composante cellulaire non-cancéreuse de la tumeur (cellules endothéliales, fibroblastes et cellules inflammatoires), et la matrice extracellulaire (MEC) composée essentiellement de médiateurs solubles de cet environnement (cytokines et facteurs de croissance) et d'autres éléments acellulaires (carbohydrates et protéoglycanes) (Noël and Foidart, 1998).

Le microenvironnement « normal » a un rôle suppresseur de tumeur, à l'inverse du stroma tumoral qui est caractérisé par des propriétés pro-oncogéniques responsables de la transformation des cellules non tumorales en cellules cancéreuses. Réciproquement, la transformation cellulaire enclenche des modifications du microenvironnement.

Dans une tumeur, les interactions entre les différents composants du microenvironnement peuvent être à l'origine, à la fois, de signaux biochimiques et de contraintes structurelles pilotés par des facteurs de croissance, des cytokines et des molécules d'adhésion. La progression tumorale est, par conséquent, basée sur des interactions dynamiques entre cellules cancéreuses et cellules stromales (Mueller and Fusenig, 2004).

2. Composition du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement est une structure complexe. Cette complexité concerne à la fois sa composition et ses fonctions. La composante cellulaire du microenvironnement comprend des cellules non inflammatoires (fibroblastes) et inflammatoires (Figure 4).

Le microenvironnement tumoral est, aussi, caractérisé par une MEC dont la composition biochimique est différente d'une MEC « normale », et par une composante cellulaire, qui bien que non transformée, est contrôlée par les cellules tumorales.

2.1. La composante non inflammatoire

Les fibroblastes représentent la plus importante composante cellulaire du stroma. Ils jouent un rôle très important dans la synthèse de la MEC. Ils sont responsables de la sécrétion de certains de ses éléments, comme le collagène de type I, II et V, la fibronectine (Tomasek et

al, 2002). Ils sont également impliqués dans la synthèse des membranes basales en sécrétant la laminine et le collagène IV (Chang et al, 2002).

Dans un contexte physiologique, le stroma est caractérisé, généralement, par un nombre réduit de fibroblastes. Dans un contexte tumoral, le stroma comprend un nombre plus important de fibroblastes dotés d'un taux de prolifération élevé et d'une capacité d'invasion anormale. En effet, les fibroblastes tumoraux ont un phénotype différent puisqu'ils sécrètent l'alpha actine des muscles lisses (*α -smooth muscle actin : α -SMA*), de la vimentine, de la desmine et de la FAP (*fibroblast activated protein*) (Garin-Chesa et al, 1990). Ils portent le nom de myofibroblastes et leur origine n'est pas encore claire. Certaines études suggèrent que les fibroblastes tumoraux dérivent des fibroblastes normaux, sous l'action des facteurs libérés par les cellules tumorales. D'autres études supposent que les myofibroblastes proviennent des cellules musculaires lisses, ou des péricytes ou encore des cellules tumorales impliquées dans leur transition épithélio-mésenchymateuse (Rønnov-Jessen et al, 1995).

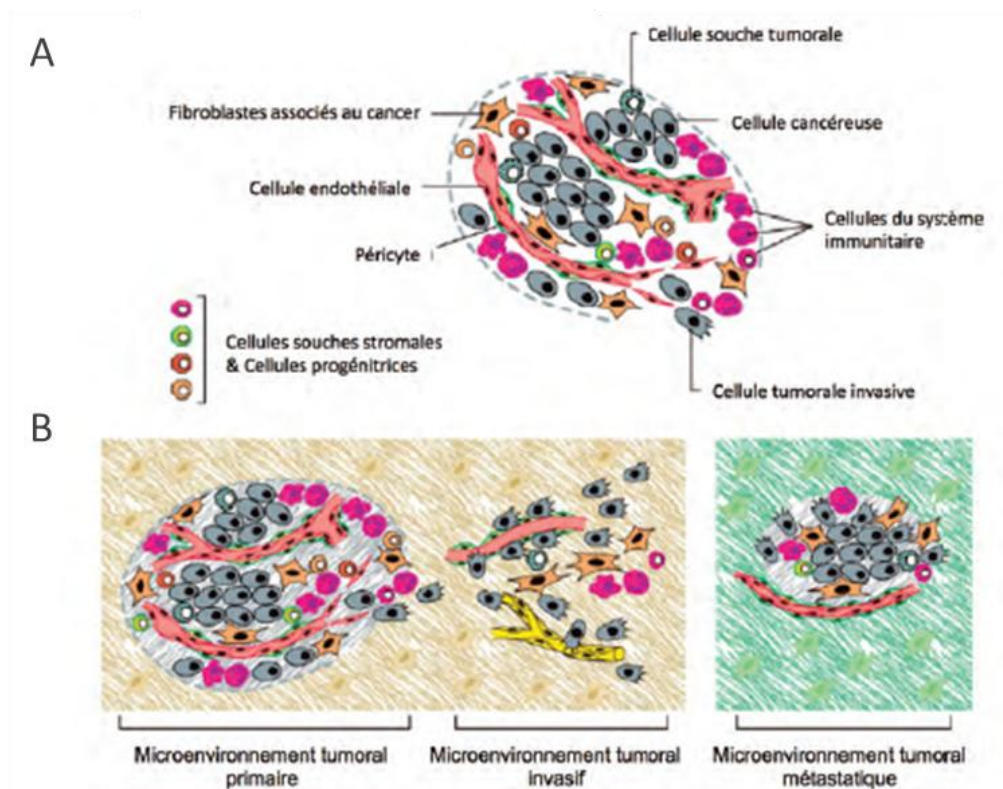


Figure 4 : Composante cellulaire du microenvironnement tumoral (adaptée de (Hanahan and Weinberg, 2011)).

A. Une tumeur solide est constituée d'un assemblage de types cellulaires distincts. Le parenchyme et le stroma tumoraux comportent différents types et sous-types cellulaires différents impliqués dans la croissance et la progression tumorale. B. Les différents microenvironnements tumoraux caractérisant le stade de la pathologie cancéreuse. L'abondance, l'organisation histologique, les caractéristiques phénotypiques des cellules stromales et les propriétés de la matrice extracellulaire (fond hachuré), évoluent pendant la progression tumorale (initiation, invasion, métastase).

Ces fibroblastes tumoraux sont impliqués dans les processus d'invasion et de la métastase. Ils jouent un rôle clé dans la progression tumorale. Les facteurs pro-migratoires, comme la tenascine C, sont fortement exprimés par les myofibroblastes. Ces fibroblastes tumoraux secrètent également du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), et sont par conséquent, impliqués dans l'angiogenèse et le recrutement des cellules endothéliales (Kalluri and Zeisberg, 2006). D'autre part, les protéases – jouant un rôle crucial dans le remaniement de la matrice extracellulaire – peuvent être sécrétées par les fibroblastes tumoraux (Simian et al, 2001).

2.2. La composante inflammatoire

Une des caractéristiques les plus communes et persistantes du microenvironnement tumoral est l'inflammation. Le lien entre cancer et inflammation a été décrit au milieu du dix-neuvième siècle (Balkwill and Mantovani, 2012). En 1863, Rudolph Virchow était le premier à étudier cette association. Il détecta la présence de leucocytes dans des tissus néoplasiques et suggéra l'initiation éventuelle du cancer dans les sites d'inflammation chronique.

Depuis les observations de Virchow, un grand nombre d'études épidémiologiques a mis en évidence la capacité de l'inflammation et de l'infection à prédisposer à un changement carcinogénique. Plusieurs études suggèrent qu'environ 25% des cancers sont associés à une inflammation chronique. L'inflammation chronique, à elle seule, peut être à l'origine d'une oncogénèse. Cependant, il est plus fréquent que l'infection survienne en premier et déclenche le processus d'inflammation (Morrison, 2012).

Les sages disent que " la majorité des choses dans la vie sont une arme à double tranchant". Elles nous sont bénéfiques à une certaine dose ou sous une certaine condition, et deviennent nuisibles à une autre dose ou condition.

Dans un contexte physiologique, l'inflammation constitue une réponse normale et rapide à un dommage causé à l'organisme. Cette réponse peut être, simplement, pyrogène comme la fièvre. Elle est de courte durée et aboutit à des conséquences thérapeutiques. Cependant, quand l'inflammation devient chronique ou dure longtemps, elle peut provoquer un état pathologique. L'inflammation, peut donc constituer un important facteur de risque dans l'apparition de la pathologie cancéreuse (Figure 5). L'inflammation chronique est associée aux différentes étapes de la tumorigénèse, incluant la transformation cellulaire, la promotion, la survie, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et la métastase (Aggarwal et al, 2006). En effet, au cours d'une réponse inflammatoire active, le microenvironnement

cellulaire devient hautement réactif et instable ; Cela est dû aux effets combinés de diverses espèces réactives d'oxygène et de nitrogène, des cytokines, des chémokines, des eicosanoïdes, des aldéhydes réactifs et des facteurs de croissance exprimés à un taux élevé. Le résultat de la coopération de tous ces éléments est l'élimination du pathogène et la réparation du dommage. Tout dysfonctionnement ou échec dans le contrôle de la réponse immune peut être à l'origine d'une inflammation chronique et la génération d'un microenvironnement favorable à l'initiation et la progression tumorales. De plus, les composants du microenvironnement au cours d'une réponse inflammatoire peuvent constituer des facteurs de risque d'instabilité génétique et de mutations (Morrison, 2012).

Ainsi, l'inflammation constitue un facteur de risque de la maladie cancéreuse. Toutefois, le cancer peut, également, faire appel aux systèmes immunitaires et inflammatoires pour assurer sa croissance et sa dissémination. Quelle que soit son origine, la tumeur et son microenvironnement orchestrent plusieurs mécanismes et voies susceptibles de réguler et de coordonner la réponse immunitaire/inflammatoire.

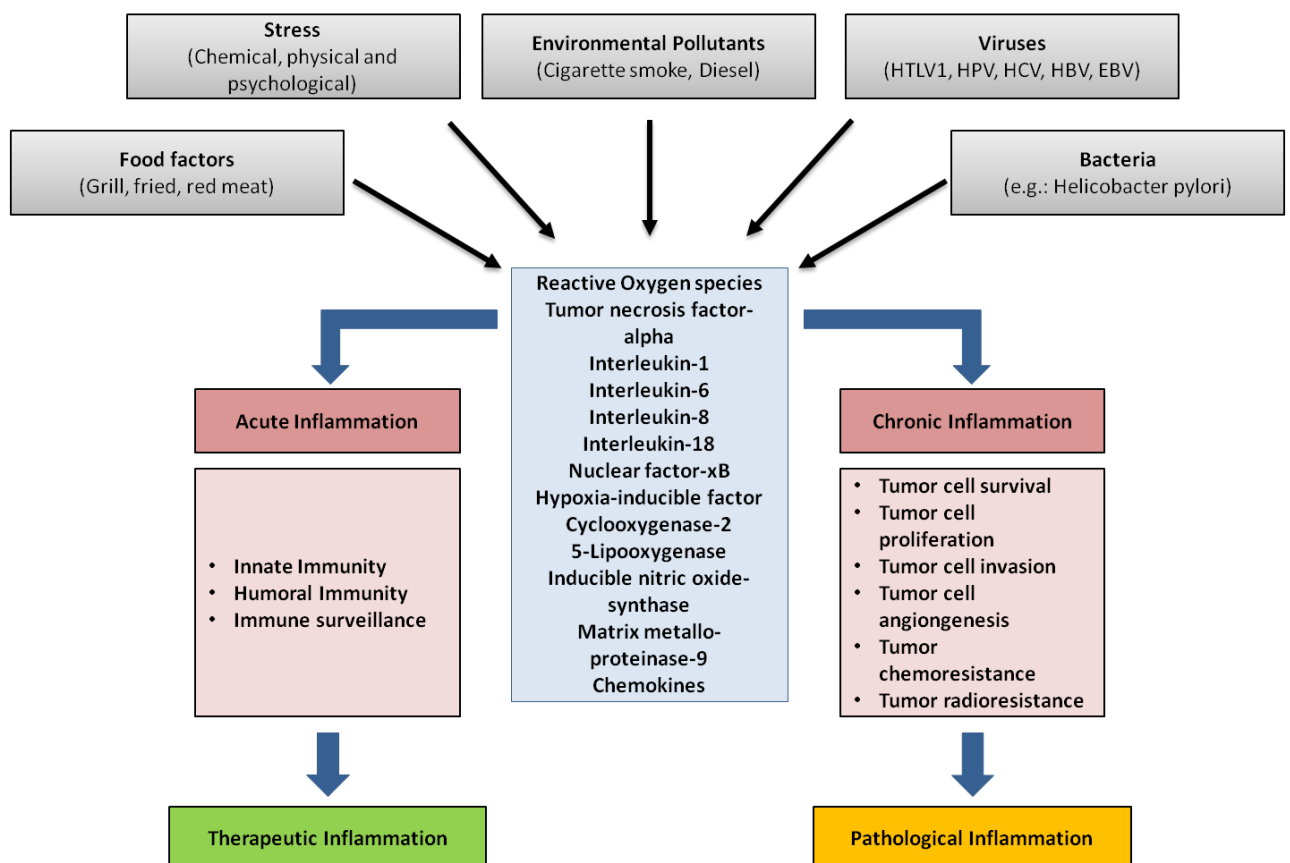


Figure 5 : Différentes facettes de l'inflammation et son rôle dans la tumorigenèse (Aggarwal et al, 2006).

En effet, le microenvironnement tumoral renferme, à la fois, des composants de l'immunité, dont le rôle est de contrecarrer le processus tumoral et des cellules immunosuppressives dont la fonction est de favoriser la croissance tumorale. Une réponse immunitaire anti-tumorale efficace repose sur les lymphocytes (Th1, Tc1), les macrophages de type 1, les cellules NK ou autres cellules. Mais le microenvironnement tumoral peut faire face à une réponse immunitaire efficace à travers différents mécanismes illustrés dans la Figure 6 :

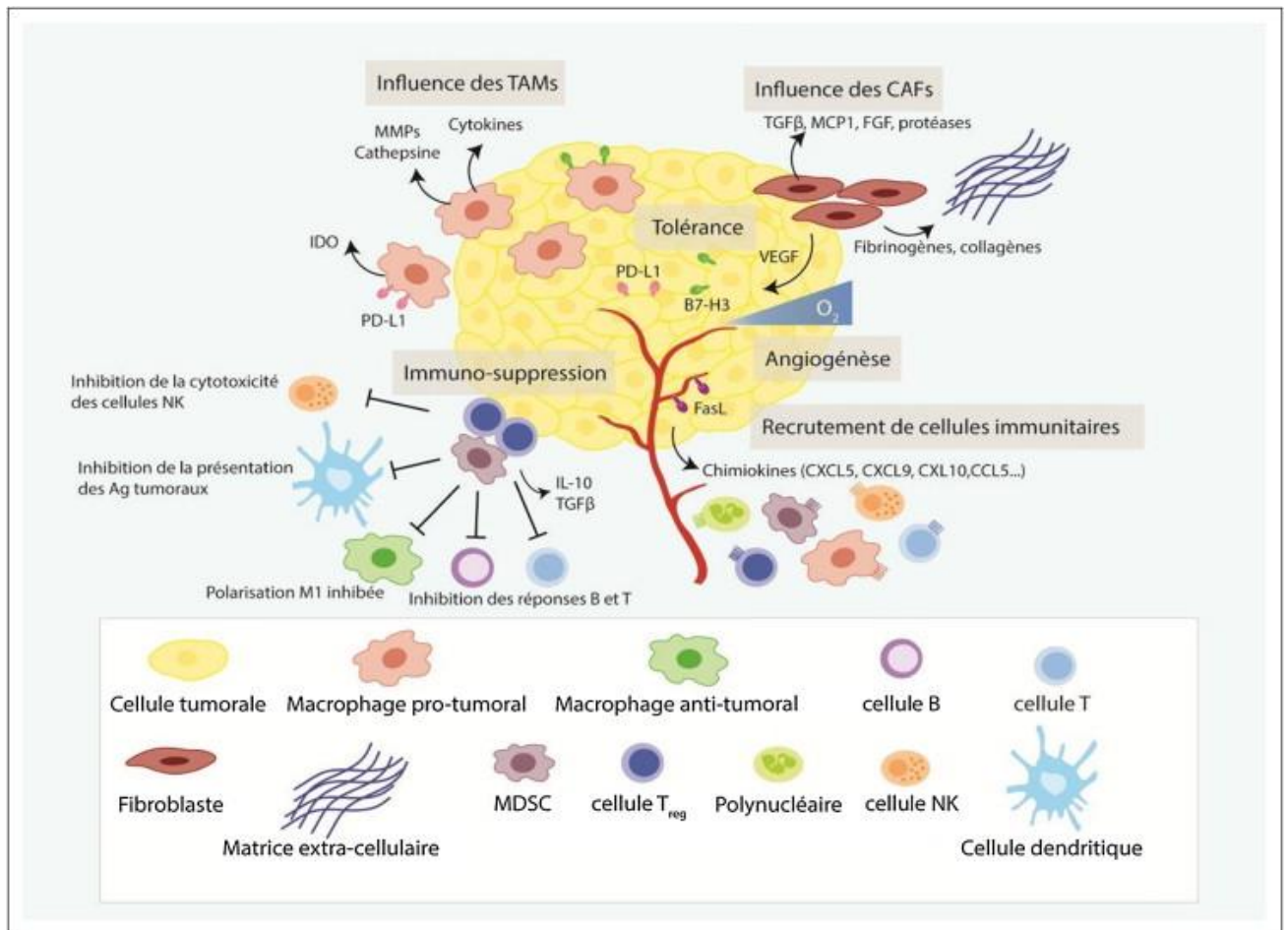


Figure 6 : Mise en place d'un microenvironnement suppressueur (figure et légende d'après Desbois et al, 2015).

Le microenvironnement favorise l'échappement tumoral à travers la régulation de l'angiogenèse, la mise en place de zones hypoxiques, la sécrétion de facteurs solubles et le recrutement de cellules immunosuppressives. Les réponses des effecteurs de l'immunité présents au site tumoral sont supprimées, notamment l'activation et la prolifération des lymphocytes B et T, la cytotoxicité des cellules NK, la présentation antigénique des cellules dendritiques ou encore la polarisation M1 des macrophages. TAMs : macrophages associés aux tumeurs ; CAFs : fibroblastes associés au cancer ; MMPs : metallo-protéases de la matrice ; Ag : antigène ; MDSC : cellule myéloïde suppressive ; NK : natural killer.

2.3. La matrice extracellulaire

La MEC a été longtemps considérée comme une structure inerte composée de biomacromolécules. Mais la MEC est loin d'être une simple structure de soutien. En effet, elle joue un rôle actif dans la modulation du comportement des cellules en activant des cascades de signalisation ou en régulant les interactions et l'accès entre ses composants (Lanigan et al, 2007). A travers des mécanismes indirects et directs, la MEC régule le comportement cellulaire et est indispensable pour la majorité des processus du développement

La MEC est composée de plusieurs éléments biochimiques caractérisés par leur aptitude d'interagir entre eux, incluant des protéines, des glycoprotéines, des protéoglycanes et des polysaccharides avec des propriétés physiques et chimiques différentes (Tableau 4) (Frantz et al, 2010).

Composant	Rôle
Collagène	Support structural / membrane basale
Elastine	Elasticité, plasticité
Fibronectine	Migration, lien entre intégrines et collagène
Laminine	Résistance
Protéoglycane	Hydratation tissulaire, rétention des facteurs de croissance
Acide hyaluronique	Rétention hydrique, gel de remplissage de la matrice
Fibrine	Interaction matrice-cellule
Fibuline	Organisation supramoléculaire, migration

Tableau 4 : Principaux composants de la matrice extracellulaire et leurs fonctions (Frantz et al, 2010).

La matrice extracellulaire est une structure dynamique qui est en équilibre permanent entre la synthèse de ses composants et leur dégradation par des enzymes spécialisées. La perte de cet équilibre homéostatique entraîne des aberrations au niveau de ses fonctions et conduit à des pathologies, comme le cancer. Par exemple, les différents stades du remodelage des fibres de collagène (TACS : *Tumor-associated collagen signature*) de la MEC corrélerent avec la progression tumorale et la dissémination métastatique (Figure 7). Dans un tissu normal et quiescent, une isotropie et une allure en "boucles" des fibres de collagènes sont observées (TACS-1). A un stade de prédisposition au cancer, les fibres sont lissées et arrangées parallèlement autour de la tumeur (TACS-2), caractérisant un tissu pré-invasif. Enfin, à un stade TACS-3, l'épaississement, le lissage des fibres et l'alignement perpendiculaire par rapport à la limite de la tumeur sont plus prononcés, caractérisant un stade métastatique. Les

mêmes phénomènes ont été observés dans le cas d'une MEC dérivant des fibroblastes tumoraux (Malik et al, 2015).

Le microenvironnement tumoral est, également, caractérisé par une forte activité protéolytique. Cette activité est assurée majoritairement par les métalloprotéases (*Matrix metalloproteinases* : MMPs) (Wilson et al, 1999).

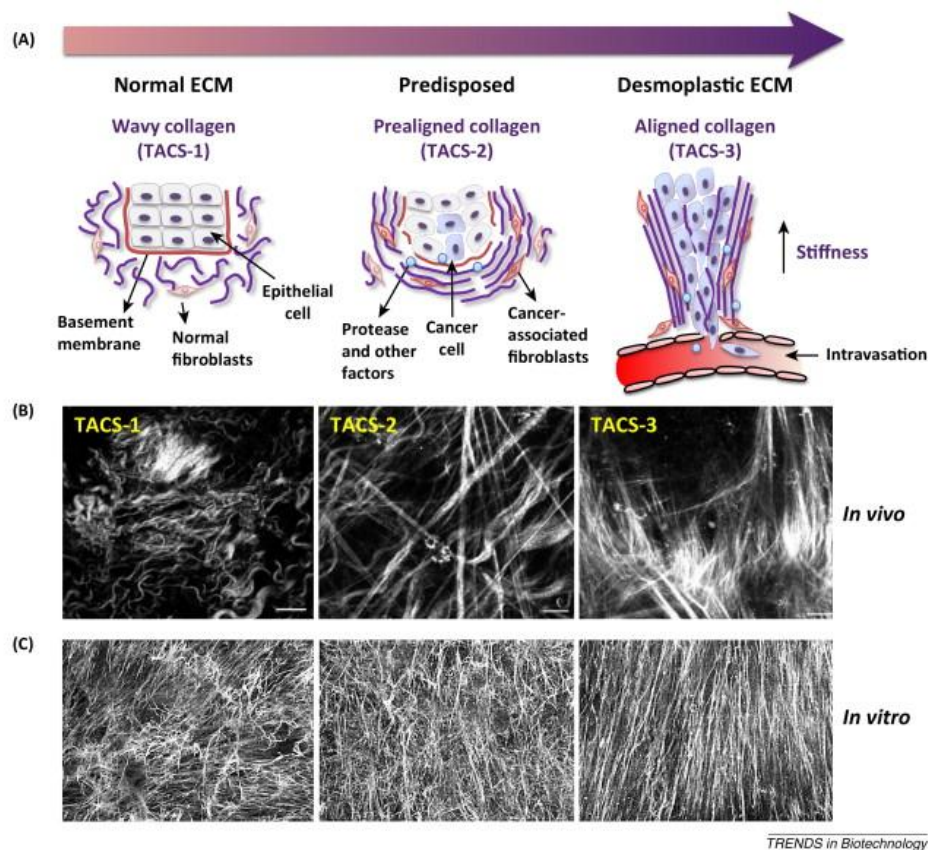


Figure 7 : Remodelage des fibres de collagène de la MEC au cours de la tumorigenèse (Malik et al, 2015).

A. Diagrammes schématiques. B. Micrographes (Microscopie à balayage laser multi photonique) sur un modèle de souris atteintes du cancer du sein. C. Images confocales, obtenues *in vitro*, de la MEC issue des fibroblastes dans un cancer épidermoïde murin.

2.4. Les Métalloprotéases et leur rôle dans le processus tumoral

Les MMPs sont des enzymes dont l'activité requière un ion métallique, généralement un atome de zinc. Elles doivent leur implication dans le processus tumoral à leur capacité de dégrader et remodeler la MEC et la membrane basale. Les MMPs sont secrétées, à une forte concentration au niveau de la zone invasive de la tumeur, par les cellules inflammatoires périphériques à la tumeur, les fibroblastes et les cellules tumorales.

Les MMPs participent à toutes les phases du processus tumoral. En outre, les MMPs peuvent avoir une activité pro-tumorale, comme elles peuvent assurer une activité anti-

tumorale. On parle d'une dualité qui penche vers une activité plutôt qu'une autre en fonction du substrat clivé et de la cascade de réactions activées (López-Otín and Matrisian, 2007 ; Folgueras et al, 2004).

Cette dualité dans les fonctions des MMPs concerne le développement et la survie des cellules cancéreuses, l'angiogenèse tumorale, la régulation de l'invasion cellulaire et la réponse immunitaire au sein de la tumeur (Figure 8).

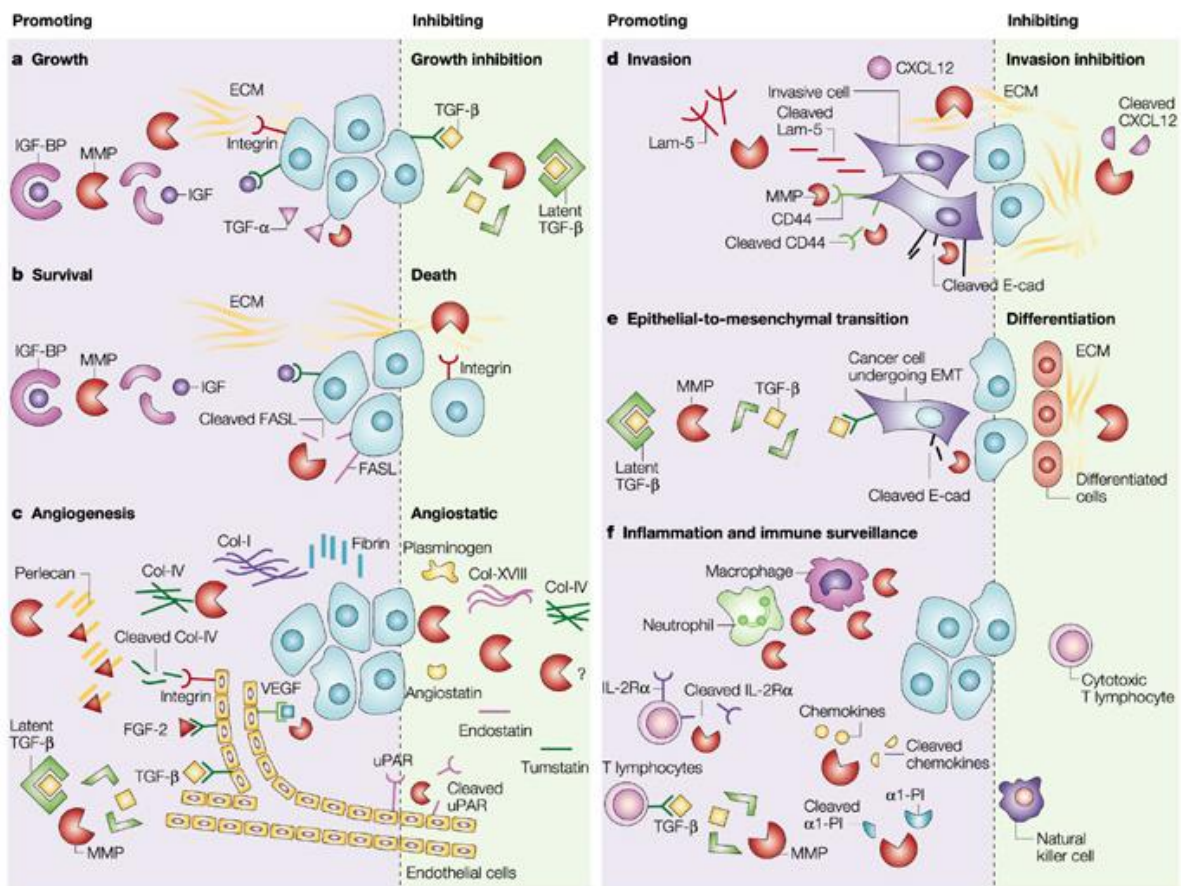


Figure 8 : Fonctions des MMPs dans la progression tumorale (Egeblad and Werb, 2002).

Les métalloprotéinases possèdent, à la fois, des fonctions pro-tumorales et anti-tumorales. Ces effets opposés sont, parfois, le résultat d'une cascade initiée par le clivage du même substrat.

* MMPs et développement tumoral :

Les MMPs peuvent favoriser la croissance des cellules tumorales par le clivage des précurseurs de facteurs de croissance de la MEC comme l'*insuline-growth-factor-binding protein* (IGF-BP) et libérer l'IGF, ou le *Transformin-growth factor-α* (TGF-α). Les MMPs sont, aussi, capables de promouvoir indirectement la croissance des cellules tumorales, en régulant les interactions entre les molécules de la MEC et les intégrines.

L'activité des MMPs peut avoir un effet négatif sur la croissance cellulaire tumorale, en libérant le TGF- β (*transforming-growth factor*) de son complexe latent, induisant, par conséquent, l'apoptose.

* MMPs et survie des cellules tumorales :

Les MMPs régulent positivement la survie des cellules cancéreuses en libérant l'IGF ou en dégradant le ligand FASL, une cytokine impliquée dans la mort cellulaire.

A l'opposé de cette fonction, les MMPs participent à l'activation de l'apoptose – probablement en modifiant la composition de la MEC et en régulant indirectement les voies de signalisation des intégrines.

* MMPs et angiogenèse tumorale :

Les MMPs jouent un rôle dans la régulation positive de l'angiogenèse en augmentant la biodisponibilité des facteurs de croissance proangiogéniques comme le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) et le TGF- β . Ces facteurs stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. L'invasion des cellules endothéliales est, également, améliorée par le clivage des composants structurels de la MEC comme le collagène de Type I (Col-I), IV (Col-IV) et la fibrine. Le Col-IV favorise l'angiogenèse en fixant l'intégrine $\alpha v \beta 3$. En ce qui concerne leur action angiostatique, les MMPs sont capables de cliver le plasminogène et le Col-XVIII, ce qui résulte en la génération de facteurs anti-angiogéniques comme l'endostatine et de l'angiostatine, ou encore la tumstatine, un fragment du Col-V. Aussi, l'hydrolyse de certains récepteurs comme l'*urokinase plasminogen activator receptor* (uPAR), un facteur indispensable à l'invasion cellulaire, peut avoir une conséquence angiostatique.

* MMPs et invasion cellulaire :

Les MMPs régulent l'invasion cellulaire en dégradant les composants structurels de la MEC, tout particulièrement, la lamine-5 (Lam-5), ou en clivant certaines molécules d'adhésion comme le CD44 ou la E-cadhérine (E-Cad).

* MMPs et différenciation des cellules tumorales :

L'*epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT) est la transformation des cellules cancéreuses en des cellules mésenchymateuses ; ces dernières étant caractérisées par un phénotype tumoral plus agressif. Les MMPs jouent un rôle dans cette transition par le clivage des molécules d'adhésion E-Cad ou la libération du TGF- β .

* MMPs et réponse immunitaire :

Les MMPs peuvent aussi aider les cellules cancéreuses à contrecarrer une réponse immunitaire. En effet, les MMPs, *via* le clivage du récepteur α de l'interleukine-2 (IL-2R α), ou la libération du TGF- β , inhibent la prolifération des lymphocytes T ou bloquent leur fonction immunitaire contre les cellules cancéreuses. Les NK peuvent aussi être influencées par l'action des MMPs. Ces cellules tueuses peuvent être recrutées par des inhibiteurs de protéases à sérine, les *α 1-proteinase inhibitor* (α 1-PI). Sous l'action des MMPs, ces inhibiteurs sont clivés, ce qui diminue considérablement la sensibilité des cellules cancéreuses aux cellules NK. Enfin, de nombreuses chémokines (CC et CXC) peuvent être hydrolysées par les MMPs. Cela limite le recrutement des leucocytes par ces facteurs (Egeblad and Werb, 2002).

Ainsi, les MMPs constituent un élément clé des processus pro- et anti-tumoraux. Cette dualité fonctionnelle est à l'origine des échecs cliniques des traitements anti-tumoraux par des inhibiteurs synthétiques des MMPs.

2.5. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est le processus qui permet le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Risau and Flamme, 1995). Elle est essentielle à la réparation ou à la prolifération tissulaire.

Dans un contexte physiologique, l'angiogenèse constitue un processus ponctuel et localisé qui repose sur l'action régulée de plusieurs acteurs cellulaires et moléculaires : la régulation de l'angiogenèse se base sur une balance équilibrée entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques, modulant ainsi la prolifération et la migration des cellules endothéliales et le remodelage de la MEC.

Dans un contexte tumoral, les mécanismes de l'angiogenèse sont détournés pour assurer une vascularisation efficace de la tumeur afin d'entretenir la croissance tumorale. En effet, au premier stade de la tumorigenèse, la tumeur est avascularisée, créant autour d'elle une zone d'hypoxie. La mise en place d'un réseau vasculaire devient, ensuite, indispensable pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Folkman, 1996).

Plusieurs mécanismes se mettent en route, tels que la libération de facteurs angiogéniques, l'activation des cellules endothéliales, la sécrétion d'enzymes protéolytiques pour la dégradation et le remodelage de la MEC et de la membrane basale, la prolifération et la migration des cellules endothéliales et la néovascularisation. Il résulte de cette néoangiogenèse une forte accumulation des facteurs de croissance qui favorisent la croissance

tumorale (Holmgren et al, 1995). La néovascularisation permet, aussi, d'éliminer les cellules mortes autour de la tumeur et de favoriser l'évasion des cellules tumorales de leur site initial et donc la dissémination métastatique (Hashizume et al, 2000).

La diversité et la complexité du système angiogénique tumoral et son implication dans la promotion et la croissance tumorales, la migration et la dissémination métastatique des cellules cancéreuses, expliquent l'importance des stratégies anti-angiogéniques dans le traitement de la pathologie cancéreuse (Ferrara and Kerbel, 2005).

Chapitre 4. Biologie de la coagulation

L'hémostase est un système complexe qui se base sur divers phénomènes physiologiques dont le but est de maintenir la fluidité sanguine à l'intérieur des vaisseaux. Ces mécanismes contribuent à l'arrêt des hémorragies et à la prévention de thrombose.

L'hémostase repose sur l'action de différents acteurs cellulaires comme l'endothélium, la paroi vasculaire, les plaquettes et les cellules sanguines circulantes et de divers éléments plasmatiques protéiques. Classiquement, on peut distinguer, trois temps clés de la coagulation, qui sont activés simultanément : l'hémostase primaire, la coagulation au sens propre et la fibrinolyse. Ces trois phases sont concomitantes et interdépendantes, même si elles sont différentes en durée et en intensité. L'importance de chacun de ces mécanismes varie, également, en fonction de la localisation de la lésion vasculaire (vaisseau artériel ou veineux) et la taille du vaisseau.

1. Hémostase primaire

L'hémostase primaire est activée immédiatement après la formation d'une brèche vasculaire. Son rôle est de fermer la lésion et d'arrêter le saignement par la formation d'un caillot plaquettaire, dit « thrombus blanc »

Dès l'apparition d'une lésion vasculaire, le processus d'hémostase primaire se met en place. La première réaction enclenchée est la vascularisation localisée et l'activation des plaquettes. Cette réaction arrête les hémorragies, diminue le flux sanguin et modifie les conditions hémodynamiques. L'exposition du sous-endothélium au facteur de von Willebrand (*von Willebrand factor* : vWF) induit le recrutement d'autres plaquettes. Les plaquettes s'agrègent et forment un microthrombus fragile (Reininger, 2008). Le microthrombus induit, également, la dégranulation des plaquettes, entraînant la libération de leur contenu en cytokines (VEGF, PDGF, IGF-1, TGF- β), le facteur de coagulation V, le facteur vWF et du fibrinogène (Harrison and Cramer, 1993). L'agrégation devient irréversible et le caillot se solidifie, constituant ainsi le clou plaquettaire.

2. La coagulation

La coagulation proprement dite est la conséquence d'un enchaînement de réactions chimiques qui impliquent différents substrats et enzymes, aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine.

L'enzyme clé permettant de transformer le fibrinogène, une protéine soluble, en fibrine soluble est la thrombine. Le processus de formation de la thrombine est complexe et fait appel à différents facteurs de coagulation (de I à XIII). Les facteurs de coagulation sont majoritairement des protéines hépatiques synthétisés en zymogènes. Ils sont présentés dans le Tableau 5.

Le processus de coagulation s'appuie sur deux voies :

*** La voie extrinsèque :**

Le FT est un récepteur membranaire, enchâssé dans la paroi vasculaire et exposé au sang suite à une lésion vasculaire. Le FT active le facteur VII pour former un complexe tenace qui, à une concentration élevée, active le facteur X. En présence de phospholipides membranaires et de calcium, le facteur Xa se lie à son tour au facteur Va pour former la prothrombinase, enzyme nécessaire à la transformation de la prothrombine (II) en thrombine (IIa). La thrombine générée (IIa) déclenche un rétrocontrôle positif en activant les plaquettes et les facteurs V, VIII et XI. La thrombine renforce l'agrégation plaquettaire au sein du caillot par la liaison, à la surface des plaquettes, à son récepteur PAR-1 (*protease-activated receptor 1*) (Mackman et al, 2007).

La voie extrinsèque est rapide et intervient précocement pour générer les premières molécules de thrombine (Dieri et al, 2008).

*** La voie intrinsèque :**

Elle est enclenchée par l'activation du facteur XII suite au contact avec le collagène. L'activation du facteur XII entraîne la transformation de la prékallicroïne (PK) en kallicroïne (PKa). Une boucle d'auto-activation, entre la PKa et le facteur XII, se met en place. Enfin, une cascade de réactions permettent la formation de la prothrombinase (facteur Xa-facteur Va) et donc de la thrombine (Gailani and Renné, 2007).

La voie intrinsèque est la plus longue, vue la faible concentration plasmatique du facteur XII et le nombre de facteurs impliqués. Cela dit, elle constitue la voie d'amplification de la coagulation (Figure 9).

La thrombine générée, par les deux voies, clive le fibrinogène en libère la fibrine en monomères. Le facteur XIIIa stabilise les protofibrilles de fibrine par l'intermédiaire de liaisons covalentes, formant ainsi un réseau solide autour des agrégats de plaquettes. Le

processus de coagulation s'achève quand la brèche est fermée par un dépôt de plaquettes et de fibrine.

Nom commun	Symbole	Autres noms	Lieu de synthèse	Fonction	Produit final
Fibrinogène	I	Facteur I	Foie	Fibrine précurseur (plasma, plaquettes)	Ia, fibrine
Prothrombine*	II	Facteur II	Foie	Protéase zymogène (plasma)	IIa, thrombine
Facteur tissulaire	FT	Thromboplastine tissulaire, Facteur III	Sous-endothélium cellules sanguines	Initiateur, cofacteur de VIIa dans l'activation de IX et X	Actif d'emblée
Calcium	IV	Ca ²⁺	Ubiquitaire	Cofacteur	
Facteur V	V	Proaccélélerine	Foie	Cofacteur de Xa dans l'activation de la prothrombine (plasma, plaquettes)	Va
Facteur VI : non retenu par le comité international de nomenclature					
Facteur VII*	VII	Convertine	Foie	Protéase zymogène (plasma)	VIIa
Facteur VIII	VIII	Facteur anti-hémophilique A	Foie	Cofacteur de IXa dans l'activation de X (plasma)	VIIIa lié au vWF
Facteur IX*	IX	Facteur anti-hémophilique B	Foie	Protéase zymogène (plasma)	Ixa
Facteur X*	X	Facteur Stuart	Foie	Protéase zymogène (plasma)	Xa
Facteur XI	XI	<i>Plasma thromboplastin antecedent</i>	Foie	Protéase zymogène (plasma)	XIa
Facteur XII	XII	Facteur Hageman	Foie	Protéase zymogène (plasma)	XIIa
Facteur XIII	XIII	Facteur stabilisant de fibrine	Foie	Zymogène de transglutaminase (plasma, plaquettes)	XIIIa

Tableau 5 : Principales caractéristiques des facteurs de coagulation. *Vitamine K-dépendant.

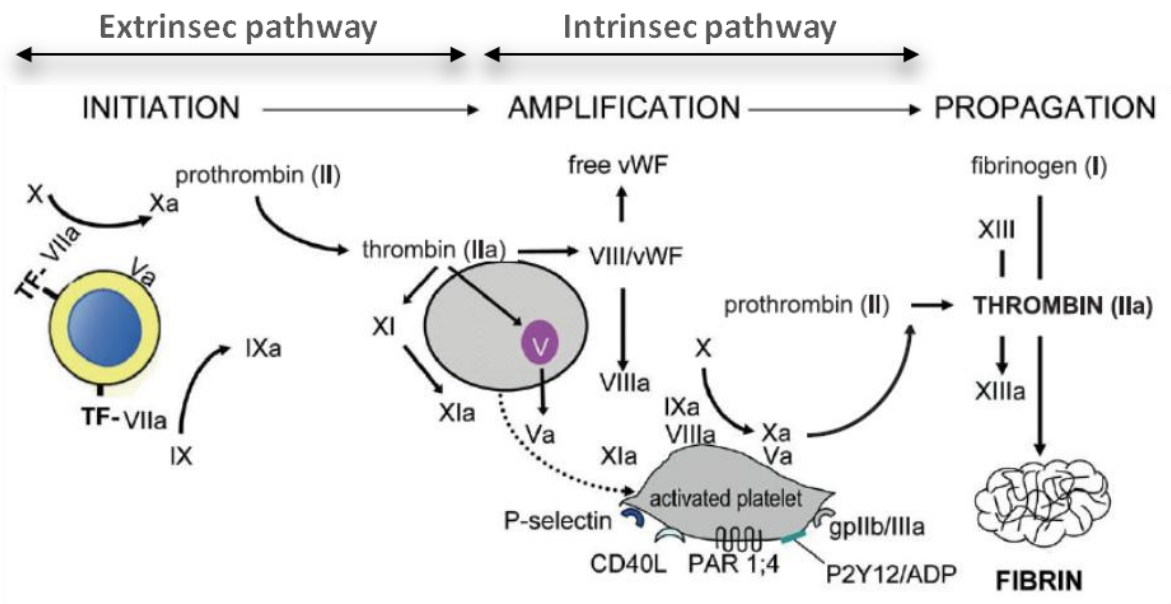


Figure 9 : Modèle moderne de l'hémostase basé sur les cellules (adaptée de (De Caterina et al, 2013)).

3. La fibrinolyse

Lorsque la cicatrisation prend la relève pour réparer la lésion vasculaire, le caillot de fibrine se dissout progressivement. L'hydrolyse de la fibrine est assurée par la plasmine, une sérine protéase hépatique sécrétée en zymogène : le plasminogène.

Le plasminogène est activé par deux protéases : la première est d'origine rénale et porte le nom d'urokinase (u-PA) et la deuxième est d'origine endothéliale et est appelée activateur du plasminogène (t-PA). En effet, la présence de fibrine entraîne l'activation de la pro urokinase en urokinase. L'u-PA s'active par la fixation du récepteur u-PAR (récepteur membranaire et sites de fixation de la t-PA sur la fibrine). L'activation du t-PA se fait par son substrat la plasmine, ce qui enclenche une forte boucle d'auto-activation (Lijnen, 2001) (Figure 10). La plasmine générée dégrade la fibrine et libère des fragments très hétérogènes appelés produits de dégradation de la fibrine (PDF) comme les D-dimères.

La fibrinolyse est contrôlée par différentes voies :

- Inhibition de la plasmine : lorsque la plasmine est en excès, elle est désactivée dans le courant plasmatique par ses inhibiteurs, tels que l' α_2 -antiplasmine et d'un degré moindre l' α_2 -microglobuline (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005).
- Internalisation du complexe u-PA/u-PAR, par endocytose cadhérine dépendante. Cette voie est enclenchée suite à la fixation du complexe par PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1).

Cela résulte en la dégradation d'u-PA et le recyclage de son récepteur. PAI-2, produit de l'épissage alternatif de PAI-1, joue le rôle d'inhibiteur, à la fois, de u-PA et t-PA.

- Inhibition par le TAFI (*Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) : Il s'agit d'une carboxypeptidase. Son activité est améliorée en présence de thrombomoduline (TM), un peptidoglycane exprimé à la surface des endothéliums (Willemse and Hendriks, 2007).

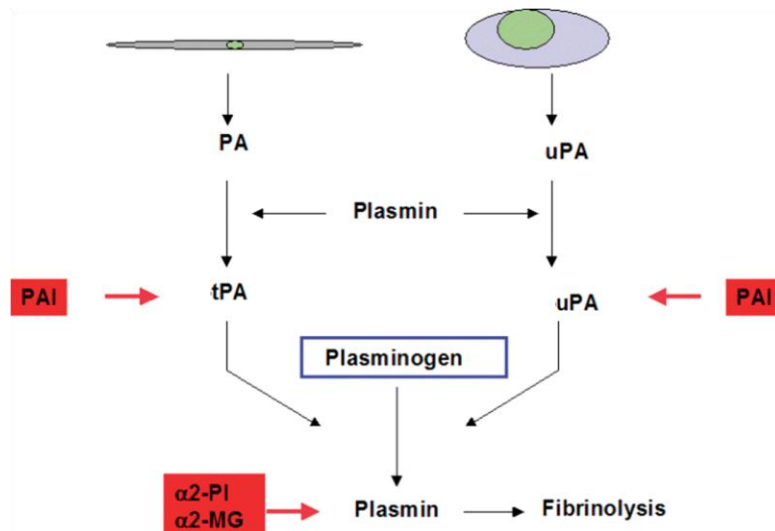


Figure 10 : Mécanismes moléculaires de la fibrinolyse (adaptée de (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005)).

Le plasminogène est converti en sérine protéase activée, la plasmine, par l'action du tPA et de l'uPA. Ces deux activateurs sont sécrétés, respectivement, par les cellules endothéliales et par les monocytes macrophages ou les cellules endothéliales. Les blocs en rouge représentent les voies de régulation négative.

4. Inhibition de la fibrinof ormation

L'inhibition de la fibrinof ormation est un des mécanismes majeurs de la régulation négative de la coagulation. Elle repose sur trois voies :

- Le *Tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) : module la réponse procoagulante déclenchée par le FT. Le TFPI forme un complexe avec le facteur Xa, le FT et le facteur VIIa, bloquant ainsi la voie extrinsèque de la coagulation (Sandset, 1996).

- L'antithrombine (AT) : il s'agit d'une protéine hépatique de la famille des serpinés. Elle est capable de former un complexe avec la thrombine et les facteurs VIIa, IXa, Xa, XIa et XIIa et les neutraliser d'une manière irréversible (Levi et al, 2008).

- Le système protéine C / récepteur endothélial de la protéine C : La protéine C (PC) et son récepteur endothélial (EPCR : *Endothelial protein C receptor*) sont au centre des systèmes anticoagulants. En effet, lorsqu'elle est en interaction avec la thrombomoduline, la thrombine active un processus de rétro-inhibition et perd ses propriétés coagulantes suite à des modifications conformationnelles. La thrombine perd même son affinité pour les plaquettes et le fibrinogène et devient un acteur principal dans l'inhibition de la fibrinoformation (Sadler, 1997). Le complexe thrombine-TM est responsable de l'activation de la protéine C, une sérine protéase hépatique vitamine K dépendante. La protéine C activée (PCA) est ainsi libérée. En présence de la protéine S, la PCA inactive le facteur Va et le facteur VIIIa par clivage protéolytique, inhibant par conséquent la génération de la thrombine (Figure 11). Le récepteur endothélial de la protéine C, exprimé au niveau des cellules endothéliales, fixe le domaine Gla de la protéine C et facilite son activation par le complexe thrombine-TM (Van de Wouwer et al, 2004).

En plus de son activité anticoagulante, la PC est également capable d'améliorer la fibrinolyse en inactivant le PAI-1 sécrété par les cellules endothéliales (Kobayashi et al, 1994).

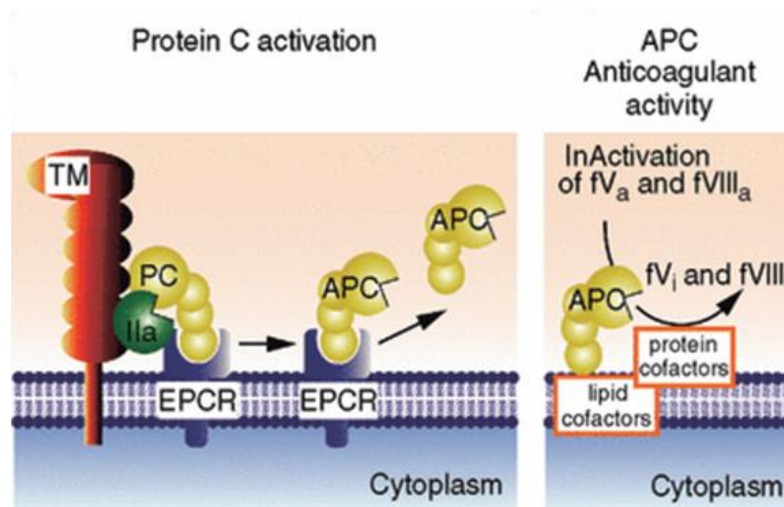


Figure 11 : Rôle de la protéine C et son récepteur dans l'inhibition de la fibrinoformation (Griffin et al, 2007).

La thrombomoduline et la thrombine forme un complexe activant la protéine C fixée à son récepteur. La protéine C activée (APC), en présence de la protéine S, inhibe les facteurs coagulants Va et VIIIa.

5. Schéma récapitulatif de la régulation de la coagulation

Les différents mécanismes impliqués dans la régulation de la coagulation sont récapitulés dans la Figure 12.

Chapitre 5. Biologie de l'association entre cancer et thrombose

Comme nous l'avons décrit précédemment, la forte incidence de la thrombose au cours de la pathologie cancéreuse est liée aux différents éléments de la triade de Virchow : stase veineuse, altération endothéliale et hypercoagulabilité induite par le cancer.

Dans cette section, nous allons détailler les principaux acteurs procoagulants liés au cancer et leurs mécanismes d'action dans un contexte tumoral.

1. Facteur tissulaire, thrombine et acteurs de l'inflammation

Le facteur tissulaire est le principal initiateur physiologique de la coagulation. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire, qui par son rôle de récepteur du facteur VII, active la voie extrinsèque de la coagulation. Le FT est synthétisé par les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales, les fibroblastes, les monocytes activés et les cellules endothéliales lésées.

Plusieurs études montrent une corrélation positive entre le taux du FT et les cancers associés à un risque thrombotique élevé, par rapport aux cancers avec un faible risque de thrombose (Uno et al, 2007 ; White et al, 2007 ; Khorana et al, 2007). L'expression du FT peut être, entre autres, augmentée par certaines cytokines inflammatoires liées à la pathologie cancéreuse comme l'IL-1 β , le TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) et le VEGF (Clauss et al, 1990 ; Dittman et al, 1990). Il a été, également, rapporté que l'IL-1 et le TNF- α peuvent bloquer l'expression de la thrombomoduline et par conséquent entraver l'activation de la PC, élément majeur de l'inhibition de la fibrinof formation (Dittman and Majerus, 1990).

Outre ses propriétés procoagulantes, le FT joue un rôle dans l'angiogenèse, particulièrement, dans les voies de signalisation intracellulaires au niveau des cellules endothéliales. Le FT est donc impliqué dans la formation de néovaisseaux au cours de la pathologie néoplasique (Ott et al, 1998). Le FT favorise aussi la dissémination métastatique en activant le récepteur PAR-2 exprimé par les cellules cancéreuses (Even-Ram et al, 1998).

D'autre part, une forte expression du FT, dans le cancer, peut être à l'origine d'une importante génération de thrombine. La thrombine est une enzyme pivot de l'hémostase. Elle est responsable de la formation de fibrine à partir du fibrinogène, elle participe aussi à l'activation plaquettaire et régule tout le système de la coagulation (par activation ou rétrocontrôle négatif). La génération accrue de thrombine dans le cancer est, non seulement liée au taux d'expression élevé du FT, mais également aux cellules cancéreuses elles-mêmes.

Ces dernières peuvent fournir des surfaces procoagulantes au complexe prothrombinase et favoriser, davantage, la libération de thrombine (Sakai and Kisiel, 1990).

Cette augmentation de la formation de thrombine dans le cancer, peut également induite par l'inflammation. En général et toujours dans un contexte tumoral, l'inflammation peut être aussi responsable de la génération excessive du facteur VIII, du vWR, de fibrinogène mais aussi de la résistance acquise à la PCA et par conséquent de l'apparition d'un état d'hypercoagulabilité et d'événements thrombotiques (Viale, 2005).

L'implication de la thrombine dans le cancer peut prendre forme à plusieurs niveaux. Par exemple, la thrombine est capable d'augmenter l'expression de la sélectine P par les cellules endothéliales, ce qui favorise l'adhésion des plaquettes aux cellules cancéreuses et endothéliales (Wahrenbrock et al, 2003). La thrombine est également impliquée dans la croissance et la dissémination tumorale. En effet, la thrombine participe à la modulation de l'angiogenèse en contrôlant l'expression de certains facteurs de croissance comme le VEGF, ou en activant les récepteurs activés par les protéases (PAR) au niveau des cellules endothéliales (Wahrenbrock et al, 2003). En activant des métalloprotéases, la thrombine joue, aussi, un rôle dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Brooks et al, 1996). Son rôle dans la dissémination métastatique se traduit, également, par l'activation des récepteurs PAR-1 ou en favorisant l'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales et à la matrice extracellulaire, *via* des molécules d'adhésion telles que la sélectine P, le CD 40-ligand ou encore l'intégrine α IIb- β 3 (Nierodzik et al, 1991 ; Nierodzik et al, 1992).

En outre, l'activation des récepteurs PAR-1 et PAR-2, respectivement par la thrombine et le FT, entraîne une augmentation de l'expression de PAI-1, bloquant ainsi l'activation du plaminogène et par conséquent la fibrinolyse (McEachron et al, 2010).

Enfin, le déséquilibre de la balance fibrinolytique, dans un contexte tumoral, est aussi provoqué par des cytokines pro-inflammatoires. Ces dernières modifient l'expression de t-PA (activateur de la fibrinolyse) ou celle de PAI-1 (van Hinsberg et al, 1990).

2. Microparticules

Les microparticules (MPs) ont été initialement décrites par Chargaff et West (Chargaff and West, 1946) au milieu du 20ème siècle comme un « facteur précipitable », présent dans le plasma et capable de promouvoir les processus de coagulation. En 1967, Wolf décrivit des déchets de plaquettes dans le plasma et mit en évidence leur activité procoagulante (Wolf,

1967). Cette observation a été le point de départ d'une augmentation exponentielle du nombre d'études sur les MPs.

Les MPs sont des vésicules de nature hétérogène et de taille variant de 0.1 à 1µm. Elles sont libérées des membranes cellulaires en réponse à une activation des cellules ou à leur apoptose. Elles ont une membrane phospholipidique intacte et exposent à leur surface des protéines membranaires qui diffèrent selon leur origine cellulaire (Tesse et al, 2006). Classiquement, la détection des MPs se base sur leur taille, mais également sur la présence des phosphatidylsérines, sous une forme externalisée, sur la membrane cellulaire. Les MPs dérivent des cellules du sang et des cellules endothéliales ou encore des cellules cancéreuses. Toutefois, les plaquettes activées constituent la plus importante source de MPs chez les personnes non atteintes de maladie grave (Mooberry and Key, 2015). Une étude de recherche suggère qu'une partie importante des MPs plaquettaires dérivent, directement, des mégacaryocytes de la moelle osseuse (Flaumenhaft et al, 2009).

La formation et la libération des MPs, à partir de leurs cellules d'origine, survient suite à une stimulation ou à une induction apoptotique. Leur sécrétion est considérée comme le reflet d'une balance dynamique entre prolifération, stimulation et mort cellulaire. Leur libération peut être provoquée par des cytotoxines, endotoxines ou par des lésions oxydatives ou encore par une forte contrainte de cisaillement (Mooberry and Key, 2015).

Exposant diverses protéines à leur surface, les MPs sont dotées de différentes propriétés et peuvent être impliquées dans différents mécanismes et processus. Ainsi, les MPs peuvent jouer un rôle dans la coagulation. Leur fonction procoagulante est liée, essentiellement, à l'exposition vers l'extérieur des phosphatidylsérines et/ou du facteur tissulaire. Les phosphatidylsérines associées aux MPs fournissent une surface catalytique aux complexes enzymatiques procoagulants (Owens and Mackman, 2011). Une étude, *ex vivo*, montre que les MPs issues des plaquettes présentent une activité procoagulante 50 à 100 fois plus élevée que celle des plaquettes activées elles-mêmes. Cela constitue un indice important quant au potentiel thrombogénique des MPs (Sinauridze et al, 2007).

D'autre part, la présence de FT sur les MPs, des monocytes ou des cellules tumorales, a été bien démontrée. En effet, les MPs exprimant ce facteur peuvent être une source non négligeable de FT circulant, chez les patients atteints d'un cancer. Une étude montre la corrélation positive entre la concentration plasmatique des MPs associées au FT et le risque de survenue de thrombose chez des patients atteints du cancer du pancréas au stade

métastatique (Khorana et al, 2008b). Les MPs peuvent, aussi, favoriser la coagulation indépendamment du FT, puisqu'elles sont impliquées dans la promotion de la voie intrinsèque de la coagulation – en stimulant positivement le facteur XI ou le facteur XII. Cela dit, les mécanismes par lesquels les MPs favorisent la voie intrinsèque ne sont pas encore élucidés.

Enfin, le rôle des MPs dans la progression tumorale est aussi lié à plusieurs autres mécanismes, indépendant de la coagulation (Figure 13). En effet, les MPs peuvent être à l'origine de développement d'une résistance aux médicaments anti-tumoraux, à travers le transfert de protéines de résistance comme la P-gp and la MRP-1. Les MPs améliorent, aussi, le potentiel métastatique de la tumeur, en véhiculant des protéases, des micro ARNs et des protéines de type tyrosine kinase. La promotion de l'angiogenèse par les MPs est liée à la dissémination de certains éléments, comme la sphingomyéline et le VEGF. La survie et l'évasion cellulaires de système immunitaire sont favorisés par le transfert de caspase 3, la protéine LMP-1 et le ligand de Fas (Gong et al, 2015).

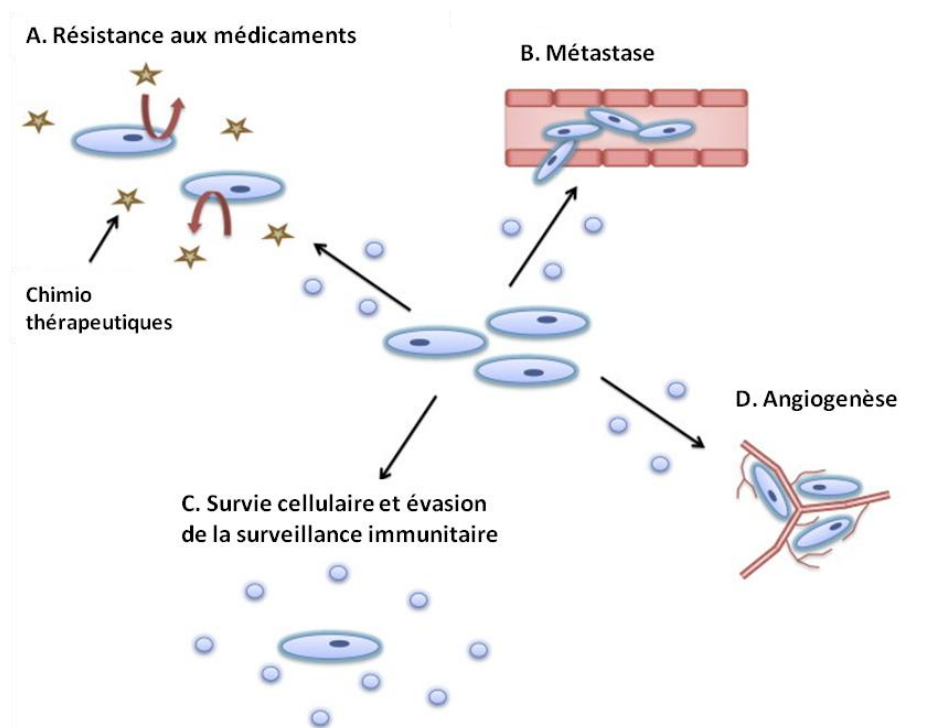


Figure 13 : Rôle des microparticules dans la progression tumorale (adaptée de (Gong et al, 2015)).

3. Synthèse

Les mécanismes potentiels contribuant au profil thrombophile de la pathologie cancéreuse sont d'origines diverses et complexes (Figure 14).

D'une part, la majorité des partenaires cellulaires et plasmatiques de l'hémostase interagissent et contribuent au phénotype procoagulant de la tumeur. Les acteurs du compartiment vasculaire interviennent à tous les stades et dans tous les processus impliqués dans l'initiation et la croissance tumorale, ainsi qu'à la dissémination métastatique. D'autre part, la tumeur constitue le premier acteur responsable du détournement des mécanismes physiologiques de la coagulation.

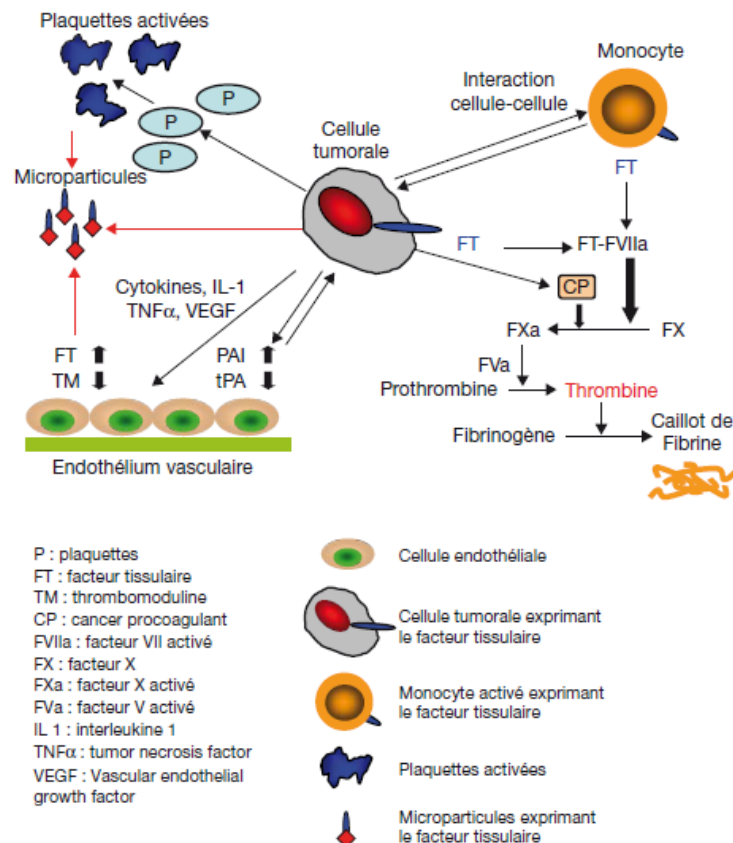


Figure 14 : Interactions des cellules tumorales avec l'hémostase participant à l'hypercoagulabilité, l'angiogenèse et la prolifération tumorale (Dargaud, 2012).

La relation entre hypercoagulabilité, inflammation, angiogenèse tumorale et tumorigenèse fait appel à des connections et des interactions intriquées.

Dans cette section, nous avons détaillé brièvement certains mécanismes procoagulants et leur rôle dans la pathologie cancéreuse. Le système de la protéine C et son récepteur endothélial, ainsi que l'activation plaquettaire constituent des acteurs clé dans la balance hémostase/cancer. Les deux chapitres suivants seront entièrement consacrés à ces deux systèmes et à leur implication dans le processus tumoral.

Chapitre 6. Protéine C et son récepteur endothélial

Le rôle anticoagulant de la protéine C et son récepteur endothélial a été étudié pendant des décennies. La protéine C activée est capable d'initier des voies de signalisation cellulaire, modulant ainsi divers processus comme la cytoprotection qui comprend les mécanismes anti-apoptotique et anti-inflammatoire, ou encore la stabilisation de la barrière endothéliale. La protéine C activée est, aussi, impliquée dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire.

Dans ce chapitre, nous détaillons les principales propriétés de la protéine C et son récepteur et leurs différentes fonctions, notamment leur implication dans la pathologie cancéreuse.

1. La protéine C : gène et structure

La protéine C (PC), une protéine plasmatique vitamine K dépendante, a été purifiée initialement par Stenflo en 1976 à partir du plasma bovin (Stenflo, 1976). Il s'agit d'une sérine protéase hépatique codée par le gène humain PROC d'environ 11 kb, localisé sur le chromosome 2 (2q13-14), et comportant 9 exons.

La PCA est générée à partir de sa forme zymogène (PC), suite à son activation protéolytique par la thrombine (Griffin et al, 2007).

La PC présente une seule chaîne peptidique de 56 kDa (461 acides aminés). Sa maturation résulte en son clivage en deux chaînes, une légère et une lourde, les deux reliées par un pont disulfure. En présence de vitamine K, la PC est aussi carboxylée au niveau de certains résidus d'acide glutamique. Cela permet de confectionner son domaine Gla, un domaine indispensable pour sa sécrétion et sa fonction biologique. En effet, le domaine Gla est à l'origine de la capacité de la PC à se lier aux phospholipides chargés négativement, ainsi qu'à son récepteur (Presto, et al, 2005). En revanche, son interaction avec son cofacteur, la protéine S, est dépendante de ses deux domaines "EGF-like" (Figure 15).

2. Le récepteur endothélial de la protéine C

2.1. Propriétés structurales et biochimiques de la protéine

Le récepteur endothélial de la protéine C (EPCR) est une glycoprotéine transmembranaire de type I synthétisée sous sa forme précurseur.

La structure protéique de l'EPCR est composée de 238 acides aminés (AA), comportant 17 AA qui constituent le peptide signal et 221 AA qui représentent la protéine mature. La partie extracellulaire, de la protéine mature, correspond à la partie N-terminale. Sa partie ancrée dans la membrane est composée de ses 17 AA C-terminaux. Les quatre sites de N-glycosylation de la protéine participent à sa masse molaire (MM) puisque la MM apparentée est de 46 kDa – lorsque la protéine est glycosylée – et de 28,5 kDa, après déglycosylation (Fukudome and Esmon, 1994).

La structure tridimensionnelle de l'EPCR (Figure 16) présente une homologie de séquence avec la famille des protéines CD1 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), tout particulièrement le CD1d. Cette homologie a permis de déduire la structure en trois dimensions de l'EPCR et aussi son implication dans les processus inflammatoire et immunitaire (Oganesyan et al, 2002).

Indépendamment de son interaction avec la PC, l'EPCR est également capable de fixer d'autres ligands comme le facteur X, la protéinase-3, le récepteur de l'antigène du lymphocyte T $\gamma\delta$ et la *plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (Mohan Rao et al, 2014).

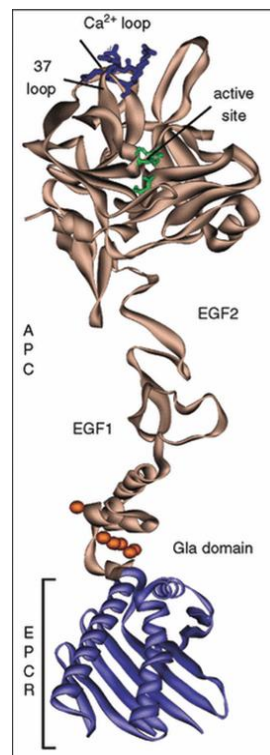


Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la protéine C (Griffin et al, 2007).

Le site actif de la protéine est représentée en vert et la boucle de fixation du calcium est en bleu. Le domaine Gla est impliqué dans la fixation aux phospholipides chargés négativement et à l'EPCR. Les domaines EGF 1 et 2 sont impliqués dans l'interaction avec la protéine S.

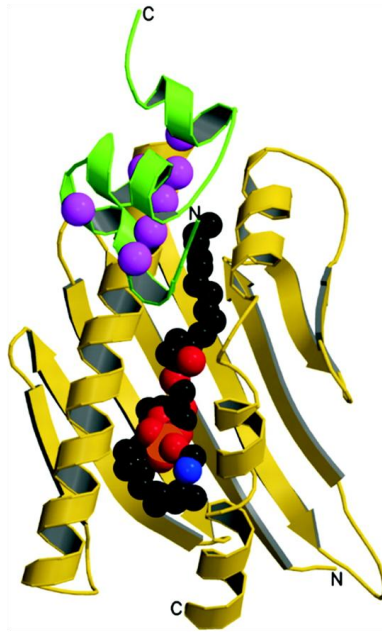


Figure 16 : Structure tridimensionnelle de l'EPCR (Oganessian et al, 2002).

Le ruban jaune représente l'EPCR soluble en interaction avec le domaine Gla de la PC (ruban vert) et une molécule lipidique (sphères centrales). L'EPCR est constitué de deux hélices α et huit feuillets β , qui créent une cavité chargée de phospholipides. La fixation des ions calcium (sphères en magenta) au domaine Gla de la PC, expose la partie N-terminale de la boucle ω , qui en l'absence de l'EPCR interagit avec les phospholipides au niveau des surface membranaires.

2.2. Gène et régulation de l'expression

Le gène de l'EPCR, cloné en 1998, est localisé sur le chromosome 20 en position q11.2. Il couvre une séquence de 6 kb et comporte quatre exons et trois introns. Le premier exon code pour la région non codante en 5' (5' UTR : *untranslated region*) et le peptide signal. La plus grande partie de son domaine extracellulaire est codée par les exons 2 et 3. Le domaine transmembranaire, la courte queue intra-cytoplasmique et la région 3'UTR se situent dans l'exon 4 (Fukudome and Esmon, 1995).

L'EPCR est exprimé, principalement, par l'endothélium des veines (veines cave inférieure) et des artères (aorte, artères cardiaques et pulmonaire). Son expression est faible dans les capillaires (capillaires de la paroi alvéolaire des poumons, peau, médullaire rénale, glandes surrénales, nodules lymphoïdes et sinus médullaires) et dans certaines rares veinules post-capillaires (Laszik et al, 1997 ; Fukudome et al, 1998 ; Ye et al, 1999).

L'expression préférentielle de l'EPCR au niveau de l'endothélium est liée à sa régulation génétique. En effet, il a été démontré, chez un modèle murin, qu'une partie du promoteur du gène de l'EPCR réprime son expression au niveau de la microcirculation et que

la délétion de cette partie alignait le taux d'expression du gène de l'EPCR dans la microcirculation à celui des gros vaisseaux (Gu et al, 2000).

Une étude *in vivo*, montre que l'expression de l'EPCR est augmentée dans un contexte inflammatoire. En effet, suite à une perfusion d'endotoxine chez le rat, le taux d'ARN messenger est augmenté d'un facteur de trois et sa concentration plasmatique d'un facteur de quatre. En cas de perfusion préalable des rats, par l'hirudine, cette augmentation est supprimée. Ce même phénomène est observé en cas d'addition du peptide agoniste de PAR-1, récepteur de la thrombine. Ces résultats mettent en évidence l'interdépendance entre le taux d'ARN messenger de l'EPCR et la thrombine. En effet, le gène de l'EPCR renferme, dans sa séquence promotrice, un élément de réponse à la thrombine (Gu et al, 2000).

2.3. Solubilisation de l'EPCR : mécanisme, propriétés et régulation génétique

Le mécanisme de la sécrétion de l'EPCR soluble (EPCRs) dans le plasma a été mis en évidence et caractérisé en 2000 (Xu et al, 2000). La forme circulante de l'EPCR résulte de la protéolyse constitutive de l'EPCR membranaire par une métalloprotéase, le TNF- α *converting enzyme*/ ADAM 17 (TACE) (Qu et al, 2007). L'EPCRs de 42 kDa est capable de fixer ses ligands naturels, notamment la PC et la PCA avec la même affinité que l'EPCR membranaire.

Cela dit, en fixant la PC, l'EPCRs inhibe son activation par compétition avec l'EPCR membranaire. Aussi, en séquestrant la PCA, l'EPCRs empêche ce ligand d'interagir avec les surfaces membranaires négativement chargées et nécessaires au clivage des facteurs de coagulation Va et VIIIa. Ainsi, l'EPCRs, en bloquant l'activité anticoagulante de la PC, se convertit en un facteur thrombogénique (Kurosawa et al, 1997 ; Liaw et al, 2000 ; Regan et al, 1996).

Le clivage métalloprotéique n'est pas le seul mécanisme impliqué dans le clivage du domaine membranaire de l'EPCR et sa libération dans le plasma, puisqu'il a été démontré que l'EPCR pouvait aussi être libéré sous l'action de la protéinase-3 (PR3) des polynucléaires neutrophiles activés (Mohan Rao et al, 2014).

D'autre part, la régulation de l'affinité de l'EPCR aux métalloprotéases est liée à des mécanismes d'épissage alternatif de son gène. En effet, le gène de l'EPCR présente 13 polymorphismes à un seul nucléotide (SNP : *single nucleotide polymorphism*), comme schématisé dans la Figure 17.

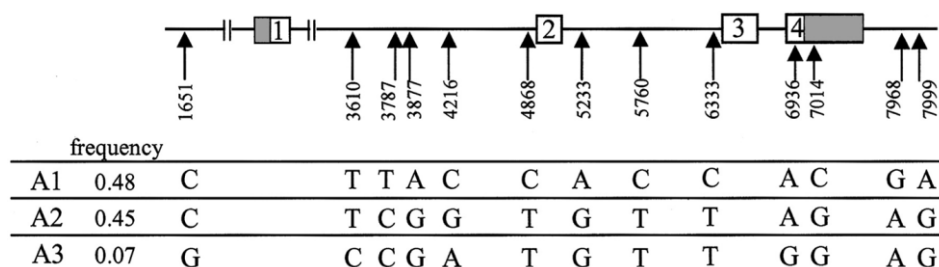


Figure 17 : Structure du gène codant pour l'EPCR et ses haplotypes (Saposnik et al, 2004).

Les exons sont numérotés de 1 à 4. Les zones transcrites sont représentées en gris foncé. Les flèches noires indiquent la localisation des 13 polymorphismes (SNP). Le tableau décrit les loci des SNP, localisés d'après la séquence de référence GenBank AF106202.

Ces SNPs caractérisent 2 haplotypes majoritaires A1 et A2 avec une fréquence allélique respective de 0,48 et 0,45 et un troisième haplotype A3 rare avec une fréquence allélique de 0,07. L'haplotype A3 est caractérisé, essentiellement, par la substitution en position 6936 d'une base d'Adénosine par une base de Guanosine (6936A/G). Cet SNP entraîne la substitution, en position 219 au niveau transmembranaire de la protéine, d'un résidu sérine par une glycine. Cette modification augmenterait l'affinité de l'EPCR aux métalloprotéases (Qu et al, 2006).

Saposnik et al (Saposnik et al, 2004) étaient les premiers à suggérer la forte association entre l'haplotype A3 de l'EPCR et sa concentration plasmatique. Depuis, le nombre d'études qui discutent la corrélation entre l'haplotype A3 de l'EPCR et l'incidence de la maladie thromboembolique ne cesse d'augmenter.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux d'étude de la fréquence du génotype 6936AG et l'incidence de thrombose chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique (Besbes et al, sous presse).

3. Fonctions du système PC/EPCR

3.1. Fonction anticoagulante

Comme nous l'avons décrit précédemment, la fixation de la PC sur son récepteur membranaire, EPCR, entraîne une accélération d'un facteur de trois à cinq de la vitesse d'activation de la PC par le couple thrombine-thrombomoduline. Cette accélération est expliquée par une diminution de la Km (constante de Michaelis) qui passe de 869 nM – quand l'activation de la PC se fait sur une membrane cellulaire exprimant seulement la thrombomoduline (TM) – à 140 nM lorsque les cellules expriment à la fois la TM et l'EPCR (Fukudome et al, 1998).

L'activation de la PC est critique pour la régulation négative de la coagulation. En effet, en présence de la protéine S, la PCA inactive les facteurs Va et VIIIa, deux facteurs clé responsables de l'amplification des réactions de coagulation – inhibant ainsi la formation de la thrombine.

En plus de son rôle d'inhibiteur de la fibrinof ormation, la PCA peut également promouvoir la fibrinolyse en inactivant le PAI-1, favorisant ainsi la génération de plasmine (Ikezo, 2015).

La fonction anticoagulante du système PC/EPCR est illustrée dans la Figure 18.

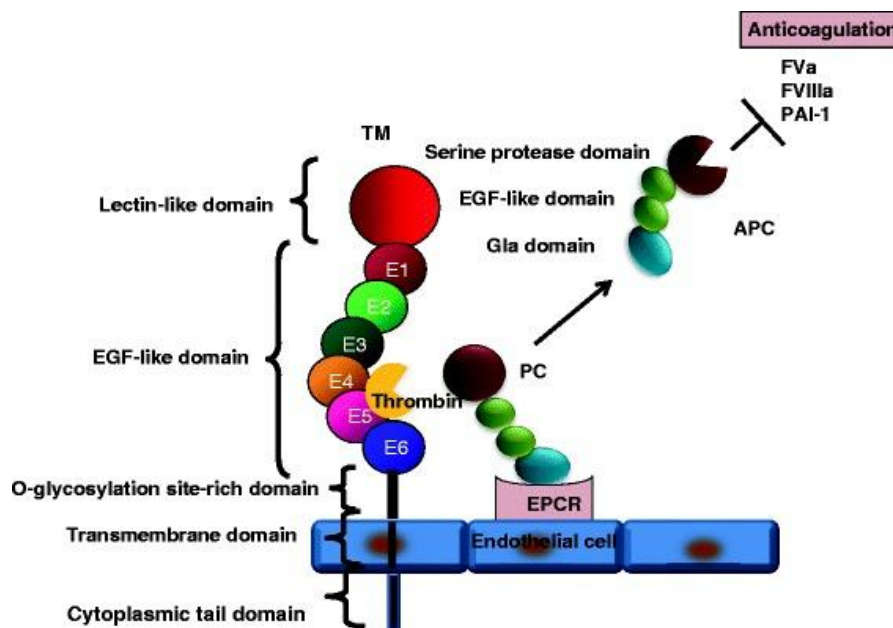


Figure 18 : Fonction anticoagulante du système PC/EPCR (Ikezo, 2015).

TM : thrombomoduline; PC : protéine C; APC : PC active; EPCR : récepteur endothélial de la PC; PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor-1*; EGF : *epidermal growth factor*; Gla : acide gamma-carboxyglutamique.

3.2. Fonctions cytoprotectrice et anti-inflammatoire

Depuis quelques années, le statut de la PCA, en tant que facteur impliqué exclusivement dans la coagulation, a changé pour intégrer d'autres fonctions comme la fonction cytoprotectrice et anti-inflammatoire (Figure 19).

Diverses études de recherche et/ou cliniques rapportent des preuves quant à l'implication de la PCA dans l'inflammation. Une étude, *in vivo*, montre que l'inhibition de la fixation de la PC à son récepteur aggrave la réponse aux doses sublétales d'*Escherichia coli* chez les babouins (Taylor et al, 2000). Une étude chez l'homme montre que l'administration de PCA, dans le cadre d'essais cliniques, réduit la mortalité chez des patients atteints d'un

sepsis sévère (Bernard et al, 2001). Ces résultats mettent, aussi, en évidence le rôle cytoprotecteur que joue le système PC/EPCR. Ce rôle est lié essentiellement à la régulation négative de l'inflammation et de l'apoptose. Il concerne également le maintien de l'intégrité de la barrière membranaire et se traduit particulièrement par la régulation de la signalisation cellulaire et l'altération de gènes impliqués dans ces deux processus (Joyce et al, 2001).

Plusieurs voies de signalisation sont initiées suite à l'activation du récepteur de la thrombine PAR-1 par la PCA. En effet, la PC, liée à son récepteur endothélial, est capable d'activer PAR-1, par protéolyse de son extrémité N-terminale. Le PAR-1 s'autoactive alors par sa nouvelle extrémité, change de conformation et déclenche différentes voies de signalisation. Les effets observés varient, ensuite, en fonction du type cellulaire et du tissu. Ainsi, PAR-1 peut stimuler d'autres récepteurs, tels que le récepteur au sphingosine-1-phosphate (S1P1), un récepteur à protéine G appartenant à la famille de gènes de différenciation endothéliale. La S1P1 active la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), dont la kinase ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*). Une cascade de réaction est enclenchée, aboutit à une meilleure stabilité du cytosquelette intracellulaire et promeut l'angiogenèse (Weiler, 2011).

D'autre part, la PCA est aussi capable de modifier le profil d'expression des gènes de protéines d'adhésion et ceux de l'inflammation; et ce, en modulant négativement les gènes pro-inflammatoires et positivement des gènes *anti-inflammatoires*. Par exemple, la PCA peut être à l'origine d'une diminution de l'expression du facteur de transcription NFκB. Cela entraîne une diminution de l'expression des gènes qu'il contrôle, et notamment une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et le TNFα, ainsi qu'une inhibition de la synthèse de molécules d'adhésion telles que ICAM-1, VCAM-1 et la sélectine E (Okajima, 2004).

La PCA peut, également, induire des voies de signalisation par liaison directe à d'autres récepteurs tels que les sous-unités β1/β3 des intégrines (effet anti-inflammatoire), le récepteur de l'apolipoprotéine E, ApoER2, (effet cytoprotecteur). En se fixant, au récepteur hétérodimérique des intégrines CD11b/CD18, la PCA enclenche la voie de signalisation PAR-1/S1P1. Cela résulte en la suppression de la réponse inflammatoire induite par les macrophages activés (Ikezoe, 2015).

Indépendamment de PAR-1, la PCA peut neutraliser les complexes histone-ADN, (appelés NET pour *neutrophil extracellular trap*), libérés suite à une réponse à une inflammation et/ou une infection. La PCA est capable de contrecarrer ce mécanisme de deux

manières : par sa fonction antiapoptotique consécutive à sa fixation à l'EPCR et qui limite la formation de NET ou par protéolyse des histones, limitant par conséquent l'effet cytotoxique au niveau du site inflammatoire (Xu et al, 2009).

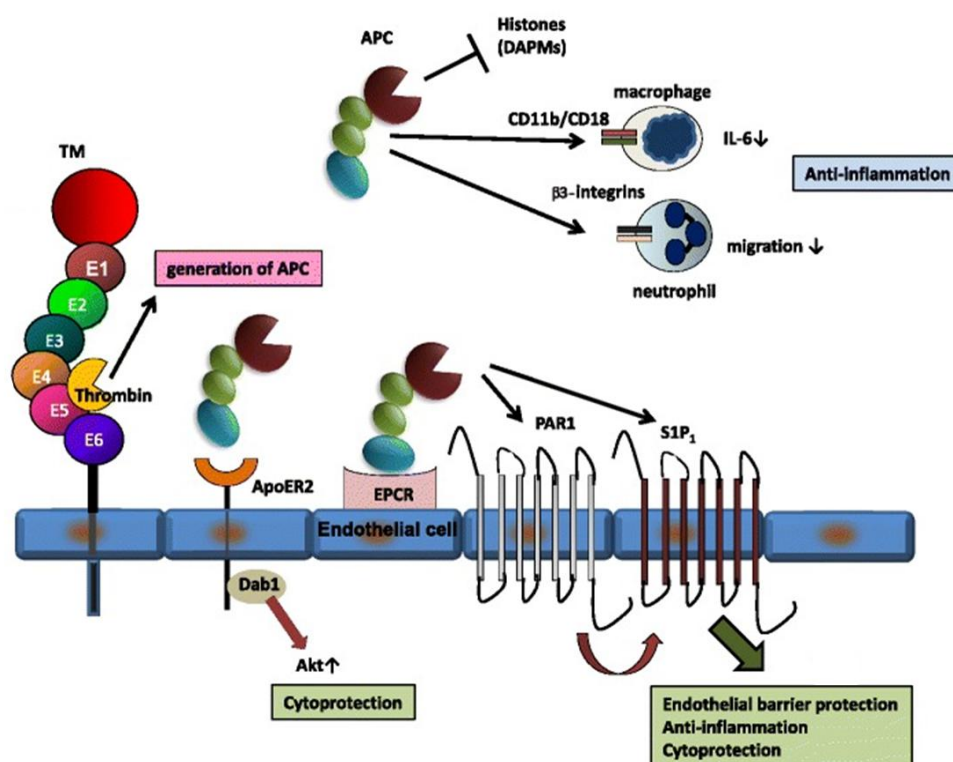


Figure 19 : Fonction cytoprotectrice et anti-inflammatoire du système PC/EPCR (adaptée de (Ikezoe, 2015)).

3.3. Fonction anti-apoptotique

La protéolyse de PAR-1 par la PCA peut amorcer trois phénomènes impliqués dans l'apoptose : la diminution de la dégradation de l'ADN, la réduction de l'activation de la caspase 3 et le blocage de la translocation de la phosphatidylsérine vers l'extérieur de la membrane cellulaire. La PCA est, également, capable d'induire des régulations post-traductionnelles des gènes de l'apoptose – en modulant positivement le gène anti-apoptotique Bcl-2 et négativement le gène pro-apoptotique Bax et le supresseur de tumeur p53 (Cheng *et al*, 2003).

3.4. Système PC/EPCR et pathologies

3.4.1. Système PC/EPCR et thrombose

Le complexe PCA/EPCR joue un rôle crucial dans la coagulation. Tout défaut ou perturbation, affectant la fonction anticoagulante de la PCA ou de l'EPCR, peut être à l'origine de diverses manifestations pathologiques, notamment l'augmentation du risque de thrombose.

Ainsi, la résistance à la PCA constitue un facteur majeur d'hypercoagulabilité. On peut distinguer :

* La résistance congénitale : elle est considérée comme la cause majeure de thrombophilie héréditaire. Elle a été découverte en 1993 par Dahlbäck suite à des observations, *in vitro*, portant sur l'effet d'ajout de PCA aux plasmas de patients thrombophiles, comparé à celui observé dans le plasma normal. En effet, Dahlbäck et ses collègues ont remarqué que l'ajout de PCA ne retarde pas le temps de coagulation pour certains patients à profil thrombophile par rapport à un plasma « normal ». Cette résistance à la PCA a été, ensuite, expliquée par la détection d'une mutation au niveau du gène codant pour le facteur V. Cette mutation se traduit par le remplacement d'une arginine en position 506 par une glutamine (FV Leiden). Cette substitution induit la suppression du premier site de clivage au niveau du facteur V, et par conséquent la diminution de la vitesse de son hydrolyse par la PCA. Le risque de survenue de thrombose est alors multiplié par sept chez les sujets hétérozygotes et d'un facteur de 80 chez les sujets homozygotes (Dahlbäck et al, 1993 ; Dahlbäck, 2008).

La résistance acquise est indépendante du facteur V Leiden. Elle est liée à la présence d'anticorps antiphospholipides dirigés contre la prothrombine ou contre le co-facteur protéine S (Nojima et al, 2002 ; Nojima et al, 2009).

En ce qui concerne l'EPCR, une insertion homozygote de 23 pb au niveau l'exon 3 du gène d'EPCR a été identifiée comme étant à l'origine de l'expression d'un récepteur tronqué. Cette mutation est associée à la survenue de MVTE, d'infarctus du myocarde et de septicémie fatale chez l'homme (Biguzzi et al, 2001 ; Kendirli et al, 2007).

Aussi, une étude montre que 20% des patients, atteints du syndrome des antiphospholipides, présentent un taux d'anticorps dirigés contre l'EPCR qui est supérieur à la normale. Cela entraîne une diminution du taux de PCA et se traduit par l'apparition de maladies comme le lupus érythémateux ou la MVTE aux épisodes multiples (Lavigne-Lissalde et al, 2005).

Un taux élevé des anticorps anti-EPCR est également associé au risque de thrombose de placenta, conduisant à un avortement spontané chez la femme (Lavigne-Lissalde et al, 2005). Une autre étude suggère que les anticorps anti-EPCR synthétisés par le sujet malade, constitue un facteur de risque d'infarctus du myocarde chez les jeunes femmes (Montes et al, 2005).

Enfin, la forme circulante de l'EPCR (EPCRs) est associée, dans plusieurs études, à un risque élevé de thrombose. Approximativement, 20% de la population générale présentent un taux d'EPCRs compris entre 200 et 700 ng/mL, contre une concentration plasmatique normale comprise entre 75 et 178 ng/mL. Ces variations de la concentration d'EPCRs dans le plasma est sous contrôle génétique dans 50 à 80% des cas. La majorité des sujets, présentant un taux élevé d'EPCRs, sont porteurs de l'haplotype A3 (Saposnik et al, 2004).

Également, un taux élevé d'EPCRs cause une perte des propriétés anti-inflammatoires de la PCA (Figure 20). Cet effet est lié à deux mécanismes : la liaison aux neutrophiles activés diminuant leur disponibilité au niveau des surfaces endothéliales et le blocage des voies de signalisation de PAR-1 modulées par la PCA (Gandrille, 2008).

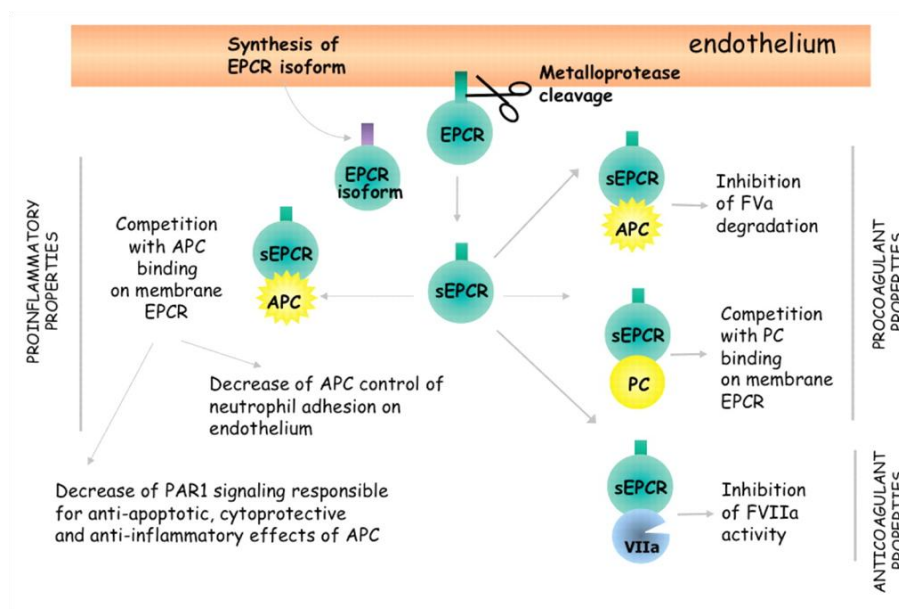


Figure 20 : Propriétés et effets de l'EPCRs (Gandrille, 2008).

3.4.2. Système PC/EPCR et cancer

Les premières études suggérant une corrélation entre la PCA et la pathologie cancéreuse sont basées sur des observations cliniques portant sur la résistance à la PCA. La fréquence du facteur V Leiden est comparable entre la population non cancéreuse et celle atteinte de cancer. En revanche, les patients cancéreux semblent avoir une prédisposition à développer une résistance acquise à la PCA (Green et al, 1997 ; Haim et al, 2001).

Le rôle du système PC/EPCR dans la pathologie cancéreuse est complexe. La capacité de l'EPCR de promouvoir la génération de PCA, limitant la formation de thrombine, devrait avoir un effet préventif de la croissance tumorale. Aussi, par son effet cytoprotecteur et son

implication dans le maintien de la barrière vasculaire, le système PC/EPCR peut limiter l'extravasation cellulaire et la dissémination métastatique.

Une étude sur un modèle de souris transgéniques avec une tumeur métastatique et surexprimant l'EPCR, révèle une diminution significative des métastases au niveau des poumons et du foie ; et ce, par rapport au phénotype sauvage exprimant un taux normal d'EPCR. Une diminution similaire des métastases est observée quand les souris transgéniques sont traitées avec la PCA (Bezuhly et al, 2009).

A l'opposé de ces résultats, l'EPCR semble promouvoir la métastase dans le cancer du poumon. En effet, l'extinction du gène de l'EPCR ou le blocage de ses interactions avec la PCA réduit l'infiltration des cellules cancéreuses dans l'organe cible, diminuant ainsi l'activité prométastatique de la tumeur (Antón et al, 2012).

Il semble que les effets attribués à l'EPCR exprimé par l'endothélium de l'hôte sont à l'opposé de ceux induits par l'EPCR exprimé par les cellules tumorales. L'EPCR, exprimé par les cellules cancéreuses, est capable de majorer le potentiel métastatique de ces cellules (Figure 21). En effet, dans le compartiment tumoral, les voies de signalisation régulées par la PCA et son récepteur promeuvent la survie des cellules cancéreuses, favorisent l'angiogenèse et inhibent l'apoptose de ces cellules. Le système PC/EPCR favorise, aussi la migration et l'invasion des cellules tumorales (Mohan Rao et al, 2014). Dans notre équipe, nous mettons en évidence la forte association entre l'expression de l'EPCR par les cellules cancéreuses ovariennes, l'effet de la PCA, et le potentiel migratoire et métastatique de ces cellules (Althawadi et al, 2015).

Dans ce contexte, une étude, *in vivo*, sur des souris auxquelles ont été injectées des cellules du cancer du sein surexprimant l'EPCR (EPCR⁺), révèle un fort potentiel de croissance tumorale chez ces souris, à un stade initial de la progression cancéreuse. Curieusement, à la fin du traitement, le volume de la masse tumorale induite chez ces souris était à 30% plus faible que celui détecté chez des souris traitées par injection de cellules cancéreuses caractérisées par une faible expression d'EPCR. L'analyse des tumeurs montre une réduction significative de l'infiltration des macrophages et de l'angiogenèse dans les cellules cancéreuses (EPCR⁺), ce qui pourrait expliquer la diminution de la croissance tumorale à un stade avancé (Keshava et al, 2013).

En revanche, dans les mésothéliomes pleuraux malins (MPM), l'EPCR est doté d'un effet suppresseur de la croissance tumorale par la promotion de l'apoptose cellulaire et/ou en

inhibant la prolifération cellulaires tumorale. Cela dit, le rôle joué par l'EPCR dans les MPM n'est pas encore connu. La présence de récepteurs spécifiques au niveau des MPM ou dans le microenvironnement pleural constitue une hypothèse à explorer (Keshava et al, 2013).

Le rôle de la forme circulante de l'EPCR dans la pathologie cancéreuse est mis en évidence par un nombre réduit d'études (Heng et al, 2013). Dans notre équipe, nous démontrons que l'EPCRs peut constituer un biomarqueur dans le cancer ovarien (Ducros et al, 2012). Aussi, nos travaux révèlent l'effet prépondérant, du complexe plasmatique PCA et EPCRs, sur la modulation de la réponse immunitaire dans le cancer de l'ovaire (Azzazene et al, 2013).

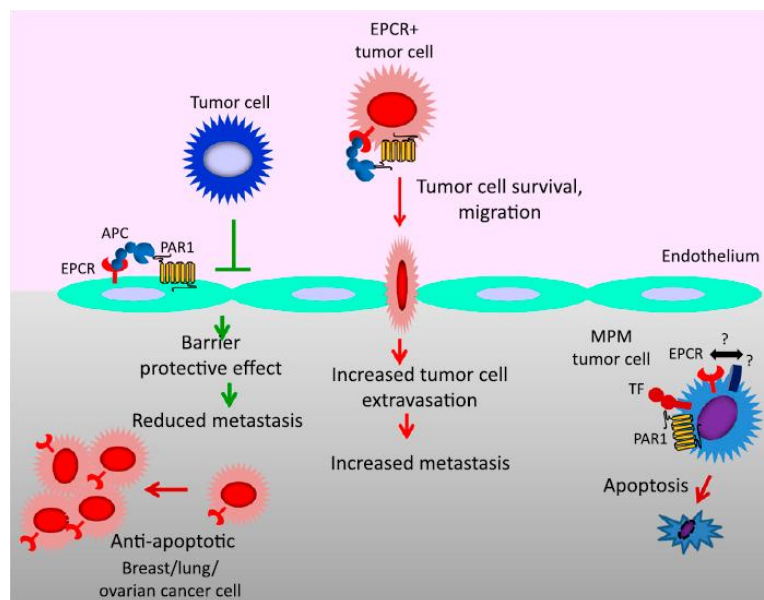


Figure 21 : Effets multiples de l'EPCR dans le cancer (Mohan Rao et al, 2014).

Chapitre 7. Thrombopoïétine et plaquettes

En cas de lésion vasculaire, les plaquettes constituent le premier acteur cellulaire du système hémostatique à arriver sur le site de la plaie. Elles s'agrègent et forment un thrombus blanc pour fermer la brèche et stopper l'hémorragie.

En outre, le rôle des plaquettes, dans la croissance tumorale, la métastase et la thrombose, est bien établi.

Dans ce chapitre, nous résumons les propriétés et le rôle de la thrombopoïétine, la principale cytokine régulatrice de la production de plaquettes. Nous examinons, aussi, les principaux aspects d'implication de la thrombopoïétine et des plaquettes dans le processus tumoral.

1. La thrombopoïétine

1.1. Gène et structure protéique

Le terme thrombopoïétine (TPO) a été utilisé pour, la première fois, en 1958 pour décrire un régulateur hormonal présent dans le plasma thrombocytopénique (Kelemen et al, 1958). A partir de cette description, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à l'isolation et la purification de la TPO à partir de plasma, de sérum et d'autres sources physiologiques.

La découverte et la caractérisation du virus murin de leucémie myéloproliférative (MPLV), chez des souris infectées, ont apporté une réelle perspective de recherche sur la TPO (Wendling et al, 1986). L'oncogène viral en question (*V.mpl* ou *Mpl*) fût cloné en 1990 et le protogène (*c-mpl* ou *Mpl*) deux ans plus tard (Souyri et al, 1990 ; Vignon et al, 1992). En se basant sur la structure du *c-mpl*, il était évident que le gène identifié codait pour un récepteur de cytokine hématopoïétique. Ce groupe de cytokines comprend, entre autres, l'érythropoïétine (EPO) et l'interleukine-3 (IL-3) (Cosman, 1993). C'est en examinant le profil protéique de la lignée cellulaire bipotente érythroïde et mégacaryocytaire (HEL) – à partir de laquelle le *c-mpl* fût identifié – que la TPO a été finalement proposée comme ligand de ce récepteur (Hitchcock and Kaushansky, 2014).

Le gène de la TPO a été ensuite cloné et la séquence d'acides aminés caractérisée (Bartley et al, 1994 ; de Sauvage et al, 1994). Le gène humain de la TPO est localisé sur le

chromosome 3q27, s'étend sur 6,2 kb et comporte cinq introns et six exons (Ogami, 1996 ; Sasaki et al, 1999). Ce gène code pour une protéine précurseur de 30 kDa et d'une séquence de 353 acides aminés. La protéine mature (332 AA) comprend deux domaines :

* Un domaine amino-terminal : il est composé de 154 résidus, présente une homologie de structure à l'EPO et capable de se fixer au récepteur c-Mpl .

* Le domaine carboxy-terminal : il est unique dans sa structure et est dépourvu d'activité enzymatique. Cependant, il joue un rôle dans le prolongation de la demi vie de la TPO circulante et sert aussi de protéine chaperon intermoléculaire, aidant au repliement du polypeptide et la formation de la cytokine mature (Hitchcock and Kaushansky, 2014).

La TPO est sécrétée, majoritairement, par le foie, les poumons et la moelle osseuse. Mais l'expression du gène de la TPO a été, également, mis en évidence dans la rate, les testicules, les ovaires et le système nerveux (Marcucci and Romano, 2008).

1.2. Régulation de l'expression du gène et du taux de la thrombopoïétine

Le gène de la TPO présente une région non codante en 5 atypique (5'UTR). Contrairement à la majorité des gènes, la traduction de la TPO ne se fait pas au premier codon ATG de l'ARN messager mais au huitième ATG (troisième exon). Ce huitième codon est enchâssé dans le court cadre de lecture du septième codon. Cela rend le taux de traduction à partir du huitième codon peu efficace. Ainsi, dans des conditions physiologiques, la TPO est sécrétée en petite quantité, quel que soit son taux d'ARN messager (Hitchcock and Kaushansky, 2014).

Chez des patients atteints de thrombocytémie essentielle héréditaire, des mutations au niveau du gène de la TPO sont détectées. Ces mutations augmentent l'efficacité de la traduction de l'hormone et constituent un facteur de risque de thrombocytose (Wiestner et al, 1998). Indépendamment de sa régulation génétique, la concentration plasmatique de la TPO peut varier en fonction de la capacité des plaquettes de l'absorber, l'internaliser et la détruire. Ainsi, chez les patients atteints de thrombocytose, le faible taux de TPO pourrait être expliqué par la forte métabolisation de l'hormone par les plaquettes. D'autres mécanismes peuvent réguler l'expression de la TPO, notamment certains contextes inflammatoires *via* une régulation médiée par l'IL-6 (Hitchcock and Kaushansky, 2014).

Enfin, la transcription et l'expression du gène de la TPO peuvent être augmentées par l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA). Cela renforce l'hypothèse d'une possible induction de la sécrétion de la TPO par des stimuli exogènes et/ou inflammatoires.

1.3. Thrombopoïétine et isoformes

Le gène de la TPO présente un site d'épissage alternatif au niveau de son sixième exon. Six variants d'épissage sont identifiés et validés par plusieurs études, caractérisant six principales isoformes de la protéine (Figure 22).

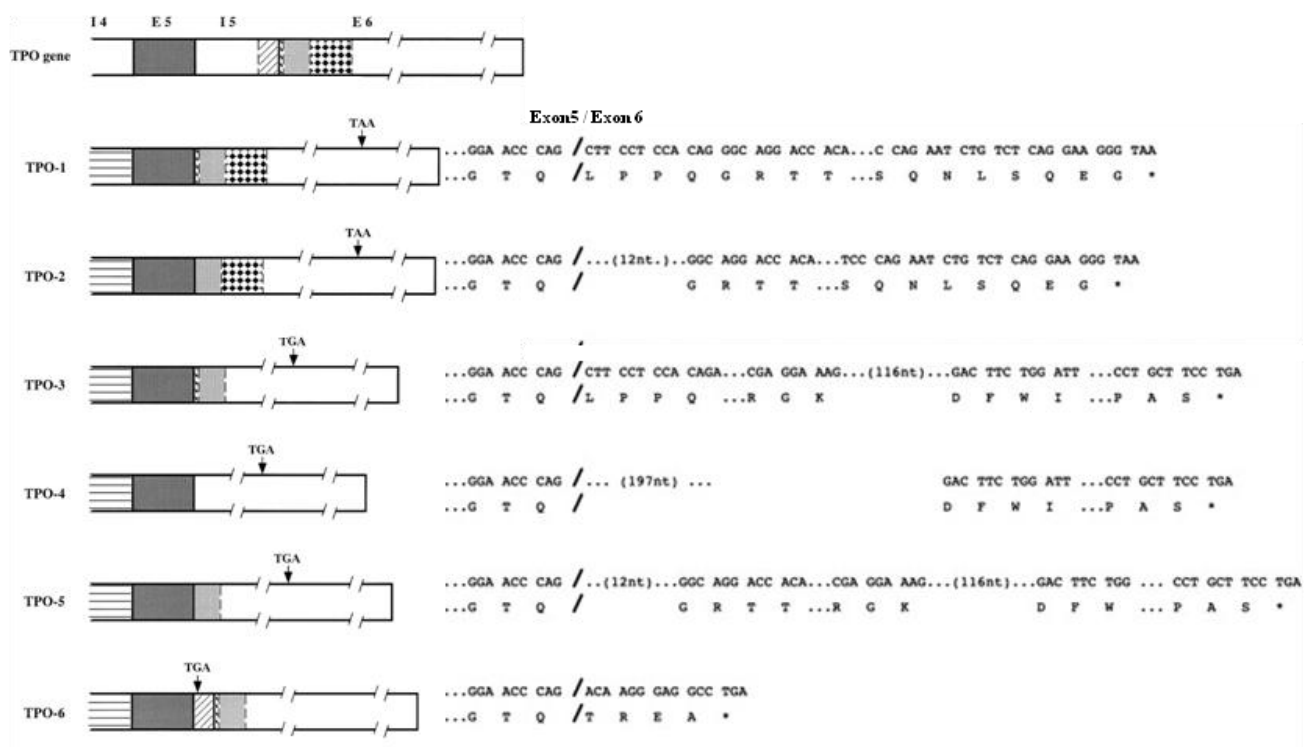


Figure 22 : Illustration schématique du gène humain de la thrombopoïétine (Sasaki et al, 1999 ; Marcurri et al, 2008).

Structure du gène de l'intron 4 (I4) à l'exon 6 (E6) et différentes isoformes.

Deux autres variants ont été également identifiés : le variant TPO Δ Ex2, dépourvu de l'Exon 2 et le variant TPO+85, résultant de l'activation d'un site accepteur d'épissage en extrémité 3' de l'intron 2 (Marcucci et al, 2007).

L'épissage alternatif de l'ARN messager de la TPO, à l'origine de la synthèse de plusieurs isoformes, semble être impliqué dans la modulation de divers fonctions biologiques, en plus de la fonction principale qui est la thrombopoïèse (Tableau 6).

Variant d'épissage	Organe exprimant la TPO	Taux de sécrétion	Fonctions
TPO1	foie, rein, muscle squeletique, placenta, rate, testicules, ovaires, poumon fœtal, moelle osseuse, cerveau, lignées de cellules de carcinome	Secrétée	Activité proliférative Inhibition de l'apoptose mégacaryocytaire Activité proapoptotique Inhibition de la différentiation neuronale induite par le NGF et la signalisation par ERK
TPO 2,3,4,5,6	lignées cellulaires de carcinome, foie, rein, cerveau	faiblement secrétée	Pas d'activité proliférative Régulation négative?
TPO ΔEx2	lignées cellulaires de carcinome, foie, rein, cerveau	Secrétée	Pas d'activité proliférative Régulation négative?
TPO + 85	lignées cellulaires de carcinome, foie, rein, cerveau	?	Pas d'activité proliférative Régulation négative?

Tableau 6 : Expression et fonctions des principales isoformes de la thrombopoïétine (Marcucci and Romano, 2008).

2. Régulation de la mégacaryocytopoïèse et la production de plaquettes

Plusieurs études, *in vitro*, suggèrent que la TPO intervient dans les différents stades de la mégacaryocytopoïèse. Elle n'est pas, seulement, impliquée dans la différenciation des mégacaryocytes, mais aussi, dans la prolifération des cellules progénitrices. Elle agit comme agent stimulant les colonies de mégacaryocytes aux stades précoces de mégacaryocytopoïèse et elle joue un rôle crucial dans la différenciation et la maturation des mégacaryocytes, en une batterie de cellules polyploïdes capables de produire les plaquettes (Hitchcock and Kaushansky, 2014).

D'un point de vue mécanistique, la phosphorylation du résidu tyrosine au niveau du c-MPL et d'autres protéines associées, est primordiale pour enclencher l'action de la cytokine hématopoïétique (Sato et al, 1992). Cependant, comme le c-MPL est dépourvu d'activité

kinase intrinsèque, il recrute les kinases indispensables à la transduction des signaux induits par la TPO (Hitchcock and Kaushansky, 2014)..

Ainsi, suite à la fixation de la TPO à son récepteur, la kinase JAK2 est recruté par le c-MPL. Une cascade de réactions est enclenchée et résulte en l'augmentation du nombre de mégacaryocytes et leur ploïdie, la maturation cytoplasmique et la libération des plaquettes par fragmentation transendothéliale cytoplasmique (Gewirtz, 1995).

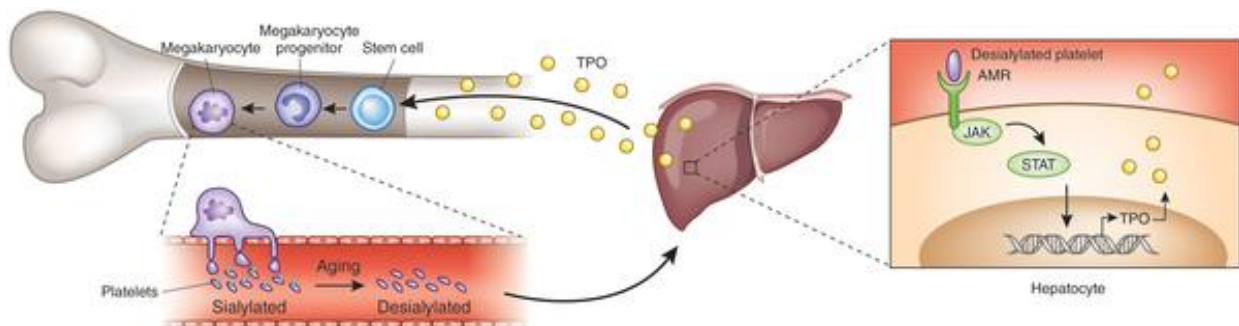


Figure 23 : Boucle de régulation thrombopoïétine/plaquettes (Kile, 2015).

Régulation de la production des plaquettes par la thrombopoïétine et rétro-régulation de la sécrétion de la TPO par les plaquettes désialylés. A un stade avancé de leur vie, les plaquettes circulantes perdent leur acide salicylique au niveau de leur surface et sont reconnues, fixées et absorbées par les récepteurs Ashwell-Morell (AMR) dans les hépatocytes. Cela stimule la voie de signalisation JAK-STAT et induit une régulation subséquente positive de l'ARN message de la TPO.

Les plaquettes expriment le c-MPL et toute la machinerie nécessaire à l'action de la TPO : JAK2, STAT3, STAT5, AKT et Ras (Hitchcock and Kaushansky, 2014). Les plaquettes désialylées à un stade avancé de leur vie, seraient, en outre, capables d'induire un mécanisme de rétro régulation de la sécrétion de la TPO dans le foie, comme illustré dans la Figure 23 (Kile, 2015).

Enfin, le c-MPL est capable de recruter d'autres familles de kinases comme la famille MAPK. Une fois liée à son récepteur, la TPO stimule la phosphorylation des MAP Kinases au niveau de leurs résidus tyrosine, ce qui déclenche l'activation de la voie de signalisation pilotée par les MAP Kinases. Plusieurs études suggère l'implication de cette famille de kinases, une fois activée, dans la différenciation des mégacaryocytes (Rouyez et al, 1997; Rojnuckarin et al, 1999).

3. Rôle de la thrombopoïétine et des plaquettes dans le cancer et la thrombose

Dans des conditions physiologiques, la TPO est majoritairement produite par le foie. Cela dit, une étude, *in vitro*, montre que certaines lignées cellulaires, issues de carcinome humain, sont aussi capables de sécréter la TPO (Sasaki et al, 1999). Une étude clinique met en évidence, par une méthode d'immunohistochimie, la présence de la TPO dans les cellules de carcinome ovarien chez une patiente (Furuhashi et al, 1999). Une autre étude suggère que le taux de TPO, dans le plasma, peut constituer un marqueur de la pathologie cancéreuse ovarienne. Cela dit, les résultats de dosage des plaquettes chez la population malade étudiée ne corrélaient pas avec le taux de TPO plasmatique (Tsukishiro et al, 2008).

D'un point de vue mécanistique, et indépendamment de son rôle dans la mégacaryocytopoïèse, la TPO peut jouer un rôle dans l'adhésion plaquettaire. En effet, même à faibles concentrations, la TPO accélère l'adhésion des plaquettes au facteur vWF et prévient même leur détachement à une forte concentration. La TPO pourrait, donc, jouer un rôle dans la coagulation (Van Os et al, 2003). Aussi, des mutations dans le gène du récepteur c-MPL et celui de JAK2 (V617F) sont reportées comme étant impliquées dans les néoplasmes myéloprolifératifs (Kilpivaara and Levine, 2008).

Les résultats concernant l'implication directe de la TPO dans le cancer et/ou la coagulation sont relativement élusifs et les mécanismes par lesquelles cette cytokine est régulée et/ou peut agir dans ce contexte sont mal connus.

Nous sommes les premiers à mettre en évidence et de caractériser, *in vitro* et *in vivo*, l'expression du gène de la TPO par des cellules issues de carcinome ovarien humain. Nous montrons, aussi, l'effet de la PCA, sur l'induction de la production de la TPO ovarienne. Nous vérifions, également, le maintien de la fonction biologique de la cytokine ovarienne, suggérant ainsi, le rôle potentiel que pourrait avoir la TPO non hépatique dans le processus tumoral d'une part, et dans d'autres voies de signalisation activées par la PCA d'autre part (Besbes et al, article soumis).

En revanche, le rôle des plaquettes et les mécanismes par lesquelles elles agissent dans la pathologie cancéreuse, notamment dans la métastasogenèse est bien établi (Gupta and Massagué, 2004). L'implication des plaquettes dans la dissémination tumorale est mise en évidence grâce à des modèles animaux. Ces expérimentations révèlent l'expression des récepteurs de la thrombine de type PAR-4, par les plaquettes (Camerer et al, 2004). De plus, l'agrégation des plaquettes se base sur l'interaction des récepteurs plaquettaires GPIIb-IIIa qui

se lie au fibrinogène. Les monomères de fibrine étant capables de se lier aux molécules CD54 (ICAM 1), favorisent l'agrégation plaquettaire au niveau des cellules tumorales. La masse incluant la fibrine et les agrégats plaquettaire permet, entre autres, de protéger les cellules tumorales de l'action destructive des cellules NK, favorisant ainsi la dissémination métastatique (Palumbo and Degen, 2007).

Enfin, comme décrit dans une section précédente, les microparticules sont, en grande partie, d'origine plaquettaire. Leur implication dans l'hypercoagulabilité et dans la progression tumorale constituent une évidence (Morel et al, 2008 ; Gong et al, 2015).

OBJECTIFS

Le développement de thérapies ciblées constitue le principal objectif des travaux de recherche sur le cancer. Dans le but d'une meilleure compréhension et d'une maîtrise des différentes composantes du processus tumoral, ces études de recherche inspectent à la loupe tous les mécanismes impliqués dans cette pathologie. Ainsi, le travail présenté ici, s'inscrit dans cette perspective.

La tumorigenèse est un processus cellulaire et moléculaire complexe. Il ne s'agit pas d'une simple transition d'un phénotype « normal » à un phénotype « malin ». L'acquisition du phénotype tumoral est certes la conséquence de l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques – et la compréhension du rôle des oncogènes et des gènes suppresseurs dans l'oncogenèse est incontestablement primordiale. Cela dit, depuis quelques décennies, les approches d'étude de la biologie tumorale se sont bien développées et évoluées vers un concept plus complexe, celui de l'analyse des interactions hétérotypiques, régissant le microenvironnement tumoral.

Ce microenvironnement, appelé aussi stroma tumoral, est en communication étroite avec les cellules cancéreuses. Ces dernières agissent sur leur microenvironnement pour détourner ses composantes à leur profit. Le stroma réactif résultant conditionne la croissance des cellules tumorales et régule leur potentiel métastatique.

En outre, ces interactions peuvent déstabiliser la balance hémostatique et aussi perturber l'homéostasie de la coagulation. En effet, la pathologie cancéreuse constitue un véritable modèle d'hypercoagulabilité acquise. Cette association entre cancer et état prothrombotique repose sur des connexions complexes entre cancer, inflammation et hémostasie.

L'hypercoagulabilité conduit à la génération exacerbée de fibrine, encastrant la tumeur. L'échappement des cellules tumorales et leur dissémination métastatique sont étroitement liés à leur capacité à remodeler, par hydrolyse, la matrice extracellulaire de la tumeur. Même si la fibrinolyse constitue un mécanisme majeur dans le remaniement matriciel, curieusement, le processus d'inhibition de la formation de cette matrice reste peu étudié.

Le système PC et EPCR joue un rôle crucial dans l'inhibition de la fibrinof ormation. Ce complexe est aussi connu pour sa capacité de moduler le processus inflammatoire et apoptotique des cellules. Le système PC et EPCR peut, donc, jouer un rôle crucial dans le développement tumoral et la dissémination métastatique. Aussi, l'EPCR sous sa forme libre, en séquestrant la PCA et l'empêchant d'exercer sa fonction anticoagulante, promeut le dépôt de fibrine péri-tumoral. L'EPCR constituerait, par conséquent, un élément clé de l'hypercoagulabilité associée au cancer.

Le système PC et EPCR peut également induire directement des effets pléiotropes, aux différentes propriétés. Il est aussi impliqué dans diverses cascades de signalisation et différents processus biologiques.

Les objectifs de ce travail étaient :

- d'évaluer la pertinence du polymorphisme nucléotidique A/G en position 6936 du gène d'EPCR, en tant que biomarqueur de la thrombose chez des patients atteints d'hémopathies malignes.
- d'analyser l'effet modulateur de la PCA sur la sécrétion de la thrombopoïétine, une cytokine clé dans la régulation de la production des plaquettes, notamment dans le cancer de l'ovaire
- de caractériser la thrombopoïétine d'origine ovarienne, sur le plan génétique, post-transcriptionnel et fonctionnel.
- De détecter l'EPCR dans des lignées néoplasiques, ainsi que chez des patients atteints de cancer et juger sa validité en tant que marqueur de la pathologie cancéreuse.
- De vérifier les fonctions du système PC/EPCR, dans le cancer de l'ovaire, notamment dans la régulation de la réponse immunitaire tumorale et la promotion de la dissémination métastatique.

ORGANISATION DE L'OUVRAGE

Le présent ouvrage est divisé comme suit :

Les articles en premier-auteur sont présentés dans les deux premiers volets :

***Le polymorphisme nucléotidique en 6936A/G comme biomarqueur possible du risque thrombotique chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique.**

***Production d'une thrombopoïétine fonctionnelle par une lignée cellulaire de d'adénocarcinome ovarien.**

Les articles, de collaboration, portant sur la même principale thématique de recherche de ce travail, sont présentés selon l'ordre chronologique de leur publication :

***Le récepteur endothélial de la protéine C exprimé par les cellules du cancer de l'ovaire en tant que biomarqueur possible du début de la pathologie cancéreuse**

***Le récepteur plasmatique endothélial de la protéine C influence la réponse immunitaire innée dans le cancer de l'ovaire en diminuant la population de cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules auxiliaires TH17.**

***La protéine C activée promeut la migration des cellules de cancer de l'ovaire et limite la coagulabilité dans le microenvironnement tumoral.**

En annexes, trois publications sont présentées :

***Stratégies ciblant les protéines d'apoptose pour améliorer la thérapie de la leucémie lymphoïde chronique.**

***Nouvelle dimension dans le ciblage thérapeutique de la famille des protéines BCL-2.**

***Premiers "BH3 mimetics" ciblant MCL-1 comme thérapeutiques potentiels pour viser les traitements du cancer.**

MATERIELS ET METHODES

Les méthodes utilisées sont détaillées dans les sections « *Materials and methods* » des articles insérés ci-après.

Dans cette section, nous rappelons brièvement le principe et les étapes de chaque technique.

1. Culture cellulaire

1.1. Culture de lignées cellulaires

Les lignées cellulaires étudiées, adhérentes ou en suspension, sont cultivées dans le milieu de culture adéquat, complété de sérum de veau foetal préalablement décomplémenté, de L-glutamine et d'antibiotiques (streptomycine, pénicilline). A 80% de confluence, les cellules adhérentes sont rincées au PBS, détachées de leur support par un traitement à la trypsine ou à l'acutase, diluées dans leur milieu et centrifugées pour éliminer le traitement enzymatique. Le culot cellulaire est alors repris dans du milieu de culture et les cellules sontensemencées dans un plus grand nombre de flasques. Les cellules en suspension sont, quant à elles, diluées dans un volume adéquat de milieu de culture. Les lignées sont conservées dans l'azote liquide, dans un mélange de sérum (80%) et de DMSO (20%).

1.2. Co-culture cellulaire

La co-culture permet d'évaluer la réponse d'une première lignée cellulaire à des conditions données, induites par la croissance d'une deuxième lignée dans le même milieu de culture.

Dans ce travail, la croissance de la première lignée cellulaire dépend de la présence ou non d'une cytokine. Sa viabilité dépend donc de la capacité de la deuxième lignée cellulaire de produire et libérer la cytokine d'intérêt dans le milieu de culture commun. Les deux lignées sont séparées par un filtre de culture cellulaire, empêchant le contact directe entre les deux lignées et laissant circuler le milieu de culture et ses composantes de part et d'autre de la surface de séparation.

Il ne s'agit pas uniquement d'étudier la viabilité d'une lignée cellulaire en fonction d'une condition donnée, puisque le principal but de cette méthode est de mettre en évidence,

d'une façon indirecte, la production (ou non) de la cytokine d'intérêt par la deuxième lignée. Également, cette méthode nous permet d'étudier l'effet de certaines conditions sur l'induction ou la variation au niveau de la production de la cytokine par la lignée en question.

1.3. Culture primaire

Les échantillons d'ascites proviennent de patientes atteintes de carcinose péritonéale (service de chirurgie carcinologique digestive, hôpital Lariboisière, Paris). Les ascites sont récupérées et utilisées dans le cadre d'une activité de recherche après l'obtention du consentement de chaque patiente. Les amas cellulaires de l'ascite sont récupérés par simple centrifugation et mis en culture dans un milieu de culture adéquat, en présence de sérum de veau fœtal, de L-glutamine et d'antibiotiques (streptomycine, pénicilline). Le support de culture utilisé est préalablement « coaté » avec de la gélatine à 0.2%. Cette particularité est indispensable car elle permet de faciliter l'attachement et la croissance des cellules. A 80% de confluence, les cellules sont détachées de leur support par traitement enzymatique, réparties dans d'autres supports de culture, congelées ou traitées pour d'autres finalités.

2. Biologie moléculaire

2.1. Purification des cellules mononucléées

Les échantillons de sang veineux humain sont prélevés et collectés, après obtention d'un consentement écrit pour chaque donneur. Les échantillons sont recueillis dans des tubes contenant de l'héparine ou de l'EDTA.

Deux principales populations sont constituées : celle des donneurs sains (Banque du sang de l'hôpital Hôtel-Dieu, Paris) et celle des patients atteints d'hémopathie maligne (tumorothèque de l'hôpital de Saint-Antoine, Paris). Les cellules mononucléées de chaque échantillon sont isolées sur gradient de densité (Ficoll). L'isolement sur Ficoll repose sur les densités respectives des cellules et du Ficoll. Après centrifugation, les cellules mononucléées forment un anneau opaque surnageant au-dessus du Ficoll. L'anneau est délicatement prélevé, lavé et centrifugé. Le culot cellulaire est conservé à -80°C.

2.2. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des cellules mononucléées repose sur le principe de filtration sur colonne. Brièvement, les cellules sont lysés dans des conditions dénaturantes à température élevée. La lyse est réalisée en présence de Protéinase K. Ensuite, l'ADN génomique est fixé à la membrane de gel de silice de la colonne. Après un lavage minutieux

éliminant les inhibiteurs, les sels et les autres contaminants chimiques, l'ADN est élué dans l'eau. Les ADN sont conservés à -20°C.

2.3. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux des cellules en culture repose sur le même principe de filtration sur colonne utilisée au cours de l'extraction de l'ADN génomique.

Les cellules sont remises en suspension dans un tampon contenant du thiocyanate de guanidinium et du phénol associé à un agent réducteur (β -mercaptoéthanol) permettant à la fois de lyser les cellules, de dissocier les protéines, d'inhiber les nucléases, de dénaturer l'ARN et de le séparer de l'ADN génomique. Après centrifugation, la phase renfermant les ARN (phase supérieure) est récupérée. Les ARN sont isolés par filtration sur colonne de silice. En présence d'alcool, les sels chaotropiques (thiocyanate de guanidinium) attirent les molécules d'eau permettant une réaction d'adsorption des acides nucléiques sur la silice. A la fin de plusieurs étapes de lavage, les ARNs sont élués dans de l'eau et sont conservés à -80°C.

2.4. Reverse transcription (RT)

Le brin complémentaire (ADNc) des ARNs extraits est synthétisé, à partir d'amorces oligo dT, par une ADN polymérase ARN dépendante thermostable isolée d'un virus murin (Mu-MLV).

2.5. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Précédée d'une RT, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une amplification génique reposant sur des cycles successifs de répllication d'une séquence spécifique d'ADN matrice par une ADN polymérase ADN dépendante thermostable (Taq polymérase). Le couple d'amorces spécifiques du gène à étudier le plus adéquat est sélectionné par le programme Primer 3, à partir de la séquence disponible dans la banque de séquence Genbank au NCBI (*National center for biotechnology information* ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Une analyse *in silico* par le logiciel d'alignement de séquence BLASTN (également sur NCBI) permet de vérifier la spécificité des amorces.

2.6. Electrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose

Un gel d'agarose est coulé de sorte à ménager des puits dans lesquels le produit de PCR à analyser sera déposé. Lorsqu'un potentiel électrique est appliqué de part et d'autre du gel, l'ADN – qui est hautement chargé négativement à pH neutre – migrera vers le pôle

positif. Les molécules d'ADN sont séparées dans le gel en fonction de la taille de l'ADN. Plus l'ADN sera de taille réduite, plus facilement il pourra se glisser dans les mailles du gel : plus vite il migrera. Après la migration, l'ADN est mis en présence d'une substance fluorescente qui s'intercale entre les plateaux de bases. Sous rayonnement ultraviolet (UV), des bandes d'ADN apparaissent. Les bandes d'intérêt sont découpées et l'ADN en est extrait et purifié par filtration sur colonne.

2.7. Réaction de polymérisation en chaîne nichée : *Nested-PCR*

Des séries d'amorces successives peuvent être utilisées pour améliorer la spécificité et le rendement de la PCR. La PCR nichée est réalisée en deux étapes : la première étape est effectuée avec une série d'amorces. Pour éliminer toute source de contamination biologique, notamment la matrice d'ADNc et la première série d'amorces, les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose et purifiés de leurs bandes, comme décrit précédemment. Une deuxième série d'amorces est ensuite utilisée. Le deuxième couple flanque une région interne du premier produit ADN amplifié. Ainsi, le plus grand fragment produit lors des premiers cycles de la PCR est utilisé comme matrice pour la seconde PCR. Les produits de la deuxième PCR sont analysés sur gel d'agarose. Les bandes d'intérêt sont excisées et l'ADN en est isolé.

2.8. Génotypage d'un *Single Nucleotide Polymorphism connu*

Les échantillons d'ADN génomique sont envoyés à température ambiante au service de génotypage de *Genoscreen* (Lille, France).

La détection du SNP d'intérêt repose sur le système KASPar (*Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system*). Le génotypage est effectué en utilisant trois amorces ; deux amorces – caractérisant chacune un des deux allèles spécifiques – et une troisième amorce pour l'allèle commun. L'amplification spécifique de chaque allèle est alors couplée à une émission de fluorescence particulière. L'acquisition des données du génotypage se fait par la détection de cette fluorescence au niveau du SNP ciblé.

2.9. Séquençage des produits de PCR

Les produits de PCR purifiés à partir des bandes de gel d'agarose (comme décrit précédemment) sont séquencés par *Eurofins Genomics* en Allemagne.

La portion à séquencer est amplifiée par l'ADN polymérase HotStar-Taq Plus, en utilisant les amorces utilisées pour la deuxième étape de la PCR nichée. Le séquençage est réalisé selon la méthode de Frederick Sanger, consistant à utiliser, en plus des

désoxyribonucléotides naturels (dNTP), des didésoxyribonucléotides couplés à des fluorochromes (ddNTP). Ces ddNTPs sont incorporés d'une manière aléatoire au cours de l'amplification, mais dès qu'elle est faite au niveau du nouveau brin, la synthèse s'arrête puisqu'aucune liaison phosphodiester (3' – 5') ne peut se créer après une base ddNTP. Les deux brins d'ADN sont séquencés par un analyseur automatisé basé sur un système d'électrophorèse en capillaire, permettant de distinguer deux intermédiaires consécutifs ayant une différence de taille d'un seul nucléotide. Chaque base ddNTP étant marquée avec un fluorochrome différent caractérisé par un signal donné. Le séquençage est effectué base par base et les séquences obtenues sont alignées avec les séquences de référence de la banque Genbank sur NCBI.

2.10. PCR en temps réel

La PCR en temps réel ou PCR quantitative consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent et par conséquent, de mesurer quantitativement l'expression des gènes. La PCR quantitative utilise l'ADNc, synthétisé au cours de la reverse transcription, comme matrice. Les fragments amplifiés, en phase exponentielle, sont mis en évidence au fur et à mesure des cycles de la réaction. Les sondes utilisées sont des sondes TaqMan. Une sonde TaqMan est composée d'une séquence spécifique à la séquence cible et fixée à deux fluorochromes, un *quencher* et un *reporter*. Le *reporter* ne peut émettre un signal que lorsqu'il est libéré au cours de la synthèse du brin d'ADN. Le *quencher* est inactivée par l'action de la Taq polymérase. L'émission d'un signal par le *reporter* permet de suivre à temps réel l'amplification.

La PCR est réalisée en triplicata et les données sont ensuite analysées et normalisées par rapport à un contrôle interne. L'analyse statistique se base sur la méthode du delta Ct (Cycle seuil ou Threshold Cycle). Un contrôle de la qualité et de l'intégrité des ADNc est utilisé pour la PCR classique, la PCR nichée et la PCR en temps réel. Ce contrôle positif cible le gène de référence codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

3. Méthodes biochimiques et analytiques

3.1. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de mesurer la fluorescence ou la lumière diffractée d'un grand nombre de cellules ou de particules. Les cellules, préalablement marquées à un ou plusieurs fluorochromes sont entraînées dans un flux liquide jusqu'à la source lumineuse

d'excitation. En effet, les cellules, alignées les unes derrière les autres, défilent à grande vitesse devant un LASER. La collecte des signaux optiques émis par les cellules préalablement marquées est faite par des photomultiplicateurs, numérisés et traités *in silico*. En se basant sur la diffusion lumineuse des cellules, l'appareil caractérise dans l'axe du LASER la taille (forward scatter FSC), à 90° du LASER la granulométrie (side scatter SSC) et la fluorescence des cellules (mean fluorescence intensity MFI). Les paramètres morphologiques des cellules sont donnés dans un cytogramme. La fluorescence émise par les cellules marquées est comparée à celle des mêmes cellules non marquées ou incubées, seulement, avec l'anticorps secondaire (en cas d'un marquage double).

Dans nos travaux, les objectifs de cette méthode varient :

* Etudier la synthèse d'une protéine donnée et la régulation de sa sécrétion : Les cellules, cultivées selon différentes conditions, sont lavées, fixées en utilisant un tampon renfermant du paraformaldéhyde. Elles sont, ensuite, perméabilisées sous l'action de la saponine avant d'être incubées avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine cible et un anticorps secondaire porteur d'un fluochrome et dirigé contre l'anticorps primaire. Idéalement, pour limiter le bruit de fond, un anticorps primaire couplé à un fluochrome peut être utilisé directement s'il est disponible sur le marché.

* Etudier l'apoptose/viabilité des cellules : L'apoptose provoque l'altération de l'asymétrie de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines, normalement localisées du côté cytosolique de la membrane sont transférées sur le feuillet externe. Comme elles ont une forte affinité à l'annexine V, elles peuvent être détectées en mesurant la fixation de ce marqueur d'apoptose par cytométrie en flux. Les résultats du modèle de la co-culture sont évalués par cette méthode.

* Caractériser une population donnée : Certains biomarqueurs de surface permettent d'identifier, de caractériser et même de deviner la fonction biologique d'une population cellulaire ou acellulaire donnée. Il est possible de détecter la présence de ces biomarqueurs, par cytométrie en flux, en les ciblant par des anticorps couplés à un fluochrome (un fluochrome différent par biomarqueur).

3.2. Test MTT

Le test MTT est un test de détection colorimétrique mitochondriale des cellules.

Ce test de viabilité est basé sur la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium en un précipité insoluble.

Nous utilisons dans ce travail une méthode révisée du test MTT et adaptée aux cellules non adhérentes et à une réaction MTT en présence du milieu de culture (Tada et al, 1986).

Dans cette version du test MTT, le milieu de culture n'est pas éliminé et la densité optique est détectée à 590 nm. Ce test nous permet de mesurer le taux de prolifération des cellules, et par conséquent de quantifier l'effet d'une modification induite par une condition donnée.

3.3. Immunocytochimie

Cette technique permet la détection d'une protéine cible dans une cellule par réaction antigénique en utilisant un anticorps spécifique. Les cellules sont fixées (paraformaldéhyde PFA ou acide acétique 10% méthanol 90%), puis le milieu est saturé avec de l'albumine pour empêcher les fixations non-spécifiques. Les cellules sont incubées avec l'anticorps puis rincées. Des anticorps secondaires couplés à la biotine, à un fluorochrome (fluorescéine FITC, phyco-érythrine PE) ou à la peroxydase (peroxydase du radis noir HRP) et dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce ayant servi à préparer l'anticorps primaire sont ensuite utilisés. Si l'anticorps secondaire est couplé à la biotine, les cellules sont incubées avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome ou en présence d'eau oxygénée avec un substrat chromogénique de la peroxydase (diaminobenzidine DAB).

Pour une analyse en microscopie, les cellules adhérentes sont cultivées dans des chambres de culture sur lame de verre (Lab-Tek). Les cellules en suspension sont déposées par *cytospin* sur des lames de verres. Une coloration des noyaux (iodure de propidium IP, colorant DAPI) peut être effectuée. Les cellules sont observées, après fixation d'une lamelle, au microscope droit (coloration à la peroxydase) ou à fluorescence.

3.4. Immunohistochimie

Le principe et le protocole sont les mêmes que ceux de l'immunocytochimie. Une seule différence réside dans la nécessité d'incuber les lames dans du toluène la nuit pour éliminer la paraffine dans laquelle les tissus sont incorporés.

3.5. Dosage immunologique en ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Il s'agit d'un test immunologique utilisé pour détecter et quantifier une protéine dans un tapis cellulaire (CytoELISA), un lysat cellulaire, un milieu conditionné ou encore un

liquide biologique par l'utilisation de 2 anticorps spécifiques de l'antigène ; le deuxième étant couplé à la peroxydase. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout d'un substrat chromogénique soluble de la peroxydase (orthophénylène diamine OPD ou tetraméthyl benzidine TMB). Enfin l'enzyme est bloquée par l'acide sulfurique. L'analyse est faite par spectrophotométrie. La densité optique mesurée est directement proportionnelle à la concentration. La réalisation d'une gamme étalon de la protéine d'intérêt permet de quantifier cette protéine dans les différents échantillons.

3.6. *Cytokine array*

La technologie *cytokine array* ou technologie des puces à anticorps sur membrane est basée sur un principe identique à celui du dosage immunologique en sandwich. Une batterie d'anticorps de capture est immobilisée à des points spécifiques et connus de la membrane. L'incubation de la membrane avec les échantillons biologiques permet la capture des protéines par leurs anticorps correspondants. La liaison des protéines est, ensuite, mise en évidence par des anticorps biotinylés. Les signaux sont analysés par chimioluminescence. Cette méthode est, par conséquent, qualitative et quantitative à la fois. Le profil de cytokine est établi pour chaque échantillon, mais aussi les variations dans les niveaux d'expression des cytokines sont, également, quantifiées.

ARTICLE N°1

Le polymorphisme nucléotidique 6936A/G comme biomarqueur possible du risque thrombotique chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique

Endothelial protein C receptor gene 6936A/G single-nucleotide polymorphism as a possible biomarker of thrombotic risk in acute myeloid leukemia

Samaher BESBES, Hamda ALTHAWADI, Halema ALFARSI, Shahsoltan MIRSHAHI, Ruoping TANG, Fanny FAVA, Julia PARDO, Eva-Maria HUESSLER, Thomas GALTIER, Ibtissem GHEDIRA, Jeannette SORIA, Jean Pierre MARIE and Massoud MIRSHAHI

MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY (Article sous presse)

La thrombose constitue une complication fréquente du cancer. Elle représente la deuxième cause de décès chez les patients atteints d'une pathologie cancéreuse.

Le traitement de la maladie thrombo-embolique veineuse, dans un contexte tumoral, est compliqué, puisque le risque hémorragique induit par les anticoagulants est souvent augmenté par les traitements anticancéreux. De plus, les patients atteints d'un cancer ne partagent pas tous le même risque de développer une thrombose. L'identification de marqueurs biologiques s'avère cruciale pour prédire la survenue de thrombose chez les patients atteints d'un cancer et de proposer un traitement ciblé et personnalisé à chaque patient.

La protéine C (PC) et son récepteur endothélial (EPCR) jouent un rôle de première importance dans l'homéostasie du sang et dans le maintien de l'équilibre entre coagulation et thrombose. En effet, l'EPCR, en fixant la PC, favorise son activation par le complexe thrombine-thrombomoduline. La protéine C ainsi activée (PCA), en présence de son cofacteur la protéine S, clive les facteurs Va et VIIIa (facteurs de coagulation), inhibant ainsi la fibrinoformation.

Cependant, il existe à l'état physiologique une forme soluble circulante de l'EPCR (EPCRs) résultante de la protéolyse constitutive de la forme membranaire. L'EPCR est capable de fixer, avec la même affinité, la PC et la PCA. En séquestrant son ligand, l'EPCR obstrue la fonction anticoagulante de la PCA et favorise un état d'hypercoagulabilité.

La forme circulante de l'EPCR est contrôlée par un polymorphisme génétique : le gène de l'EPCR porte 13 polymorphismes nucléotidiques (SNP : *single nucleotide polymorphism*) caractérisant trois haplotypes. L'haplotype A3 est caractérisé par le SNP 6936A/G. Au niveau de la protéine, cet SNP se traduit par l'apparition, en position 219, d'un résidu glycine à la place de la sérine. Ce changement augmente considérablement l'affinité des métalloprotéases pour l'EPCR membranaire et favorise sa libération dans le plasma. Les porteurs des génotypes 6936AG ou 6936GG pourraient, donc, présenter un risque accru de thrombose.

L'objectif de cette étude était d'établir une corrélation entre le SNP 6936A/G de l'EPCR et l'incidence de thrombose chez une population de patients atteints d'hémo-pathologies.

Dans le cadre de notre étude rétrospective, deux cent soixante-huit prélèvements de sang ont été collectés :

- Deux cent cinq prélèvements provenaient de la tumorothèque de l'hôpital de Saint-Antoine (Paris). Il s'agit de patients atteints d'un cancer hématologique (LLC Leucémies lymphoïdes chroniques, LAM : leucémie aiguë myéloblastique, LAL : leucémie aiguë lymphoblastique, autres hémo-pathologies).
- Soixante-trois prélèvements de donneurs sains ont été collectés à la banque du sang de l'hôpital Hôtel-Dieu (Paris).

L'ADN génomique a été extrait des cellules mononucléées de chaque prélèvement. Ensuite, tous les échantillons d'ADN génomique ont été analysés (Genoscreen, Lille, France) afin d'identifier le génotype d'EPCR porté par chaque sujet.

Les résultats montrent que la fréquence des génotypes 6936AA, 6936AG et 6936GG est similaire dans les deux populations saine et malade. En raison de la faible fréquence du génotype 6936GG, nous avons décidé d'éliminer les patients porteurs de ce génotype de l'étude statistique.

L'étude des dossiers cliniques des patients révèle que l'incidence de thrombose était élevée chez les patients porteurs du génotype 6936AG (38,1%). L'étude statistique, basée sur un modèle de régression logistique univariable, met en évidence une différence significative dans la survenue de thrombose entre les patients porteurs du génotype 6936AG et ceux avec le génotype

6936AA (P=0,018). En effet, la moitié (50%) des patients atteints de LAM et porteurs du génotype 6936AG avaient développé au moins un épisode thrombotique, contre 22% chez les patients atteints de la même pathologie mais porteurs du génotype 6936AA.

Le SNP A6936A/G de l'EPCR pourrait, donc, constituer un biomarqueur clé dans la prévention de thrombose chez les patients atteints d'un cancer, et d'une manière particulière ceux atteints de leucémie aiguë myéloblastique.

Endothelial protein C receptor gene 6936A/G single-nucleotide polymorphism as a possible biomarker of thrombotic risk in acute myeloid leukemia

SAMAHER BESBES¹, HAMDA ALTHAWADI^{1,2}, HALEMA ALFARSI^{1,2}, SHAHSOLTAN MIRSHAHI³, RUOPING TANG⁴, FANNY FAVA⁴, JULIA PARDO¹, EVA-MARIA HUESSLER⁵, THOMAS GALTIER⁵, IBTISSEM GHEDIRA⁶, JEANNETTE SORIA¹, JEAN PIERRE MARIE⁴ and MASSOUD MIRSHAHI¹

¹UMR, Paris Diderot, Paris 7 University, Lariboisière Hospital, INSERM U965, 75010 Paris, France;

²Qatar Foundation, Doha 5825, Qatar; ³Research and Development, Diagnostica Stago, 92230 Genevilliers;

⁴Leukemia Tumor Bank, Saint-Antoine Hospital, 75012 Paris; ⁵UMRS 872, Information Sciences to Support Personalized Medicine Group, Cordeliers Research Center, 75006 Paris, France;

⁶University of Monastir, Monastir 5000, Tunisia

DOI: 10.3892/mco_00000000

Abstract. Protein C (PC) is a natural anticoagulant, which interacts with the endothelial PC receptor (EPCR). EPCR single-nucleotide polymorphism (SNP) 6936A/G results in high levels of a free soluble form of EPCR (sEPCR) and may affect the risk of coagulation. The objective of this study was to assess whether the 6936A/G SNP of the EPCR gene is involved in the procoagulant activity displayed by hematological malignancies. EPCR 6936A/G polymorphism analysis was performed in 205 patients with hematological malignancies and in 63 healthy controls. All the subjects were genotyped for the EPCR 6936A/G SNP (AA, AG and GG genotypes). The 6936A/G polymorphism distribution was similar between healthy donors and patients. The association between EPCR 6936A/G SNP and thrombosis was investigated in 110 patients. The disease-wise break-up revealed that 55 of the patients suffered from acute myeloid leukemia (AML). In AML patients, the incidence of thrombosis was 28.3% and significantly higher in the 6936AG compared with that in the 6936AA genotype (50 vs. 22%, respectively). In conclusion, this study revealed a significant association of the 6936AG genotype of EPCR with thrombotic events in AML. Therefore, the presence of the 6936AG genotype in AML patients may be considered as a risk indicator of thrombosis.

Correspondence to: Dr Massoud Mirshahi, UMR, Paris Diderot, Paris 7 University, Lariboisière Hospital, INSERM U965, 41 Boulevard de la Chapelle, 75010 Paris, France
E-mail: massoud.mirshahi@inserm.fr

Key words: endothelial protein C receptor gene, 6936A/G single-nucleotide polymorphism, thrombosis, acute myeloid leukemia, genetic diagnosis

Introduction

Thrombosis is one of the most frequent complications in cancer and the second leading cause of death among patients with malignant diseases (1). Despite the strong association between thrombosis and cancer, thrombosis remains underdiagnosed and undertreated in such patients. Predicting the advent of thrombosis may be difficult due to lack of reliable markers.

The protein C (PC) pathway plays a major role in regulating coagulation. PC is activated when thrombin binds to the endothelial cell surface receptor thrombomodulin. Activated PC (APC), in the presence of its cofactor, protein S, inactivates factors Va and VIIIa, thus limiting the progression of the coagulation cascade. The interaction between endothelial PC receptor (EPCR) and its ligand increases the affinity of PC for the thrombin-thrombomodulin complex. EPCR, which binds PC or APC with the same affinity, may be released in the plasma as a free soluble form (sEPCR) from membrane-associated EPCR. Circulating sEPCR is formed through the action of a metalloprotease, which is activated by thrombin and by certain inflammatory mediators (2-4), or as a result of proteolytic cleavage (a disintegrin and metalloprotease 17/tumor necrosis factor α -converting enzyme) (5). sEPCR circulates in the plasma and inhibits PC activation and APC anticoagulant function (6). sEPCR, by binding free PC, reduces the availability of the latter for the EPCR present on endothelial cells, leading to an increase in the incidence of thrombosis (7). EPCR is a 46-kDa type 1 transmembrane glycoprotein. The plasma variation of sEPCR is under genetic control. The EPCR gene consists of 4 exons and is located on chromosome 20q-11.2. Several studies have reported certain EPCR gene polymorphisms as candidate risk factors for thrombosis (8).

The 6936A/G single-nucleotide polymorphism (SNP) results in a serine-to-glycine substitution at residue 219 in the transmembrane domain and is associated with increased levels

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74

of sEPCR and increased thrombotic risk (9). In a previous study, we reported that malignant cells express and secrete EPCR and that sEPCR is associated with hypercoagulability in human hematological malignancies (10,11). We also reported that the EPCR gene sequence of hL-60 myeloblastic leukemia cells is quite identical to that of endothelial cells, in that it harbors the different SNPs (11) as previously reported for the endothelial cell gene (12). However, in the hL-60 cell gene, a thymidine insertion (locus 260) and an adenosine deletion (locus 840) were also identified within the 5' untranslated region. Moreover, a thymidine repetition was detected within the untranslated region (locus 7650) of the exon IV (10). The HL-60 cells are malignant leukemic cells and, therefore, finding additional modifications inherent in the EPCR gene structure was not surprising. In this study, we demonstrated that, while the risk of thrombosis is high in cancer patients, the presence of 6936A/G SNP further increases this risk, underlining the synergetic role of the EPCR gene polymorphisms in coagulation.

Patients and methods

Patients. In order to determine the role of the EPCR 6936A/G SNP as a possible indicator of the risk of thrombosis in leukemia, we conducted a retrospective study on 205 patients with diagnosed hematological malignancies. DNA from patients with leukemia, who were admitted at the hematology Departments of Hôtel-Dieu and Saint-Antoine hospitals (Paris, France) between 1995 and 2012, were obtained from the Leukemia Tumor Bank (Table IA). Blood samples from healthy donors were obtained from the Hôtel-Dieu blood bank and used as controls (Table IA). The patients (117 men and 88 women) were divided into 3 groups on the basis of their pathology as follows: Chronic lymphocytic leukemia (CLL, n=76), acute myeloid leukemia (AML, n=72) and acute lymphoblastic leukemia (ALL, n=33). In addition to these 3 groups, a fourth group included other hematological pathologies, namely lymphoma (n=13), chronic myelogenous leukemia (n=8), chronic myelomonocytic leukemia (n=1), B-cell prolymphocytic leukemia (n=1) and myeloproliferative neoplasm (n=1).

Only 110 medical records were available for profiling analysis. We were therefore obliged to disregard the remaining 95 cases (Table IB). The diagnosed types of thrombosis are presented in Table IC.

Blood mononuclear cells and DNA samples. Following patient informed consent, venous blood samples were collected in 5-ml tubes containing heparin or EDTA. The blood was centrifuged and the plasma discarded. Mononuclear cells were isolated by Ficoll density gradient centrifugation using lymphocyte separation medium (GE Healthcare Ltd., Velizy-Villacoublay, France), according to the manufacturer's recommendations and the resulting pellets were frozen at -80°C and conserved in the leukemia cell bank until use. DNA from 5x10⁶ cells was extracted and purified using Qiagen spin columns (Qiagen, Courtaboeuf, France). The purity and concentration of the DNA were determined by optical density measured at 260 nm using a NanoDrop™ 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). The DNA samples were frozen at -20°C until use.

Table I. Subject data.

A, Disease-wise split of patients/healthy donors by gender and age

Subjects	No.	M/F	Age, years
			mean ± SD (range)
Healthy donors	63	23/40	35±15 (22-57)
Patients			
Total	205	117/88	59±19 (15-91)
CLL	76	39/37	68±10 (90-44)
AML	72	43/29	59±17 (25-91)
ALL	33	18/15	38±17 (15-80)
Others ^a	24	17/7	61±16 (34-83)

B, Patients with available and complete clinical data

Patients	No.	M/F	Age, years
			mean ± SD (range)
Total	110	56/46	59±19 (15-91)
CLL	25	9/16	71±9 (88-50)
AML	55	29/26	60±18 (25-91)
ALL	16	6/10	37±18 (15-76)
Others	14	10/4	59±16 (34-79)

C, Distribution of types of thrombosis

Total no. of patients	Thrombosis type								
	DIC	DVT	PE	IS	AT	SVT	C	S	NS
23	5	9	2	2	1	1	1	1	1

^aLymphoma, 13; chronic myelogenous leukemia, 8; and chronic myelomonocytic leukemia, B-cell prolymphocytic leukemia and myeloproliferative neoplasm, 1 each. M, male; F, female; SD, standard deviation; CLL, chronic lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; DIC, disseminated intravascular coagulation; DVT, deep venous thrombosis; PE, pulmonary embolism; IS, ischemic stroke; AT, arterial thrombosis; SVT, superficial venous thrombosis; C, catheter-related thrombosis; S, stent-related thrombosis; NS, not specified thrombosis type.

Genotyping of SNP. SNP genotyping is the measurement of genetic variations of SNPs between members of a species. The EPCR 6936 SNP was determined using 10 ng/ml DNA in the patented SNP genotyping system (k Bioscience UK Ltd., Hoddesdon, UK) based on fluorescent resonance energy transfer; this is a homogenous fluorescent genotyping system using a unique form of competitive allele-specific polymerase chain reaction (PCR) (the Competitive Allele Specific PCR genotyping system; k ASPar system). Genotyping was performed using GenoScreen (Lille, France). The use of two competitive allele-specific tailed forward primers (primer for the 6936A allele, AGCCACACCAGCAATGATGAACT; and primer for the 6936G allele, GCCACACCAGCA

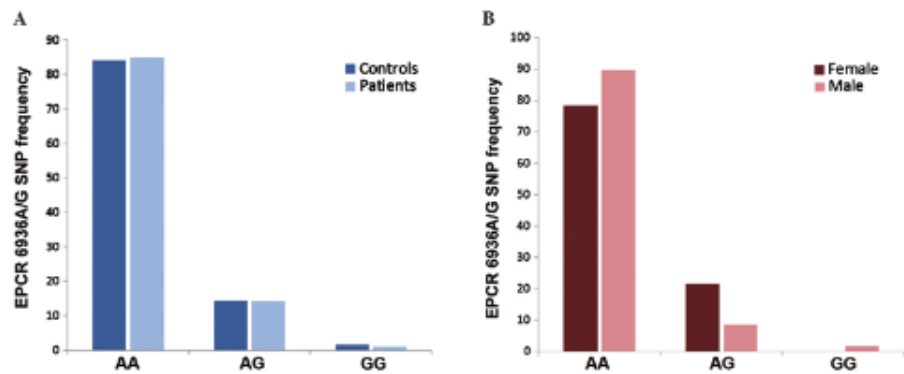


Figure 1. Distribution of endothelial protein C receptor (EPCR) 6936A/G single-nucleotide polymorphism (SNP). (A) EPCR 6936A/G SNP frequency in control donors and patients ($P=0.859$). (B) EPCR 6936A/G SNP as a function of gender ($P=0.009$).

ATGATGAAACC) and one reverse primer (GGAGCCAAAC AAGCCGCTCCTA) provided increased locus-specific discrimination.

Statistical analysis. The Fisher's exact test was employed in order to verify whether the distribution of 6936A/G SNP was identical between healthy donors and leukemia patients. We then investigated the distribution of 6936A/G SNP as a function of gender and type of hematological malignancy. Finally, we also investigated the incidence of thrombosis as a function of the type of pathology and the 6936A/G SNP by resorting to the logistic regression model. All the tests were in bilateral comparison with a significance level of 0.05. The results were obtained using R version 3.0.0 and version 3.0.1 software.

Results

Allele distribution. The distribution of the 6936A and 6936G alleles was similar in all subjects (healthy donors and patients; $n=268$) ($P=0.859$) (Fig. 1A). In the cohort of patients ($n=205$), this distribution was found to change according to gender (Fig. 1B), with the frequency of the 6936AG genotype being 2-fold lower in men (9%) compared with that in women (22%) ($P=0.009$). The male ($n=43$) and female ($n=29$) AML patients presented 11.6 and 31% of the 6936AG genotype, respectively (data not shown).

Genotype distribution. The genotype distribution according to pathology is presented in Table II. No significant difference was observed between the different types of malignancies ($P=0.684$).

Of the 205 patients, case files mentioning whether they had a previous thrombotic event were available for only 110. The number of patients, grouped according to each covariate, is presented in Table III.

Incidence of thrombosis. As there were only 2 homozygous patients with the 6936GG genotype in our database, estimates of the effect of the 6936GG genotype on thrombosis would be extremely unreliable; therefore, they were excluded from the present study, thus leaving a total of 108 cases for further analysis. In addition, 6 patients received medication for thrombosis prevention. This medication may lower the risk of thrombosis,

Table II. EPCR 6936A/G SNP as a function of pathology.

Pathology	Genotype, no. (%)			Total	P-value
	AA	AG	GG		
CLL	66 (87)	10 (13)	0 (0)	76 (100)	
AML	58 (80)	12 (17)	2 (3)	72 (100)	
ALL	30 (91)	3 (9)	0 (0)	33 (100)	
Others ^a	20 (83)	4 (17)	0 (0)	24 (100)	
Total	174 (85)	29 (14)	2 (1)	205 (100)	0.684

^aLymphoma, 13; chronic myelogenous leukemia, 8; and chronic myelomonocytic leukemia, B-cell prolymphocytic leukemia and myeloproliferative neoplasm, 1 each. EPCR, endothelial protein C receptor; SNP, single-nucleotide polymorphism; CLL, chronic lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Table III. Characteristics of patients included in the regression model ($n=110$).

Characteristics	Patient no.
Gender	
Male	56
Female	54
EPCR 6936A/G SNP	
AA	87
AG	21
GG	2
Pathology	
CLL	25
AML	55
ALL	16
Others ^a	14

^aLymphoma, 13; chronic myelogenous leukemia, 8; and chronic myelomonocytic leukemia, B-cell prolymphocytic leukemia and myeloproliferative neoplasm, 1 each. EPCR, endothelial protein C receptor; SNP, single-nucleotide polymorphism; CLL, chronic lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia.

Table IV. Incidence of thrombosis as a function of EPCR 6936A/G SNP and pathology.

Variables	Patient no. (M/F)	Thrombosis, % (patient no., M/F)
All patients	108 (52/46)	21.3 (23, 11/12)
AA	87 (47/40)	17.2 (15, 8/7)
AG	21 (15/16)	38.1 (8, 3/5)
CLL	25 (9/16)	12.0 (3, 2/1)
AA	20 (8/12)	10.0 (2, 2/0)
AG	5 (1/4)	20.0 (1, 0/1)
AML	53 (27/26)	28.3 (15, 6/9)
AA	41 (24/17)	22.0 (9, 3/6)
AG	12 (3/9)	50.0 (6, 3/3)
ALL	16 (6/10)	12.5 (2, 1/1)
AA	15 (6/9)	13.3 (2, 1/1)
AG	1 (0/1)	0
Others ^a	14 (10/4)	21.4 (3, 2/1)
AA	11 (9/2)	18.2 (2, 2/0)
AG	3 (1/2)	33.3 (1, 0/1)

^aLymphoma, 13; chronic myelogenous leukemia, 8; and chronic myelomonocytic leukemia, B-cell prolymphocytic leukemia and myeloproliferative neoplasm, 1 each. EPCR, endothelial protein C receptor; SNP, single nucleotide polymorphism; M, male; F, female; CLL, chronic lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia.

which, in the present analysis, would introduce a confusion bias. However, given the low number of patients treated, a stratification or adjustment based on treatment would result in erroneous estimation. To ensure that the inclusion of the patients treated for thrombosis prevention did not alter our findings, we set up the computation with only the 102 non-treated patients and assessed whether the results were similar to those obtained for the 108 patients. Of the 108 patients tested for thrombotic events, 21.3% developed at least one thrombotic episode. The thrombosis rate in all pathologies for male and female patients is presented in Table IV.

The data analysis revealed that thrombosis occurred in 12% of patients with CLL, 28.3% of patients with AML, 12.5% of patients with ALL and 21.4% of patients with other hematological malignancies (lymphoma, 13; chronic myelogenous leukemia, 8; and chronic myelomonocytic leukemia, B-cell prolymphocytic leukemia and myeloproliferative neoplasm, 1 each).

On analysis of the data regarding EPCR 6936A/G SNP, we found that the incidence of thrombotic events was higher when the 6936AG genotype (38.1%) was present, compared with the 6936AA genotype (17.2%); in patients with the 6936AG genotype, thrombotic event(s) occurred in 50% of AML, 20% of CLL and 33.3% of the other patients, whereas in patients with the 6936AA genotype, thrombosis developed in 22% of AML, 10% of CLL and 18.2% of other hematological pathologies.

Of note, no thrombotic disorder was reported in ALL patients with the 6936AG genotype. Therefore, thrombotic

Table V. Logistic regression model.

Explanatory variable	Category	Reference	OR	95% CI	P-value ^c
Genotype ^a	AG	AA	2.95	1.04-8.37	0.047
AML ^b	AML*AG	AML*AA	4.65	1.34-16.17	0.018

^aComparison between patients with the 693AA genotype vs. those with the 6936AG genotype (n=108). ^bComparison between AML patients with the 693AA genotype vs. those with the 6936AG genotype (n=53). ^cP-value, likelihood ratio test. AML, acute myeloid leukemia; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

disorders were prevalent only in ALL patients harboring the 6936AA genotype, occurring in 13.3% of the cases. This may be due to the fact that patients with ALL were younger (mean age, 37 years) compared with those with other malignant hematological diseases.

Logistic regression model. In the univariate logistic model for thrombosis and 6936A/G SNP, it was demonstrated that patients with the 6936AG genotype (n=21) were more susceptible to thrombotic episodes compared with those with the 6936AA genotype (n=87). The odds ratio was estimated at 2.95, which is significantly higher than 1 (P=0.047) (Table V). The data from the logistic regression model show a significant difference in the incidence of thrombosis between AML patients with the 6936AA (n=41) and 6936AG (n=12) genotypes. The odds ratio was estimated at 4.65 (P=0.018). The risk of developing thrombosis is therefore higher for patients with AML harboring the 6936AG genotype.

Discussion

One of the EPCR polymorphisms, 6936A/G SNP, results in the substitution of the serine at residue 219 with glycine in the transmembrane domain. This mutation is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis (5). The presence of 6936A/G SNP (EPCR Gly 219) was also found at a higher frequency in coronary heart disease and has been associated with increased thrombosis risk in type 2 diabetic patients (13).

We previously reported that EPCR is expressed in human malignant blood cells, often resulting in higher plasma sEPCR levels (11). Using a retrospective clinical study (n=110), we observed that, when the plasma sEPCR level rises above the 200 ng/ml threshold, the risk of thrombosis also rises considerably (40%) in hematological pathologies (11). In this study, we demonstrated that the thrombotic event incidence increases in leukemic patients when plasma sEPCR is high, due to the presence of the 6936AG genotype. This synergism increased the incidence of thrombotic events in AML patients with high plasma sEPCR, from 41.7% reported previously (11) to 50% for AML heterozygous patients with the 6936AG genotype.

Several thrombotic events are under genetic control. EPCR gene polymorphism is one among several genetic traits that affect venous thrombosis. There are several other genes that are involved in thrombotic events, including Serpin C-1, 120

1 ABO locus, PC, protein S1, factor V Leiden (resistant to APC),
2 prothrombin, fibrinogen γ chain, factor XI, glycoprotein VI,
3 hIVEPI (protein that participates in the transcriptional
4 regulation of inflammatory target genes) and kininogen 1
5 (gene encoding high-molecular-weight kininogen) genes (14).
6 However, the mechanism by which this large panel of genes
7 intervene in cancer thrombophilia remains obscure. In brief,
8 we observed that leukemic cells not only harbor EPCR gene
9 polymorphisms but also secrete large amounts of the EPCR
10 protein (11). In a previous retrospective study, the association
11 between EPCR SNPs and the incidence of thrombosis has
12 been investigated in several myeloma patients (15).

13 The data presented in this study indicate that, in patients
14 with malignant hemopathies, the presence of the EPCR
15 6936A/G SNP results in an increase in the incidence of throm-
16 bosis. Despite the difference in the incidence rates, there was
17 no statistically significant difference in the 6936A/G SNP
18 distribution between the 4 patient groups (CLL, AML, ALL
19 and other hematological malignancies) and the healthy donors
20 group. The EPCR 6936A/G SNP distribution is under genetic
21 control, is independent of the occurrence of any pathology and
22 remains identical for any population.

23 Among patients with malignant hemopathies, those with
24 AML harboring the 6936AG genotype were found to be
25 the most prone to thrombosis. Thrombosis affected ~50%
26 of individuals with the 6936AG genotype, whereas this rate
27 was lower for CLL, ALL and other malignant hemopathies.
28 The difference in the thrombosis rate between the 6936AA
29 and 6936AG genotypes in AML was found to be statistically
30 significant ($P < 0.01$).

31 Our cohort of patients was rather small ($n=110$) and
32 the frequency of the 6936GG genotype in any population
33 is low. Therefore, a definitive statistical statement on the
34 6936GG genotype cannot be made with a limited number of
35 cases.

36 In conclusion, this pilot study was the first to demonstrate
37 a significant association of the 6936AG genotype (6936A/G
38 SNP) of EPCR with thrombotic events in AML. The presence
39 of the 6936AG genotype in patients with malignant hemato-
40 logical diseases may be a risk factor for thrombosis and its
41 determination in patients, particularly in those with AML,
42 may be crucial for thrombosis prevention and management. To
43 the best of our knowledge, this is the first report on the associa-
44 tion of the 6936AG genotype with the risk of thrombosis in
45 leukemia.

46 Acknowledgements

47 We would like to thank Professor Amu Therwath (UMR, Paris
48 Diderot, Paris 7 University, Lariboisière hospital, INSERM
49 U965, Paris, France) for his valuable assistance.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Khorana AA: Venous thromboembolism and prognosis in cancer. *Thromb Res* 125: 490-493, 2010.
2. Mohan Rao LV, Esmon CT and Pendurthi UR: Endothelial cell protein C receptor: A multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* 124: 1553-1562, 2014.
3. Gu JM, Katsura Y, Ferrell GL, Grammas P and Esmon CT: Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. *Blood* 95: 1687-1693, 2000.
4. Xu J, Qu D, Esmon NL and Esmon CT: Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 275: 6038-6044, 2000.
5. Qu D, Wang Y, Song Y, Esmon NL and Esmon CT: The Ser219-Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *J Thromb Haemost* 4: 229-235, 2006.
6. Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, de Visser MC and Bertina RM: Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2: 1305-1310, 2004.
7. Liaw PC, Neuenchwander PF, Smirnov MD and Esmon CT: Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J Biol Chem* 275: 5447-5452, 2000.
8. Dennis J, Johnson CY, Adediran AS, de Andrade M, Heit JA, Morange PE, Trégouët DA and Gagnon F: The endothelial protein C receptor (PROC) Ser219Gly variant and risk of common thrombotic disorders: A HUG review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Blood* 119: 2392-2400, 2012.
9. Saposnik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M and Gandrille S: A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 103: 1311-1318, 2004.
10. 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* 41: 433-440, 2012.
11. 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* 1: 261-267, 2012.
12. Fukudome K and Esmon CT: Identification, cloning and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 269: 26486-26491, 1994.
13. Ireland H, Konstantoulas CJ, Cooper JA, Howe E, Humphries SE, Mather H, Goodall AH, Hogwood J, Juhan-Vague I and Yudkin JS: EPCR Ser219Gly: Elevated sEPCR, prothrombin F1+2, risk for coronary heart disease, and increased sEPCR shedding in vitro. *Atherosclerosis* 183: 283-292, 2005.
14. Morange PE and Trégouët DA: Current knowledge on the genetics of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 11 (Suppl 1): 111-121, 2013.
15. Dri AP, Politou M, Gialeraki A, Bagratuni T, Kanelias N and Terpos E: Decreased incidence of EPCR 4678G/C SNP in multiple myeloma patients with thrombosis. *Thromb Res* 132: 400-401, 2013.

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

Production d'une thrombopoïétine fonctionnelle par une lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien

Production of a functional thrombopoietin by a human ovarian carcinoma cell line

Samaher BESBES, Helene HELFER, Haythem NAJAH, Caroline FOURGEAUD, Shahsoltan MIRSHAHI, Jeannette SORIA, Marc POCARD, Ibtissem GHEDIRA and Massoud MIRSHAHI

Article soumis à publication

La thrombocytose ou hyperplaquettose est une anomalie fréquente qui se définit par une augmentation du nombre de plaquettes dans le sang. Les plaquettes sont des cellules anucléées qui jouent un rôle très important dans la fonction hémostatique et peuvent participer aux processus thrombotiques, mais aussi à d'autres processus pathologiques, notamment, la progression tumorale et la dissémination métastatique.

La thrombopoïétine (TPO) est une cytokine qui régule l'ensemble de la mégacaryopoïèse. Elle est impliquée dans la prolifération des cellules souches des mégacaryocytes, ainsi que leur différenciation et leur maturation. Elle constitue la principale hormone régulatrice de la production plaquettaire. Elle est, majoritairement, synthétisée par le foie et son taux est régulé essentiellement, par les plaquettes et/ou par son récepteur, c-MPL. La TPO peut être, également, synthétisée par des lignées cellulaires, issues de carcinome humain. Dans le cancer ovarien, le taux de TPO pourrait constituer un biomarqueur de la pathologie cancéreuse. Aussi, la sécrétion de la TPO par les cellules issues d'un carcinome ovarien a été mise en évidence dans un rapport de cas (une patiente).

Dans une autre étude, nous avons démontré, par *cytokine array*, la présence de la TPO dans le milieu de culture d'une lignée cellulaire, issue d'adénocarcinome ovarien humain NIH:OVCAR-3 (abrégée en OVACAR-3). Cette sécrétion était significativement plus élevée, quand les cellules étaient stimulées par la protéine C activée.

Le but de cette étude était de mettre en évidence, par d'autres méthodes, la synthèse de la TPO par la lignée NIH:OVCAR-3 et de caractériser la thrombopoïétine d'origine ovarienne sur

les plans suivants : expression génétique, sécrétion et maintien de la fonction biologique de la cytokine.

L'expression du gène de la TPO a été révélée, par PCR, dans les agrégats cellulaires issus d'ascites de patientes atteintes de carcinome d'origine ovarienne. Elle a été également étudiée, par PCR, PCR nichée et PCR quantitative, dans différentes lignées cellulaires. Seulement OVCAR-3, SKOV-3 (une deuxième lignée d'adénocarcinome humain d'origine ovarienne) et K562 (une lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique) exprimaient significativement le gène de la TPO. L'expression de la cytokine était absente dans d'autres lignées, notamment la lignée issue du cancer du sein humain, MDA-MB231. L'étude des variants d'épissage alternatif de l'ARN messager (ARNm), dans les lignées TPO+, a révélé la présence de trois variants, caractérisant trois isoformes de TPO (TPO-1,-2 et -3). Ces résultats ont été confirmés par séquençage des produits de PCR. Les ARN messagers issus des tissus humains normaux d'ovaire et de foie ont été utilisés comme contrôles et ont présenté le même profil d'expression de transcrits.

La PCR quantitative a montré que i) la lignée MDA-MB231 n'exprimait pas le gène de la TPO, ii) la lignée K562 présentait un taux d'ARNm, significativement, plus élevé que celui des cellules OVCAR-3, iii) la stimulation préalable des cellules OVCAR-3, par la protéine C et la protéine C activée (PCA), n'avait aucun effet sur le niveau transcriptionnel du gène de la TPO.

La cytométrie en flux a permis de mettre en évidence la sécrétion de la TPO par les cellules OVCAR-3. Cette expérience a, également, montré que la production de la TPO peut être induite par la PCA. En utilisant un inhibiteur de transport de protéines, nous avons aussi démontré que la TPO, après sa synthèse, est libérée dans le milieu extracellulaire des OVCAR-3.

Enfin, nous avons analysé le maintien de la fonction biologique de la TPO d'origine ovarienne. Nous avons mis au point un modèle *in vitro* basé sur une lignée cellulaire murine Ba/F3 TPO ou interleukine-3 (IL-3)-dépendante. Les cellules Ba/F3 ont été co-cultivées dans une chambre séparée – avec les cellules OVCAR-3 ou les cellules MDA-MB231, ou seules en présence de i) TPO recombinante, ii) IL-3, iii) PC, iv) PCA. L'analyse de la viabilité des Ba/F3 a été établie par deux méthodes : la méthode de cytométrie en flux, en utilisant l'annexine V comme marqueur de l'apoptose, le test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) qui est une méthode de détection colorimétrique de l'activité mitochondriale, et par conséquent de la prolifération cellulaire.

Les résultats de ces deux méthodes ont révélé que la TPO, sécrétée par les lignées K562 et OVCAR-3 – en particulier lorsque la lignée cellulaire cancéreuse ovarienne était stimulée par la PCA – étaient capables de protéger les Ba/F3 et de favoriser leur prolifération

Cette étude met en évidence la sécrétion de la thrombopoïétine par la lignée d'adénocarcinome ovarien humain NIH:OVCAR-3. Nous sommes les premiers à démontrer qu'une TPO non hépatique peut être biologiquement active. Ainsi, la TPO d'origine ovarienne pourrait constituer un biomarqueur clé dans la pathologie cancéreuse ovarienne.

Title :

Production of a functional thrombopoietin by a human ovarian cancer cell line

Samaher BESBES^{1,2}, Helene HELFER¹, Haythem NAJAH¹, Caroline FOURGEAUD¹, Shahsoltan MIRSHAHI³, Jeannette SORIA¹, Marc POCARD¹, Ibtissem GHEDIRA² and Massoud MIRSHAHI¹

¹- Sorbonne Paris Cité , Paris 7 University, Lariboisière Hospital, INSERM U965, 75010 Paris, France; ²- Faculty of Pharmacy, University of Monastir, Monastir 5000, Tunisia; ³- Diagnostica Stago, 92230 Genevilliers;

Running title : Thrombopoietin production by human ovarian carcinomatosis

Corresponding Author:

M. Mirshahi M. D., Ph. D.
Sorbonne Paris Cité , Paris 7 University,
Lariboisière Hospital, INSERM U965
41 Bd de la Chapelle
75010, Paris, France
Tel: 00 33 1 53216765
Fax: 00 33 1 57216739
mail: massoud.mirshahi@inserm.fr

Abstract:

Hemostatic abnormalities are frequently noticed in patients with malignant diseases. These complications include platelets disorders. The role of platelets in cancer extends beyond thrombocytosis and thrombosis, since platelets promote cancer growth and metastatic dissemination. In the physiological state, platelet production is regulated by thrombopoietin, which is mainly secreted by the liver. We, previously, reported that thrombopoietin could be secreted by the ovarian adenocarcinoma cell line, OVCAR-3. Here, our main purpose is to analyze the gene expression of thrombopoietin in cancer cells and to assess its functionality.

In the present study, we investigate the thrombopoietin gene expression, using reverse transcription PCR, real-time PCR and gene sequencing, in ascitic cells from patients with ovarian carcinomatosis, as well as, in three cancer cell lines, including OVCAR-3 cells. Normal human ovary and liver tissues are used as controls. Then, we show by flow cytometry that thrombopoietin production by OVCAR-3 could be increased when cells are stimulated by activated protein C. Lastly, we assess the functionality of thrombopoietin on the basis of the viability of a thrombopoietin-dependent cell line (Ba/F3) using a co-culture method. Our results confirm that activated protein C may act, in a paracrine fashion, to boost thrombopoietin production. In this study, we report, for the first time, that the thrombopoietin secreted by ovarian cancer cells is functional. Hence, thrombopoietin produced in tumor backdrop may have a direct effect on thrombocytosis/thrombosis occurrence in patients with ovarian cancer.

Keywords: Thrombopoietin, activated protein C, ovarian carcinomatosis, thrombocytosis, thrombosis.

Introduction

Thrombosis is a major complication in malignant diseases.^(1,2) More than 50 years ago, Levin and Conley reported that thrombocytosis was associated with breast, lung, digestive and ovarian cancers.⁽³⁾ Hemostatic disorders in cancer result from the capacity of tumor cells to secrete procoagulant factors and to interact with blood component such as platelets.^(4,5) While platelets are essential for normal hemostasis, their unbridled activation may result in thrombus formation, which could lead to thrombocytosis complications. Moreover, patients with elevated platelet count have a higher risk to develop venous thromboembolism.⁽⁶⁾

Besides their role in coagulation, platelets are also involved in cancer growth and dissemination at different levels.⁽⁷⁾ Thus, activated platelets are considered as an important source of lysophosphatidic acid (LPA), which has been shown to be involved in promotion of bone metastasis in a model of mouse bearing breast or ovarian cancer cells.⁽⁸⁾

Thrombopoietin (TPO) is a key regulator of megakaryopoiesis and megakaryocyte progenitor proliferation by promoting stem cell differentiation into megakaryocytes and their expansion, hence, boosting platelet production.^(9,10)

TPO is mainly produced by the liver and it is also secreted by kidney, bone marrow and spleen.⁽¹¹⁾ The human TPO gene is localized on chromosome 3q27 and comprises six exons and five introns.⁽¹²⁻¹⁴⁾ To date, 8 different variants of TPO mRNA have been identified, including the full length mRNA (TPO-1) and its 7 alternative splicing variants. Proliferative activity was highlighted only in TPO-1 isoform.⁽¹⁵⁾

Moreover, TPO seems to be more than a megakaryopoiesis regulator. Indeed, TPO has been admitted as a crucial regulator of proliferation and secretory activity in porcine ovarian follicular cells.⁽¹⁶⁾ In pathologic conditions, several cancer cell lines from lung, stomach, liver and thyroid human carcinomas express the TPO gene.⁽¹⁷⁾ In a case report, Furuhashi *et al* reported that TPO could be produced by ovarian carcinoma.⁽¹⁸⁾ Tsukishiro and his colleagues observed, in a comparative study, that plasma TPO concentration may be a biomarker that distinguishes between benign tumor patients and those with malignant ovarian cancer.⁽¹⁹⁾

Previously, we detected TPO release in an adenocarcinoma cell line culture medium (NIH:OVCAR-3 cell line - abbreviated OVCAR-3 in this study). We also observed that activated Protein C (aPC), a natural anticoagulant, increased OVCAR-3 TPO secretion.⁽²⁰⁾

The main goal of this study was to analyze, TPO gene expression in ovarian cancer and to assess whether the ovarian TPO produced by cancer cells is functional.

Material and Methods

Cell culture

Cell lines: The human cancer cell lines used were: Ovarian (OVCAR-3 and SKOV-3), breast (MDA-MB231 and MCF7), gastric (AGS, KATO-III), intestinal (LS174T), lung (A549), leukemia (K562), and cervical (HELA). We also used human microvascular endothelial (HMEC-1) and interleukin-3 (IL-3)-dependent murine (Ba/F3) cell lines. Cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The Ba/F3 cell line that expresses the human thrombopoietin receptor (MPL) was kindly provided by Caroline Marty and Isabelle Plo.⁽²¹⁾ Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 50ug/ml of streptomycin, 50 IU/ml of penicillin and 2nM of L-glutamine (Gibco, Saint Aubin, France). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Conditioned media: Cells were seeded in plates or flasks, grown to 80% confluency and then incubated in serum-free culture medium. Three culture conditions were assayed : 1) in presence of added Protein C (PC) (PROTEXEL, Courtaboeuf, France) at a concentration of 10 µg/ml, 2) in presence of activated Protein C (aPC) (Xigris, Suresnes, France) also at a concentration of 10 µg/ml, 3) with no addition which served as control. Cell flasks were incubated 5 hours prior to flow cytometry analysis and cells in plates were incubated 24 hours for co-culture experiments. Ba/F3 cell line was cultured in the presence of: 1) recombinant IL-3

(5 ng/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) 2) human recombinant thrombopoietin (TPO) (50 ng/ml) (LifeSpan Biosciences, USA) 3) PC (10 µg/ml) 4) aPC (10 µg/ml).

Co-culture: OVCAR-3, MDA-MB231 and K562 were cultured in 6-well plates as described above. Ba/F3 cells were separately co-cultured with the three different cell lines, each separated by a 0.4µm micropore membrane (Fisher Scientific, Illkirch, France).

Patients' ascites cell culture : Ascitic fluids from patients were provided by the digestive surgery department of Lariboisiere Hospital (Paris, France). All patients gave their written informed consent. Clinical and biological annotations were recorded in an Access database approved by the "Commission Nationale de l'informatique et des Libertes- France". A total of 6 cancer patients were included in the study. Medical records reported that 4 patients had cancer from ovarian origin. Only one patient had a signet ring cell gastric carcinoma. All patients were admitted for surgery during a period from October 2014 to February 2015. Each ascitic sample was centrifuged and the cell pellet obtained was cultured in flasks coated with 0.2% gelatin (Sigma, France) in presence of D-MEM (Gibco, Saint Aubin, France) medium supplemented with 20% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 50ug/ml of streptomycin, 50 IU/ml of penicillin and 2nM of L-glutamine

Gene expression

Primers' selection, PCR and nested-PCR: TPO primers, for PCR and nested-PCR, were selected from Sasaki *et al* study.⁽¹⁷⁾ Our choice was based on TPO gene structure and its possible splice variants as shown in Figure-1A and Figure-1B. Specific primers for TPO were synthesized by Eurofins Genomis (Ebersberg, Germany). Primers used for PCR and nested-PCR are shown in Figure-1C. The detection of TPO gene expression was investigated by using F1/R1 primers set,

which amplifies, in a common product, all TPO splice variants. We performed also PCR for Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) to ensure integrity and quantitative comparison of cDNAs. GAPDH cDNA was amplified using specific primers (G1/G2) from Eurofins Genomics (Figure-1C). TPO gene expression was investigated by the detection of TPO mRNA in cells from patients' ascites culture or in cell lines. The cell RNA extracts were prepared using the RNeasy kit (Qiagen, Courtabœuf, France). Ovarian total RNA and liver cDNA from non-tumor human adult tissues were provided by BioChain (Newark, USA). Following reverse transcription (Mu-MLV reverse transcriptase and oligo(dT) primers), the polymerase chain reaction (PCR) was performed with MasterMix (5 Prime, Düsseldorf, Germany). The PCR products (F1/R1), along with a 100 bp DNA ladder, were analyzed by electrophoresis on agarose gels containing GelRed nucleic acid gel stain. After electrophoretic separation of the products, we selectively excised only intense bands for nested-PCR. DNA was eluted and purified using a DNA gel extraction kit (Norgen Biotek Corp, Ontario, Canada). Nested-PCR was performed using F2/R2 or F3/R3 primers and the products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The DNA bands of interest were again selected, excised and DNA was purified. Purity and concentration of RNA or DNA samples were determined by optical density measurement and the ratio of 260:280 nm using the NanoDrop™ 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, France).

Sequencing of nested-PCR products: Nested-PCR extracted DNA products were sequenced by Eurofins Genomic (Ebersberg, Germany), using the cycle sequencing technology (dideoxy chain termination / cycle sequencing) on ABI 3730XL sequencing machine. Sequences were analyzed by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in the NCBI database.

Real-time PCR: TPO gene expression was also analyzed by real-time PCR and TaqMan® primers with FAM probes for TPO or GAPDH (Figure-1D) were from Applied Biosystems (France). The

real-time PCR was performed using TaqMan® gene expression assay and LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Analysis of gene expression was performed using the comparative C_T method.⁽²²⁾

Flow cytometry

Protein quantification: OVCAR-3 and MDA-MB231 were cultured in flasks and incubated in a serum-free medium with or without PC/aPC stimulation as described above. The culture medium was added / or not, with 1µl/ml of protein transport inhibitor (containing Brefeldin A) provided by BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Then, cells were detached with accutase, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and suspended in 100% heat-inactivated FBS. Cell fixation and permeabilization procedures followed were as indicated by the manufacturer (Beckman Coulter, France) using the Perfix-nc assay kit. Cells were mixed at first with an anti-hTPO primary antibody (1:200) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), then washed with PBS and incubated with a fluorescein isothiocyanate (FITC) coupled secondary antibody (1:100). Cells were then washed twice and the pellet was resuspended in 500 µl of buffer provided in the kit. Flow cytometry was done using a standard Canto II eight-color flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, France) at 530 nm and data analysis was performed using Flowjo software (Flowjo LLC, USA).

Cell viability: Ba/F3 cells were co-cultred separately with MDA-MB231 or OVCAR-3 or K562 cells, alone, or in the presence of PC or aPC, as indicated above. Ba/F3 cells were cultured with IL-3, TPO, PC or aPC and served as control. After 72h, Ba/F3 cells were collected from each well and washed with PBS and then fixed with 4% (final concentration) formaldehyde. Then, Ba/F3 cells were suspended in cold binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.1% BSA), incubated for 15 min at 4°C with FITC conjugated Annexin V (Southern

Biotech, Birmingham, USA) and shielded from light. Data acquisition and analysis were performed by flow cytometry as described above.

MTT Viability test

Ba/F3 cells were co-cultured with OVCAR-3 or MDA-MB231 or K562 cells alone, or in the presence of PC or aPC. Ba/F3 cells were cultured with TPO and served as control. After 72h, Ba/F3 cell viability was investigated using Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide colorimetric assay (MTT) according to Tada *et al.* protocol.⁽²³⁾

Statistical Analysis

All values reported are the average \pm SEM. Statistical significance was determined using the GraphPad Prism 6.0 software (Kruskal-Wallis test) and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

TPO expression by ovarian carcinomatosis in primary culture and cell lines

TPO gene expression was analyzed in cultured cells harvested from peritoneal fluids of six patients suffering from carcinomatosis. Clinical characteristics of patients are summarized in Figure-2A. Photographs taken from each patient cultured cell are presented in Figure-2B. RT-PCR analysis showed that, unlike the signet ring cells, all the cells from ovarian origin expressed the TPO gene (Figure-2C). To extend this analysis, we inspected TPO gene expression in various human cancer cell lines. Results showed different TPO expression with regards to the cell lines considered: ovarian (OVCAR-3 and SKOV-3) and leukemia (K562) cancer cell lines expressed TPO at high level; gastric (AGS, KATO-III), intestinal (LS174T), lung (A549), and cervical (HELA)

cancer cell lines expressed TPO at a very low level; TPO gene expression could not be detected in human breast adenocarcinoma (MDA-MB231 and MCF7) and in human microvascular endothelial (HMEC-1) cell lines (Figure-3A). TPO gene expression was found to be lower in normal ovary tissue than in the liver.

Positive TPO cell lines express different transcript patterns

We next compared the different TPO splice variants in the cancer cell lines that were positive for elevated TPO expression (OVCAR-3, SKOV-3 and K562) and control tissues. Results showed that all cancer cell lines express the three TPO-1 (full length TPO), TPO-2 (12bp deletion) and TPO-3 (116bp deletion) variants, similarly to the liver and ovary control tissues (Figure-3B). Since the splice variants differ by a limited number of nucleotide, the presence of these variants was confirmed by sequencing. Of note, sequencing data showed that the TPO-3 variant harbored the C/T 5183 SNP (Figure-4) which is known to be a common mutation for all clones⁽¹⁴⁾ that does not affect the final sequence of the protein.

Regulation of TPO production by activated protein C

Since we previously showed that aPC-stimulated OVCAR-3 produced TPO by cytokine array⁽²⁰⁾, we further investigated the regulation of TPO expression by aPC. TPO expression was thus assessed by quantitative PCR in OVCAR-3 before and after stimulation by protein C (PC) or activated protein C (aPC). The results obtained showed that neither PC nor aPC had any effect on TPO mRNA level (Figure-5). To further explore TPO production, we next analyzed TPO protein content in these various conditions by flow cytometry. We considered MDA-MB231 cell line as a negative control (Figure-6A). We observed that TPO content of OVCAR-3 cells was similar before and after PC stimulation. However, TPO secretion increased markedly when the cells were incubated with aPC (Figure-6B). The results were also significant when we compared

the TPO protein content between OVCAR-3 cell cultures with or without a protein transport inhibitor (Figure-6C), confirming the secreted nature of TPO in the OVCAR-3 cell line.

OVCAR-3 secretes functional TPO

To assess whether TPO from OVCAR-3 cells is functional, the TPO-dependent Ba/F3 cell line was co-cultured with OVCAR-3, in the presence or not of PC or aPC. As control, Ba/F3 was co-cultured with MDA-MB231 cells that do not produce TPO, K562 that produce high level of TPO, or cultured alone with PC, aPC, xenogeneic TPO or interleukin-3 (IL-3).-Ba/F3 cells viability was assessed in those various conditions by MTT assay and Annexin V labeling. Viability of Ba/F3 cells in each condition was compared to that of Ba/F3 cells incubated with xenogeneic TPO. The results showed that Ba/F3 cells survived similarly when co-cultured with OVCAR-3 cells with or without PC stimulation; viability increased when OVCAR-3 were stimulated by aPC. Of note, Ba/F3 also survived when incubated with IL-3 (Figure-7A and B). Using MTT assay, we evaluated the amount of TPO produced by stimulated or not OVCAR-3 by comparing the survival of Ba/F3 cells incubated with xenogeneic TPO and co-cultured with aPC-stimulated OVCAR-3 (Figure-7C). Relative TPO Secreted (ng) is indicated in Figure-7D .The results suggest an increased TPO production when OVCAR-3 cells where were stimulated by aPC.

Discussion

The results presented here confirm that normal ovarian tissue as well as ovarian cancer cells express TPO and show for the first time that TPO produced by cancer cells is functional. These results provide new insight into the relationship between cancer and hemostatic disorders.

Thrombocytosis associated to malignant disease was, traditionally, attributable to interleukin-6 (IL-6) or to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.⁽²⁴⁻²⁶⁾ Stone *et al* suggested that IL-6 may act alone in a paracrine manner to increase hepatic thrombopoietin production, thereby increasing platelet count.⁽²⁶⁾

Furthermore, Sakar *et al* demonstrated the expression of TPO and its receptor c-MPL in bovine ovarian follicles. They also showed that TPO and c-MPL expression and production in the corpus luteum, during oestrous cycle, vary depending on the luteal stage. Therefore, locally produced TPO and c-MPL may play a crucial role in regulation of the ovarian.⁽²⁷⁾

In addition, TPO serum levels are more elevated in women with ovarian cancer than those with benign ovarian cyst^(28,19) Here we showed that normal ovarian tissue and the ovarian cancer cell lines, specially OVCAR-3 express TPO. These results are reminiscent from a preliminary observation done in ovarian carcinoma.⁽¹⁸⁾ However we report for the first time that the pattern of expression of the TPO gene in ovarian cancer cells is similar to what observed in the liver, and most importantly that the TPO produced is functional. These results have two major clinical implications. First, TPO could be used as a biomarker for the detection and progression of ovarian pathology. Indeed, data suggest a hypothesis whereby TPO-secreting ovarian cancer cells contribute significantly in the elevated TPO plasma in patients with ovarian cancer. Further study should be performed to establish a quantitative relationship between TPO plasma levels and cancer progression. Second, the production of functional TPO by ovarian cancer cells directly links the risk of thromboembolism or thrombocytosis to ovarian cancer. In such a context, it is most likely that the TPO produced by the cancer cells directly act to promote the expansion of platelets. This hypothesis is summarized in Figure-8.

This study also highlighted a new mechanism of regulation of TPO secretion. TPO regulation by aPC does not occur at the transcriptional but rather the post-transcriptional level. This mechanism has not been described yet and will need further investigation to better understand the players involved. These data could also support a model whereby both TPO and aPC interact together *in vivo*.

Disclosures:

The authors have no financial conflicts of interest.

Acknowledgements:

We would like to thank Doctor Nicolas VODOVAR (Lariboisière Hospital, U942, Paris, France) for his valuable assistance.

We acknowledge Annie MUNIER (IFR 65 cell sorting and flow cytometry platform, Paris, France) for her help in flow cytometry analysis.

Figures:

Figure-1

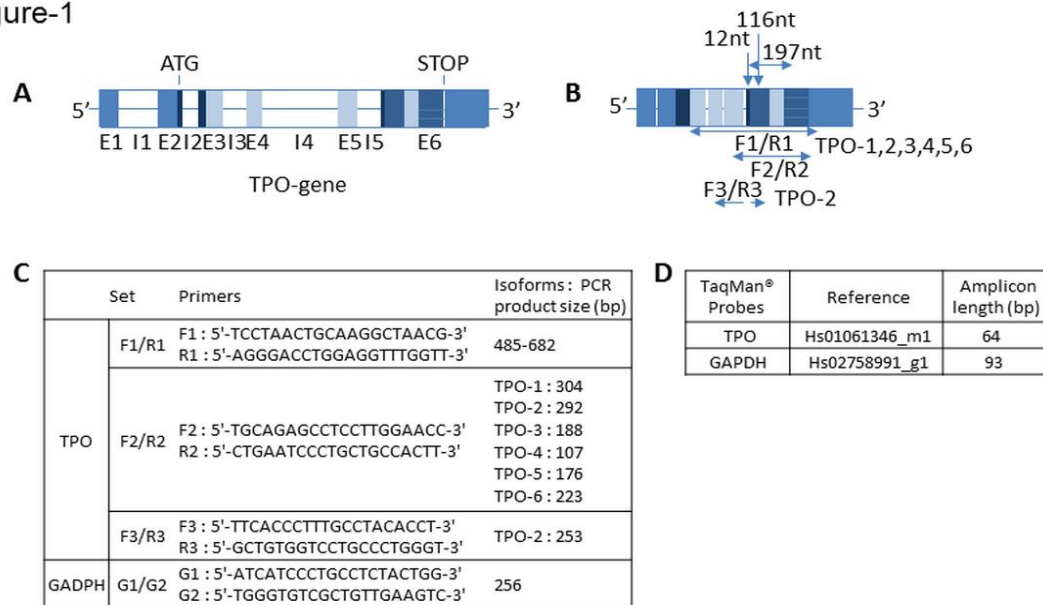


Figure-1: TPO primers' selection.

(A,B) Schematic illustration of human TPO-gene and mRNA isoforms and selected TPO primers: (A) TPO-gene contains 6 exons (E 1-6) and 5 introns (I 1-5). (B) Alternative RNA splicing patterns previously identified for TPO. Horizontal arrows represent the amplified regions by RT-PCR. (C) Primers used for PCR and nested-PCR. First PCR products were used as DNA template for the nested-PCR. TPO-amplified isoforms and their sizes are shown. GAPDH PCR was used as control. (D) TaqMan® Probes for TPO and GAPDH.

Figure-2: TPO-gene expression in cultured cells from ascitic fluids of cancer patients.

A: Subject data. B: Photographs taken of ascitic fluid cells in culture. C: Analysis of TPO and GADPH gene expression. 2% agarose gel. PCR using F1/R1 primers for TPO gene amplification.

Figure-2

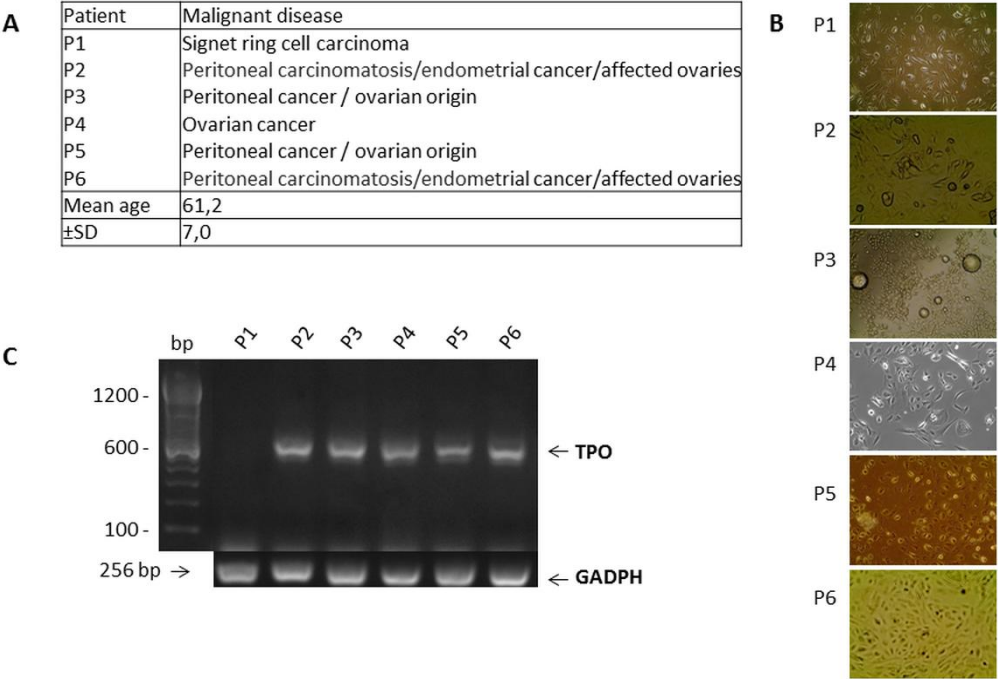


Figure-3: TPO gene expression by cell lines.

(A) First PCR analysis of TPO-and GADPH gene expressed by various cell lines, ovarian (OVCAR-3 and SKOV-3), breast (MDA-MB231 and MCF7), gastric (AGS, KATO-III), intestinal (LS174T), lung (A549), leukemia (K562), cervical (HELA) and human microvascular endothelial (HMEC-1) cell lines. 2% agarose gel. Normal adult ovary and liver tissues served as control. (B) 2% agarose gel pattern of nested-PCR product of TPO: TPO-1 (full length), TPO-2 (12 bp deletion), TPO-3 (116 bp deletion). Boxes (1,2) represent bands chosen for sequencing.

Figure-3

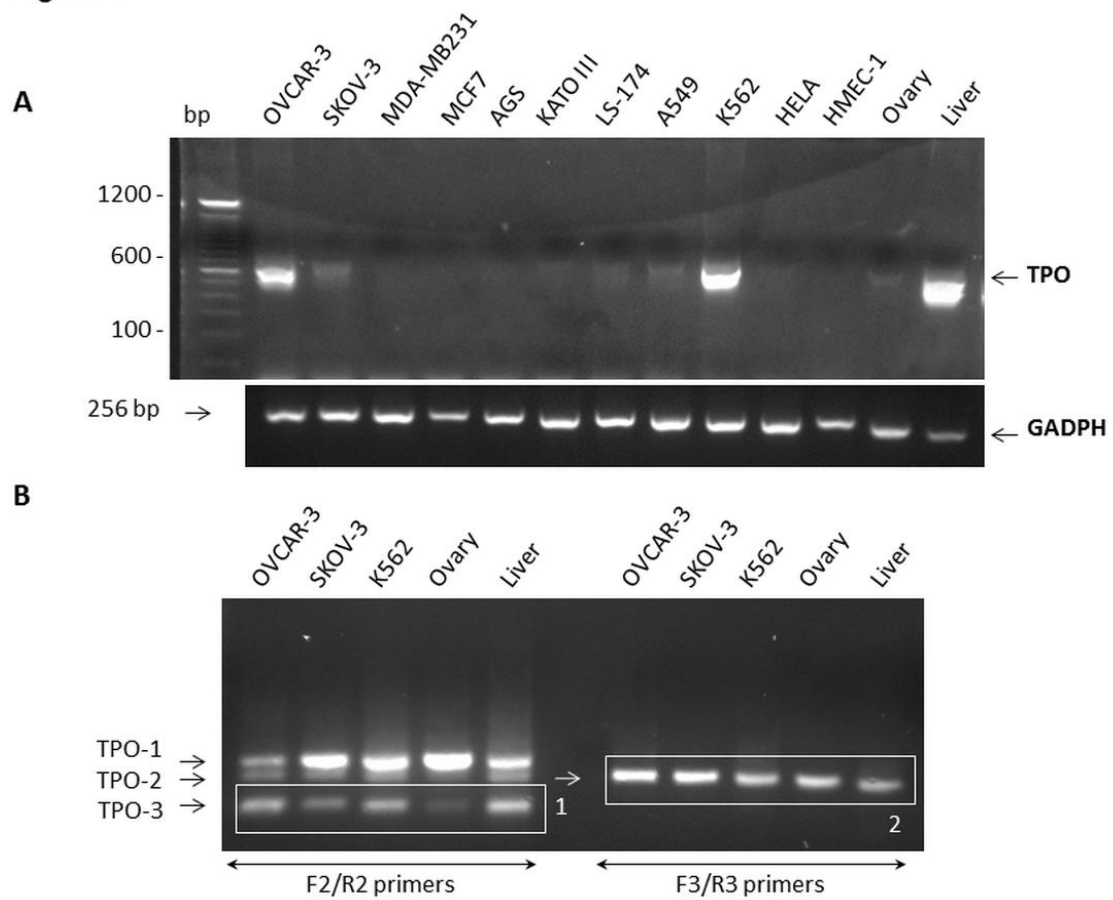


Figure-4: Comparison of TPO-3 sequence from OVCAR-3, SKOV-3 and K562 cell lines and normal control ovary and liver tissues with TPO-3 cDNA from NCBI database.

Sequences of PCR products extracted from agarose gel bands are shown in the upper line. R2 primer was used for sequencing. Boxes show a C/T 5183 SNP. "... " and "*" symbols refer to two different alternative splicing sites (respectively 12 bp and 116 bp deletions). A 116 bp deletion characterizing TPO-3 is detected. BLAST reveals no significant mutation.

Figure-4

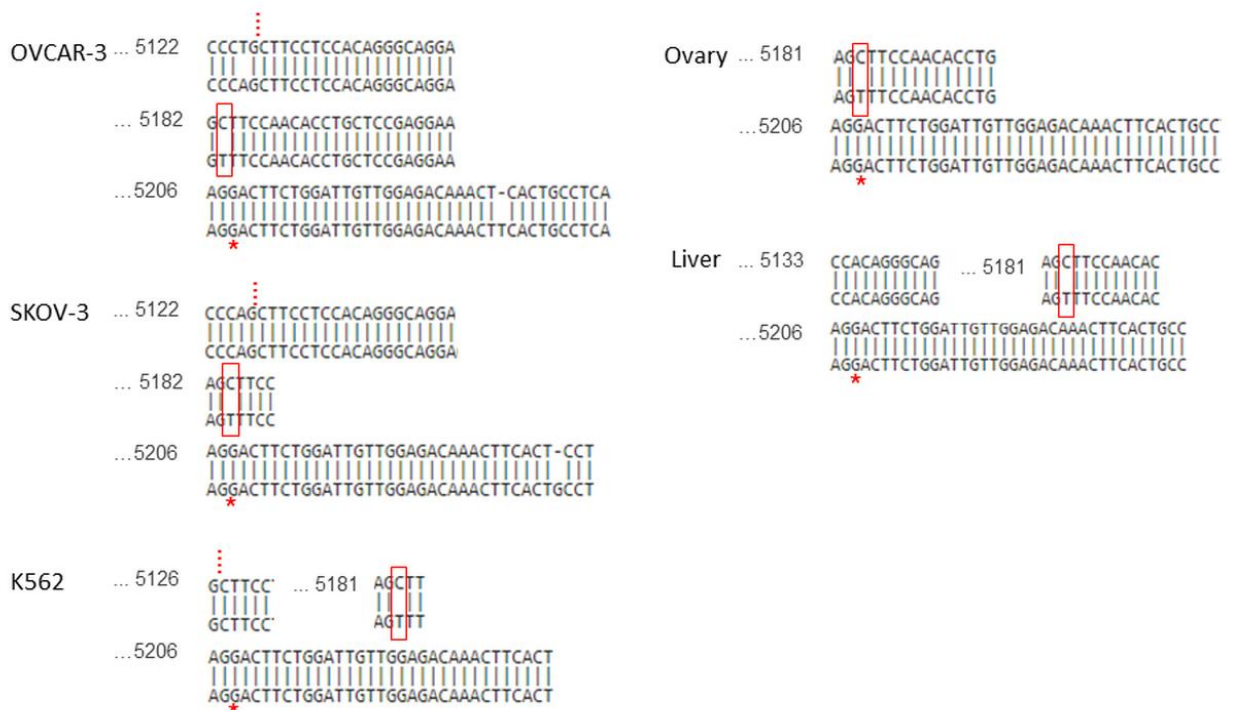


Figure-5: Quantification of TPO-gene expression using TaqMan® Probes. In different cancer cell lines (P<0,05).

Figure-5

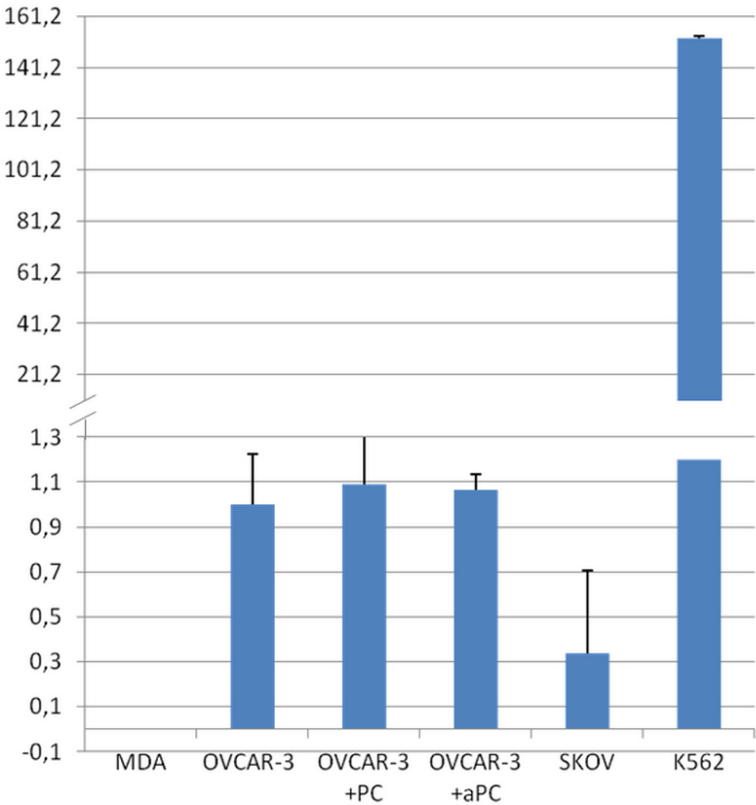
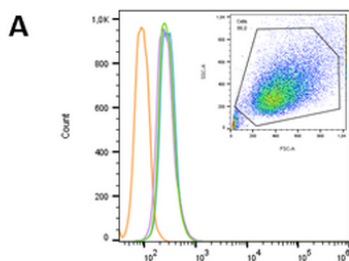


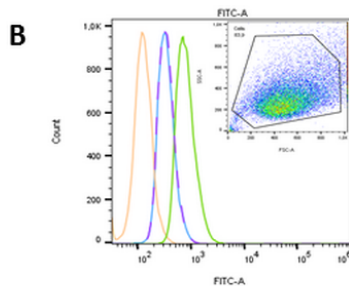
Figure-6: Analysis of TPO-secretion by MDA-MB231 and OVCAR-3 cell lines.

Flow cytometry distribution plots are shown. Graphs represent Geometric Fluorescence Mean. (A,B) : Graphs for MDA-MB231 (A) and OVCAR-3 (B) cells incubated with the secondary antibody alone (orange), labelled with primary and secondary antibodies after incubation without PC or aPC (blue), with PC (purple) or with aPC (green). (C) TPO-released protein by OVCAR-3. OVCAR-3 were incubated (for 5 hours) without (blue) or with (green) protein transport inhibitor, or with only 2nd antibody as control (orange). 2nd antibody GMFI / GMFI sample ratio was calculated for each condition.

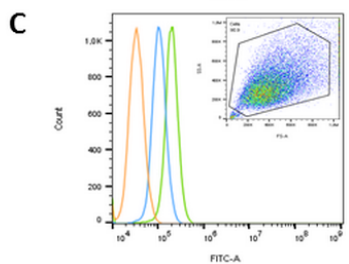
Figure-6



Sample Name	2nd antibody/sample ratio
MDA-MB231 + 2nd antibody	1,0
MDA-MB231	2,9
MDA-MB231 +PC	2,6
MDA-MB231 +aPC	2,7



Sample Name	2nd antibody/ sample ratio
OVCAR-3 + 2nd antibody	1
OVCAR-3	2,7
OVCAR-3 +PC	2,7
OVCAR-3 + aPC	6,3



Sample Name	2 nd antibody/sample ratio
OVCAR-3 + 2 nd antibody	1
OVCAR-3 - protein transport inhibitor	3,1
OVCAR-3 + protein transport inhibitor	5,3

Figure-7: Functionality of TPO: Viability study of TPO-dependent Ba/F3 cells.

(A) The panel shows the distribution of two populations of Ba/F3 cells cultured in the presence of TPO: a non-labeled population (FITC-A-/viability) and a labeled population (FITC-A+/apoptosis). (B) The graph shows Ba/F3 viability (FITC-A-). (C, D) Relative TPO Secreted quantity (ng). ($P < 0,02$).

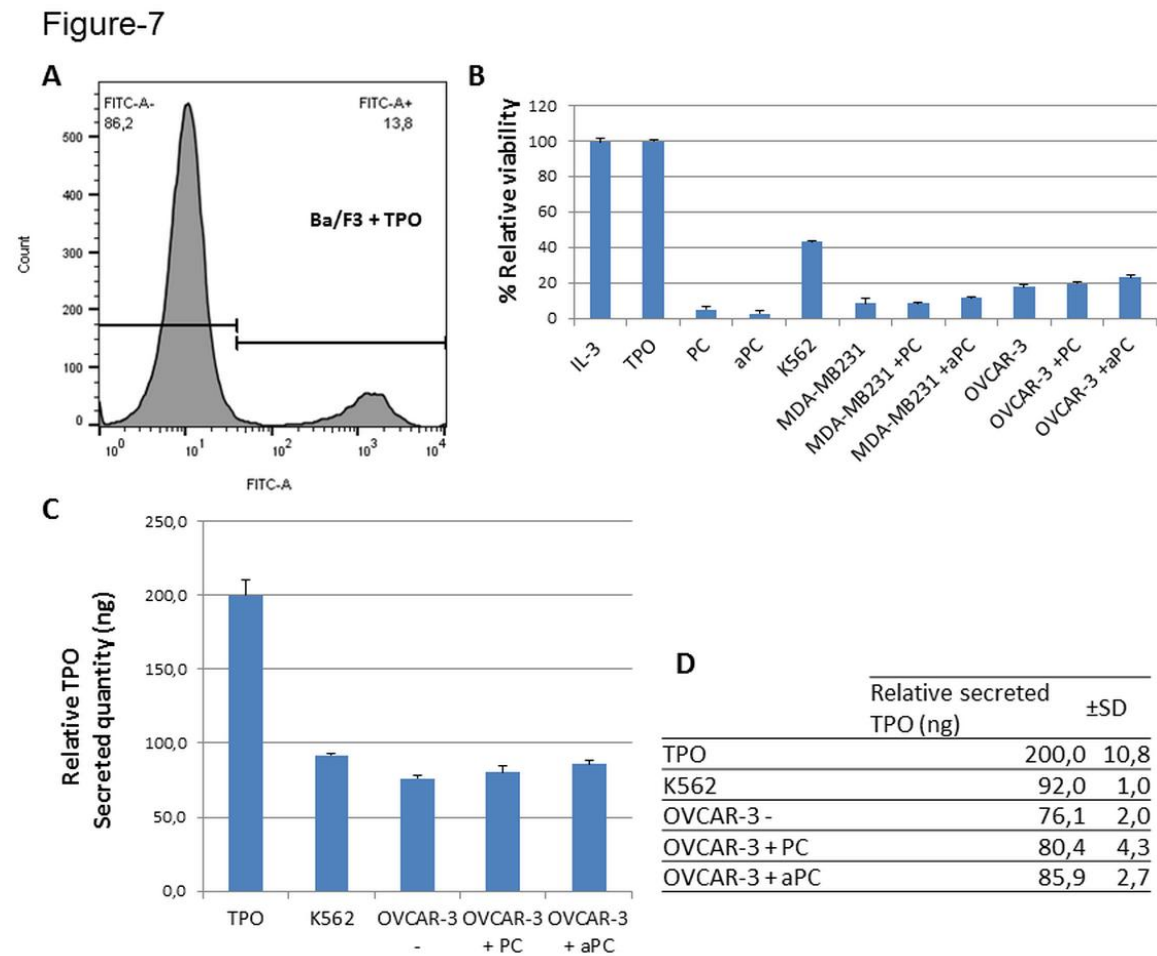
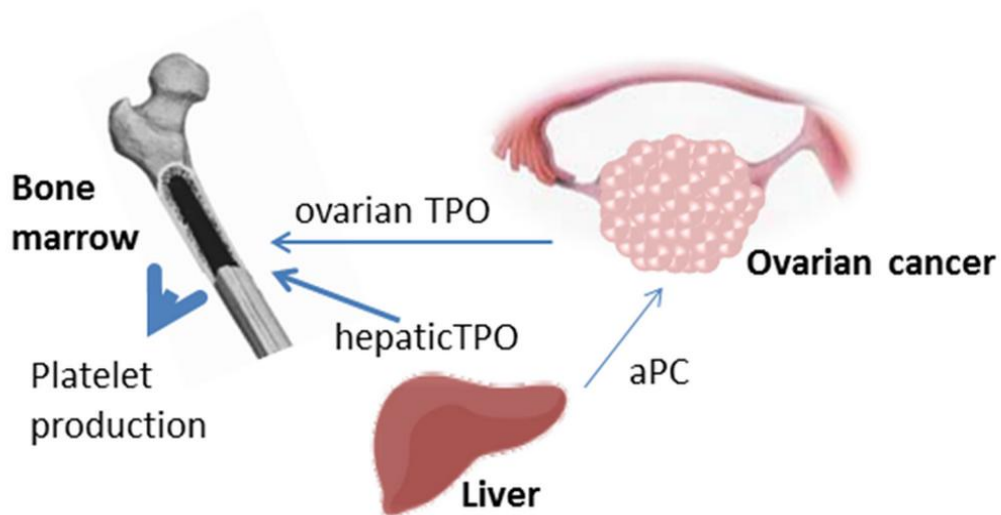


Figure-8: Ovarian TPO influenced platelet generation via bone marrow.

TPO produced by ovarian cancer cells may directly act to promote the expansion of platelets.

Figure-8



References

- 1 Trousseau A. Phlegmatia alba dolens. Clinique Médicale de l'Hôtel Dieu. Paris, Baillière Ed, Paris 1865; 654- 712.
- 2 Buller HR, van Doormaal FF, van Sluis GL, Kamphuisen PW. Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations. J Thromb Haemost 2007;5 Suppl 1:246-54.
- 3 Levin J, Conley CL. THROMBOCYTOSIS ASSOCIATED WITH MALIGNANT DISEASE. Arch Intern Med 1964;114:497-500.
- 4 Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Kisiel W. The role of hemostatic system inhibitors in malignancy. Semin Thromb Hemost 2007;33(7):621-42.

- 5 Bick RL. Coagulation abnormalities in malignancy: a review. *Semin Thromb Hemost* 1992;18(4):353-72.
- 6 Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Lyman GH. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* 2005;104(12):2822-9.
- 7 Bambace NM, Holmes CE. The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost* 2011;9(2):237-49.
- 8 Boucharaba A, Serre C-M, Grès S, Saulnier-Blache JS, Bordet J-C, Guglielmi J, et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* 2004;114(12):1714-25.
- 9 de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369(6481):533-8.
- 10 Jones DV, Ashby M, Vadhan-Raj S, Somlo G, Champlin R, Gajewski J, et al. Recombinant human thrombopoietin clinical development. *Stem Cells* 1998;16 Suppl 2:199-206.
- 11 Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1997;89(1):101-7.
- 12 Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* 1994;353(1):57-61.
- 13 Foster DC, Sprecher CA, Grant FJ, Kramer JM, Kuijper JL, Holly RD, et al. Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(26):13023-7.
- 14 Gurney AL, Kuang WJ, Xie MH, Malloy BE, Eaton DL, de Sauvage FJ. Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. *Blood* 1995;85(4):981-8.
- 15 Marcucci R, Romano M. Thrombopoietin and its splicing variants: structure and functions in thrombopoiesis and beyond. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782(7-8):427-32.
- 16 Sirotkin AV, Sanislo P, Schaeffer H-J, Florkovicová I, Kotwica J, Bulla J, et al. Thrombopoietin regulates proliferation, apoptosis, secretory activity and intracellular messengers in porcine ovarian follicular cells: involvement of protein kinase A. *J Endocrinol* 2004;183(3):595-604.
- 17 Sasaki Y, Takahashi T, Miyazaki H, Matsumoto A, Kato T, Nakamura K, et al. Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms. *Blood* 1999;94(6):1952-60.

- 18 Furuhashi M, Miyabe Y, Oda H. A case of thrombopoietin-producing ovarian carcinoma confirmed by immunohistochemistry. *Gynecol Oncol* 1999;74(2):278-81.
- 19 Tsukishiro S, Suzumori N, Nishikawa H, Arakawa A, Suzumori K. Preoperative serum thrombopoietin levels are higher in patients with ovarian cancer than with benign cysts. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;140(1):67-70.
- 20 Azzazene D, Thawadi H Al, Farsi H Al, Besbes S, Geyl C, Mirshahi S, et al. Plasma endothelial protein C receptor influences innate immune response in ovarian cancer by decreasing the population of natural killer and TH17 helper cells. *Int J Oncol* 2013;43(4):1011-8.
- 21 Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, Grosjean S, Saliba J, Mouton C, et al. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* 2014;123(9):1372-83.
- 22 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101-8.
- 23 Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986;93(2):157-65.
- 24 Estrov Z, Talpaz M, Mavligit G, Pazdur R, Harris D, Greenberg SM, et al. Elevated Plasma Thrombopoietic Activity in Patients With Metastatic Cancer-Related Thrombocytosis. *The American Journal of Medicine* 1995;98(6):551-8.
- 25 Suzuki A, Takahashi T, Nakamura K, Tsuyuoka R, Okuno Y, Enomoto T, et al. Thrombocytosis in patients with tumors producing colony-stimulating factor. *Blood* 1992;80(8):2052-9.
- 26 Stone RL, Nick AM, McNeish IA, Balkwill F, Han HD, Bottsford-Miller J, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2012;366(7):610-8.
- 27 Sarkar M, Schilffarth S, Schams D, Meyer H, Berisha B. The expression of thrombopoietin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. *Reprod Domest Anim* 2011;46(5):757-62.
- 28 Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, et al. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* 1996;87(6):2154-61.

Le récepteur endothélial de la protéine C exprimé par les cellules du cancer de l’ovaire en tant que biomarqueur possible du début de la pathologie cancéreuse

Endothelial protein C receptor expressed by ovarian cancer cells as a possible biomarker of cancer onset

Elodie Ducros, Shahsoltan Mirshahi, Dalel Azzazene, Sophie Camilleri-Broët, Eliane Mery, Halema Al Farsi, Hamda Althawadi, **Samaher Besbes**, Jean Chidiac, Eric Pujade-Lauraine, Amu Therwath, Jeannette Soria And Massoud Mirshahi

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, 2012

La protéine C est un important régulateur de la coagulation. Fixée à son récepteur membranaire (EPCR), elle est activée par le complexe thrombine- thrombomoduline. La protéine C se transforme en protéine C activée (PCA), qui en présence de son cofacteur la protéine S, dégrade les facteurs V et VIII activés.

Sous l’action d’enzymes protéolytiques, l’EPCR peut se détacher de la cellule endothéliale. Cette protéolyse entraîne sa libération dans le plasma sous une forme soluble (EPCRs). L’EPCRs, en captant la PCA, constitue un véritable piège pour son ligand, l’empêchant d’exercer sa fonction anticoagulante.

L’objectif de ce travail était d’évaluer le potentiel d’EPCRs, en tant que biomarqueur de la pathologie cancéreuse, notamment dans le cas du cancer de l’ovaire.

Dans ce travail, nous confirmons, *in situ*, la présence de l’EPCR sur des biopsies provenant de différents cancer (sein, ovaire, poumon et côlon). Cela indique que la présence d’EPCR est commune à toute les pathologies cancéreuses, quelle que soit leur origine. Aussi, nous détectons la présence d’EPCR dans les agrégats cellulaires issus de prélèvements d’ascites de patientes atteintes de carcinome ovarien. Le dosage d’EPCRs dans ces prélèvements révèle un taux supérieur à la concentration plasmatique normale; et ce, dans 91% des cas.

Sur un nombre réduit de cette population malade (patientes non traitées), nous mettons en évidence une corrélation positive, entre le taux d'EPCRs et un biomarqueur de la pathologie cancéreuse ovarienne : CA125.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la lignée cellulaire issue d'adénocarcinome humain OVCAR-3. Dans cette partie, nous démontrons, à la fois, la présence d'EPCR et de PAR-1. En effet, il est admis que la PCA, fixée à son récepteur, est capable d'activer une cascade de signalisation dépendante de PAR-1 et de PI3K. Cette cascade de réactions améliore la survie des cellules cancéreuses et amplifie leur potentiel migratoire.

Enfin, le séquençage d'EPCR met en évidence une conservation importante de la séquence entre les lignées cancéreuses et la lignée endothéliale. Les mêmes polymorphismes nucléotidiques (SNP) sont détectés. Ces 13 SNP caractérisent les trois haplotypes d'EPCR.

En se basant sur ces résultats, un haplotype est attribué à chaque lignée cellulaire : les lignées de tumeur mammaire MDA-MB231 et ovarienne OVCAR-3 portent l'haplotype A3 à l'état hétérozygote. La lignée de tumeur pulmonaire A549 porte l'haplotype A3 à l'état homozygote. Ces résultats corrélerent, parfaitement, avec le taux d'EPCRs dans le milieu de culture de chaque lignée cellulaire.

En conclusion, la PCA fixée à son récepteur, confère aux cellules cancéreuses des effets cytoprotecteurs et promeut leur dissémination métastatique. Aussi, la conservation des séquences codant pour l'EPCR constitue une preuve quant au rôle de ce dernier dans la physiopathologie cancéreuse. Enfin, un dosage combiné d'EPCRs et de CA125 peut nous fournir un outil puissant de suivi de la progression de la pathologie cancéreuse ovarienne.

Endothelial protein C receptor expressed by ovarian cancer cells as a possible biomarker of cancer onset

ELODIE DUCROS¹, SHAHSOLTAN MIRSHAHI², DALEL AZZAZENE¹, SOPHIE CAMILLERI-BROËT¹, ELIANE MERY³, HALEMA AL FARSI¹, HAMDALATHAWADI¹, SAMAHER BESBESS¹, JEAN CHIDIAC⁴, ERIC PUJADE-LAURINE⁴, AMU THERWATH¹, JEANNETTE SORIA¹ and MASSOUD MIRSHAHI¹

¹National Institute for Medical Research (INSERM), Cordeliers Research Center (UMRS 872), University of Pierre and Marie Curie, Sorbonne University (UPMC) and University of Paris Descartes, Paris; ²Diagnostica Stago, Gennevilliers; ³Claudius Regaud Institute, Toulouse; ⁴Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France

Received December 28, 2011; Accepted March 9, 2012

DOI: 10.3892/ijo.2012.1492

Abstract. Coagulation disorders often accompany cancer onset and evolution, which, if not properly managed, could have grave consequences. Endothelial protein C is an important regulator of homeostasis and acts through its high affinity binding to its transmembrane receptor (EPCR). Soluble (sEPCR) which results from the proteolytic cleavage of the membrane bound form can trap activated endothelial protein C and deprive it of its anti-coagulant function. In this study, the expression of EPCR and its soluble form (sEPCR) released into plasma as a result of proteolytic cleavage were investigated in ovarian, breast, lung and colorectal cancer biopsies, as well as in ascitic cell clusters and peritoneal fluid from ovarian cancer samples. In parallel, breast, ovarian, lung and colorectal cancer cell lines were investigated for the expression of EPCR. The integrity of the EPCR gene sequence as well gene haplotypes were ascertained in the established cancer cell lines in order to understand their eventual regulatory functions. The results from the present study indicate that in cancer patients, the levels of sEPCR are significantly higher than the normal range compared to healthy volunteers. The increase in the levels of sEPCR parallels the increase in CA125, showing a close correlation. Therefore, the detection of sEPCR in cancer and during the post-treatment period could be taken into account as an additional marker that could re-inforce the one obtained using CA125 alone as a marker of cancer cell mass.

Introduction

The search for newer and more reliable biomarkers is a continuing research endeavour. Biomarkers are crucial in narrowing down on a precise diagnosis and are equally important during the follow-up stage in disease management. Preliminary experiments in our laboratory indicated that endothelial protein C could be a possible biomarker candidate.

The endothelial protein C along with its receptor displays pleiotropic functions. One such recognized function is its role as an important regulator of homeostasis, besides being implicated in the systemic response to acute inflammation. Protein C zymogen binds to endothelial protein C receptor (EPCR) with high affinity and stimulates its activation via the thrombin-thrombomodulin complex. Activated protein C (aPC), together with its co-factor, protein S, degrade factors Va and VIIIa and thereby interfere with thrombin generation (1-3).

EPCR is a type 1 transmembrane glycoprotein (CD201) that shares considerable homology with the major histocompatibility complex (4). EPCR is known to be constitutively released in the plasma in a free soluble form as a result of proteolytic cleavage. This soluble form of EPCR (sEPCR) has the ability to trap free aPC, thereby depriving it of its anti-coagulant function within the surrounding environment (5,6). It has been shown that the shedding of EPCR by human umbilical cord endothelial cells (HUVECs) is effectively regulated by IL-1 β and TNF- α , and downstream by MAP kinase signaling pathways and metalloproteinases (7).

During acute inflammation, a significant increase in circulating sEPCR is observed which in turn could provide an early biological marker of sepsis outcome (8). It is known that cytokines, such as IL-1 β , and TNF- α , as well as endotoxins, can attenuate the expression of EPCR which then leads to diminution in plasma aPC (9). However, the nature of the anti-inflammatory action of aPC remains unclear.

The EPCR gene carries 13 single nucleotide polymorphisms, which define 3 haplotypes. One of these haplotypes, A3, encodes a protein, which is more sensitive than the other two to the action of shedding enzymes, which can result in a marked increase in

Correspondence to: Dr Massoud Mirshahi, National Institute for Medical Research, Cordeliers Research Center, University of Pierre and Marie Curie, Paris-VI, University of Paris Descartes, Paris-V, 15 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France
E-mail: massoud.mirshahi@upmc.fr

Key words: endothelial protein C receptor, ovarian cancer, DNA sequence, biomarker, CA125

the level of sEPCR. The presence of the A3 haplotype therefore coincides with the presence of a high sEPCR level, the latter being a candidate risk factor for venous thrombosis (10-12). Interest in EPCR/aPC in relation to tumor biology is gaining momentum with the appearance of an increasing number of publications (13-16).

The appearance of high levels of sEPCR in malignant tumors during disease and during relapse could have an implication in venous thrombosis and if detected early enough could serve as a useful indicator and therefore, preventive measures could be taken. Taking this evidence into consideration, we undertook a detailed study of aPC/EPCR not only in a large cohort of tumor biopsies, patient ascitic fluid and plasma, but we also extended our study to include *in vitro* cultured tumor cell lines.

Materials and methods

Reagents. Reagents were obtained from the following sources: primary antibody AF2245 against EPCR (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); primary antibody ATAP2 against PAR-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); biotinylated anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat IgG, streptavidin- fluorescein conjugate (Amersham, Buckinghamshire, UK); rabbit anti-goat HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark); phycoerythrin-coupled anti-P-gp antibody (Millipore, Billerica, MA, USA); human recombinant aPC (Lilly, Suresnes, France); U0126 and wortmannin (Calbiochem, San Diego, CA, USA). The recombinant form of human aPC marketed as Xigris, was obtained from Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA). The PCR primers were designed with the Primer3 program, BLAST verified, and synthesized by Eurobio (Les Ulis, France).

Cells. The human cancer cell lines used were: ovarian (OVCAR, ATCC), breast (MDA-MB231 ATCC), lung (A549) and colorectal (HT-29, HCT-8R ATCC). Cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum, penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 µg/ml) and incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C, as recommended by the supplier (PAA Laboratories Inc., Etobicoke, ON, USA).

Conditioned medium. Cells, seeded in two 25-cm² flasks, were grown to 80% confluency and then incubated in 1 ml serum-free culture medium. aPC (10 µg/ml) was added to one flask, while the second one, without aPC, served as the control. Cells were pelleted by centrifugation after 18 h and the conditioned medium was collected and aliquoted.

Plasma, ascites and mononuclear cells

Plasma samples. Blood (n=79) samples from patients with ovarian cancer were obtained from the Oncology Department of Hôtel-Dieu Hospital (Paris, France) after informed consent, in accordance with the rules of the revised Helsinki protocol. A total of 79 patients with an age range of 39-90 years (mean ± SD, 62±14 years) were selected. Patients received anti-coagulants.

Ascitic cells. Peritoneal fluid from 23 cancer patients of the Hospital Hôtel-Dieu was collected. As ascite evacuation is part of the routine management of patients, only oral consent was obtained from them. Cells from ascitic fluid were pelleted by a short spin at 1,000 rpm and the supernatant was collected.

EPCR-specific antibody production. Three EPCR-specific peptides were chosen based on information provided by the crystallographic structure (21) and with the aid of the Cn3D 4.1 program for the tridimensional structure of EPCR. The EPCR-specific peptides synthesized were as follows: peptide no. 1, 51-GGHLT HVLEG PDTNT TIQL-70; peptide no. 2, 68-IQLQP LQEPE SWART QSQLQ-87; and peptide no. 3, 157-TSGVV TFTLQ QLNAY NRTRY-176. One of the peptides (peptide no. 3) contained three essential residues required for aPC binding (Q166, R173 and T174). The peptides were KLH-coupled and injected in combination with Freund's adjuvant every two weeks into New Zealand white rabbits (150 to 300 µg per injection) provided on contract by Agro-Bio (La Ferté St. Aubin, France), followed by immunoglobulin purification. The fifth and last antigen injection was on the 56th day and sera from rabbits were collected on the 77th day. The specificity of polyclonal antibodies to peptides was tested using a competition assay by the ELISA method using purified peptides.

Immunolabeling. The presence of EPCR proteins in cancer cells was revealed by immunocytochemistry as previously described (17). As the controls, isotypic antibodies were used in parallel and the nuclei were DAPI-labeled. FACS analysis was performed on cells detached by accutase (PAA) treatment and immunolabeled as previously described (17) with EPCR (20 µg/ml) antibody and compared with the isotypic control. Ascitic cells were examined as previously described (17). Cells were observed after staining with methylene blue and eosin.

Tissue microarray (TMA). EPCR expression was examined on 4 mm-thick routinely processed paraffin sections of tumor biopsies as described by Rafi *et al.* (18). Four different TMAs were prepared. Ovarian cancer TMA contained 146 samples (before treatment, n=84 and after treatment, n=62), breast tumor TMA 120 samples, while colon cancer TMA had 30 samples and the lung cancer TMA had 24. EPCR proteins were revealed by fluorescent immunolabeling and compared to the controls using isotypic antibodies.

sEPCR-ELISA assay. sEPCR in cultured cell supernatants and in ascitic fluid was measured using Asserachrom sEPCR immunoassay as recommended by the commercial supplier (Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, USA).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. The cancer cell RNA extracts were prepared using the Nucleospin RNA-II kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). Following reverse transcription [Mu-MLV reverse transcriptase and oligo(dT) primers], PCR was performed with TaqDNA polymerase (Gibco-BRL, Paisley, UK). Specific primers for EPCR synthesis were as follows: sense, 5'-CAA CTT CAG GAT GTT GAC AA-3'; antisense, 5'-CTA CAG CCA CAC CAG CAA T-3' to yield a product size of 692 bp (18). The PCR products, along with a 100-bp DNA ladder, were analyzed by electrophoresis on agarose gels containing ethidium bromide.

Gene sequencing. The cancer cell RNA extracts were prepared and subjected to reverse transcription as described above. Cancer cell DNA extracts were prepared using the Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel EURL). Genomic DNA and cDNA

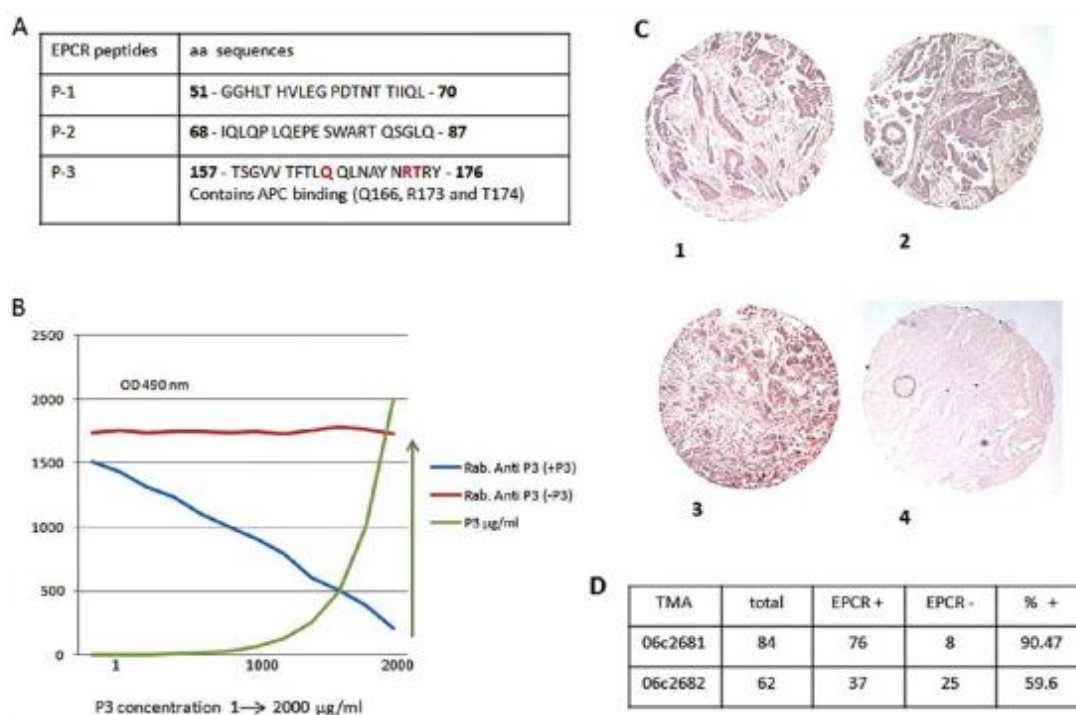


Figure 1. Preparation of anti-EPCR antibodies for *in situ* detection of EPCR in ovarian cancer biopsies. (A) The three EPCR-specific peptides (P1, P2 and P3) were chosen based on information provided by the crystallographic structure and synthesized. (B) The specificity of the polyclonal antibodies to these peptides were tested by ELISA using a competition assay and purified peptides. (C) *In situ* detection of EPCR performed using immunohistochemistry of EPCR on ovarian cancer tissue microarray. (C-1 and -2) EPCR was revealed either by standard peroxidase staining before treatment and (C-3) after treatment. (C-4) Negative control, performed with an isotypic antibody (initial magnification, x20). Results are representative of three independent experiments, each of which gave similar results. The results were analysed and are presented in (D). Rab, rabbit.

samples were shipped on dry ice to the Qiagen Sequencing Service. Samples were amplified with HotStarTaq Plus DNA Polymerase using custom-made primers, designed by Qiagen. These primers were selected according to the EPCR sequence available under GenBank accession nos. AF106202 or BC01445. Reference AF106202 includes the entire gene and promoter region (8,167 bp) whereas BC01445 represents the mRNA (1,381 bp). Both strands of DNA were sequenced with BigDye 3.1 Terminator Chemistry (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), using the ABI Sequence Analyzer 3730XL. The genomic DNA sequence was aligned with the GenBank reference sequence AF106202 whereas the cDNA sequenced was aligned with BC01445.

Results

Detection of protein C receptor *in situ* in ovarian cancer. Three rabbit anti-EPCR-specific peptides were produced. One of these peptides (peptide 3) contained an APC binding (Q166, R173 and T174) domain (Fig. 1A). The specificity of these antibodies was tested using a competitive immune assay based on the binding competition between rabbit anti-peptides and the corresponding peptide. Results are presented only for peptide 3 (Fig. 1B). These antibodies were used for the immune analysis of EPCR in the present study. EPCR expression *in situ* was evaluated in various cancer biopsies by TMA using anti-peptide 3 antibody. As presented in Fig. 1C and D, of the 146 biopsies from ovarian cancer tested before (n=84, Fig. 1C-1

and C-2) and after (n=62, Fig. 1C-3) treatment, 90.47 and 56.6% of biopsies were positive for the protein C receptor, respectively. The control is presented in Fig. 1C-4.

Similarly, EPCR was detected in 20 out of 24 lung cancer biopsies, representing approximately 80% of positive samples in this case. Also, of the 30 colon cancer biopsies tested, 20 (65%) were positive for EPCR expression (data not shown). Therefore, the presence of EPCR in tumors, whatever their origin, seems to be, more or less, common.

Evaluation of sEPCR in ascitic cell clusters, fluid samples and plasma from ovarian cancer patients. Twenty-three ascitic fluid samples and their floating cell clusters were also screened for the presence of EPCR (Fig. 2). The data in Fig. 2 indicate the presence of membrane-bound EPCR detected by immunohistochemistry (Fig. 2B), while the isotype control remained negative (Fig. 2A). All ascitic cell clusters were found to be positive for EPCR protein expression. Similar results were also obtained when we used rabbit anti-EPCR peptides as the probe (data not shown). These results were then confirmed using RT-PCR analysis. Cells in the floating aggregates (clusters) were found to transcribe the EPCR gene as an amplified band consistent with the predicted size (Fig. 2C).

The quantity of sEPCR in ascitic supernatants and plasma from ovarian cancer was assessed by ELISA. All samples tested positive, and exhibited a concentration well above the baseline plasma value of 100 ng/ml (Fig. 2D). Ascite samples (91%) tested positive, revealing a concentration noticeably higher than

the plasma baseline value estimated at 100 ng/ml. The above cited results correlate with fibrin deposits generally observed in ascites (data not shown). Finally, in plasma samples from ovarian cancers, once again, 70% of the samples revealed a concentration well above the baseline plasma value (Fig. 2E).

sEPCR expressed by ovarian cancer cells may be a biomarker of cancer onset. We assessed by ELISA the quantity of sEPCR and detectable CA125 in a relatively small number (n=29) of patients with ovarian cancer before treatment. This allowed us to establish, using the Spearman's test, a positive correlation between plasma sEPCR and CA125 in the patient population (Spearman's coefficient, $Rho = 0.36$).

We divided all patients into two subgroups: group 1 (n=12) with the amount of plasmatic sEPCR below the baseline (68 to 117 ng/ml) and group 2 (n=17) where the concentration of sEPCR was noticeably higher than the plasma baseline value (140 to 250 ng/ml, n=17). The results are presented in Table I.

The median value obtained was 68.5 ng/ml for sEPCR and 197 ng/ml for CA125 in the first group and 198 ng/ml for sEPCR and 339 ng/ml for CA125 in the second group. The results obtained show that in the second group, when CA125 increased by 1.72-fold, the amount of sEPCR also increased by 2.9-fold. Thus, in the second group, there was a positive correlation between sEPCR and CA125, indicating that sEPCR could be measured as an indicator of ovarian cancer along with the currently used measure of CA125.

OVCAR-3 ovarian cancer cell line expresses PAR-1 antigens, CD133 and CD117. Analysis by cytometry of OVCAR-3 cells using CD133 and CD117 antibodies revealed a positive immune reactivity with these. The representative experiments presented in Fig. 3A show that 65.2% of OVCAR-3 wild-type cells expressed CD133, while 42% of these cells expressed both CD133 and CD117. The same results (70-75%) were obtained using CD133 microbeads. As CD133 and CD117 are recognized markers of pro-stem cells, their presence tends to favour the idea that OVCAR-3 cells carry pro-stem cell characteristics.

Due to the crucial role of PAR-1 in EPCR function, we tested the presence of this protein in OVCAR cells. As shown in Fig. 3B, these cells express the PAR-1 protein. This finding was also confirmed by flow cytometry (data not shown).

Expression of EPCR by the OVCAR-3 cancer cell line. EPCR expression in OVCAR-3 cells was evaluated. RT-PCR (Fig. 4A) and FACS analysis (Fig. 4B) indicated that both EPCR mRNAs and proteins were detectable in these cells. Other cell lines, derived from lung (A549), colorectal (HT-29) and ileocecal (HCT-8R) cancers, were also screened for EPCR transcription by RT-PCR amplification. Analysis of the product of RT-PCR by gel electrophoresis exhibited a prominent amplification band for all three cell lines. The band size was consistent with the predicted size for EPCR (Fig. 4A).

The integrity of the coding sequences and the EPCR gene locus was further scrutinized through sequencing of the EPCR cDNA and the EPCR gene. The sequence obtained was compared to a consensus sequence corresponding to the endothelial gene. It was observed that the cancer cell and endothelial cell EPCR haplotypes share similarity with respect to single nucleotide polymorphisms (SNPs). For this purpose, both genomic and

Table I. Quantification of EPCR and CA125 in all the patients.

A, group 1		
Patients	EPCR, ng/ml	CA125 J0
1	68	54
2	86	83
3	64	84
4	69	114
5	57	127
6	117	195
7	85	199
8	57	273
9	82	279
10	43	369.5
11	11	553
12	80	637
Median	68.5	197
B, group 2		
Patients	EPCR, ng/ml	CA125 J0
1	146	30.6
2	229	99.4
3	250	101.3
4	170	122
5	150	140
6	143	148
7	162	265
8	130	296.1
9	180	339
10	291	370
11	198	387
12	251	668
13	274	798
14	140	928
15	253	946
16	230	1130
17	234	3620
Median	198	339

Group 1 comprised 12 patients with a sEPCR level below the baseline (68 to 117 ng/ml). Group 2 comprised patients with a sEPCR level noticeably higher than the plasmatic baseline level (140 to 250 ng/ml, n=17).

cDNA were sequenced for OVCAR and MDA-MB231 cell lines, whereas only cDNA was sequenced for A549, HCT-8R and HT-29 cells. The cDNA and genomic DNA sequences were compared with BC01445 (1,381 bp) and AF106202 (8,167 bp) GenBank loci, respectively (Fig. 4). We detected the 13 SNPs already described in endothelial cell genes (Sapoznik *et al.*) (11). In addition, within the 5'UTR region, a thymidine insertion (locus 260) and an adenosine deletion (locus 840) were found in both MDA-MB231 and OVCAR cells. Moreover, a SNP was observed between the second and the third exon for both cell lines (C5727T). Two other SNPs (G7965C and T8153C) were detected only in the OVCAR cells within the 3'UTR region.

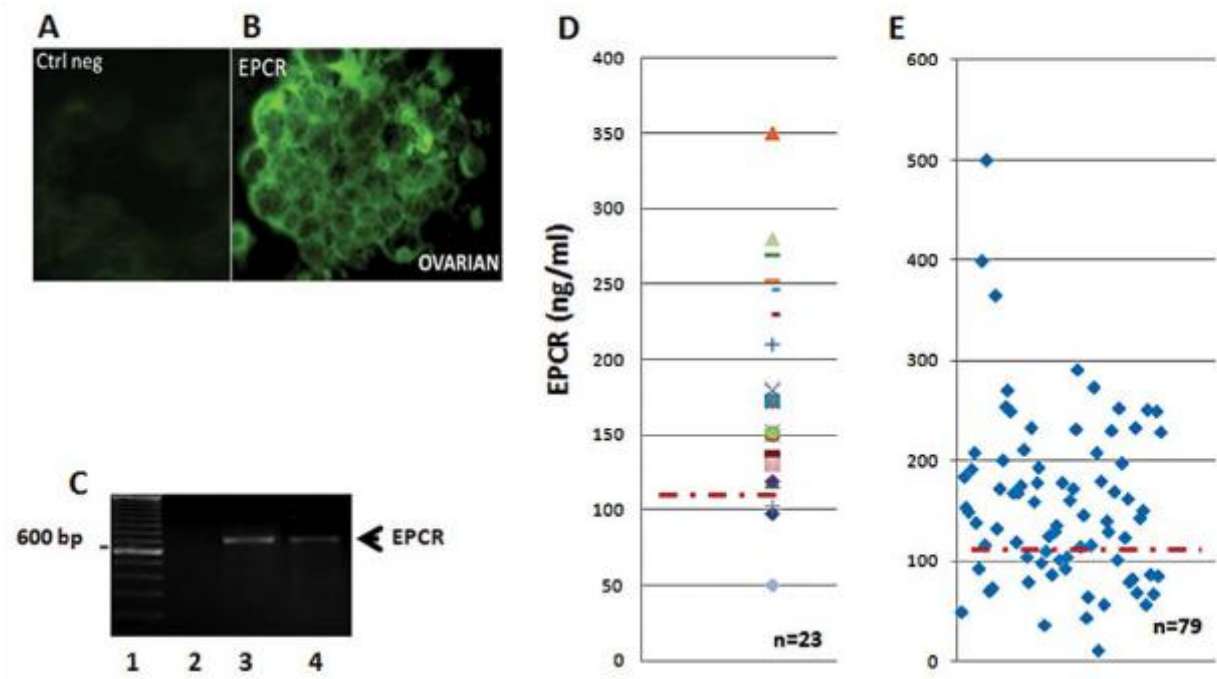


Figure 2. Immunodetection of EPCR in ascitic cell clusters, ascitic fluid and plasma from ovarian cancer patients. (A) Isotype control monoclonal anti-EPCR antibody used for the detection of cell-associated EPCR in ovarian cancer cell clusters from ascites (B). These results were confirmed by RT-PCR using specific primers for EPCR in several patients. Lanes 3 and 4 show results obtained for two distinct patients. Lane 1 shows the DNA ladder used as marker of fragment size and lane 2 represents the negative control. The expected 692-bp fragment was observed as shown in lane 4. The amount of sEPCR in (D) 23 samples from ascitic fluid and (E) 79 plasma samples from ovarian cancer patients was quantified by ELISA.

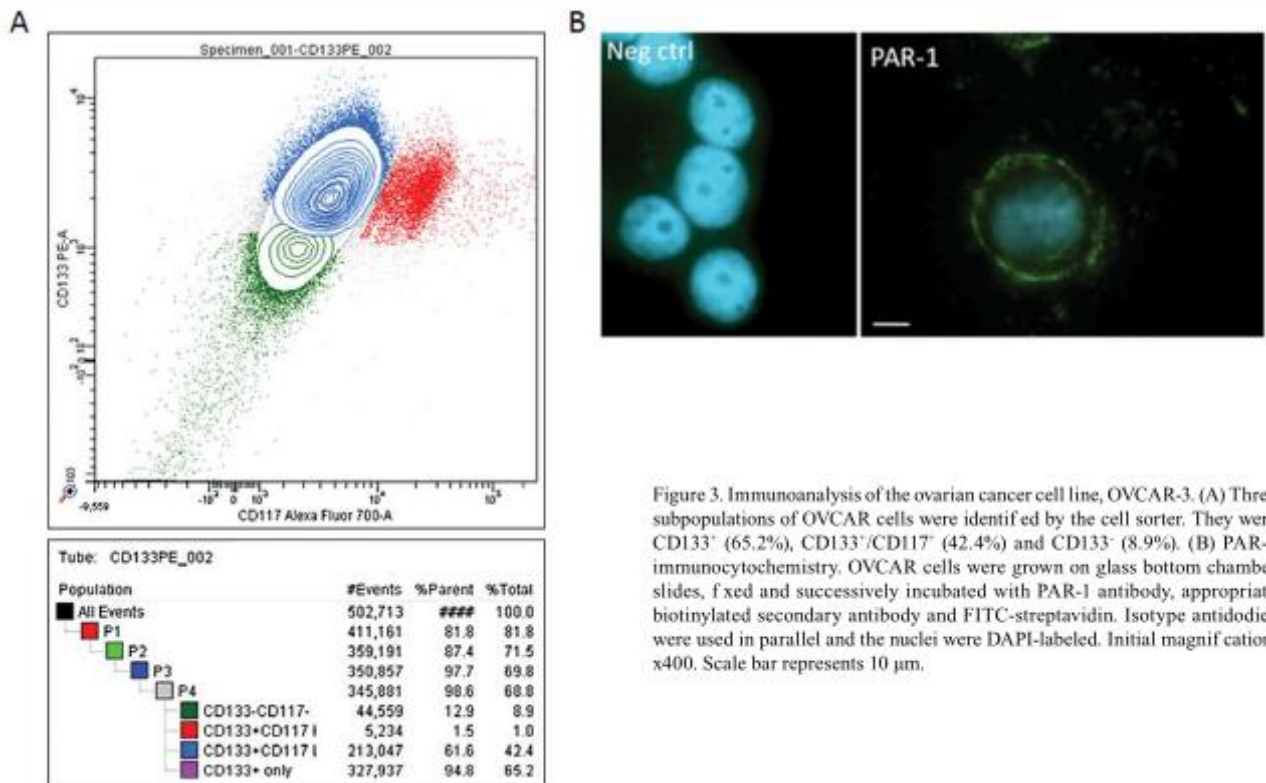


Figure 3. Immunoanalysis of the ovarian cancer cell line, OVCAR-3. (A) Three subpopulations of OVCAR cells were identified by the cell sorter. They were CD133⁺ (65.2%), CD133⁺/CD117⁺ (42.4%) and CD133⁻ (8.9%). (B) PAR-1 immunocytochemistry. OVCAR cells were grown on glass bottom chamber slides, fixed and successively incubated with PAR-1 antibody, appropriate biotinylated secondary antibody and FITC-streptavidin. Isotype antibodies were used in parallel and the nuclei were DAPI-labeled. Initial magnification, x400. Scale bar represents 10 μ m.

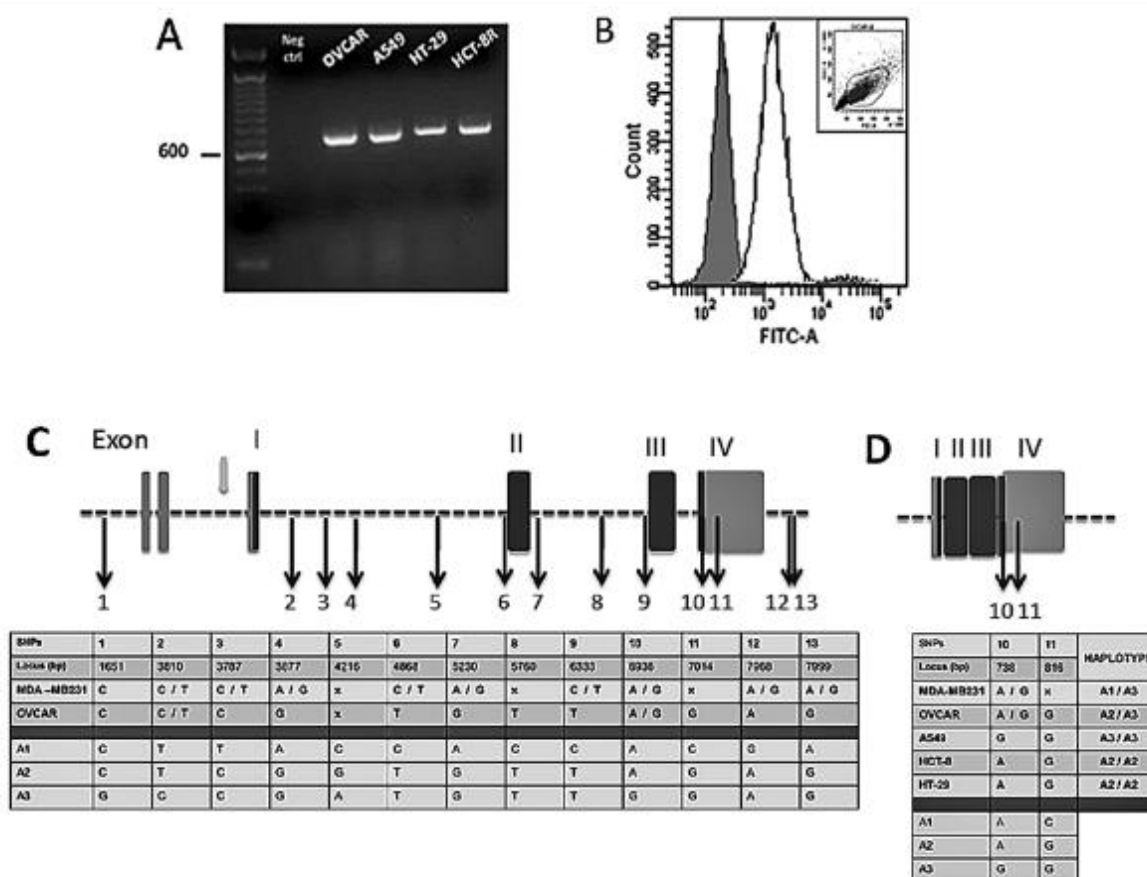


Figure 4. EPCR gene sequence analysis from ovarian, breast, lung and colorectal cancer cell lines. (A) Gel electrophoresis of EPCR (RT-PCR products) of ovarian (OVCAR), lung (A549), colorectal (HT-29) and ileocecal (HCT-8R) cancer cell lines. Expected bands of 692 bp were observed as shown and the control without nucleic acid (Neg ctrl) remained negative. (B) Flow cytometry analysis of EPCR in OVCAR. The solid line shows EPCR staining and the isotype control as represented by the shaded area. The cytogram gate is displayed in the upper corner. (C) Breast and ovarian cancer cell EPCR DNA alignment with GenBank data (reference no. AF106202). (D) Ovarian, breast, lung and colon cancer cell EPCR cDNA alignment with GenBank data (reference no. BC01445). DNA and cDNA extracts were shipped to the Qiagen Sequencing Service. Both DNA strands were sequenced and nucleotides were numbered according to the appropriate GenBank reference no. The 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) initially described in endothelial cells were also found here allowing us to designate 3 haplotypes (A1, A2, A3). Exons are presented as vertical rectangular blocks; darkly shaded regions are the ones that are transcribed. Black arrows indicate the SNPs. Gray arrow shows a promoter region. The 'x' indicates positions of bases that the commercial firm, Qiagen, was uncertain of; it can represent any one of the four bases.

OVCAR, a human ovarian adenocarcinoma cell line carries both C and T at the nucleotide position 3787 and both A and G at nucleotide position 6936 (Fig. 4C). This reflects a heterozygosity for A1 and A3 haplotypes. In the same manner, the breast cancer cell line, MDA-MB231, is heterozygous for A2 and A3 since only C is detected at position 3787, which is located in intron 1, while both A and G are found at position 6936.

The data in Fig. 4D show that the lung cancer cell line, A549, is homozygous for the A3 haplotype, since exon 4 contains G nucleotides at loci 738 and 817. Similar analysis revealed that both colorectal and ileocecal cancer cell lines (HT-29 and HCT-8R) carry the A2 haplotype in the homozygous form.

It is interesting to note that A3 carriers were found to be associated with a large amount of sEPCR shed into their culture medium. It was observed that one million A3 homozygous A549 cells shed approximately 4,250 ng/ml of sEPCR, whereas A3 heterozygous MDA-MB231 and OVCAR cells shed only 450 and 145 ng/ml per million cells, respectively (data not shown).

Discussion

Data generated recently in our laboratory encouraged us to investigate the role of aPC/sEPCR in ovarian cancers. In the present study, we addressed the question of sEPCR and its levels of expression in ovarian and other cancers, as well as in established cancer cell lines. Our aim was to find out whether sEPCR could be a candidate biomarker.

Our data provide evidence of the presence of EPCR in ovarian cancer cells and also in a large cohort of tumor biopsies. The release of sEPCR is significant since its secretion in the plasma of patients with ovarian cancer is related to enhanced cell survival, invasion and immune down regulation. However, the mechanisms behind this remain to be elucidated. It is of vital importance, in routine clinical practice, to avail of reliable markers of tumor behaviour. CA125 is the currently used marker for ovarian tumors. An additional biomarker of tumor cells, if revealed, would contribute towards making a sounder diagnosis.

EPCR proteins were detected *in situ*, by antibodies against the synthetic peptides of EPCR. In ovarian cancer (90.47%), in the breast (60%), lung (80%) and colon (65%) cancer biopsies. The relatively low percentages of positive samples observed could be an underestimate as TMA samples may contain, besides tumor cells, necrosed tissue or the biopsy may simply miss the tumor nodule and aspirate adipose and/or tumor adjacent healthy tissue. However, TMA analysis of ovarian cancers after treatment showed a decrease in EPCR immunostaining.

aPC is a key inhibitor of fibrin formation. Other than hemostatic function, aPC is also known to exert pleiotropic effects, depending on the cell types expressing EPCR. Among others, aPC interferes with the endothelial cell p53 pathway (19,20). It also promotes endothelial cell proliferation through the MAPK and PI3K signaling pathways (20-22). Cancer cells expressing EPCR may therefore benefit from the cytoprotective effect imparted by aPC (23). Scheffer *et al* found a high expression of EPCR in a large panel of tumor cell lines and interpreted this in the light of the role of EPCR in coagulation (15). Beaulieu and Church (16) claimed that aPC increases breast cancer cell invasion and chemotaxis through EPCR and PAR-1. These findings are demonstrative of the importance of EPCR expression in tumor cell behavior (17). Of note, the OVCAR-3 cell line used in the present study was found to express high levels of CD133 and CD117, which are markers characteristic of pre-stem cells. We also noticed an increased expression of PAR-1, which is a known cofactor for the EPCR signaling pathway in cancer cells.

In addition, we found that ovarian cell-associated EPCR is functional. Treatment of cancer cells with aPC induced cell survival that could be inhibited by the neutralizing antibody, anti-peptide 3. The study of ascites from patients showed that EPCR in the soluble form (sEPCR) could be detected on the cancer cell membranes as well as in the ascitic fluid. In the ascitic fluid, membrane-associated EPCR, via aPC, can inhibit fibrin formation and participate in fluid expansion in ovarian cancer, whereas under intravascular conditions, sEPCR, due to its trapping action, may be a leading cause of hypercoagulable state associated with cancer.

RT-PCR analysis detected the presence of EPCR mRNA in ascitic cell clusters of ovarian cancers, OVCAR-3 cells and several other tumor cell lines, such as breast (MDA-MB231), lung (A549) and colorectal (HT-29, HCT-8R). The presence of EPCR-specific mRNA is in line with and confirms our observation by TMA analysis.

The increase in expression levels of EPCR/sEPCR observed by immune antibodies and TMA was further corroborated by examining the sequence integrity of the EPCR gene and its mRNA transcript. This allowed us to characterize the cancer cell haplotypes which reflects one of the originalities of the current study. EPCR gene sequencing provided evidence for A3 haplotype expression in heterozygous (OVCAR and MDA-MB231) and homozygous (A549) forms. Of note, among the 10 alleles sequenced, 4 represented the A3 haplotype, which is a non-negligible figure. Knowing the frequency in the healthy population (7%), it is questionable whether the values we obtained indeed reflect the malignant nature of the cells studied (11). It might be pertinent to compare the haplotypes of tumor and healthy cells of a patient to see whether the genotype changes with malignancy. The A3 haplotype favors the proteolytic cleavage of EPCR and is thus associated with increased

plasma levels of sEPCR (11). It is interesting to note that the cultured cells carrying the A3 haplotype shed large amounts of sEPCR into the medium. Elevated sEPCR plasmatic level increases the risk of venous thrombosis (11,24). Thus, cancer cells that express the A3 haplotype may expose patients to a higher risk level. The A3 haplotype and elevated sEPCR, both of which are inter-related, contribute synergistically to the thrombophilic state in ovarian cancer patients (24).

The results from our study present strong evidence in favour of the role of EPCR/sEPCR in tumor cells, whether in tumor biopsies or in established cancer cell lines. There is a clear increase in sEPCR concomitant with the existence of malignant cells.

CA125 is the currently used marker for ovarian tumors. Nevertheless, on the basis of our observations, we propose that the measurement of plasma sEPCR at regular intervals during the remission period in cancer patients, particularly those with cancer of the ovaries, may provide clinically relevant information and perhaps an early signal warranting attention. The measurement of sEPCR and CA125 simultaneously in ovarian cancer patients could go a step further towards providing a sounder diagnosis.

References

- Dahlbäck B and Villoutreix BO: Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 1: 1525-1534, 2003.
- Li W, Zheng X, Gu J, Hunter J, Ferrell GL, Lupu F, Esmon NL and Esmon CT: Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *J Thromb Haemost* 3: 1351-1359, 2005.
- Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G and Esmon CT: Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation *in vivo*. *Blood* 97: 1685-1688, 2001.
- Fukudome K and Esmon CT: Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 269: 26486-26491, 1994.
- Xu J, Qu D, Esmon NL and Esmon CT: Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 275: 6038-6044, 2000.
- Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR and Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 271: 17491-17498, 1996.
- Menschikowski M, Hagelgans A, Eisenhofer G and Siegert G: Regulation of endothelial protein C receptor shedding by cytokines is mediated through differential activation of MAP kinase signaling pathways. *Exp Cell Res* 315: 2673-2682, 2009.
- Guitton C, Gérard N, Sébille V, Bretonnière C, Zambon O, Villers D and Charreau B: Early rise in circulating endothelial protein C receptor correlates with poor outcome in severe sepsis. *Intensive Care Med* 37: 950-956, 2011.
- Esmon CT: Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12: 343-359, 1999.
- Pintao MC, Roshani S, de Visser MC, Tiekens C, Tanck MW, Wichers IM, Meijers JC, Rosendaal FR, Middeldorp S and Reitsma PH: High levels of protein C are determined by PROCRA haplotype 3. *J Thromb Haemost* 9: 969-976, 2011.
- Sapoznik B, Reny JL, Gaussem P, Emmerich J, Aiach M and Gandrille S: A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 103: 1311-1318, 2004.
- Qu D, Wang Y, Song Y, Esmon NL and Esmon CT: The Ser219->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *J Thromb Haemost* 4: 229-235, 2006.
- Tsuneyoshi N, Fukudome K, Horiguchi S, Ye X, Matsuzaki M, Toi M, Suzuki K and Kimoto M: Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb Haemost* 85: 356-361, 2001.

14. Wang X, Wang E, Kavanagh JJ and Freedman RS: Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med* 3: 25, 2005.
15. Scheffer GL, Flens MJ, Hageman S, Izquierdo MA, Shoemaker RH and Scheper RJ. Expression of the vascular endothelial cell protein C receptor in epithelial tumour cells. *Eur J Cancer* 38: 1535-1542, 2002.
16. Beaulieu LM and Church FC: Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1. *Exp Cell Res* 313: 677-687, 2007.
17. Ducros E, Berthaut A, Mirshahi SS, Faussat AM, Soria J, Agarwal MK and Mirshahi M: Aldosterone modifies hemostasis via upregulation of the protein-C receptor in human vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 192-196, 2008.
18. Rafi A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat AM, Simon A, Ducros E, Mery E, Couderc B, Lis R, Capdet J, Bergalet J, Querleu D, Dagonnet F, Fournié JJ, Marie JP, Pujade-Lauraine E, Favre G, Soria J and Mirshahi M: Oncologic trogocytosis of original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* 3: e3894, 2008.
19. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K and Zlokovic BV: Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 9: 338-342, 2003.
20. Mosnier LO, Zlokovic BV and Griffin JH: The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109: 3161-3172, 2007.
21. Suzuki K and Hayashi T: Protein C and its inhibitor in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 33: 667-672, 2007.
22. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H and Suda T: Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* 95: 34-41, 2004.
23. Kobayashi H, Moniwa N, Gotoh J, Sugimura M and Terao T: Role of activated protein C in facilitating basement membrane invasion by tumor cells. *Cancer Res* 54: 261-267, 1994.
24. Uitte de Willige S, Van Marion V, Rosendaal FR, Vos HL, de Visser MC and Bertina RM: Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2: 1305-1310, 2004.

ARTICLE N°4

Le récepteur plasmatique endothélial de la protéine C influence la réponse immunitaire innée dans le cancer de l'ovaire en diminuant la population de cellules tueuses naturelles (NK) et les cellules auxiliaires TH17

Plasma endothelial protein C receptor influences innate immune response in ovarian cancer by decreasing the population of Natural Killer and TH17 helper cells.

Azzazene Dalel, Al Thawadi Hamda, Al Farsi Halema, **Besbes Samaher**, Geyl Caroline, Mirshahi Shahsoltan, Pardo Julia, Faussat Anne Marie, Jeannette Soria, Therwath Amu, Pujade-Lauraine Eric, Mirshahi Massoud

PLOS ONE, 2013

L'implication des systèmes de régulation de la coagulation et la fibrinolyse dans les processus physiopathologiques est une évidence. En diminuant le dépôt péri-tumoral de fibrine, la protéine C et son récepteur jouent un rôle capital dans l'oncogenèse et la dissémination métastatique. Aussi, ce système est capable de moduler d'autres processus biologiques, et détourner leurs mécanismes en faveur de la croissance et la progression tumorales. Ainsi, la protéine C activée (PCA) peut moduler les réponses immunitaire et inflammatoire associées à un contexte néoplasique.

En outre, l'EPCR membranaire peut être relâché dans le plasma, suite à l'action de métalloprotéases. Il en résulte une forme libre capable de fixer la PC et la PCA et de bloquer leur fonction anticoagulante. Dans un travail précédent, nous avons montré que certaines tumeurs solides exprimaient l'EPCR et que ce dernier, une fois solubilisé (EPCRs), peut constituer un biomarqueur clé de la pathologie cancéreuse, notamment, chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire. L'EPCRs, en séquestrant la PCA, pourrait aussi jouer un rôle dans la réponse immunitaire innée, associée à la pathologie cancéreuse ovarienne.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence et caractériser le rôle de l'EPCRs dans la modulation de la réponse immunitaire innée, dans un contexte tumoral.

Dans ce travail, nous avons étudié, par *Cytokine array*, l'effet de la PCA sur la sécrétion de cytokines par des cellules d'adénocarcinome ovarien humain (NIH:OVCAR-3, abrégée en OVACAR-3).

Les résultats ont montré que, la stimulation des cellules OVCAR-3 par la PCA, induisait une augmentation de la sécrétion de 23 cytokines telles la TARC (*Thymus and activation-regulated cytokine*), la TECK (*Thymus expressed cytokine*, CCL25), l'IL-2 et la thrombopoïétine (TPO), protéines connues pour leurs effets pléiotropes et leur implication dans le développement des lymphocytes T. Ces cytokines constitueraient, également, des chémoattractants pour les lymphocytes B et T.

Ensuite, nous avons effectué un dosage d'EPCRs dans des prélèvements de plasma provenant de patientes atteintes du cancer de l'ovaire. Toutes les patientes étaient positives à ce dosage et 61% d'entre elles présentaient un taux supérieur à la concentration plasmatique de référence.

En nous basant sur ces résultats, nous avons divisé notre population de malades en deux groupes : i) taux d'EPCRs < 100 ng/ml; ii) taux d'EPCRs >100 ng/ml. Pour chaque groupe, nous avons étudié le profil de cellules immunitaires circulantes et des cytokines et interleukines sécrétées et établi des corrélations négatives ou positives entre les profils générés et le taux d'EPCRs dosé.

Notre étude révèle que l'EPCRs influence, qualitativement et quantitativement, la réponse immunitaire chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire. Notamment, nos résultats montrent une régulation négative des cellules tueuses *Natural killer* (NK) et des cellules auxiliaires Th17. Le rôle des cellules Th17 dans le cancer n'est pas encore élucidé. En revanche, ces cellules sont connues pour leur capacité d'induire une réponse inflammatoire, dans les maladies infectieuses ou auto-immunes.

En conclusion, l'EPCR sous sa forme soluble, en limitant la disponibilité de la PCA, semble jouer un rôle dans le comportement sécrétoire des cellules tumorales (cytokines et interleukines) qui, à leur tour, régulent la réponse immunitaire innée.

La compréhension des mécanismes d'action de ces acteurs de la réponse immunitaire et leur régulation par l'EPCRs, dans un contexte néoplasique, permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques et de mettre en place des stratégies de traitement personnalisées, en fonction du profil de chaque patient.

Plasma endothelial protein C receptor influences innate immune response in ovarian cancer by decreasing the population of natural killer and TH17 helper cells

DALEL AZZAZENE¹, HAMDA AL THAWADI¹, HALEMA AL FARSI¹, SAMAHER BESBES¹, CAROLINE GEYL¹, SHAHSOLTAN MIRSHAHI², JULIA PARDO¹, ANNE MARIE FAUSSAT¹, SORIA JEANNETTE¹, AMU THERWATH¹, ERIC PUJADE-LAURINE² and MASSOUD MIRSHAHI^{1,2}

¹National Institut for Medical Research (INSERM), Cordeliers Research Center (UMRS 872), University of Pierre and Marie Curie and University of Paris Descartes; ²Hôtel Dieu Hospital, Paris, France

Received March 7, 2013; Accepted May 13, 2013

DOI: 10.3892/ijo.2013.2021

Abstract. In spite of the growing importance of endothelial protein C receptor/active protein C (EPCR/aPC) in tumor biology, their impact on immunological homeostasis remains largely unexplored. The objective of this study was to assess whether soluble plasma endothelial protein C receptor (sEPCR), which is a regulator of circulating aPC, is involved in innate immune response in cancer patients. In the Ovar-3 ovarian cancer line, the role of aPC in secretion of cytokines was analyzed. In parallel, in 33 patients, with a diagnosis of ovarian epithelial cancer, sEPCR was quantified, blood immune cell phenotypes were determined by flow cytometry and plasma cytokines were evaluated using a protein array. Spearman's rank correlation coefficients (r) and coefficient significance was determined by a statistical hypothesis test ($\alpha=0.05$). Our results show that i) aPC induced the secretion of several cytokines in Ovar-3 cells; ii) 61% of patients exhibited a concentration of plasma sEPCR well above the baseline (normal plasma level, 100 ± 28 ng/ml); iii) comparing immune cell phenotypes in patients having a normal level of sEPCR with those having a high level of sEPCR, it was found that sEPCR levels were correlated with high intensity of cells expressing CD45ra, CD3, CD8, CD25 and low intensity of cells expressing CD56 (NK cells), CD294 (TH2 cells), IL-2, IL-10, IL-17a (TH17 cells), IL-21 (TH21 cells) and CD29 markers ($r \geq 0.60$); and iv) high levels of sEPCR correlate with high levels of plasma bioactive proteins such as insulin-like growth factor-2 (IGFII), IL-13 α , macrophage inflammatory protein (MIP1 α) and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) that have already been proposed as biomarkers for ovarian cancer and particularly those with

poor prognosis. In conclusion, sEPCR produced by ovarian cancer cells, by modulating circulating aPC, influences the secretory behavior of tumor cells (cytokines and interleukins). Consequently, sEPCR in turn acts on the innate immune response by decreasing effector cells such as natural killer and T helper cells (TH2, TH17 and TH21).

Introduction

Endothelial protein C is an important regulator of homeostasis in addition to its involvement in the systemic response to acute inflammation. It is known that circulating protein C zymogens, secreted by liver, binds to endothelial protein C receptor (EPCR) with high affinity and stimulates its activation via the thrombin-thrombomodulin complex. The activated protein C (aPC), together with its cofactor protein S, degrades factors Va and VIIIa and thereby interferes with thrombin generation and inhibits the coagulation cascade (1-3). EPCR exists as membrane bound as well as free soluble form (sEPCR). sEPCR, in fact, can regulate the quantity of circulating aPC (4,5).

EPCR is a type I transmembrane glycoprotein that shares considerable homology with the major histocompatibility complex (6). EPCR is known to be constitutively released in the plasma in a free soluble form as a result of proteolytic cleavage. Soluble EPCR has the ability to trap free aPC, thereby depriving the latter of its anticoagulant function (within the surrounding environment) (4-6). The shedding of EPCR is known to be regulated by IL-1 β (interleukin), TNF- α , endotoxin, and via the MAP kinase signaling pathways in human vascular endothelial cell line (HUVEC) (7) and by the presence of EPCR A3-haplotype homozygosity (8).

It is known that in severe sepsis aPC is also involved in preventing thrombosis due to its anticoagulant action (9). A drop in levels of protein C in severe sepsis is in fact always associated with poor prognosis (10). Several studies have demonstrated the anticoagulant and pro-fibrinolytic nature of aPC and also its involvement in inflammation (11). The involvement of certain signaling pathways such as NF- κ B (12) and WNT (13) were also revealed. On the other hand, the influence of aPC on the immune system is far from clear today.

Correspondence to: Dr Massoud Mirshahi, INSERM UMRS 872, Université Pierre et Marie Curie, Paris-VI, Université Paris Descartes, Paris-V, 15 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France
E-mail: massoud.mirshahi@upmc.fr

Key words: endothelial protein C receptor, innate immune response, ovarian cancer, natural killer cells, T helper cells

With the recent appearance of an increasing number of publications, the interest in EPCR/aPC, in relation to tumor biology, is gaining momentum (14-17). In a previous study, we demonstrated that several solid tumors express EPCR and that sEPCR in patients with ovarian cancer could be a biomarker of cancer expansion (18). In addition sEPCR was proposed by us to be a biomarker of cancer associated hypercoagulability in human hematologic malignancies (19).

The increase in plasmatic level of sEPCR in cancer patients leads to increased sequestration/capture and use of protein C. This could affect or modulate thrombotic events and immune inflammatory response. As of present, the question of how sEPCR is involved in tumor immunology, however, remains unclear. On the basis of our present findings we are inclined to think that besides being a biomarker of cancer expansion and cancer associated hypercoagulability (18,19) sEPCR (a regulator of circulating aPC) could be involved in the innate immune response in ovarian cancer patients.

Materials and methods

Reagents. Reagents were obtained from following sources: primary antibody AF2245 against the EPCR (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); primary antibody ATAP2 against PAR-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); biotinylated anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat IgG, streptavidin-fluorescein conjugate (Amersham, Buckinghamshire, UK); rabbit anti-goat HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark); human recombinant aPC (Lilly, Suresnes, France).

For phenotyping of immuno-inflammatory cells we used FITC-anti-CD29, PE-anti-CD30, ECD-anti-CD8, PC5-anti-CD25, PC7-anti-CD20, APC-anti-CD14, APC AF700-anti-CD45, APC AF750-anti-CD16, FITC-anti-CD31, PE-anti-CD294, ECD-anti-CD45RA, PC5-anti-CD146, PC7-anti-CD4, APC-anti-CD56, APC-AF700-anti-CD10, APC-AF750-anti-CD3 (all from Beckman Coulter, Roissy CDG, France). FITC-anti-CD94, PE-anti-HLA-G, APC-anti-ROR-G, PercPcy 5.5-anti-CD161. FITC-anti-IL2, PE-anti-IL21, PC5-anti-FOXP3, PercpCy 5.5-anti-IL17A, APC-anti-TGF β (transforming growth factor), PE-anti-CD133, PE-anti-IL10 (all from eBiosciences, Montrouge, France). The 174 and 100 biotin label-based human antibody array from RayBioTech (Clinisciences, Montrouge, France) were used.

Cells. Ovarian cancer cell lines (Ovcar-3, Skov-3, ATCC) were used. Cells were cultured in DMEM medium containing 10% fetal calf serum, penicillin (50 U/ml), and streptomycin (50 μ g/ml) and incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C, as recommended by the supplier (PAA Laboratories Inc, Etobicoke, ON, USA).

Plasma and blood mononuclear cells

Plasma samples. Patients were aged >18 years, with a histological proven diagnosis of epithelial cancer of the ovary with asymptomatic disease in progression (detected by increase of CA125 levels according to Gynecologic Cancer Intergroup criteria). Ovarian tumors of low malignant potential or non-epithelial ovarian or mixed epithelial/non-epithelial tumors were excluded. Blood samples from patients (n=33) were obtained after informed consent, in accordance with the rules of

the revised Helsinki protocol and with Articles L. A1121-1 1, L. 1221-8 and L. 1221-8-1, and following the Code of Public Health (CSP), the plasmas were provided to us with a label depicting a code number without the name of the patient. All participants provide their written consent to participate in this study and the ethics committees CPP of Ile de France-1 (regional committee) and National Agency for the Safety of Drugs and Health Products (ANSM national committee) approved this consent procedure and this study.

Mononuclear cells. PBMCs were collected from 33 cancer patients at the Hospital Hôtel-Dieu and mononuclear cells were separated by Ficoll gradient centrifugation and then stored in 200 μ l of DMSO (10%)/FCS 90% at -80°C.

Phenotyping of immuno-inflammatory cells by immunocytochemical analysis. Flow cytometry was carried out using the 30 antibodies as described in Reagents section.

Mononuclear cells were labeled with several antibodies bound to different fluorescent agents. The controls were performed using corresponding isotype antibodies. The cytometer used was a type analyzer LSRII (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) to 9 colors and 4 lasers.

The antigens, detected on appropriate cells, were identified and analyzed by 'DAVID Gene Concept' which is a functional annotation tool. It allows ranking functional categories of sets of genes and unraveling new biological processes associated with cellular functions. The results are expressed as percentage of cells for each blood sample. The analysis was done on the area bound P1 representing lymphocytes. The protocol used in this project was developed using samples obtained from five healthy females (aged 25-50 years).

Soluble EPCR-ELISA assay. Soluble EPCR in plasma fluids was measured using Asserachrom sEPCR immunoassay as recommended by the commercial supplier (Diagnostic Stago, Asnieres sur Sein, France).

Cytokine array

The effect of APC on the ovarian cancer cell line. To analyze the pleiotropic role of APC, we examined the supernatant of Ovcar cells using a protein cytokine array (RayBio® Human Cytokine Antibody). This technique is based on the principle of 'sandwich immunoassay'. It comprises essentially of screening, in duplicate, 174 different membrane-coupled anti-cytokines along with appropriate controls (experiments repeated 3 times).

Ovcar-3 cells (10⁶ cells per ml) were incubated in presence (or not) of APC (200 ng/ml⁻¹) in DMEM without fetal calf serum at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ for 24 h. Supernatants containing cytokines were retrieved and the cytokines were allowed to couple with their specific antibodies previously immobilized on membranes. Membranes were saturated for 2 h at room temperature with bovine serum albumin (BSA). Incubation of array membranes with supernatants (along with controls) was carried out overnight at 4°C using corresponding antibodies. After several successive washes, membranes were incubated in the presence of a mixture of antibodies and anti-cytokines biotinylated at 4°C overnight. Streptavidin, coupled with HRP, was added on the membranes for 2 h at room temperature. The presence of antibody coupled proteins was revealed by applying ECL (enhanced chemiluminescence) to the membranes, according

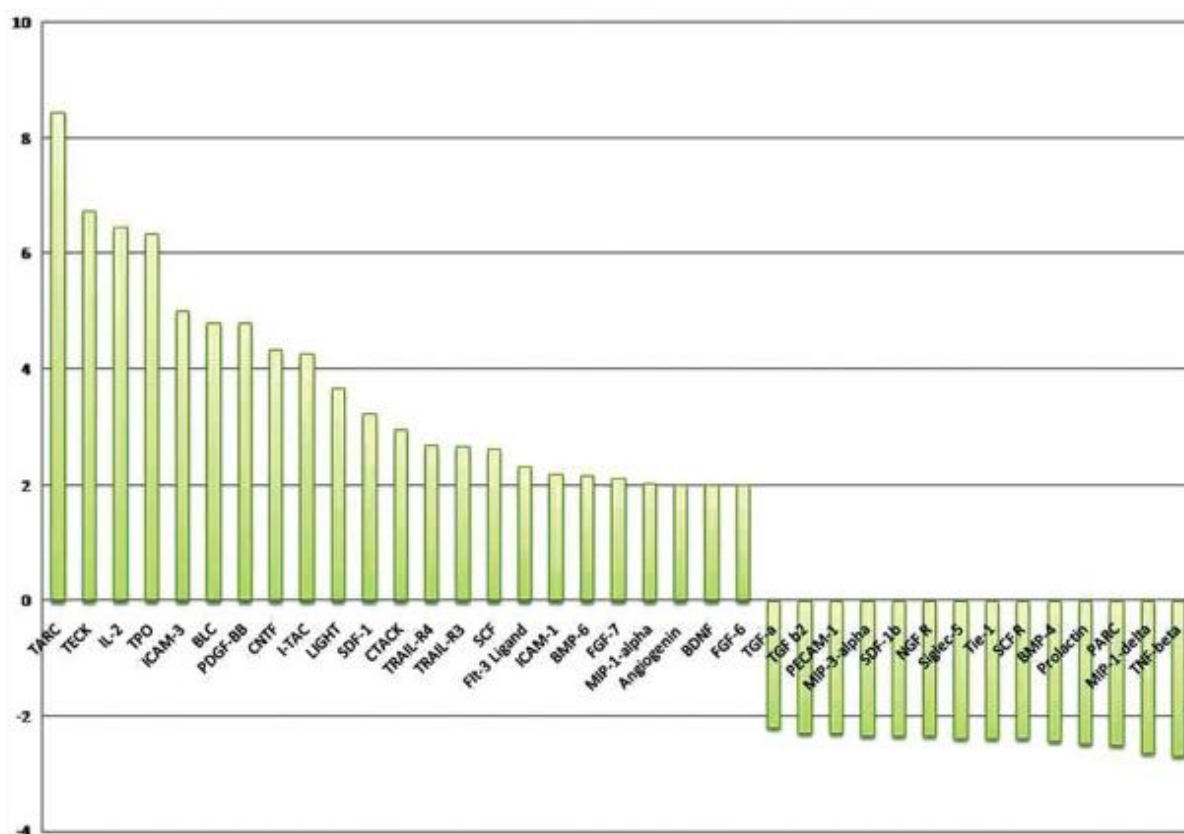


Figure 1. The effect of aPC on the ovarian cancer cell line. In order to analyze the pleiotropic role of active protein C (after treatments of ovarian cell line with aPC for 24 h), we examined the cell supernatants using a protein cytokine array as described in Materials and methods (RayBio® Human Cytokine Antibody). The ratio of values between cells treated by aPC and non-treated is shown. The positive control was considered as 1. Of the 174 proteins proposed in this test only 23 were upregulated (ratio of cells treated by aPC vs. non-treated cells was >2). They are TARC, TECK, IL-2, TPO, ICAM-3, BLC, PDGF-BB, CNTF, I-TAC, LIGHT, SDF-1 α , CTACK, TRAIL-R3, SCF, FLT-3 ligand, ICAM-1, BMP-6, FGF-7, MIP-1 α , angiogenin, BDNF and FGF-6 while 14 proteins such as TGF α , TGF β , PECAM-1, MIP-3 α , SDF-1 β , NGF-R, Siglec-5, BMP-4, prolactin, PARC, MIP-1 δ and TNF β were downregulated (ratio cells treated by aPC vs. non-treated cells was <2). The ratio situated beyond 4 was taken into consideration for the present study. The results indicate that aPC interacted with tumor cells and activated the secretion of several cytokines such as thymus and activation-regulated chemokine (TARC, CCL17), thymus expressed chemokine (TECK, CCL25), interleukin-2 (IL-2), thrombopoietin (TPO), intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3, CD56), B lymphocyte chemoattractant (BLC), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), ciliary neurotrophic factor (CNTF) and T cell alpha chemoattractant (I-TAC) by ovarian cell lines.

to the recommendations of the manufacturer. Membranes were then exposed to photosensitive film (Kodak, X-OMAT, AR, USA).

The intensity of chemiluminescence captured on the photosensitive film was measured and recorded. After subtracting the background noise, the results were expressed as a ratio of chemiluminescence intensity of experimental versus control spots. The positive control was considered as 1. Less than a -2 ratio value indicated a reduction of the cytokine and a value greater than +2 indicated an increase in cytokine expression.

Plasma cytokine array. Plasma cytokine array was performed using different membranes coupled with 100 anti-cytokines antibodies (RayBio Biotin Labeled-based Human Antibody Array) as described above for cell cytokines. Briefly, the membranes were incubated with serum from ovarian cancer patients (diluted 10 times in PBS and BSA 1%). Signal intensities were quantified with a Bio-Imaging System MF-ChemiBis 4.2 (FSVT, Courbevoie, France) and analyzed with Multi Gauge V3.2 software

(Fujifilm). For each spot, the net optical density level was determined by subtracting the background optical level from the total raw optical density level.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using Prism 4.0 (GraphicPad) or Cricket Graph III (Computer Associates International) software. Parametric statistical analysis (mean \pm SEM, linear and exponential regression) was performed using standard methods.

Spearman's rank correlation coefficients (non-parametric measures) were calculated using R software. Correlation of coefficient significance was determined by a statistical hypothesis test ($\alpha=0.05$).

Results

Active protein C induces the secretion of cytokines in ovarian cancer cell lines. The *in vitro* cell line, Ovar-3 and cells of ovarian tumor, share many biological properties. Both express

EPCR and PAR-1 (18). Both ovarian cancer cells and ovarian cell lines (Ovar-3 and Skov cells) could be targets for circulating aPC or exogenously added aPC. Since these cells (18) display certain makers of stem cells (CD117⁺, CD133⁺), we looked for the influence of aPC on the secretion of physiologically active proteins by the Ovar and Skov cells and analyzed these proteins using a RayBioTech protein array method.

Of the 174 proteins proposed in this test only 23 proteins were upregulated (ratio of cells treated by aPC vs. non-treated cells was >2) while 14 were downregulated (ratio of cells treated by aPC versus non-treated cells was <2). When ratio was more than 4 it was considered as a positive response. As presented in Fig. 1 we observed that aPC induced the secretion of several cytokines such as TARC (thymus and activation-regulated chemokine, CCL17), TECK (thymus expressed chemokine, CCL25), IL-2, TPO (thrombopoietin), BLC (B lymphocyte chemoattractant, CXCL13), PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB), CNTF (ciliary neurotrophic factor), I-TAC (T cell alpha chemoattractant CXCL11, also called interferon-inducible T cell alpha) and ICAM-3 (intercellular adhesion molecule 3, CD56) in ovary cell lines at high level ($r \geq 4$). From the data obtained by gene code analysis of all regulated bioactive proteins using DAVID v6.7, we found that these proteins may be involved in cytokine/cytokine-receptor interactions and in immune responses.

Evaluation of sEPCR in plasma of ovarian cancer patients. Protein C is involved in septicemia. It can also be trapped by free sEPCR thus rendering it unavailable for thrombotic function. We determined by ELISA the quantity of plasmatic sEPCR in patients diagnosed with ovarian cancer, but asymptomatic. All the samples tested ($n=33$) were positive for the presence of sEPCR. The base-line value of 100 ± 28 ng/ml was considered as normal. Thus, 61% exhibited a concentration well above the base-line (Fig. 2).

Influence of plasma sEPCR on circulating immune cells. To underline the significance of sEPCR in tumor behavior and its influence on circulating immune cells, we analyzed the correlation of sEPCR level in plasma with that of immune cells from blood in 33 patients, using antibodies against CD45, CD45ra, CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, CD294, CD30, CD56, CD161, CD14, CD16, CD20, CD31, CD133, CD31, CD10, CD146, IL-21, IL-2, TGF β , IL-17a, IL10, CD94, CD127, ROR- γ , CD127 and CD29.

As indicated in Fig. 3, the patients were divided into 2 groups: group 1 with sEPCR <100 ng/ml (normal) (Fig. 3A) and group 2 with sEPCR >100 ng/ml (Fig. 3B). A total of 61% of patients exhibited a concentration of plasma sEPCR well above the base-line (normal plasma level, 100 ± 28 ng/ml). Comparing immune cell phenotypes in patients having a normal level of sEPCR with those having a high level of sEPCR, it was found that sEPCR level was correlated with high intensity of cells expressing CD45ra, CD3, CD8, CD25 and low intensity of cells expressing CD56 (NK cells), CD294 (TH2 cells), IL-2, IL-10, IL-17a (TH17 cells), IL-21 (TH21 cells) and CD29 markers ($r \geq 0.60$). In addition, when level of sEPCR was high, a decrease in IL-17a-expressing cells was associated with decrease of cells expressing CD161 and ROR- γ (RAR-related orphan receptor) involved in the secretion of IL-17 (Fig. 3).

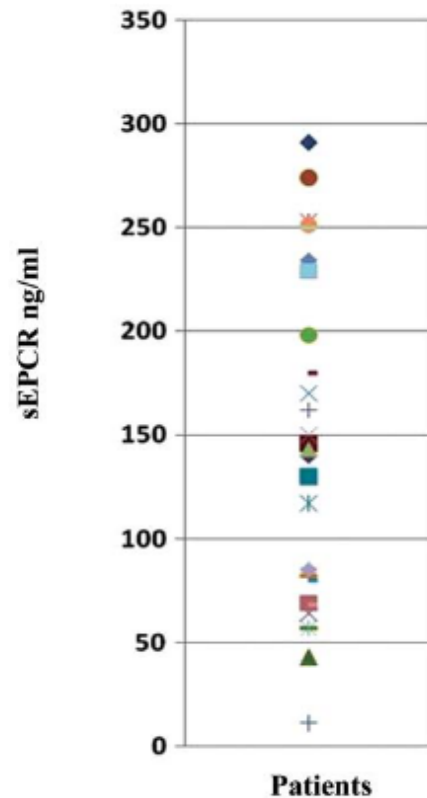


Figure 2. Evaluation of sEPCR in plasma of ovarian cancer patients. Blood ($n=33$) samples from patients aged >18 years were obtained. Soluble EPCR in plasma fluids was measured using Asserachrom sEPCR immunoassay as recommended by the commercial supplier. All the 33 samples tested were positive for the presence of sEPCR. The base-line value of 100 ± 28 ng/ml was considered as normal. Thus, 60.7% of them exhibited a concentration well above the base-line.

Influence of sEPCR on cytokines and interleukins in plasma. To understand the influence of sEPCR on plasma cytokines and interleukins, we analyzed, using protein array test the correlation between the amount of sEPCR in plasma (groups 1 and 2) and a set of 100 biologically active plasma proteins. We compared the significance ($r \geq 0.60$) of plasmatic sEPCR in group 1 (sEPCR <100, blue histograms) and in group 2 (sEPCR >100, red histograms) (Fig. 4A).

The experimental data were further subjected to scrutiny using the Spearman statistical test (Fig. 4B). We observed (Fig. 4A) that when plasma sEPCR was higher than 100 ng/ml; the expression of Fas-Ligand, CD40 ligand, bFGF, FGF9, IGFII (insulin-like growth factor), IGFbp3 and 6 (insulin-like growth factor binding proteins), IL1ra (receptor antagonist), IL-8, IL-13ra, IL-17b, IL-17c, IL-17R, IL-28A, IL-29, MIP1 (macrophage inflammatory protein), MMP-7 (matrix metalloproteinase), MMP-9, MMP-10 ($r \geq 0.60$) and VEGF ($r=0.40$) increased significantly compared to when sEPCR level was below 100 ng/ml.

Certain proteins such as IGFII, IL-13ra, MIP1 α and MMP7 have already been proposed as biomarkers for ovarian cancer and particularly those with poor prognosis (20-22). The Spearman statistical test (Fig. 3B), confirmed the results

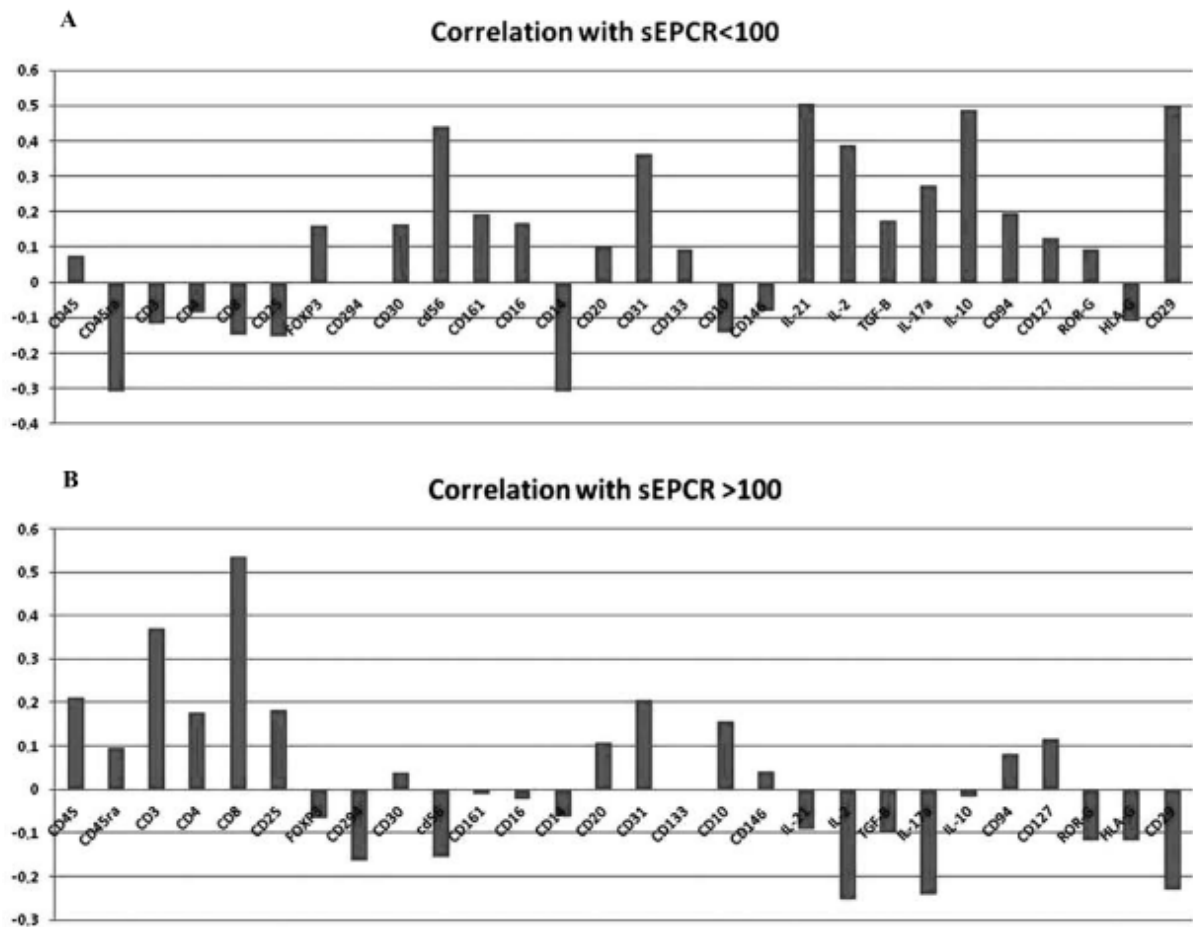


Figure 3. Influence of plasma sEPCR in blood immune cells. Mononuclear cells from 33 patients were separated by Ficoll gradient centrifugation and then stored in 200 μ l of DMSO/FCS 50% at -80°C . Phenotyping of immuno-inflammatory cells were performed by flow cytometry the using 30 antibodies as given above. (A) When sEPCR is <100 ng/ml (group 1), plasmatic sEPCR correlated with low intensity of some cell associated markers such as CD45ra, CD3, CD8 and high intensity of with CD56 (NK cells) and cell associated IL-2, IL-10, IL-17a, IL-21 and CD29 markers ($r \leq 0.40$). When sEPCR is >100 ng/ml (group 2), plasmatic sEPCR correlated with high intensity of CD45ra, CD3, CD8, CD25 and low intensity of CD56, IL-2, IL-10, IL-21 and CD29 markers ($r \geq 0.60$). The expression of some cell markers such as CD4, FoxP3, CD20 and CD10 was independent of plasma sEPCR variation ($r \leq 0.3$). A decrease in IL-17a in group-2 (B) was associated with the diminution of CD161 and ROR- γ associated cells. These results indicate that increase of plasma sEPCR was associated with a decrease of effector immune cells in blood circulation.

shown in Fig. 3A and also revealed some additional ones between sEPCR levels and the recently classified type III interferon group (IL-28A, and IL-29).

Discussion

In a recently published work we showed that ovarian cancer cell line Ovar-3 expressed stem cell markers CD133 $^{+}$ /CD117 $^{+}$ (C-Kit) (18). Another ovarian cancer cell line Skov also expressed C-Kit (80%), a receptor for stromal growth factor. Similar results were also obtained when ovarian tumors were screened (results not shown). Ovarian tumors and the ovarian cell lines also expressed EPCR and PAR-1. In the present study we analyzed, by a proteins array test, the influence of aPC on the secretion of biologically active proteins.

Our results indicate that aPC induces the secretion of cytokines such as TARC (23,24), TECK (25), IL-2 (26), TPO (27),

BLC (28), PDGF-BB (29), CNTF (ciliary neurotrophic factor) (30), I-TAC (31) and ICAM-3 (32) by tumor cells. These pleiotropic cytokines and proteins, believed to play a role in the development of T cells, are in addition chemoattractants for B and T lymphocytes. In light of these observations, we predict that ovarian cancer cells could be targets for circulating protein C, which in turn may be affected by plasma sEPCR.

In the study reported here, we present data on the significance of soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) in circulating immune cells and the regulation of cytokines and interleukins in plasma of patients with ovarian cancer.

We investigated the influence of plasma sEPCR on the immune system by characterizing immune cells from 33 ovarian cancer patients as described in Materials and methods. Based on the sEPCR level, group 1 patients, showed high content of CD29, CD31, CD56 and IL-2, IL-10, IL-17a, and IL-21 associated immune cells and low levels of CD45ra and CD14. Surprisingly, statistical analysis showed a positive correlation between

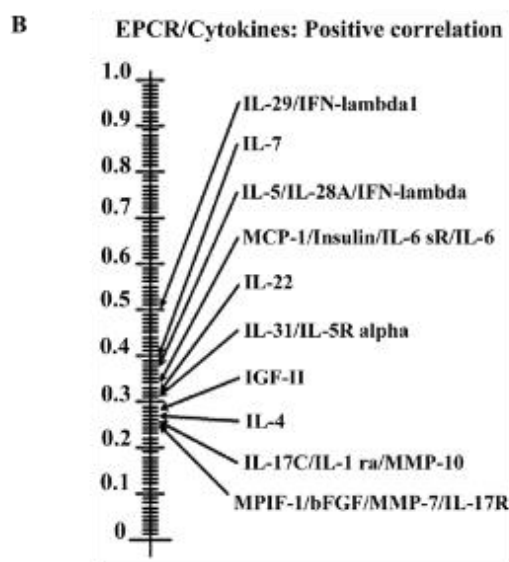
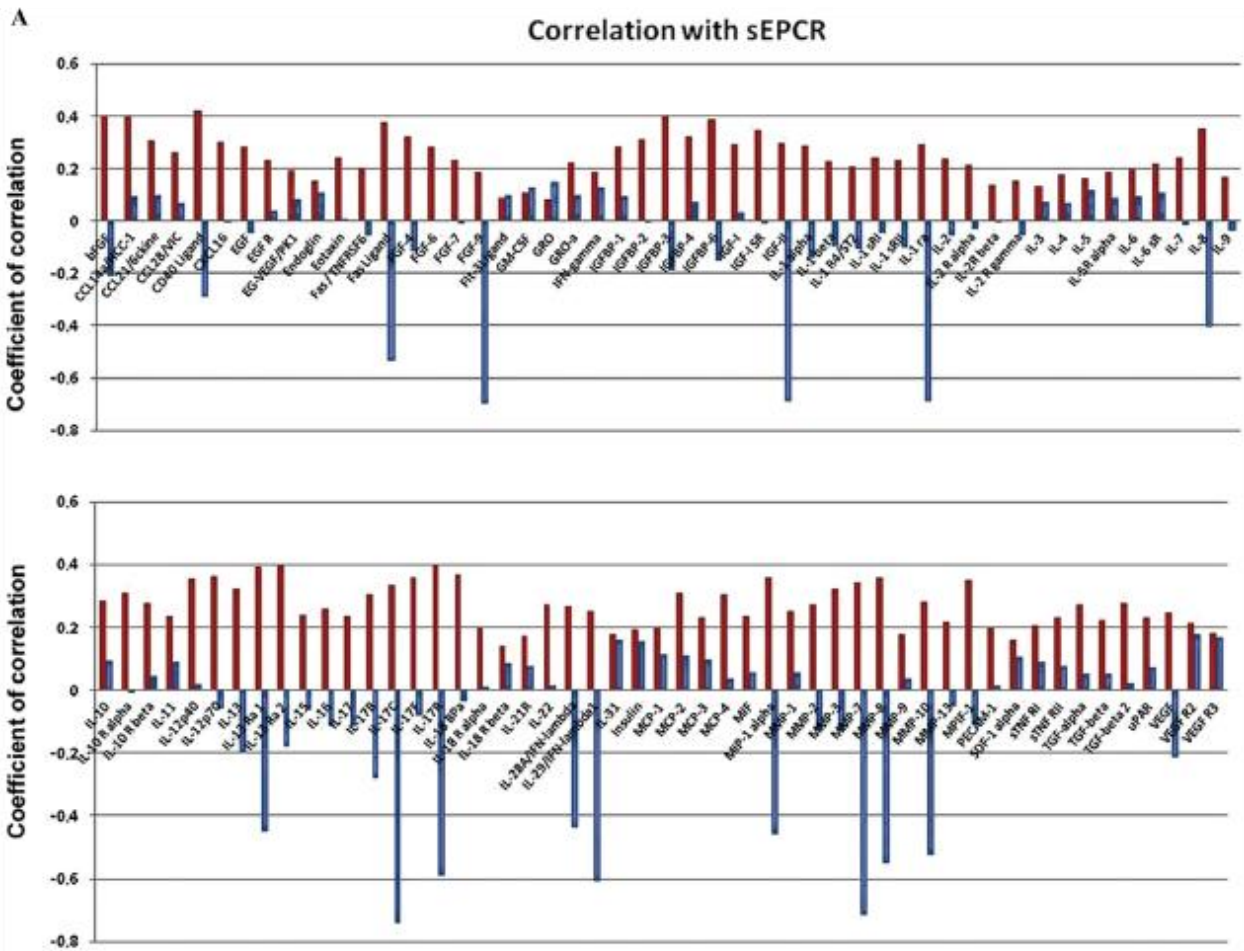


Figure 4. Influence sEPCR on the level of cytokines and interleukins in plasma. (A) We analyzed the correlation between the amount of sEPCR in plasma and a set of 100 biologically active plasma proteins. The membranes were incubated with serum from ovarian cancer patients (10X in PBS albumin 1%). Signal intensities were quantified with a Bio-Imaging System MF-ChemiBis 4.2 and analyzed with Multi Gauge V3.2 software. We compared the significance ($r \geq 0.60$) of plasmatic sEPCR in group 1 (sEPCR <100, blue histograms) and in group 2 (sEPCR >100, red histograms). When plasma sEPCR is >100 ng/ml, the expression of Fas-Ligand, CD 40 ligand, bFGF, FGF-9, IGF-II, IGFbp 3 and 6, IL-ra (receptor antagonist), IL-8, IL-13ra, IL-17b, IL-17c, IL-17R, IL-28A, IL-29, MIP-1, MMP-7, MMP-9, MMP-10 ($r \geq 0.60$) and VEGF ($r=0.40$) not only reversed but also increased significantly. (B) The experimental data were further subjected to scrutiny using the Spearman statistical test. These results confirmed the results shown in (A) and also revealed some additional ones between sEPCR levels and the recently classified type III interferon group.

sEPCR and CD3, CD8 and a negative correlation between CD56 (NK cells), CD29 (integrin β -1, present on all blood cells), CD294 (TH2 cells), and the immune cells containing IL-2, IL-17a, IL-10 and IL-21. IL-2 is one of a multitude of cytokines produced by

lymphocytes and monocytes that trigger a cascade of immune reactions (33). IL-10 inhibits the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ , IL-2 and TNF α . It has the ability to suppress the antigen-presentation capacity of antigen presenting cells (34). The exact role of T helper (Th) 17 cells in malignancy is currently under debate. Th17 plays a protective role against extracellular bacteria and fungi by inducing an inflammatory response (35,36). Interleukin-21 is a potent immunomodulatory four- α -helical-bundle type I cytokine and is produced by NKT and CD4⁺ T cells (37). CD294 is a prostaglandin D2 receptor that mediates the pro-inflammatory chemotaxis and is preferen-

tially expressed in CD4⁺ effector T helper 2 (Th2) cells (38). These results indicated that in several ovarian cancer patients with high level of sEPCR, there was a decrease of immune cells that are otherwise crucial in innate immune response.

CA125 is currently used and is an important biologic marker for ovarian cancer (39). Other plasmatic proteins such as IGFII, IL-13 α , MIP1 α and MMP-7 were reported as ovarian cancer biomarkers associated with poor prognosis (40). In a recent study we demonstrated a close correlation between increase in sEPCR and CA125 (18). However, the correlation between sEPCR and other cytokines, cited above remains yet to be worked out.

A step in this direction was made by undertaking measurements of soluble plasma cytokines, chemokines and interleukins via a proteins array test. All proteins ($r \geq 0.60$) including Fas-Ligand, CD40 ligand, bFGF, FGF9, IGFII, IGFbp3 and 6, IL1 α (receptor antagonist), IL-8, IL-13 α , IL-17b, IL-17c, IL-17R, IL-28A, IL-29, MIP1 α , MMP-7, MMP-9, MMP-10 and VEGF ($r=0.40$) increased when plasma sEPCR was higher than 100 ng/ml (group 2). Markers such as IGFII, IL-13 α , MIP1 α and MMP-7 correlated well with high amount of plasma sEPCR and CA125 in ovarian cancer.

Results obtained here indicate that sEPCR has an influence on immune cells and plasma cytokine levels. However, how this occurs remains to be clarified. Treatment of blood mononuclear cells (n=5) with aPC (10 μ g/ml for 48 h, *in vitro*) did not modify significantly the immune cell subpopulation as judged by presence/absence of different characteristic markers (results not shown). Further studies are necessary to investigate the effect of aPC on blood mononuclear cells and their cytokine profile of antigen presenting or effector cells.

Activated protein C is a key inhibitor of fibrin formation. Other than hemostatic function, aPC is also known to exert pleiotropic effects, depending on the cell type expressing EPCR. Among others, aPC interferes with the endothelial cell p53 pathway (41,42). It also promotes endothelial cell proliferation through MAPK and PI3K signaling pathways (43,44). Cancer cells expressing EPCR may therefore benefit from the cytoprotective effect imparted by aPC (45). Scheffer *et al* reported a high expression of EPCR in a large panel of tumor cell lines and have interpreted this in light of the EPCR's role in coagulation (16). Beaulieu and Church (17) claimed that aPC increases breast cancer cell invasion and chemotaxis through EPCR and PAR-1. These sound findings are demonstrative of the importance of EPCR expression and aPC-EPCR signaling pathway in tumor cells.

The overall data suggest that differential expression patterns of chemokines are involved in the specific inflammatory microenvironment of ovarian cancers. In a parallel, but different study (unpublished data) using mRNA-gene array (n=1200) and DAVID analysis of results, we showed the activation of innate immune gene family such as Jak-STAT (46) and TOLL-like receptor (47) when the breast cancer MDA-231 cell line was stimulated by activated protein C. These results suggest that plasma aPC/sEPCR can influence plasma cytokine levels in a quantitative and qualitative manner. As a consequence, circulating or intra-tumoral lymphocytes will respond to variations in plasma sEPCR. Future investiga-

tion by a randomized study needs to analyze whether all the biomarkers only correlate with severity of the disease.

The above cited cytokines may have a vast potential as well as pleiotropic function. A precise understanding of their involvement in the development of ovarian cancer is critical in developing effective strategies for disease intervention. This is particularly important in the light of a downregulation of NK cells and the immune cells containing interleukin 2, IL-17 α (TH17) and IL-21 which suggests the influence of tumor cells on the innate immune system.

References

- Dahlbäck B and Villoutreix BO: Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 1: 1525-1534, 2003.
- Li W, Zheng X, Gu J, Ferrell GL, Lupu F, Esmon NL and Esmon CT: Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *J Thromb Haemost* 3: 1351-1359, 2005.
- Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G and Esmon CT: Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation *in vivo*. *Blood* 97: 1685-1688, 2001.
- Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR and Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 271: 17491-17498, 1996.
- Xu J, Qu D, Esmon NL and Esmon CT: Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J Biol Chem* 275: 6038-6044, 2000.
- Fukudome K and Esmon CT: Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 269: 26486-26491, 1994.
- Zheng X, Li W, Gu JM, Qu D, Ferrell GL, Esmon NL and Esmon CT: Effects of membrane and soluble EPCR on the hemostatic balance and endotoxemia in mice. *Blood* 109: 1003-1009, 2007.
- Sapoznik B, Lesteven E, Lokajczyk A, Esmon CT, Aiach M and Gandrille S: Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene PROCRA and generates a novel soluble form of EPCR in plasma. *Blood* 111: 3442-3451, 2008.
- Shorr AF, Janes JM, Artigas A, Tenhunen J, Wyncoll DL, Mercier E, Francois B, Vincent JL, Vangerow B, Heiselman D, Leishman AG, Zhu YE and Reinhart K: Randomized trial evaluating serial protein C levels in severe sepsis patients treated with variable doses of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 14: R229, 2010.
- Yan SB, Helterbrand JD, Hartman DL, Wright TJ and Bernard GR: Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases. *Crit Care Med* 28: S49-S56, 2000.
- Della Valle P, Pavani G and D'Angelo A: The protein C pathway and sepsis. *Thromb Res* 129: 296-300, 2012.
- Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B and Grinnell BW: Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 11199-11203, 2001.
- Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO and Schoedon G: Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 504-510, 2008.
- Tsuneyoshi N, Fukudome K, Horiguchi S, Ye X, Matsuzaki M, Toi M, Suzuki K and Kimoto M: Expression and anticoagulant function of the endothelial cell protein C receptor (EPCR) in cancer cell lines. *Thromb Haemost* 85: 356-361, 2001.
- Wang X, Wang E, Kavanagh JJ and Freedman RS: Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med* 3: 25-29, 2005.
- Scheffer GL, Flens MJ, Hageman S, Izquierdo MA, Shoemaker RH and Scheper RJ: Expression of the vascular endothelial cell protein C receptor in epithelial tumour cells. *Eur J Cancer* 38: 1535-1542, 2002.
- Beaulieu LM and Church FC: Activated protein C promotes breast cancer cell migration through interactions with EPCR and PAR-1. *Exp Cell Res* 313: 677-687, 2007.

18. Ducros E, Mirshahi S, Azzazene D, Camilleri-Broët S, Mery E, Al Farsi H, Althawadi H, Besbes S, Chidiac J, Pujade-Lauraine E, Therwath A, Soria J and Mirshahi M: Endothelial protein C receptor expressed by ovarian cancer cells can be a biomarker of cancer expansion. *Int J Oncol* 41: 433-440, 2012.
19. Ducros E, Mirshahi S, Faussat AM, Mirshahi P, Dimicoli S, Tang R, Pardo J, Ibrahim J, Marie JP, Therwath A, Soria J and Mirshahi M: Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) is a likely as a biomarker of cancer associated hypercoagulability in human hematologic malignancies. *Cancer Med* 1: 261-267, 2012.
20. Davidson B, Zhang Z, Kleinberg L, Li M, Flørenes VA, Wang TL and Shihle M: Gene expression signatures differentiate ovarian/peritoneal serous carcinoma from diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Clin Cancer Res* 12: 5944-5950, 2006.
21. Kioi M, Kawakami M, Shimamura T, Husain SR and Puri RK: Interleukin-13 receptor alpha2 chain: a potential biomarker and molecular target for ovarian cancer therapy. *Cancer* 107: 1407-1418, 2006.
22. Amonkar SD, Bertenshaw GP, Chen TH, Bergstrom KJ, Zhao J, Seshaiiah P, Yip P and Mansfield BC: Development and preliminary evaluation of a multivariate index assay for ovarian cancer. *PLoS One* 4: e4599, 2009.
23. Kaushansky K: Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 354: 2034-2045, 2006.
24. Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang YH, Malefyt Rde W, Omori M, Zhou B and Ziegler SF: TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 25: 193-219, 2007.
25. Johnson EL, Singh R, Singh S, Johnson-Holiday CM, Grizzle WE, Partridge EE and Lillard JW Jr: CCL25-CCR9 interaction modulates ovarian cancer cell migration, metalloproteinase expression, and invasion. *World J Surg Oncol* 8: 62, 2010.
26. Vergara C and Ramirez B: CNTF, a pleiotropic cytokine: emphasis on its myotrophic role. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 161-173, 2004.
27. Simmons DL: The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surv* 24: 141-155, 1995.
28. Kunkel EJ and Butcher EC: Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16: 1-4, 2002.
29. Muller YD, Ehrlichou D, Golshayan D, Buhler LH and Seebach JD: Potential of T-regulatory cells to protect xenografts. *Curr Opin Organ Transplant* 17: 155-161, 2012.
30. Dalbeth N and Lee YC: Lymphocytes in pleural disease. *Curr Opin Pulm Med* 11: 334-339, 2005.
31. Achen MG and Stacker SA: Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann NY Acad Sci* 1131: 225-234, 2008.
32. Furuya M, Yoneyama T, Miyagi E, Tanaka R, Nagahama K, Miyagi Y, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y and Aoki I: Differential expression patterns of CXCR3 variants and corresponding CXC chemokines in clear cell ovarian cancers and endometriosis. *Gynecol Oncol* 122: 648-655, 2011.
33. Shusterman S, London WB, Gillies SD, Hank JA, Voss SD, Seeger RC, Reynolds CP, Kimball J, Albertini MR, Wagner B, Gan J, Eickhoff J, DeSantes KB, Cohn SL, Hecht T, Gadbow B, Reisfeld RA, Maris JM and Sondel PM: Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol* 28: 4969-4975, 2010.
34. Rutz S and Ouyang W: Regulation of interleukin-10 and interleukin-22 expression in T helper cells. *Curr Opin Immunol*: 605-612, 2011.
35. Wilke CM, IKryczek I, Wei S, Zhao E, Wu K, Guobin W and Weiping Z: Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis* 32: 643-649, 2011.
36. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L and Annunziato F: Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol* 47: 3-7, 2009.
37. Spolski R and Leonard WJ: Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 26: 57-79, 2008.
38. Saito Y, Kagami S, Kawashima S, Takahashi K, Ikeda K, Hirose K, Oshitari T, Yamamoto S, Okamoto Y and Nakajima H: Roles of CRTH2⁺ CD4⁺ T cells in immunoglobulin G4-related lacrimal gland enlargement. *Int Arch Allergy Immunol* 158 (Suppl 1): 42-46, 2012.
39. Gupta D and Lis CG: Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival - a review of the epidemiological literature. *J Ovarian Res* 2: 13, 2009.
40. Cramer DW, Bast RC Jr, Berg CD, Diamandis EP, Godwin AK, Hartge P, Lokshin AE, Lu KH, McIntosh MW, Mor G, Patriotis C, Pinsky PF, Thornquist MD, Scholler N, Skates SJ, Sluss PM, Srivastava S, Ward DC, Zhang Z, Zhu CS and Urban N: Ovarian cancer biomarker performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens. *Cancer Prev Res (Phila)* 4: 365-374, 2011.
41. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K and Zlokovic BV: Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 9: 338-342, 2003.
42. Riewald M and Ruf W: Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem* 280: 19808-19814, 2005.
43. Suzuki K and Hayashi T: Protein C and its inhibitor in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 33: 667-672, 2007.
44. Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H and Suda T: Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* 95: 34-41, 2004.
45. Kobayashi H, Moniwa N, Gotoh J, Sugimura M and Terao T: Role of activated protein C in facilitating basement membrane invasion by tumor cells. *Cancer Res* 54: 261-267, 1994.
46. Liu MQ, Zhou DJ, Wang X, Zhou W, Ye L, Li JL, Wang YZ and Ho WZ: IFN- λ 3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. *PLoS One* 7: e35902, 2012.
47. Shatz M, Menendez D and Resnick MA: The human TLR innate immune gene family is differentially influenced by DNA stress and p53 status in cancer cells. *Cancer Res* 15: 3948-3957, 2012.

La protéine C activée promeut la migration des cellules de cancer de l'ovaire et limite la coagulabilité dans le microenvironnement tumoral

Activated protein C upregulates ovarian cancer cell migration and promotes unclottability of the cancer cell microenvironment

Hamda Althawadi, Halema Alfarsi, **Samaher Besbes**, Shahsoltan Mirshahi, Elodie Ducros, Arash Rafii, Marc Pocard, Amu Therwath, Jeannette Soria and Massoud Mirshahi

ONCOLOGY REPORTS, 2015

Le microenvironnement tumoral est caractérisé par un équilibre dynamique entre hypercoagulabilité et fibrinolyse. Les facteurs pro-coagulants favorisent la formation d'un maillage de fibrine enchâssant la tumeur. Les facteurs fibrinolytiques exprimés par les cellules cancéreuses permettent la déstabilisation de ce maillage, favorisant ainsi l'échappement et la migration cellulaires. Le système de la PCA et de son récepteur, en limitant le dépôt de la fibrine péri-tumoral, joue un rôle crucial dans la tumorigénèse et la dissémination métastatique.

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle de la protéine C activée dans la réduction de la coagulabilité dans des ascites de patients, ainsi que dans l'activation des cellules issues d'un adénocarcinome ovarien humain NIH:OVCAR-3 (abrégée en OVACAR-3).

Nos résultats révèlent la présence de des D-dimères, produits de dégradation de la fibrine, et celle de la fibrine soluble, dans les ascites de patientes atteintes de carcinome ovarien. Ce résultat est le reflet de l'activation exacerbée de la coagulation suivie d'une forte action fibrinolytique. Autrement dit, si la fibrine est formée, elle est constitutivement dégradée. Cependant, le taux d'EPCR soluble dans la plupart des ascites, était plus bas que dans le plasma, résultant ainsi en une disponibilité plus élevée de la PC dans le fluide péritonéal. Il est intéressant de préciser que la population malade, incluse dans cette étude, était en stade métastatique. A ce stade de la pathologie, le volume du liquide, dans la cavité péritonéale, est généralement

important. La quantité d'EPCRs présente est, par conséquent diluée, son action procoagulante l'est aussi. En revanche, le nombre croissant de nodules tumoraux, exprimant l'EPCR à leur surface, promeut l'activité anticoagulante de la PCA.

Cette étude a aussi révélé, une modification du cycle cellulaire des cellules OVCAR-3, appréciée par la modification de la teneur en DNA par cytométrie de flux dans des conditions bien déterminées : la PCA, au niveau des cellules OVCAR-3, serait impliquée dans la diminution du nombre des cellules en phase G2 et l'augmentation de celles en phase S.

Nous avons également observé que i) la PCA, en se fixant sur les cellules OVACAR-3, induit une augmentation de la migration cellulaire ; ii) la stimulation des cellules OVACAR-3 par la PCA, provoquait une réparation plus rapide d'une blessure formée sur un tapis de cette lignée cellulaire.

Les cellules OVACAR-3, cultivées en présence de PCA, ont été également caractérisées par une migration plus rapide. Cette observation a été faite sur des cellules OVCAR-3, incorporées dans une gouttelette de Matrigel.

Nos résultats ont révélé, par cytoELISA, une activation cellulaire objectivée par une phosphorylation de la thréonine. Cette activation était plus rapide que celle de la phosphorylation de la tyrosine.

Enfin, nous avons mis en évidence l'effet de l'inhibition des voies de signalisation MEK-Erk et Rho-GTPase sur l'obstruction de la migration induite par la PCA.

Il est à noter que toutes ces modifications sont induites par la protéine C activée et à un moindre degré par la forme native de la protéine.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence le rôle joué par le système PC et son récepteur endothélial dans le développement tumoral. Ce rôle repose sur des interactions qui rendent le cancer plus agressif, et qui favorisent la migration cellulaire, essentiellement *via* la fibrinoformation.

Activated protein C upregulates ovarian cancer cell migration and promotes unclottability of the cancer cell microenvironment

HAMDA ALTHAWADI^{1,2}, HALEMA ALFARSI^{1,2}, SAMAHER BESBES¹, SHAHSOLTAN MIRSHAHI¹,
 ELODIE Du CROS¹, ARASH RAFII², MARC POCARD¹, AMU THERWATH¹,
 JEANNETTE SORIA¹ and MASSOU D MIRSHAHI¹

¹u MR, Paris Diderot, Paris 7 u niversity, Lariboisiere Hospital, INSERM u 965, Paris, France;

²Qatar Foundation, weill Cornell Medical College in Qatar, Doha, Qatar

Received April 14, 2015; Accepted May 11, 2015

DOI: 10.3892/or.2015.4061

Abstract. The objective of this study was to evaluate the role of activated protein C (aPC), known to be a physiological anti-coagulant, in ovarian cancer cell activation as well as in loss of clotting of cancer ascitic fluid. The effect of aPC on an ovarian cancer cell line (OVCAR-3) was tested in regards to i) cell migration and adhesion with the use of adhesion and wound healing assays as well as a droplet test; ii) protein phosphorylation, evaluated by cyto-ELISA; iii) cell cycle modification assessed by flow cytometric DNA quantification; and iv) anti-coagulant activity evaluated by the prolongation of partial thromboplastin time (aPTT) of normal plasma in the presence or absence of aPC-treated ovarian cancer cells. In addition, the soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) was quantified by ELISA in ascitic fluid of patients with ovarian cancer. Our results showed that in the OVCAR-3 aPC-induced cells i) an increase in cell migration was noted, which was inhibited when anti-endothelial protein C receptor (EPCR) was added to the culture medium and which may act via MEK-ERK and Rho-GTPase pathways; ii) an increase in threonine, and to a lesser extent tyrosine phosphorylation; iii) cell cycle activation (G1 to S/G2); and iv) a 2-3-fold prolongation of aPTT of normal plasma. In the peritoneal fluid, the sEPCR concentration was 71 ± 23 ng/ml. In conclusion, free aPC binds to membrane EPCR in ovarian cancer cells and induces cell migration via MEK-ERK and Rho-GTPase pathways. This binding could also explain the loss of clotting of peritoneal fluids.

Introduction

Ovarian cancer remains one of the most difficult oncologic challenges, as it is often discovered at advanced stages. It is diagnosed often with intraperitoneal dissemination of cancer cells and the presence of ascitic fluid. The cancer cells present in the intraperitoneal space often display intrinsic chemoresistance. The ascitic fluid is a complex exudative liquid known to contain various growth factors and cytokines (1). It has been shown that ascites could contribute to intraperitoneal cancer cell implantation and tumor development by promoting cell growth, invasion and drug resistance (2,3). One of the characteristics of all ascites including ovarian cancer ascites is its inability to clot. This may be due to the presence of several fibrinolytic and proteolytic enzymes such as plasminogen activators and matrix metalloproteinases that are not fully neutralized by their inhibitors (4,5). The absence of clotting of ascites in the peritoneal site favors tumor cell dissemination and their implantation on the peritoneal surface.

It was reported that endothelial protein C receptor (EPCR) binds protein C (PC) secreted by liver cells (6) and thereby inhibits the coagulation pathway by generation of activated protein C (aPC). Proteolytic cleavage of thrombin bound to thrombomodulin acts on PC to generate aPC. Endothelial protein C is an important regulator of homeostasis, in addition to its involvement in the systemic response to acute inflammation (7-11). On endothelial cells, the aPC, together with its cofactor protein S, degrades factors Va and VIIIa and thereby interferes with thrombin generation and abolishes the coagulation cascade (12). Endogenous aPC is shown to limit cancer cell extravasation through SIP-1-mediated vascular endothelium (13) and also plays a role in innate immune system (14,15).

Originally, EPCR was shown to be expressed on endothelial cells of large blood vessels but not in liver sinusoidal and spleen endothelial cells (16). EPCR (CD201) expression is also detected in some inflammatory cells such as monocytes and neutrophils (17). Some authors claim that EPCR could be considered as a cancer stem cell marker (18). EPCR exists as membrane bound as well as free soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) form (19). In fact, sEPCR, can regulate the quantity of circulating aPC and influence the clotting of plasma (20). Ligand binding to EPCR promotes endocytosis

Correspondence to: Dr Masoud Mirshahi, u MR, Paris Diderot, Paris 7 u niversity, INSERM u 965, Carcinose, Angiogenèse et Recherche Translationnelle, Hôpital Lariboisière, 41 Boulevard de la Chapelle, 75010 Paris, France
 E-mail: massoud.mirshahi@inserm.fr

Key words: ovarian cancer, protein C receptor, Rho-GTPase pathway, cancer cell migration, thrombosis, partial thromboplastin time, peritoneal fluid

of EPCR (21) via the Rab GTPase pathway (22). aPC/EPCR interaction can directly modulate cell signaling and alter gene expression in inflammation and apoptosis (23) and also provide cytoprotection via PAR-1 activation (24).

We previously demonstrated the expression of EPCR in a large number of cancer cell lines, in solid tumors (25) and malignant hemopathies. This led us to suggest that plasmatc sEPCR can be considered as a biomarker of cancer-associated hypercoagulability in human hematologic malignancies (26).

In the present study, we investigated the role of aPC, known to be a natural physiological anticoagulant, in the activation of cancer cells and the loss of clotting properties of ascitic fluid in patients with peritoneal ovarian carcinomatosis.

Materials and methods

Cells. The human ovarian cancer cell line OVCAR-3NIH, purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA), was cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf serum (fCS), glutamine (03 mg/ml), penicillin (50 u/ml), streptomycin (50 µg/ml) and incubated at 37°C with 5% CO₂.

Ascites. Peritoneal fluids were collected from 20 ovarian cancer patients treated at the Hospital Hôtel-Dieu (Paris, France). As evacuation of ascites is a part of the routine management of patients, only oral consent was obtained. Cells from ascitic fluids were pelleted by a short spin at 1,000 rpm, and the supernatant was re-centrifuged for another 10 min and then collected. The pelleted cells and the resulting supernatant were aliquoted and stored.

Cyto-ELISA. OVCAR-3 cells (6x10⁴/well), in fCS-enriched medium, were seeded in flat-bottomed 96-well plates (Nunc). Confluent cell layers from 3-day cultures were washed with phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then exposed to native protein C (Ceprotin®) or aPC (Xigris®) both at concentrations of 10 ng/ml for 2, 5 and 10 min. In parallel, culture medium with only FCS served as the control. The cells adhering to the plate were fixed with 100 µl of 0.5 g/l glutaraldehyde and 0.4% Triton for 5 min at 4°C. Alternatively, the cells were fixed with 100 µl of 100% ethanol for 5 min at -20°C. The plates were washed with PBS containing 0.02% Tween-20 and 10 g/l BSA (PBS-T-Alb), and then (5-wells/test) were exposed for 90 min to mouse anti-phosphorylated threonine or tyrosine antibodies (1/100 diluted in PBS-T-Alb). The immune complexes were detected by peroxidase-conjugated anti-mouse Ig (1:2,000). The fixed peroxidase was revealed by *o*-phenylenediamine benzidine (OPD) (0.2 g/l in 0.05 mol/l phosphate buffer, pH 5.0, containing 0.5 ml/l H₂O₂). The absorbance was measured at 492 nm. Control wells were constructed with isotype or without cells. Between each step, the wells were washed three times with PBS.

Wound healing assay. OVCAR-3 cells (6x10⁴) were cultured in the presence of RPMI-1640 containing 10% fCS in 24-well plates coated with 0.2% gelatin. After 18 h, the semi-confluent cells were dislodged by a cell scraper on a standardized surface

as previously described (27). The cells were then incubated in RPMI-1640 containing only 2% fCS (to reduce cell proliferation) in the presence or absence of PC or aPC (10 ng/ml). The effect of protein C on cell migration was evaluated (Microvision Instruments, Evry, France) by measuring the number of cells migrating to the wound edge after 6, 18, 27 and 48 h.

Droplet test. To elucidate the mechanism of cell migration, we developed a 'droplet model' of Matrigel for the OVCAR-3 cells. The cell-Matrigel suspension (droplet) mimics an *ex vivo* cell cluster implant on the peritoneal membrane surface.

The ovarian cancer cells were incorporated in ice-cold Matrigel® (50,000 cells/200 µl Matrigel) to which was added either native or aPC at concentrations of 10 ng, respectively. A droplet of 10 µl Matrigel-cell suspension was then delivered into each well of a 96-well microplate previously coated with 0.2% of gelatin and cooled down until the gel had solidified. Then, 0.2 ml of culture medium containing 2% FCS was gently added to the wells.

We studied the effect of 4 signaling inhibitors including 3 inhibitors of Ras signaling [U0126 (a MEK-1/2 kinase inhibitor), PD98059 (an ERK inhibitor) and fTI-277 (a farnesyl transferase inhibitor)] and one inhibitor of Rho GTPase (GGTI-298, geranyl-geranyl transferase inhibitor). All inhibitors were from Calbiochem (France) and were used at a final concentration of 10 µM added to the OVCAR cell suspension 15 min before adding the Matrigel. The number of cells migrating out of the droplet were observed and found to be time-dependent. They were counted after 18 h.

Cell cycle (sub-G1) evaluation. OVCAR-3 cells were seeded in culture flasks and incubated with PC or aPC at 10 ng/ml for 24 h. Phase distribution (G1, S and G2) was performed using DNA content using flow cytometry and analyzed by Multi Cycle Av software as previously described (28). The coefficient of variation (CV) of the mean value of DNA-associated fluorescence of the G1 population (width of the peak) is a reflection of the accuracy of the DNA content measurement.

Anticoagulant activity of living cells. Activated partial thromboplastin time (aPTT) evaluates intrinsic coagulation pathway efficiency; coagulation of a plasma sample is measured after addition of phospholipid (cephalin) and calcium. We previously described a method, based on aPTT, to estimate EPCR expression by endothelial and cancer cells (29), i.e. cells previously incubated with aPC were added to a plasma and activated partial thromboplastin clotting time was measured. Cells expressing EPCR bind aPC, inducing a prolongation of aPTT. OVCAR-3 cells were seeded in 24-well macroplates, and after 24 h the cells were washed with RPMI-1640 and incubated with the addition of 50 µg/ml aPC for 15 min at 4°C. After a further washing, the effects of OVCAR-3 cells (either remaining attached to the Petri dish or detached by Accutase) were tested on the cephalin clotting time of normal plasma.

OVCAR-3 (10x10⁴) cells were added to 0.1 ml normal plasma. After an incubation period of 3 min at 37°C, cephalin and CaCl₂ were added to trigger coagulation. The clotting time

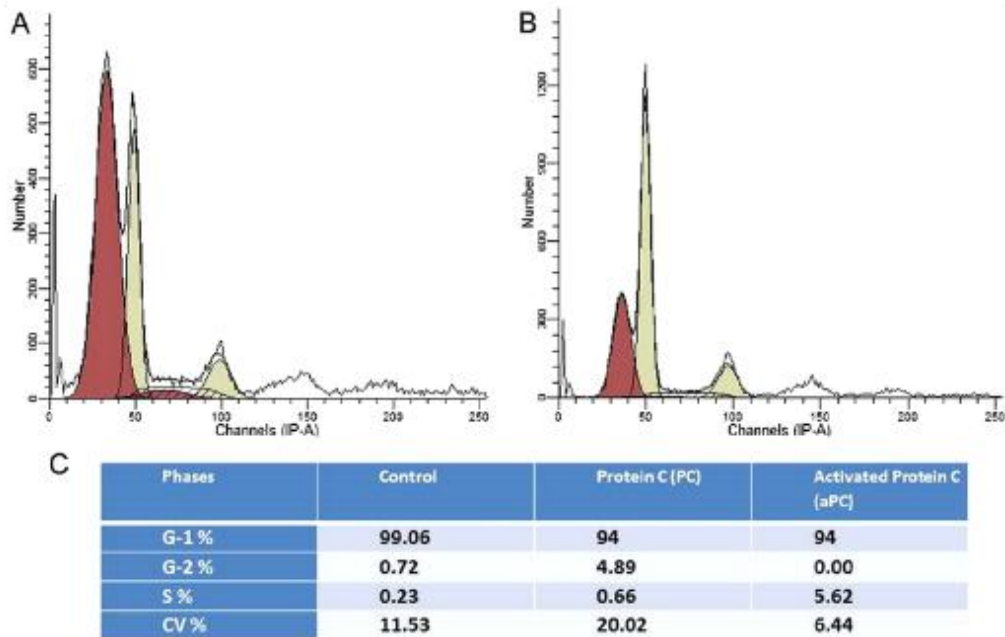


Figure 1. Influence of PC and aPC on cell cycle distribution of Ov CAR-3 cells. Cell cycle (sub-G1) was analyzed by flow cytometry induced by PC (A) or aPC (B). Detailed results are presented in C. PC, protein C; aPC, active protein C; Ov CAR-3, ovarian cancer cell line.

Table I. Samples with an sEPCR concentration similar to that of normal plasma.

Samples	D-Di (ng/ml)	SF (ng/ml)	EPCR (ng/ml)
N.1	710	770	44
N.2	420	100	57
N.3	220	10	22
N.4	350	260	43
N.5	980	710	57
N.6	2,310	210	61
N.7	290	590	247
N.8	3,760	2,280	68
N.9	510	190	96
N.10	780	240	83
N.11	470	1,210	93
N.12	760	160	106
N.13	7,440	2,240	92
N.14	810	190	72
N.15	1,250	420	250
N.16	2,410	700	154
N.17	440	720	80
N.18	250	60	91
N.19	760	70	56
N.20	1,560	440	85

SF, soluble fibrin; EPCR, endothelial protein C receptor.

was then measured at 37°C by a spectrophotometer at 595 nm. The results are presented both in real-time and as the ratio of cells + aPC/cells + PC.

Determination of sEPCR, D-dimer and soluble fibrin (SF) in the ascitic fluid. sEPCR antigen was measured by Asserachrom sEPCR-ELISA immunoassay as recommended by the commercial supplier (Diagnostic Stago, Inc.). Fibrin degradation product, D-dimer concentration, was determined by STA®-Liatest® D-Di, and SF monomers were quantified as previously reported (30).

Results

The results that follow focus on the role of aPC in ovarian cancer cell activation as well as a loss of clotting observed for ascitic fluids. The investigation concerned several issues focused on the following:

Evaluation of sEPCR and fibrin degradation products in the peritoneal fluid of ovarian cancer patients. All the samples tested (n=20) contained sEPCR. Eighty-five percent of the peritoneal fluid had an sEPCR concentration of 71 ± 23 ng/ml which was lower than that of normal plasma (baseline values 100 ± 28 ng/ml) (6). The remaining 15% samples revealed a sEPCR concentration which was similar to that of normal plasma (Table I). In parallel, D-dimer, a fibrin degradation product and SF were quantified (Table I). The 20 patients studied showed values for D-dimer (60%) and for SF (50%) which were superior to baseline values (500 ng/ml for D-dimer and 250 ng/ml for SF). The results presented in Table I indicated that in the peritoneal fluids there were ongoing processes of coagulation followed by fibrinolysis.

Protein C induces cell cycle activation. When cancer cells were cultured in medium containing 1% of fCS for 24 h, all cells entered into the G1 phase. Upon addition of culture

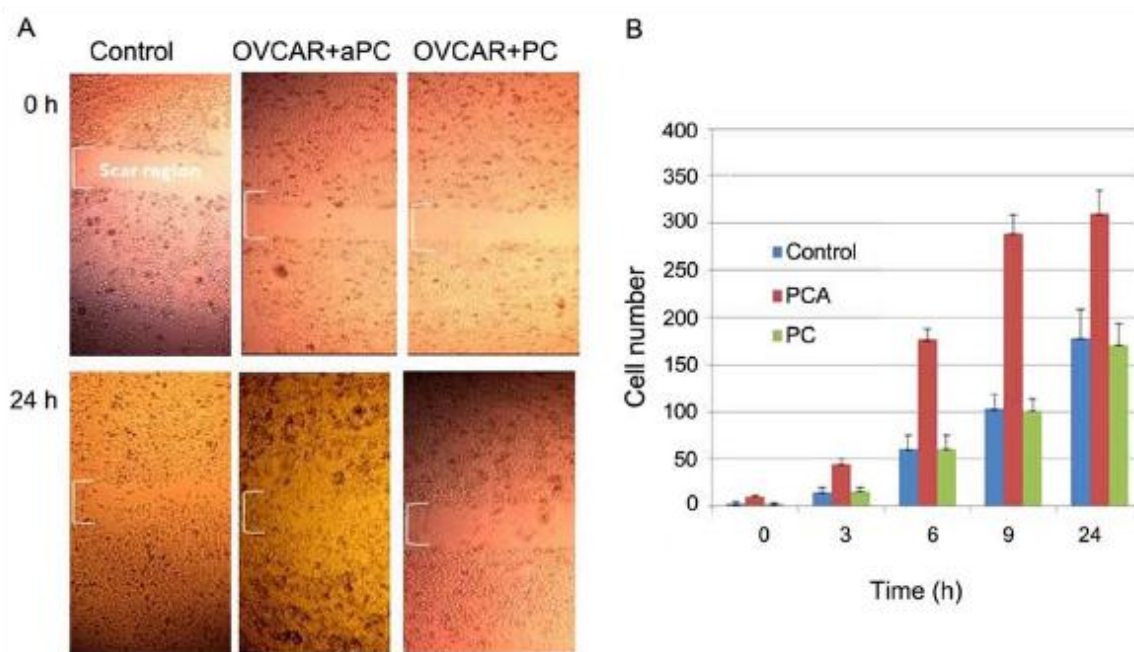


Figure 2. Influence of aPC and PC on ovarian cancer cell migration. (A) Results after 24 h compared with 0 h. (B) An increase in cell migration was induced by aPC at all time-lapses of the experiment. PC, protein C; aPC, active protein C.

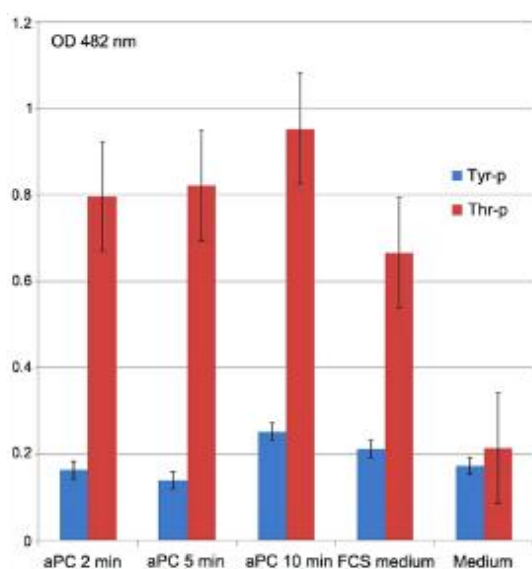


Figure 3. aPC induces threonine phosphorylation of the Ov CAR-3 cells. Tyr-p, phosphorylated tyrosine; Thr-p, phosphorylated threonine. aPC, active protein C.

medium containing protein C, 4.8% of the cells in the G1 phase underwent transition to the G2 phase (Fig. 1A), whereas when aPC was added, 5.62% of the cells in the G1 phase entered into the S phase (Fig. 1B). These results suggest that protein C influences the ovarian cancer cell cycle.

aPC induces OVCAR-3 cell migration. The influence of protein C on OVCAR-3 cell migration at 3, 6, 9 and 24 h is presented in Fig. 2. It was observed that aPC enhanced cell

migration into the wound, whereas in the presence of PC, cell migration was found to be similar to that of the control. The histogram in Fig. 2B depicts the effect of aPC and PC on ovarian cancer cells migrating into the scar region as a function of time (0, 3, 6, 9 and 24 h).

aPC induces threonine and tyrosine phosphorylation of the OVCAR-3 cells. The effect of aPC on threonine and tyrosine phosphorylation in the OVCAR-3 cancer cells was tested by cyto-ELISA (Fig. 3). Compared to tyrosine, threonine was strongly and significantly phosphorylated when the cancer cells were incubated (10 μ g/ml) with aPC. Threonine phosphorylation started 2 min after aPC incubation, while tyrosine phosphorylation occurred later, that is only after 10 min of incubation. The medium with 10% bovine calf serum served as the control and was found to induce threonine and tyrosine phosphorylation.

aPC upregulates cell migration via MEK-ERK and Rho-GTPase pathways in OVCAR-3 cells. The effect of inhibitors of several signaling pathways on cell migration was tested by droplet test (Fig. 4A and B). As presented in Fig. 4A, the cells were incorporated in the droplet. The cell migration from the droplet started after 2-3 h towards the outer periphery of the droplets (arrows). The outer of the periphery is indicated for clarity by a discontinuous line drawing. Fig. 4B indicates the control Ov CAR-3 cells (Fig. 4B1) and the Ov CAR-3 cells treated with aPC (Fig. 4B2). The cancer cell migration was inhibited by PD 98059 an ERK inhibitor (Fig. 4B3), u O126 an MEK-1/2 kinase inhibitor (Fig. 4B4) and GGTI-298 an inhibitor of Rho GTPases (Fig. 4B5), whereas the migration was unaffected by f TI-277 an inhibitor of farnesyl transferase (Fig. 4B6) and rapamycin a raptor-mTor complex inhibitor

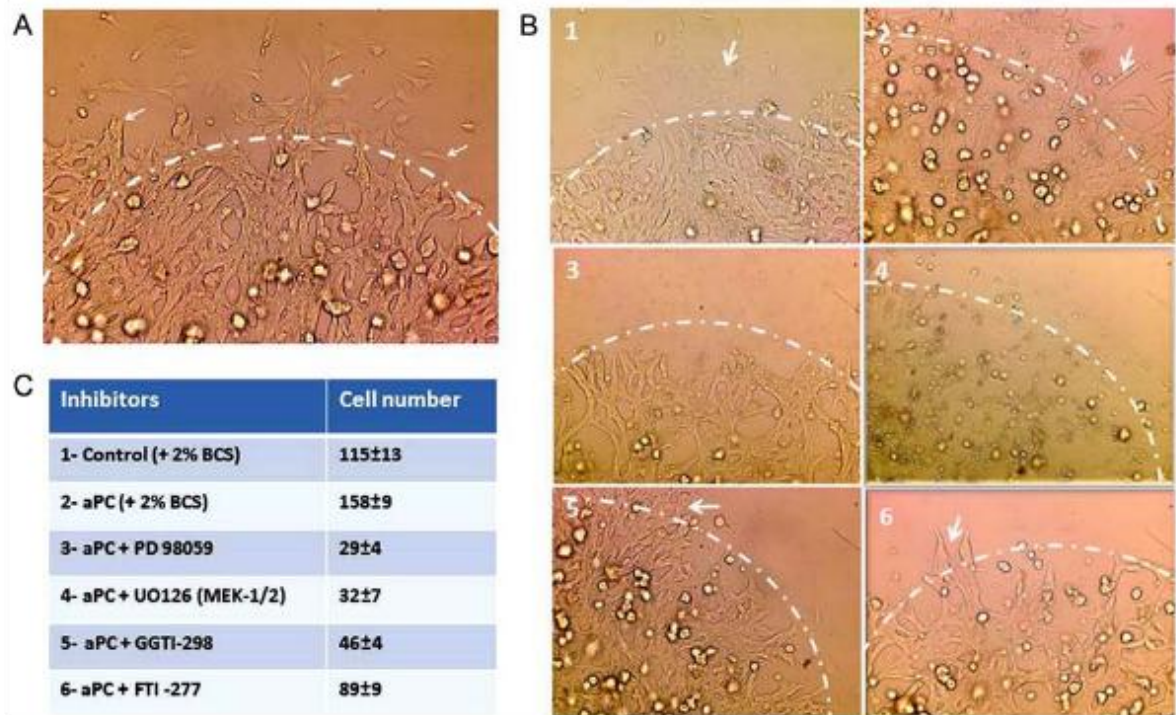


Figure 4. Cell migration in the droplet test (A) and the influence of several inhibitors of cell signaling pathways on the Ov CAR-3 cells following treatment with the control (B1), aPC (B2), PD98059 an ERK inhibitor (B3), u O126 an MEK-1/2 kinase inhibitor (B4), GGTI-298 an inhibitor of Rho GTPases (B5), FTI-277 an inhibitor of farnesyl transferase (B6) on aPC-induced cell migration from the droplet were analyzed and quantified (C). aPC, active protein C.

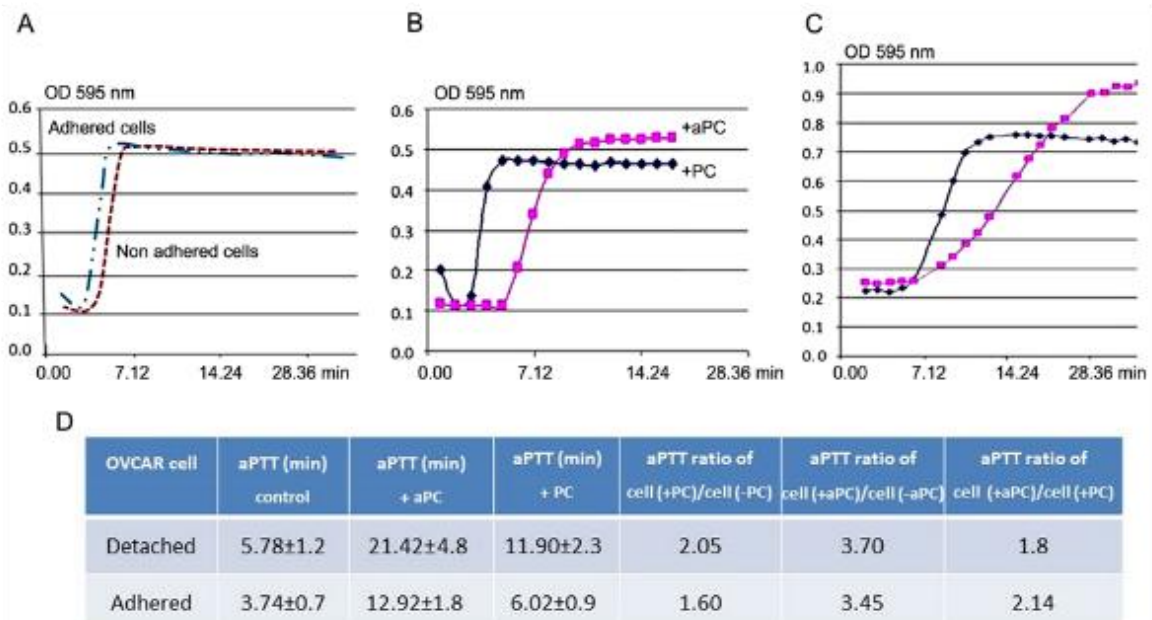


Figure 5. Fibrin formation kinetics on plasma in the presence of PC or aPC bound to Ov CAR-3 cells tested by aPTT test. (A) aPTT test of adherent and detached Ov CAR-3 cells without PC or aPC as controls. aPTT test of Ov CAR-3 cells in (B) detached and (C) adherent conditions, in the presence of PC or aPC. (D) Real-time of aPTT (minutes) in different conditions. Ov CAR-3, ovarian cancer cell line; PC, protein C; aPC, active protein C; aPTT, activated partial thromboplastin time.

(data not shown). The number of cells migrating outside the droplets, in five experiments, is presented in Fig. 4C.

Anticoagulant activity induced by OVCAR-3 cells. The anticoagulant property of OVCAR-3 cells was assessed

by measuring the prolongation of aPTT of normal plasma induced by aPC. As shown in Fig. 5A, the effect of Ov CAR-3 cells, detached and incubated either with PC or APC, in fibrin polymerization curve of normal plasma is shown. The same experiment was also performed using OVCAR-3 cells in adherent conditions. When both detached (Fig. 5B) and adherent (Fig. 5C) cells, were incubated with aPC, aPTT was prolonged as compared to cells incubated with protein C. As documented in Fig. 5D, PC added to the adherent or detached ovarian cancer cells induced a 2-fold increase in cephalin clotting time, whereas aPC under the same conditions induced a 3.7-fold increase (5.78-11.90 min for PC and 21.42 min for aPC). These results indicate the anti-coagulant action of EPCR-aPC on the Ov CAR-3 cells.

Discussion

The peritoneal cavity is a space between the visceral peritoneum and the parietal peritoneum. Ten percent of all cases of ascites are of cancer origin (31). It is an exudate commonly observed at the late stage of cancer. Ascites may originate in the peritoneum (carcinomatosis) or may come from cancer that has spread from another site of the body. In ovarian carcinomatosis, the cancer cells adhere to mesenteric cells and form micronodules on the peritoneum (32).

Peritoneal fluids contain, besides cells, several proteolytic enzymes including metalloproteases and serine proteases (33). These fibrinolytic enzymes provoke increased extracellular matrix degradation and facilitate tumor cell invasion and metastasis (34) and as a consequence detach malignant cells which leave a maternal nodule for forming a secondary nodule on the peritoneal surface. Hence, considerable diminution of clotting of the peritoneal fluid plays a major role in the pathology and poor prognosis of ovarian carcinomatosis. We previously demonstrated that EPCR on endothelial cells has a physiological anticoagulant activity as ascertained *in vitro* by aPTT test (29). In contrast sEPCR, by its ability to trap aPC from plasma, can be considered as a cancer-associated hypercoagulability factor (26).

Cell migration was found to be inhibited when a neutralizing antibody against the EPCR antibody was added to the culture medium. In addition, we also showed that cell migration, induced by the binding of aPC to EPCR, was blocked by anti-ERK, MEK-1/2, and Rho-GTPase inhibitors when they were added while performing the droplet test. Our results indicate that the ERK-MEK-1/2 and Rho-GTPase signaling pathways significantly participate in the aPC/EPCR-PAR-1 induced cell migration. We found that the droplet test was a useful and informative model for studying cell migration. In addition, in another set of experiments, we also found that aPC-EPCR interaction increased cancer cell adhesion on the bottom of gelatin-coated culture flasks (data not shown). Here, we showed that the interaction of aPC-EPCR in ovarian cancer cells resulted in accelerated cell migration as evaluated by the kinetics of the wound closure.

When cells were synchronized and arrested in the G1 phase, their incubation with protein C or aPC induced cell cycle activation and passage from G1 to S or G2 phases after 18 h. These results on the activation of the cell cycle are in good concordance with our previous observation showing

that aPC induces Ov CAR cell proliferation (6). In a similar approach, but using human keratinocytes, Xue *et al.* (34) showed that aPC stimulated the proliferation, migration and wound closure (35) again confirming that protein C induces enhanced cell migration.

The protein C system participates in the degradation of factors v a and v IIIa (9) thereby inhibiting fibrin formation. It also induces inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (36). In order to estimate the ability of EPCR to bind aPC on the surface of living endothelial cells *in vitro* (29) we used a method that we had previously developed, based on prolongation of cephalin clotting time of plasma when aPC bound cells are added. This aPTT-based method was optimized to assess EPCR presence and functionality on the Ov CAR-3 cell membrane. Our results showed that aPC bound on living ovarian cancer cells induced a prolongation of plasma clotting time suggesting that ovarian cancer cells use physiological anticoagulants such as aPC for their homeostasis.

EPCR exists as a membrane-bound form as well as a free sEPCR form. In fact, sEPCR can regulate the quantity of circulating aPC (20). Curiously, the sEPCR level in the peritoneal fluid of 85% patients was less than that in the plasma of healthy individuals. Only 3 patients (15%) had elevated levels of sEPCR (247, 250 and 154 ng/ml) which was below the level observed in plasma of patients with ovarian cancer (25). This indicates that sEPCR availability for trapping aPC is considerably reduced. Therefore, in ascitic fluids from ovarian cancer, free protein C binds to membrane EPCR of ovarian cancer cells, inducing cell migration ensuring the unclottability of peritoneal fluid by inhibition of the fibrin formation pathway.

Evaluation of D-dimer and SF in the peritoneal fluids of the ovarian cancer patients indicated that as soon as fibrin was formed, it was degraded. Moreover, the presence of EPCR-containing cancer cells in the peritoneal fluid limited the formation of fibrin on the cell surface as deduced from our observation indicating a marked increase in the cephalin clotting time of plasma.

In the peritoneal cavity, under other circumstances, aPC/EPCR interaction and cell activation can occur independent of the presence of cancer cells. There are a number of reports indicating that aPC/EPCR interaction via PAR-1 activation induces anti-inflammatory activity and anti-apoptotic activity (37,38). Peritoneal carcinomatosis is an inflammatory process and involves numerous non-tumor cells such as inflammatory cells. Inflammatory monocytes and neutrophils express EPCR on their membranes (17). The interaction of aPC/EPCR can downregulate the pro-coagulant activity of these cells. It can also induce cancer cytoprotection and enhance the malignant phenotype of cancer cells. The secretion of hyaluronan by mesenteric cells contributes to lubrication of the luminal peritoneal cavity. Whether EPCR is present or not on these cells has not been reported to date.

In conclusion, in ovarian carcinomatosis, aPC-EPCR interaction renders cancer cells highly aggressive, and as a result of inhibition of fibrin formation, the development of secondary nodules is facilitated. We are at present engaged in studies to further elucidate the role of EPCR in cancer homeostasis.

References

- Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C and Piché A: Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J Cancer Res* 2: 566-580, 2012.
- Desjardins M, Xie J, Gurler H, Muralidhar GG, Sacks JD, Burdette JE and Barbolina MV: Versican regulates metastasis of epithelial ovarian carcinoma cells and spheroids. *J Ovarian Res* 7: 70, 2014.
- Goncharenko-Khaider N, Matte I, Lane D, Rancourt C and Piché A: Ovarian cancer ascites increase Mcl-1 expression in tumor cells through ERK1/2-Elk-1 signaling to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer* 11: 84, 2012.
- Puiffé ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin PN, Chevette M, Provencher DM and Mes-Masson AM: Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 9: 820-829, 2007.
- wang L, Madigan MC, Chen H, Liu F, Patterson KI, Beretov J, O'Brien PM and Li Y: Expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in advanced epithelial ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* 114: 265-272, 2009.
- Fukudome K, Ye X, Tsuneyoshi N, Tokunaga O, Sugawara K, Mizokami H and Kimoto M: Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J Exp Med* 187: 1029-1035, 1998.
- Dahlbäck B and Villoutreix BO: Molecular recognition in the protein C anticoagulant pathway. *J Thromb Haemost* 1: 1525-1534, 2003.
- Fukudome K and Esmon CT: Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 269: 26486-26491, 1994.
- Taylor fB Jr, Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G and Esmon CT: Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 97: 1685-1688, 2001.
- Li w, Zheng X, Gu J, Hunter J, Ferrell GL, Lupu F, Esmon NL and Esmon CT: Overexpressing endothelial cell protein C receptor alters the hemostatic balance and protects mice from endotoxin. *J Thromb Haemost* 3: 1351-1359, 2005.
- Zheng X, Li w, Gu JM, Qu D, Ferrell GL, Esmon NL and Esmon CT: Effects of membrane and soluble EPCR on the hemostatic balance and endotoxemia in mice. *Blood* 109: 1003-1009, 2007.
- Griffin JH, Zlokovic Bv and Mosnier LO: Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* 95: 333-345, 2012.
- van Sluis GL, Niers TM, Esmon CT, Tigchelaar w, Richel DJ, Buller HR, Van Noorden CJ and Spek CA: Endogenous activated protein C limits cancer cell extravasation through sphingosine-1-phosphate receptor 1-mediated vascular endothelial barrier enhancement. *Blood* 114: 1968-1973, 2009.
- Azzazene D, Al Thawadi H, Al Farsi H, Besbes S, Geyl C, Mirshahi S, Pardo J, faussat AM, Jeannette S, Therwath A, Pujade-Lauraine E and Mirshahi M: Plasma endothelial protein C receptor influences innate immune response in ovarian cancer by decreasing the population of natural killer and TH17 helper cells. *Int J Oncol* 43: 1011-1018, 2013.
- van Sluis GL, Brüggemann Lw, Esmon CT, Kamphuisen Pw, Richel DJ, Buller HR, van Noorden CJ and Spek CA: Endogenous activated protein C is essential for immune-mediated cancer cell elimination from the circulation. *Cancer Lett* 306: 106-110, 2011.
- Laszik Z, Mitro A, Taylor fB Jr, ferrell G and Esmon CT: Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 96: 3633-2640, 1997.
- Balazs AB, fabian AJ, Esmon CT and Mulligan RC: Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood* 107: 2317-2321, 2006.
- Schaffner f, Yokota N, Carneiro-Lobo T, Kitano M, Schaffner M, Anderson GM, Mueller BM, Esmon CT and Ruf w: Endothelial protein C receptor function in murine and human breast cancer development. *PLoS One* 8: e61071, 2013.
- Fukudome K, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, He X, Rezaie AR and Esmon CT: The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 271: 17491-17498, 1996.
- Saposnik B, Lesteven E, Lokajczyk A, Esmon CT, Aiach M and Gandrille S: Alternative mRNA is favored by the A3 haplotype of the EPCR gene *PROCR* and generates a novel soluble form of EPCR in plasma. *Blood* 111: 3442-3451, 2008.
- Nayak RC, Sen P, Ghosh S, Gopalakrishnan R, Esmon CT, Pendurthi u R and Rao Lv: Endothelial cell protein C receptor cellular localization and trafficking: potential functional implications. *Blood* 114: 1974-1986, 2009.
- Schuepbach RA and Riewald M: Coagulation factor Xa cleaves protease-activated receptor-1 and mediates signaling dependent on binding to the endothelial protein C receptor. *J Thromb Haemost* 8: 379-388, 2010.
- Joyce DE, Gelbert L, Ciaccia A, DeHoff B and Grinnell Bw: Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 11199-11203, 2001.
- Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM and Ruf w: Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296: 1880-1882, 2002.
- Ducros E, Mirshahi S, Azzazene D, Camilleri-Broët S, Mery E, Al farsi H, Althawadi H, Besbes S, Chidiac J, Pujade-Lauraine E, et al: Endothelial protein C receptor expressed by ovarian cancer cells as a possible biomarker of cancer onset. *Int J Oncol* 41: 433-440, 2012.
- Ducros E, Mirshahi SS, Faussat AM, Mirshahi P, Dimicoli S, Tang R, Pardo J, Ibrahim J, Marie JP, Therwath A, et al: Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) is likely a biomarker of cancer-associated hypercoagulability in human hematologic malignancies. *Cancer Med* 1: 261-267, 2012.
- Berthaut A, Mirshahi P, Benabbou N, Azzazene D, Bordu C, Therwath A, Legeais JM and Mirshahi M: Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) expression in human corneal fibroblast decreased with age. *Mol vis* 15: 1997-2007, 2009.
- Queille S, Drougard C, Sarasin A and Daya-Grosjean L: Effects of XPD mutations on ultraviolet-induced apoptosis in relation to skin cancer-proneness in repair-deficient syndromes. *J Invest Dermatol* 117: 1162-1170, 2001.
- Ducros E, Berthaut A, Mirshahi SS, Faussat AM, Soria J, Agarwal MK and Mirshahi M: Aldosterone modifies hemostasis via upregulation of the protein-C receptor in human vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 192-196, 2008.
- Mirshahi S, Soria C, Kouchakji B, Kierzek G, Borg JY, Varin R, Chidiac J, Drouet L, Mirshahi M and Soria J: New combinational assay using soluble fibrin and D-dimer determinations: a promising strategy for identifying patients with suspected venous thromboembolism. *PLoS One* 9: e92379, 2014.
- Ayantunde AA and Parsons SL: Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol* 18: 945-949, 2006.
- Smolle E, Taucher V and Haybaeck J: Malignant ascites in ovarian cancer and the role of targeted therapeutics. *Anticancer Res* 34: 1553-1561, 2014.
- Casslén B, Bossmar T, Lecander I and Astedt B: Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in blood and tumour fluids of patients with ovarian cancer. *Eur J Cancer* 30A: 1302-1309, 1994.
- Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS and Fishman DA: Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* 64: 7045-7049, 2004.
- Xue M, Thompson P, Kelso I and Jackson C: Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res* 299: 119-127, 2004.
- van Hinsbergh v w, Bertina RM, van w ijngaarden A, van Tilburg NH, Emeis JJ and Haverkate f: Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood* 65: 444-451, 1985.
- Mosnier LO, Zlokovic Bv and Griffin JH: The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109: 3161-3172, 2007.
- Mohan Rao Lv, Esmon CT and Pendurthi u R: Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* 124: 1553-1562, 2014.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le microenvironnement tumoral a un effet prépondérant sur la croissance et la progression de la pathologie cancéreuse, la dissémination métastatique et la régulation des réponses biologiques associées. Ses composantes ont un effet évident sur l'évolution de la maladie. Dès l'initiation tumorale et jusqu'aux métastases, les interactions entre cellules transformées et leur microenvironnement, orchestrent l'évolution de la pathologie cancéreuse *via* différents processus biologiques et plusieurs mécanismes moléculaires. La connaissance et la maîtrise de ces multiples phénomènes sont à la base du développement de nouvelles approches thérapeutiques visant à élaborer des traitements efficaces et personnalisés contre le cancer.

Dès le début du processus tumoral, un microenvironnement procoagulant se met en place. D'une part les cellules tumorales sécrètent des facteurs procoagulants à l'origine d'une génération exacerbée de fibrine. D'autre part, l'inflammation joue un rôle de première importance dans l'amplification de l'hypercoagulabilité autour de la tumeur. La tumeur trouve refuge dans cette matrice extracellulaire (MEC), qui lui sert non seulement de structure de soutien, mais aussi de barrière protectrice contre l'action de défense de l'hôte.

Cependant, la MEC est aussi le siège d'un remodelage régulier. En effet, l'agressivité de la tumeur se traduit notamment par la capacité des cellules tumorales de s'échapper de leur site initial. Ce phénomène est étroitement lié au remodelage matriciel.

Plusieurs études se consacrent au remaniement de la MEC par l'action des protéases (MMP, urokinase). Toutefois, peu d'études s'intéressent aux aspects de l'inhibition de la formation de cette matrice.

Le microenvironnement tumoral vacille entre coagulation et anticoagulation. Le système PC/EPCR constitue le maillon commun de ces deux processus. L'EPCR favorise l'activation de son ligand, la protéine C, par le complexe thrombine-thrombomoduline. La PCA clive les facteurs Va et VIIIa, réduisant la libération de la fibrine. En revanche, l'EPCR peut être libéré, suite à son clivage membranaire, sous une forme circulante dite EPCR soluble (EPCRs). L'EPCRs séquestre la PCA et déjoue son action anticoagulante.

Dans un premier temps, nous avons évalué la prédisposition génétique, d'une population de patients atteints d'un cancer, à développer une thrombose. Autrement dit, le profil prothrombotique d'un patient cancéreux serait-il, entre autres, le reflet d'une mutation génétique donnée ?

Pour répondre à cette question, nous avons ciblé un SNP connu pour être à l'origine de la solubilisation de l'EPCR et la libération de sa forme circulante.

Notre population d'étude était composée de patients atteints d'hémopathies malignes et de donneurs sains. Nous avons démontré que la distribution des génotypes AA, AG et GG, en position 6936 du gène d'EPCR, était similaire dans la population malade et saine. Cette similitude dans la distribution des génotypes, entre les deux populations, est cohérente. En effet, le profil non-cancéreux attribué à ces donneurs constitue une étiquette ponctuelle. En d'autres termes, la population malade est une ancienne population saine. Le profil génétique, quant à lui, ne varie pas.

Au sein de la population malade, nous avons démontré que 23,3% des patients avaient développé au moins un épisode thrombotique, tout génotype confondu. Cette fréquence est de 38,1% lorsque le patient est porteur du génotype 6936AG. Aussi, nous avons trouvé que l'incidence de la thrombose était élevée dans toutes les hémopathies malignes, excepté dans la leucémie aiguë lymphoblastique. En effet, cette sous-population est relativement jeune par rapport aux autres sous-populations et il est admis que l'incidence de thrombose est majorée par le facteur âge.

Dans la sous-population atteinte de leucémie aiguë myéloblastique, l'incidence de thrombose est de 50% chez les patients porteurs du génotype 6936AG.

Tous ces résultats plaident en faveur d'une relation triangulaire entre le SNP 6936A/G d'une part, la pathologie cancéreuse et la thrombose, d'autre part. Le SNP 6936A/G pourrait, donc, constituer un biomarqueur clé dans la prévention de thrombose, chez les patients cancéreux, notamment ceux atteints de leucémie aiguë myéloblastique.

Ensuite, nous avons orienté notre étude vers la pathologie cancéreuse ovarienne. Le cancer de l'ovaire constitue un des cancers gynécologiques les plus graves, entraînant, après le cancer du sein, la mortalité la plus élevée de ces cancers. Cette pathologie est particulièrement meurtrière, car dans la majorité des cas, elle n'est diagnostiquée qu'après la dissémination des cellules cancéreuses vers la cavité péritonéale.

Une étude, *in situ*, nous a permis de mettre en évidence la présence d'EPCR membranaire dans la majorité des biopsies de tumeurs ovariennes, mais aussi dans des biopsies mammaires, pulmonaires et coliques. Cela suggère que la présence d'EPCR serait commune aux tumeurs, quelle que soit leur origine. L'EPCR membranaire était aussi détecté dans les agrégats cellulaires issus de prélèvements d'ascite de patientes atteintes du cancer de l'ovaire et aussi sur la surface de lignées cellulaires mises en culture, notamment, la lignée d'adénocarcinome ovarien OVCAR-3.

La présence d'EPCR, à la surface des nodules tumoraux, ainsi que celle des lignées cancéreuses, limiterait le dépôt de la fibrine dans le microenvironnement tumoral. L'inhibition de la fibrinogenèse par le système PC/EPCR déstabilise la matrice extracellulaire, accentue le potentiel migratoire des cellules tumorales, favorisant ainsi la dissémination métastatique et la majoration du phénotype malin de la tumeur.

Il est, également, intéressant de constater que la détection de l'EPCR membranaire, au niveau des biopsies, était plus faible après traitement thérapeutique, chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire. Cela pourrait être expliqué de deux façons :

- le potentiel prothrombotique, provoqué par un traitement thérapeutique dans un contexte néoplasique, constitue une évidence. La fonction anticoagulante de l'EPCR/PC serait, par conséquent, atténuée. La solubilisation de l'EPCR, par action protéolytique, serait augmentée. La fibrine, ainsi générée, renforcerait la matrice extracellulaire, protégeant les cellules tumorales des effets du traitement thérapeutique et de la réponse inflammatoire associée.
- la protéine C activée est connue pour ses propriétés cyto-protectrices. Ces effets nécessitent la fixation de la PCA à son récepteur EPCR et se traduisent par le clivage et l'activation de PAR-1. Dans notre étude réalisée *in situ*, l'anticorps dirigé contre l'EPCR, ciblait spécifiquement le domaine de fixation de la PC. Nous pourrions, donc, penser que ce domaine n'était plus disponible, suite à la fixation exacerbée de la PC sur son récepteur afin d'exercer sa fonction cyto-protectrice – empêchant, ainsi, par compétition la fixation de l'anticorps anti-EPCR.

Aussi, nous avons détecté que le taux d'EPCRs dosé dans le liquide péritonéal des patientes atteintes du cancer de l'ovaire était nettement supérieur à la normale plasmatique. En effet, l'ascite constitue une véritable source d'enzymes protéolytiques dont les métalloprotéases, capables de cliver l'EPCR et de libérer sa forme circulante dans le fluide péritonéal.

Dans une deuxième population atteinte du cancer de l'ovaire, mais à un stade métastatique, le taux d'EPCRs était, curieusement, comparable à celui du plasma normal. En outre, ces ascites renfermaient des quantités importantes de fibrine soluble et de fibre de fibrine, indiquant que la coagulation était suivie par une action fibrinolytique. Ces résultats mettent en évidence la faible disponibilité de l'EPCRs dans ces ascites. La basse concentration d'EPCRs pourrait être expliquée par l'important volume d'ascite chez les patientes en stade métastatique. Cela diminue non seulement le taux d'EPCRs dans ces prélèvements, mais dilue aussi son action coagulante dans le fluide péritonéal.

En conclusion à ces premiers résultats, nous distinguons deux cas de figure ; le cas des tumeurs solides et celui des hémopathies malignes.

En effet, l'EPCR membranaire présent à la surface des cellules tumorales joue un rôle crucial dans le remodelage matriciel, en limitant le dépôt de fibrine et favorisant ainsi la dissémination métastatique. Aussi, la PCA fixée à son récepteur, accentue les propriétés migratoires des cellules malignes, via la voie de signalisation ERK-MEK-1/2 et Rho-GTPase, favorisant leur extravasation dans la circulation et promouvant leur potentiel métastatique.

Dans un contexte d'hémopathie maligne, les cellules leucémiques circulantes fixent la PCA, *via*, les biomolécules d'EPCR présentes à leur surface. Les cellules tumorales diminuent le taux de PCA circulante et bénéficient de ses propriétés cyto-protectrices. Aussi la solubilisation de l'EPCR exprimé au niveau des blastes est fortement favorisée par le contexte inflammatoire spécifique à la leucémie et la sécrétion des enzymes protéolytiques par les cellules tumorales. La PCA, séquestrée par ses deux récepteurs membranaire et soluble, est par conséquent doublement empêchée d'exercer sa fonction anticoagulante. Cela fournit un élément de réponse pertinent quant au potentiel prothrombotique élevé et la forte fréquence de thrombose chez les patients atteints d'hémopathies malignes.

Sous un autre angle, le rôle du système PC/EPCR, dans un contexte néoplasique, peut être qualifié d'ambivalent.

D'une part, l'EPCR exprimé au niveau d'un nodule tumoral, accélère l'activation de son ligand. Ce complexe joue un rôle crucial dans l'inhibition de la fibrinofomation et la déstabilisation de la matrice extracellulaire. Cela promeut, considérablement, le potentiel

migratoire des cellules cancéreuses, favorisant ainsi la prolifération tumorale et la dissémination métastatique.

D'autre part, la solubilisation de l'EPCR et sa libération dans le plasma, lui confèrent un caractère procoagulant. En outre, le volume de la masse tumorale et le nombre de blastes croissants devraient libérer un plus grand nombre d'EPCRs dans le plasma. Le volume plasmatique étant constant, le dosage du taux d'EPCRs plasmatique devrait corrélérer positivement avec la croissance tumorale.

Ainsi, l'EPCR soluble, dans l'ascite ou dans le plasma, peut constituer un biomarqueur clé du développement de la pathologie cancéreuse et de la survenue de thrombose. Associé à d'autres marqueurs de la thrombose et/ou du cancer, l'EPCR peut également, représenter un critère d'évaluation pertinent de la progression des deux pathologies et aussi de l'efficacité des traitements médicamenteux.

Ces résultats peuvent constituer la base de nouvelles perspectives. Ainsi, la mise en place d'une étude sur une cohorte de patients à grande échelle atteints d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides est susceptible d'apporter des réponses tranchantes, quant à la pertinence du SNP 6936A/G de l'EPCR en tant que biomarqueur du risque thrombotique, dans un contexte tumoral. Etant donné leur faible fréquence, nous étions contraints d'abandonner les sujets porteurs du génotype 6936GG, au cours de notre étude statistique. Pourtant, les patients homozygotes avec un allèle 6936G seraient les plus prédisposés aux événements thrombotiques. Pour vérifier cela, il serait très intéressant de cibler un nombre plus importants d'individus. L'évaluation combinée d'autres biomarqueurs de la pathologie cancéreuse et/ou de la thrombose, génétiques, moléculaires ou macromoléculaires, semble importante. Il serait également judicieux de classer les patients en fonction de l'ancienneté de la pathologie néoplasique, sa localisation, son stade et l'éventuel traitement médicamenteux.

Aussi, la comparaison des résultats entre hémopathies malignes et tumeurs solides pourrait aider à mieux caractériser le potentiel thrombophile de chaque type de pathologie et cerner le rôle de l'EPCR dans cette relation causale entre cancer et thrombose.

Enfin, la dissection des mécanismes pro-invasifs et des propriétés cyto-protectrices et anti-inflammatoires de la PCA est de première importance. La PCA est capable d'enclencher plusieurs voies de signalisation. Ces cascades de réactions impliquent souvent des acteurs

moléculaires communs et aboutissent, en fonction des conditions physiopathologiques, à des résultats ou effets opposés.

Dans ce contexte, nous avons également étudié l'influence de la PCA sur la réponse immunitaire et inflammatoire dans la pathologie cancéreuse ovarienne. Nous avons démontré que la PCA était capable de réguler positivement ou négativement certains acteurs impliqués, d'une manière directe ou indirecte dans cette réponse associée. Notre étude a révélé, *in vitro*, une augmentation significative de la production de la thrombopoïétine, une cytokine majoritairement sécrétée par le foie, dans le milieu de culture d'une lignée d'adénocarcinome ovarien humain, OVCAR-3, préalablement stimulée par la PCA.

Ces résultats, nous ont poussés à mettre en place un protocole pour mettre en évidence l'expression du gène de la TPO dans cette lignée cellulaire, ainsi que dans les agrégats cellulaires de patientes atteintes de carcinome ovarien. Nous avons ensuite caractérisé la régulation post-transcriptionnelle par la PCA. Enfin, nous avons démontré, pour la première fois, que la TPO sécrétée par les cellules cancéreuses ovariennes, était capable de maintenir en vie une deuxième lignée TPO-dépendante – preuve que cette TPO ovarienne est, bel et bien, biologiquement fonctionnelle. La TPO et la PCA seraient, probablement, impliquées dans des processus communs. La PCA serait responsable de l'activation de voie(s) de signalisation et de régulation de la synthèse de la TPO et de son activité proliférative.

Curieusement, le taux de transcription du gène de la TPO était différent entre les deux lignées ovariennes étudiées ; et ce, indépendamment de la stimulation par la PCA. Ce taux était très faible dans le tissu ovarien sain. Aussi, le niveau de transcription du gène était nettement plus élevé dans la lignée leucémique K562, pourtant l'effet prolifératif de la TPO sécrétée par cette lignée était comparable à celui des OVCAR-3 stimulées.

Il faudrait, donc, éclaircir d'autres points concernant le rôle de la TPO dans la pathologie cancéreuse. Comprendre les mécanismes de régulation transcriptionnelle du gène de la TPO et de son épissage alternatif, ainsi que les fonctions des différentes isoformes sécrétées, semble indispensable.

Il est également important d'identifier et de caractériser les éventuelles interactions entre TPO et PCA dans un contexte physiologique ou tumoral. En effet, la PCA fixée à son récepteur promeut la migration des cellules cancéreuses, par la voie de signalisation ERK-MEK-1/2. La TPO est aussi capable d'activer la voie de signalisation MAPK (famille de kinases incluant

ERK). Recrutées par le récepteur c-MPL, ces kinases sont phosphorylées au niveau de leurs résidus tyrosine. Cette phosphorylation est induite par la TPO, une fois fixée à son récepteur. Plusieurs études suggèrent l'implication des MAPK dans la différenciation des mégacaryocytes. Leur rôle dépendrait de l'intensité et de la durée de l'activation de cette voie de signalisation. Comme l'expression du c-MPL a été déjà mise en évidence dans des cellules ovariennes, nous pourrions suggérer une possible coopération entre la TPO et la PCA pour amplifier le signal MAPK et promouvoir, à la fois, la différenciation des mégacaryocytes et la dissémination métastatique.

La mise en place d'une étude *in vitro* et *in vivo* pourrait nous apporter d'autres éléments de réponse quant aux possibles voies de signalisation et de régulation communes de la PCA et la TPO.

Enfin, une étude *in situ* sur des biopsies de patients atteints de cancer pourrait révéler de potentielles corrélations, notamment entre la TPO et l'EPCR. Également, la mise au point d'une trousse de dosage plasmatique et dans l'ascite (TPO, plaquettes, EPCRs) pourrait nous aider à mieux comprendre les fonctions séparées et combinées de ces acteurs dans la pathologie cancéreuse et les complications thrombotiques associées.

Le rôle de la protéine C et de son récepteur endothélial, dans le cancer et la thrombose, semble très complexe. Dans les prochaines années, l'identification et le rassemblement des nouvelles pièces du puzzle, est décisif. Il s'agit de dégager, en toute urgence, des réponses péremptoires, quant aux effets pléiotropes de la PCA, afin de pouvoir identifier des cibles thérapeutiques attractives et efficaces contre le cancer.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abou-Alfa, G.K., Schwartz, L., Ricci, S., Amadori, D., Santoro, A., Figer, A., De Greve, J., Douillard, J.-Y., Lathia, C., Schwartz, B., et al. (2006). Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* *24*, 4293–4300.

Accaoui, R.N. El, Shamseddeen, W.A., and Taher, A.T. (2007). Thalidomide and thrombosis. A meta-analysis. *Thromb. Haemost.* *97*, 1031–1036.

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., and Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1605–1621.

Althawadi, H., Alfarsi, H., Besbes, S., Mirshahi, S., Ducros, E., Rafii, A., Pocard, M., Therwath, A., Soria, J., and Mirshahi, M. (2015). Activated protein C upregulates ovarian cancer cell migration and promotes unclottability of the cancer cell microenvironment. *Oncol. Rep.* *34*, 603–609.

Andrei, M.-C., and Andercou, A. (2014). Is there a Link Between Atherothrombosis and Deep Venous Thrombosis? *Maedica (Buchar)* *9*, 94–97.

Antón, I., Molina, E., Luis-Ravelo, D., Zandueta, C., Valencia, K., Ormazabal, C., Martínez-Canarias, S., Perurena, N., Pajares, M.J., Agorreta, J., et al. (2012). Receptor of activated protein C promotes metastasis and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *186*, 96–105.

Azzazene, D., Thawadi, H. Al, Farsi, H. Al, Besbes, S., Geyl, C., Mirshahi, S., Pardo, J., Faussat, A.M., Jeannette, S., Therwath, A., et al. (2013). Plasma endothelial protein C receptor influences innate immune response in ovarian cancer by decreasing the population of natural killer and TH17 helper cells. *Int. J. Oncol.* *43*, 1011–1018.

B

Balkwill, F.R., and Mantovani, A. (2012). Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 33–40.

Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.S., Samal, B., Nichol, J.L., and Swift, S. (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* *77*, 1117–1124.

Bernard, G.R., Vincent, J.L., Laterre, P.F., LaRosa, S.P., Dhainaut, J.F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J.S., Garber, G.E., Helterbrand, J.D., Ely, E.W., et al. (2001). Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* *344*, 699–709.

Bezuhly, M., Cullen, R., Esmon, C.T., Morris, S.F., West, K.A., Johnston, B., and Liwski, R.S. (2009). Role of activated protein C and its receptor in inhibition of tumor metastasis. *Blood* *113*, 3371–3374.

Biguzzi, E., Merati, G., Liaw, P.C., Bucciarelli, P., Oganessian, N., Qu, D., Gu, J.M., Fétiqueau, R., Esmon, C.T., Mannucci, P.M., et al. (2001). A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb. Haemost.* 86, 945–948.

Blann, A.D., and Dunmore, S. (2011). Arterial and venous thrombosis in cancer patients. *Cardiol Res Pract* 2011, 394740.

Blom, J.W., Doggen, C.J.M., Osanto, S., and Rosendaal, F.R. (2005). Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 293, 715–722.

Bokemeyer, C., Aapro, M.S., Courdi, A., Foubert, J., Link, H., Osterborg, A., Repetto, L., and Soubeyran, P. (2004). EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer. *Eur. J. Cancer* 40, 2201–2216.

Bouillard, J.B., and Bouillaud, S. (1823). De l'Obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: consideration sur la hydropisies passive et generale. *Arch. Gen. Med.* 1, 188–204.

Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E., and Ferlay, J. (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* 132, 1133–1145.

Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., and Chersesh, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85, 683–693.

C

Camerer, E., Qazi, A.A., Duong, D.N., Cornelissen, I., Advincula, R., and Coughlin, S.R. (2004). Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 104, 397–401.

Cesarman-Maus, G., and Hajjar, K.A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 129, 307–321.

Chang, H.Y., Chi, J.-T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., and Brown, P.O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12877–12882.

Chargaff, E., and West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* 166, 189–197.

Cheng, T., Liu, D., Griffin, J.H., Fernández, J.A., Castellino, F., Rosen, E.D., Fukudome, K., and Zlokovic, B.V. (2003). Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat. Med.* 9, 338–342.

Chew, H.K., Wun, T., Harvey, D., Zhou, H., and White, R.H. (2006). Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch. Intern. Med.* 166, 458–464.

Clauss, M., Murray, J.C., Vianna, M., de Waal, R., Thurston, G., Nawroth, P., Gerlach, H., Bach, R., Familletti, P.C., and Stern, D. (1990). A polypeptide factor produced by fibrosarcoma cells that induces endothelial tissue factor and enhances the procoagulant response to tumor necrosis factor/cachectin. *J. Biol. Chem.* 265, 7078–7083.

Cohen, A.T., Agnelli, G., Anderson, F.A., Arcelus, J.I., Bergqvist, D., Brecht, J.G., Greer, I.A., Heit, J.A., Hutchinson, J.L., Kakkar, A.K., et al. (2007). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb. Haemost.* 98, 756–764.

Cosman, D. (1993). The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* 5, 95–106.

Cronin-Fenton, D.P., Søndergaard, F., Pedersen, L.A., Fryzek, J.P., Cetin, K., Acquavella, J., Baron, J.A., and Sørensen, H.T. (2010). Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: a population-based cohort study in Denmark, 1997-2006. *Br. J. Cancer* 103, 947–953.

Cuzick, J., Powles, T., Veronesi, U., Forbes, J., Edwards, R., Ashley, S., and Boyle, P. (2003). Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* 361, 296–300.

D

Dahlbäck, B. (2008). Early days of APC resistance and FV Leiden. *Hamostaseologie* 28, 103–109.

Dahlbäck, B., Carlsson, M., and Svensson, P.J. (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1004–1008.

Dargaud, Y. (2012). Thrombose hémostase et cancer : les mécanismes physiopathologiques en jeu. *Oncologie* 14, 638–643.

De Caterina, R., Husted, S., Wallentin, L., Andreotti, F., Arnesen, H., Bachmann, F., Baigent, C., Huber, K., Jespersen, J., Kristensen, S.D., et al. (2013). General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulants (Section I). Position Paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thromb. Haemost.* 109, 569–579.

De Cicco, M. (2004). The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 50, 187–196.

de Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., and Kuang, W.J. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369, 533–538.

Debourdeau, P., Chahmi, D.K., Zammit, C., and Farge-Bancel, D. (2008). [Venous thromboembolism associated with long-term use of central venous catheters in cancer patients]. *Pathol. Biol.* 56, 211–219.

Desbois, M., Champiat, S., and Chaput, N. (2015). [Breaking immune tolerance in cancer]. *Bull Cancer* 102, 34–52.

Dieri, R. Al, and Hemker, C.H. (2008). Thrombin generation in whole blood. *Br. J. Haematol.* 141, 895; author reply 896–897.

Dittman, W.A., and Majerus, P.W. (1990). Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood* 75, 329–336.

Dirix, L.Y., Salgado, R., Weytjens, R., Colpaert, C., Benoy, I., Huget, P., van Dam, P., Prové,

A., Lemmens, J., and Vermeulen, P. (2002). Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumour volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* 86, 389–395.

Dixon, K., and Koprás, E. (2004). Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 14, 441–448.

E

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.

Elalamy, I., Verdy, E., Gerotziapas, G., and Hatmi, M. (2008). [Pathogenesis of venous thromboembolic disease in cancer]. *Pathol. Biol.* 56, 184–194.

Elyamany, G., Alzahrani, A.M., and Bukhary, E. (2014). Cancer-associated thrombosis: an overview. *Clin Med Insights Oncol* 8, 129–137.

Even-Ram, S., Uziely, B., Cohen, P., Grisaru-Granovsky, S., Maoz, M., Ginzburg, Y., Reich, R., Vlodaysky, I., and Bar-Shavit, R. (1998). Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.* 4, 909–914.

F

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386.

Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967–974.

Flaumenhaft, R., Dilks, J.R., Richardson, J., Alden, E., Patel-Hett, S.R., Battinelli, E., Klement, G.L., Sola-Visner, M., and Italiano, J.E. (2009). Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 113, 1112–1121.

Folgueras, A.R., Pendás, A.M., Sánchez, L.M., and López-Otín, C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 411–424.

Folkman, J. (1996). New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur. J. Cancer* 32A, 2534–2539.

Franchini, M., Bonfanti, C., and Lippi, G. (2015). Cancer-associated thrombosis: investigating the role of new oral anticoagulants. *Thrombosis Research* 135, 777–781.

Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell. Sci.* 123, 4195–4200.

Fukudome, K., and Esmon, C.T. (1994). Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 26486–26491.

Fukudome, K., and Esmon, C.T. (1995). Molecular cloning and expression of murine and bovine endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR). The structural and functional conservation in human, bovine, and murine EPCR. *J. Biol. Chem.* 270, 5571–5577.

Fukudome, K., Ye, X., Tsuneyoshi, N., Tokunaga, O., Sugawara, K., Mizokami, H., and Kimoto,

M. (1998). Activation mechanism of anticoagulant protein C in large blood vessels involving the endothelial cell protein C receptor. *J. Exp. Med.* 187, 1029–1035.

Furuhashi, M., Miyabe, Y., and Oda, H. (1999). A case of thrombopoietin-producing ovarian carcinoma confirmed by immunohistochemistry. *Gynecol. Oncol.* 74, 278–281.

G

Gailani, D., and Renné, T. (2007). Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2507–2513.

Gandrille, S. (2008). Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica* 93, 812–816.

Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1990). Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7235–7239.

Gerotziafas, G.T., Mahé, I., and Elalamy, I. (2014). New orally active anticoagulant agents for the prevention and treatment of venous thromboembolism in cancer patients. *Ther Clin Risk Manag* 10, 423–436.

Gewirtz, A.M. (1995). Megakaryocytopoiesis: the state of the art. *Thromb. Haemost.* 74, 204–209.

Gong, J., Jaiswal, R., Dalla, P., Luk, F., and Bebawy, M. (2015). Microparticles in cancer: A review of recent developments and the potential for clinical application. *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 35–40.

Green, D., Maliekel, K., Sushko, E., Akhtar, R., and Soff, G.A. (1997). Activated-protein-C resistance in cancer patients. *Haemostasis* 27, 112–118.

Griffin, J.H., Fernández, J.A., Gale, A.J., and Mosnier, L.O. (2007). Activated protein C. *J. Thromb. Haemost.* 5 Suppl 1, 73–80.

Gu, J.M., Fukudome, K., and Esmon, C.T. (2000a). Characterization and regulation of the 5'-flanking region of the murine endothelial protein C receptor gene. *J. Biol. Chem.* 275, 12481–12488.

Gu, J.M., Katsuura, Y., Ferrell, G.L., Grammas, P., and Esmon, C.T. (2000b). Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo. *Blood* 95, 1687–1693.

Gupta, G.P., and Massagué, J. (2004). Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J. Clin. Invest.* 114, 1691–1693.

H

Haddad, T.C., and Greeno, E.W. (2006). Chemotherapy-induced thrombosis. *Thromb. Res.* 118, 555–568.

Haim, N., Lanir, N., Hoffman, R., Haim, A., Tsalik, M., and Brenner, B. (2001). Acquired activated protein C resistance is common in cancer patients and is associated with venous thromboembolism. *Am. J. Med.* 110, 91–96.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Harrison, P., and Cramer, E.M. (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 7, 52–62.

Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* 156, 1363–1380.

Heng, W., Mu, C.-Y., Chen, C., Huang, J.-A., and Wang, Z.-Y. (2013). Endothelial cell protein C receptor (EPCR) is expressed by lung carcinoma and correlated with clinical parameters. *Clin. Lab.* 59, 375–380.

Hitchcock, I.S., and Kaushansky, K. (2014). Thrombopoietin from beginning to end. *Br. J. Haematol.* 165, 259–268.

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* 1, 149–153.

Horsted, F., West, J., and Grainge, M.J. (2012). Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 9, e1001275.

I

Ikezoe, T. (2015). Thrombomodulin/activated protein C system in septic disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* 3, 1.

ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day (2014). Thrombosis: a major contributor to the global disease burden. *J Thromb Haemost* 12, 1580–1590.

J

Jerjes-Sanchez, C. (2005). Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *European Heart Journal* 26, 3–4.

Joyce, D.E., Gelbert, L., Ciaccia, A., DeHoff, B., and Grinnell, B.W. (2001). Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 11199–11203.

k

Kakkar, A.K., DeRuvo, N., Chinswangwatanakul, V., Tebbutt, S., and Williamson, R.C. (1995). Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor. *Lancet* 346, 1004–1005.

Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 392–401.

Kelemen, E., Cserhati, I., and Tanos, B. (1958). Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. *Acta Haematol.* 20, 350–355.

Kendirli, T., Ciftçi, E., Ince, E., Yurdakul, E., Kansu, A., and Akar, N. (2007). Homozygous 23-bp insertion of endothelial protein c receptor gene in a child with fatal sepsis. *Pediatr Hematol Oncol* 24, 199–204.

Keshava, S., Sahoo, S., Tucker, T.A., Idell, S., Rao, L.V.M., and Pendurthi, U.R. (2013a).

Endothelial cell protein C receptor opposes mesothelioma growth driven by tissue factor. *Cancer Res.* *73*, 3963–3973.

Keshava, S., Kothari, H., Rao, L.V.M., and Pendurthi, U.R. (2013b). Influence of endothelial cell protein C receptor on breast cancer development. *J. Thromb. Haemost.* *11*, 2062–2065.

Khorana, A.A. (2012). Cancer-associated thrombosis: updates and controversies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2012*, 626–630.

Khorana, A.A., Francis, C.W., Culakova, E., Fisher, R.I., Kuderer, N.M., and Lyman, G.H. (2006). Thromboembolism in hospitalized neutropenic cancer patients. *J. Clin. Oncol.* *24*, 484–490.

Khorana, A.A., Ahrendt, S.A., Ryan, C.K., Francis, C.W., Hruban, R.H., Hu, Y.C., Hostetter, G., Harvey, J., and Taubman, M.B. (2007). Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2870–2875.

Khorana, A.A., Kuderer, N.M., Culakova, E., Lyman, G.H., and Francis, C.W. (2008a). Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood* *111*, 4902–4907.

Khorana, A.A., Francis, C.W., Menzies, K.E., Wang, J.-G., Hyrien, O., Hathcock, J., Mackman, N., and Taubman, M.B. (2008b). Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J. Thromb. Haemost.* *6*, 1983–1985.

Kile, B.T. (2015). Aging platelets stimulate TPO production. *Nat. Med.* *21*, 11–12.

Kilpivaara, O., and Levine, R.L. (2008). JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia* *22*, 1813–1817.

Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., and Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* *19*, 543–555.

Kobayashi, H., Moniwa, N., Gotoh, J., Sugimura, M., and Terao, T. (1994). Role of activated protein C in facilitating basement membrane invasion by tumor cells. *Cancer Res.* *54*, 261–267.

Kurosawa, S., Stearns-Kurosawa, D.J., Hidari, N., and Esmon, C.T. (1997). Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma. *J. Clin. Invest.* *100*, 411–418.

L

Lanigan, F., O'Connor, D., Martin, F., and Gallagher, W.M. (2007). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 3159–3184.

Laszik, Z., Mitro, A., Taylor, F.B., Ferrell, G., and Esmon, C.T. (1997). Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* *96*, 3633–3640.

Lavigne-Lissalde, G., Cochery-Nouvellon, E., Granier, G., Quere, I., and Gris, J.-C. (2005a). Diffuse skin necrosis in a patient with an anti-endothelial cell protein C receptor autoantibody which blocks protein C activation. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 413–415.

Lavigne-Lissalde, G., Cochery-Nouvellon, E., Mercier, E., Marès, P., and Gris, J.-C. (2005b). High plasma levels of endothelial protein C receptor are associated with the risk of unexplained fetal death. *J. Thromb. Haemost.* *3*, 393–395.

Lee, A.Y.Y., and Levine, M.N. (2003). Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation* 107, I17–I21.

Levi, M., Schouten, M., and van der Poll, T. (2008). Sepsis, coagulation, and antithrombin: old lessons and new insights. *Semin. Thromb. Hemost.* 34, 742–746.

Liaw, P.C., Neuenschwander, P.F., Smirnov, M.D., and Esmon, C.T. (2000). Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. *J. Biol. Chem.* 275, 5447–5452.

Liao, S., Woulfe, T., Hyder, S., Merriman, E., Simpson, D., and Chunilal, S. (2014). Incidence of venous thromboembolism in different ethnic groups: a regional direct comparison study. *J Thromb Haemost* 12, 214–219.

Lijnen, H.R. (2001). Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 226–236.

Lip, G.Y., and Blann, A.D. (2000). Thrombogenesis and fibrinolysis in acute coronary syndromes. Important facets of a prothrombotic or hypercoagulable state? *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 2044–2046.

López-Otín, C., and Matrisian, L.M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 7, 800–808.

Lowe, G.D.O. (2003). Virchow's triad revisited: abnormal flow. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 455–457.

Lowe, G.D.O. (2008). Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. *Br. J. Haematol.* 140, 488–495.

M

Mackman, N., Tilley, R.E., and Key, N.S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1687–1693.

Mahé, I., and Chidiac, J. (2014). [Cancer-associated venous thromboembolic recurrence: disregard of treatment recommendations]. *Bull Cancer* 101, 295–301.

Malik, R., Lelkes, P.I., and Cukierman, E. (2015). Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* 33, 230–236.

Marcucci, R., and Romano, M. (2008). Thrombopoietin and its splicing variants: structure and functions in thrombopoiesis and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1782, 427–432.

Marcucci, R., Baralle, F.E., and Romano, M. (2007). Complex splicing control of the human Thrombopoietin gene by intronic G runs. *Nucleic Acids Res.* 35, 132–142.

McEachron, T.A., Pawlinski, R., Richards, K.L., Church, F.C., and Mackman, N. (2010). Protease-activated receptors mediate crosstalk between coagulation and fibrinolysis. *Blood* 116, 5037–5044.

Mirshahi, S., Soria, C., Kouchakji, B., Kierzek, G., Borg, J.Y., Varin, R., Chidiac, J., Drouet, L., Mirshahi, M., and Soria, J. (2014). New Combinational Assay Using Soluble Fibrin and D-Dimer Determinations: A Promising Strategy for Identifying Patients with Suspected Venous Thromboembolism. *PLoS One* 9.

Mirshahi, S.S., Pujade-Lauraine, E., Soria, C., Mirshahi, M., Fretault, J., Bernadou, A., and Soria, J. (1992). D-dimer and CA 125 levels in patients with ovarian cancer during antineoplastic therapy. Prognostic significance for the success of anti-cancer treatment. *Cancer* 69, 2289–2292.

Mohan Rao, L.V., Esmon, C.T., and Pendurthi, U.R. (2014). Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* 124, 1553–1562.

Montes, R., Hurtado, V., Alonso, A., Foco, L., Zonzin, P., Mannucci, P.M., and Hermida, J. (2005). Autoantibodies against the endothelial receptor of protein C are associated with acute myocardial infarction in young women. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1454–1458.

Mooberry, M.J., and Key, N.S. (2015). Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. *Cytometry A*.

Morel, O., Morel, N., Freyssinet, J.-M., and Toti, F. (2008). Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 19, 9–23.

Morrison, W.B. (2012). Inflammation and cancer: a comparative view. *J. Vet. Intern. Med.* 26, 18–31.

Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 839–849.

N

Nierodzik, M.L., Plotkin, A., Kajumo, F., and Karpatkin, S. (1991). Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J. Clin. Invest.* 87, 229–236.

Nierodzik, M.L., Kajumo, F., and Karpatkin, S. (1992). Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res.* 52, 3267–3272.

Noël, A., and Foidart, J.M. (1998). The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 215–225.

Nojima, J., Kuratsune, H., Suehisa, E., Kawasaki, T., Machii, T., Kitani, T., Iwatani, Y., and Kanakura, Y. (2002). Acquired activated protein C resistance is associated with the co-existence of anti-prothrombin antibodies and lupus anticoagulant activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Br. J. Haematol.* 118, 577–583.

Nojima, J., Iwatani, Y., Ichihara, K., Tsuneoka, H., Ishikawa, T., Yanagihara, M., Takano, T., and Hidaka, Y. (2009). Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb. Res.* 124, 127–131.

O

Ogami, K. (1996). Gene expression and transcriptional regulation of thrombopoietin. *Stem Cells* 14 Suppl 1, 148–153.

Oganesyan, V., Oganesyan, N., Terzyan, S., Qu, D., Dauter, Z., Esmon, N.L., and Esmon, C.T. (2002). The crystal structure of the endothelial protein C receptor and a bound phospholipid. *J. Biol. Chem.* 277, 24851–24854.

Okajima, K. (2004). Prevention of endothelial cell injury by activated protein C: the molecular

mechanism(s) and therapeutic implications. *Curr Vasc Pharmacol* 2, 125–133.

Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P, L.F., and Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79, 593–616.

Ott, I., Fischer, E.G., Miyagi, Y., Mueller, B.M., and Ruf, W. (1998). A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J. Cell Biol.* 140, 1241–1253.

Owens, A.P., and Mackman, N. (2011). Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 108, 1284–1297.

P

Palumbo, J.S., and Degen, J.L. (2007). Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor metastasis. *Thromb. Res.* 120 Suppl 2, S22–S28.

Pavic, M., Debourdeau, P., Aletti, M., Farge-Bancel, D., and Rousset, H. (2006). [Venous thromboembolism and cancer]. *Rev Med Interne* 27, 313–322.

Pitot, H.C., and Dragan, Y.P. (1991). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.* 5, 2280–2286.

Prandoni, P., Lensing, A.W.A., Büller, H.R., Cogo, A., Prins, M.H., Cattelan, A.M., Cuppini, S., Noventa, F., and Cate, J.W. ten (1992). Deep-Vein Thrombosis and the Incidence of Subsequent Symptomatic Cancer. *New England Journal of Medicine* 327, 1128–1133.

Prandoni, P., Lensing, A.W.A., Piccioli, A., Bernardi, E., Simioni, P., Girolami, B., Marchiori, A., Sabbion, P., Prins, M.H., Noventa, F., et al. (2002). Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 100, 3484–3488.

Preston, R.J.S., Villegas-Mendez, A., Sun, Y.-H., Hermida, J., Simioni, P., Philippou, H., Dahlbäck, B., and Lane, D.A. (2005). Selective modulation of protein C affinity for EPCR and phospholipids by Gla domain mutation. *FEBS J.* 272, 97–108.

Q

Qu, D., Wang, Y., Song, Y., Esmon, N.L., and Esmon, C.T. (2006). The Ser219-->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *J. Thromb. Haemost.* 4, 229–235.

Qu, D., Wang, Y., Esmon, N.L., and Esmon, C.T. (2007). Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17. *J. Thromb. Haemost.* 5, 395–402.

R

Regan, L.M., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Mollica, J., Fukudome, K., and Esmon, C.T. (1996). The endothelial cell protein C receptor. Inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 271, 17499–17503.

Reininger, A.J. (2008). Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia* 14 Suppl 5, 11–26.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 73–91.

Rojnuckarin, P., Drachman, J.G., and Kaushansky, K. (1999). Thrombopoietin-Induced Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Normal Megakaryocytes: Role in Endomitosis. *Blood* 94, 1273–1282.

Rønnov-Jessen, L., Petersen, O.W., Koteliansky, V.E., and Bissell, M.J. (1995). The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 95, 859–873.

Rouyez, M.C., Boucheron, C., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I., and Porteu, F. (1997). Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4991–5000.

Rumbaut, R.E., and Thiagarajan, P. (2010). Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* 2, 1–75.

S

Sadler, J.E. (1997). Thrombomodulin structure and function. *Thromb. Haemost.* 78, 392–395.

Sakai, T., and Kisiel, W. (1990). Binding of human factors X and Xa to HepG2 and J82 human tumor cell lines. Evidence that factor Xa binds to tumor cells independent of factor Va. *J. Biol. Chem.* 265, 9105–9113.

Sandset, P.M. (1996). Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)--an update. *Haemostasis* 26 *Suppl* 4, 154–165.

Saposnik, B., Reny, J.-L., Gaussem, P., Emmerich, J., Aiach, M., and Gandrille, S. (2004). A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis. *Blood* 103, 1311–1318.

Sasaki, Y., Takahashi, T., Miyazaki, H., Matsumoto, A., Kato, T., Nakamura, K., Iho, S., Okuno, Y., and Nakao, K. (1999). Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms. *Blood* 94, 1952–1960.

Satoh, T., Uehara, Y., and Kaziro, Y. (1992). Inhibition of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulated increase of active ras.GTP by herbimycin A, a specific inhibitor of tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 267, 2537–2541.

Schulman, S., Zondag, M., Linkins, L., Pasca, S., Cheung, Y.W., de Sancho, M., Gallus, A., Lecumberri, R., Molnar, S., Ageno, W., et al. (2015). Recurrent venous thromboembolism in anticoagulated patients with cancer: management and short-term prognosis. *J. Thromb. Haemost.* 13, 1010–1018.

Schwarzbach, C.J., Schaefer, A., Ebert, A., Held, V., Bolognese, M., Kablau, M., Hennerici, M.G., and Fatar, M. (2012). Stroke and cancer: the importance of cancer-associated hypercoagulation as a possible stroke etiology. *Stroke* 43, 3029–3034.

Shacter, E., and Weitzman, S.A. (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 16, 217–226, 229; discussion 230–232.

Shen, V.S., and Pollak, E.W. (1980). Fatal pulmonary embolism in cancer patients: is heparin prophylaxis justified? *South. Med. J.* 73, 841–843.

Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., and Bissell, M.J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128, 3117–3131.

Sinauridze, E.I., Kireev, D.A., Popenko, N.Y., Pichugin, A.V., Panteleev, M.A., Krymskaya, O.V., and Ataullakhanov, F.I. (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* 97, 425–434.

Souyri, M., Vigon, I., Penciolelli, J.F., Heard, J.M., Tambourin, P., and Wendling, F. (1990). A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 63, 1137–1147.

Stenflo, J. (1976). A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J. Biol. Chem.* 251, 355–363.

Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719–724.

T

Taylor, F.B., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S., Ferrell, G., Chang, A.C., Laszik, Z., Kosanke, S., Peer, G., and Esmon, C.T. (2000). The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 95, 1680–1686.

Tesse, A., Martínez, M.C., Meziani, F., Hugel, B., Panaro, M.A., Mitolo, V., Freyssinet, J.-M., and Andriantsitohaina, R. (2006). Origin and biological significance of shed-membrane microparticles. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6, 287–294.

Thomas, G.M., Brill, A., Mezouar, S., Crescence, L., Gallant, M., Dubois, C., and Wagner, D.D. (2015). Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* 13, 1310–1319.

Timp, J.F., Braekkan, S.K., Versteeg, H.H., and Cannegieter, S.C. (2013). Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood* 122, 1712–1723.

Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349–363.

Trousseau, A. (1865). Phlegmasia albadolens. *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris.* J.B. Ballière et Fils 3, 654–712.

Tsukishiro, S., Suzumori, N., Nishikawa, H., Arakawa, A., and Suzumori, K. (2008). Preoperative serum thrombopoietin levels are higher in patients with ovarian cancer than with benign cysts. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 140, 67–70.

U

Uno, K., Homma, S., Satoh, T., Nakanishi, K., Abe, D., Matsumoto, K., Oki, A., Tsunoda, H., Yamaguchi, I., Nagasawa, T., et al. (2007). Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 96, 290–295.

V

Van de Wouwer, M., Collen, D., and Conway, E.M. (2004). Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 1374–1383.

van Hinsbergh, V.W., Bauer, K.A., Kooistra, T., Kluft, C., Dooijewaard, G., Sherman, M.L., and Nieuwenhuizen, W. (1990). Progress of fibrinolysis during tumor necrosis factor infusions in humans. Concomitant increase in tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, and fibrin(ogen) degradation products. *Blood* *76*, 2284–2289.

Van Os, E., Wu, Y.-P., Pouwels, J.G., Ijsseldijk, M.J.W., Sixma, J.J., Akkerman, J.W.N., De Groot, P.G., and Van Willigen, G. (2003). Thrombopoietin increases platelet adhesion under flow and decreases rolling. *Br. J. Haematol.* *121*, 482–490.

Viale, P.H. (2005). Abnormal clotting in cancer: an overview of pathophysiology and etiology. *Semin Oncol Nurs* *21*, 12–20.

Vigon, I., Mornon, J.P., Cocault, L., Mitjavila, M.T., Tambourin, P., Gisselbrecht, S., and Souyri, M. (1992). Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 5640–5644.

W

Wahrenbrock, M., Borsig, L., Le, D., Varki, N., and Varki, A. (2003). Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J. Clin. Invest.* *112*, 853–862.

Walker, A.J., Card, T.R., West, J., Crooks, C., and Grainge, M.J. (2013). Incidence of venous thromboembolism in patients with cancer - a cohort study using linked United Kingdom databases. *Eur. J. Cancer* *49*, 1404–1413.

Weiler, H. (2011). Multiple receptor-mediated functions of activated protein C. *Hamostaseologie* *31*, 185–195.

Wells, P.S., Anderson, D.R., Rodger, M., Stiell, I., Dreyer, J.F., Barnes, D., Forgie, M., Kovacs, G., Ward, J., and Kovacs, M.J. (2001). Excluding pulmonary embolism at the bedside without diagnostic imaging: management of patients with suspected pulmonary embolism presenting to the emergency department by using a simple clinical model and d-dimer. *Ann. Intern. Med.* *135*, 98–107.

Wendling, F., Varlet, P., Charon, M., and Tambourin, P. (1986). MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* *149*, 242–246.

White, R.H., Chew, H., and Wun, T. (2007). Targeting patients for anticoagulant prophylaxis trials in patients with cancer: who is at highest risk? *Thromb. Res.* *120 Suppl 2*, S29–S40.

Wiestner, A., Schlemper, R.J., van der Maas, A.P., and Skoda, R.C. (1998). An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. *Nat. Genet.* *18*, 49–52.

Willemse, J.L., and Hendriks, D.F. (2007). A role for procarboxypeptidase U (TAFI) in thrombosis. *Front. Biosci.* *12*, 1973–1987.

Wilson, C.L., Ouellette, A.J., Satchell, D.P., Ayabe, T., López-Boado, Y.S., Stratman, J.L., Hultgren, S.J., Matrisian, L.M., and Parks, W.C. (1999). Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 286, 113–117.

Wolberg, A.S., Aleman, M.M., Leiderman, K., and Machlus, K.R. (2012). Procoagulant Activity in Hemostasis and Thrombosis: Virchow's Triad Revisited. *Anesth Analg* 114, 275–285.

Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288.

Wun, T., and White, R.H. (2009). Venous thromboembolism (VTE) in patients with cancer: epidemiology and risk factors. *Cancer Invest.* 27 *Suppl 1*, 63–74.

X

Xu, J., Qu, D., Esmon, N.L., and Esmon, C.T. (2000). Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 6038–6044.

Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F., and Esmon, C.T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 15, 1318–1321.

Y

Ye, X., Fukudome, K., Tsuneyoshi, N., Satoh, T., Tokunaga, O., Sugawara, K., Mizokami, H., and Kimoto, M. (1999). The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 671–677.

Z

Zwicker, J.I., Furie, B.C., and Furie, B. (2007). Cancer-associated thrombosis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62, 126–136.

ANNEXES

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai pu participer à une collaboration de Massoud Mirshahi avec Christian Billard dont le thème de recherche concerne les mécanismes d'action d'agents inducteurs d'apoptose afin de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce travail collaboratif a porté sur les nouvelles stratégies de traitement des cancers qui ciblent le rétablissement de la mort cellulaire apoptotique et les protéines de la famille BCL-2. L'apoptose est un programme physiologique qui intervient au cours du développement et de l'homéostasie tissulaire, et qui est aussi destiné à éliminer les cellules endommagées et dangereuses. L'échappement à l'apoptose est caractéristique de nombreux cancers. Il est en effet fréquemment impliqué dans le développement tumoral et c'est un mécanisme important de résistance thérapeutique. Certains cancers restent d'ailleurs incurables à cause de l'incapacité des cellules malignes à développer le programme apoptotique, et la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en est un exemple typique.

Cette collaboration a été l'objet de trois publications. La première concerne les stratégies ciblant les protéines impliquées dans le contrôle de l'apoptose dépendante des caspases pour améliorer les traitements de la LLC. La seconde est une mise à jour des agents dits « BH3 *mimetics* » ciblant les protéines de la famille BCL-2 qui régulent la voie mitochondriale de l'apoptose. Cet article souligne les perspectives novatrices qui sont offertes par les derniers composés identifiés. La troisième publication est un commentaire sur les premiers « BH3 *mimetics* » spécifiques de MCL-1 (une protéine unique de survie) qui viennent d'être découverts, mettant en évidence leur potentiel thérapeutique pour le traitement ciblé des cancers.

Stratégies ciblant les protéines d'apoptose pour améliorer la thérapie de la leucémie lymphoïde chronique

Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia

Samaher Besbes, Massoud Mirshahi, Marc Pocard and Christian Billard.

Blood Reviews, 2015 [Epub ahead of print].

Dans la voie mitochondriale de l'apoptose, la perméabilisation de la membrane mitochondriale provoque la libération du cytochrome c et d'autres facteurs apoptogènes tel que SMAC (*second mitochondrial activator of caspases*) qui permettent l'activation des caspases (famille de protéases qui sont les acteurs de la démolition cellulaire). L'activation des caspases est régulée négativement par des antagonistes de la famille de protéines IAP (*inhibitor of apoptosis protein*). La perméabilisation de la membrane mitochondriale est strictement contrôlée par les protéines de la famille BCL-2 qui comprennent les membres pro-survie (notamment BCL-2, BCL-XL, MCL-1) et les membres pro-apoptotiques de deux types : les « BH3-only » (dont BIM, PUMA, BAD, NOXA) et les effecteurs de la perméabilisation (surtout BAX et BAK). L'activité fonctionnelle des membres pro-survie est de séquestrer les protéines pro-apoptotiques sous forme de complexes inactifs. En cas de stress apoptotique, les BH3-only sont activées, et elles interagissent avec les protéines de survie ; ceci permet le relargage de BAX et BAK et leur activation. Ces dernières peuvent aussi être activées directement par certaines protéines BH3-only. Ces différentes interactions gouvernent donc la perméabilisation de la membrane mitochondriale et donc l'équilibre survie/apoptose de la cellule.

La LLC est un modèle exemplaire de cancer impliquant un défaut d'apoptose. Ceci se traduit par l'accumulation des lymphocytes leucémiques (quiescents) dans le sang périphérique. Malgré les avancées récentes des protocoles de chimio-immunothérapie, cette maladie reste incurable. Différentes stratégies visant à rétablir la machinerie apoptotique ont donc été étudiées pour améliorer les traitements des patients : (1) l'inhibition de l'expression des facteurs pro-

survie des familles BCL-2 et IAP à l'aide d'oligonucléotides antisenses et d'inhibiteurs indirects et non spécifiques de la transcription tels que les CDK (*cyclin-dependent kinases*), (2) l'inhibition de l'activité fonctionnelle des protéines de survie des familles BCL-2 et IAP avec, respectivement, des « BH3 *mimetics* » et des « SMAC *mimetics* » et (3) la régulation positive de l'expression des protéines pro-apoptotiques BH3-only avec des inhibiteurs du protéasome et des histones désacétylases (HDAC). Des résultats cliniques prometteurs ont été enregistrés avec les inhibiteurs de CDK et surtout avec des BH3 *mimetics* (navitoclax, ABT-199) qui ciblent BCL-XL et/ou BCL-2 avec une haute affinité. Les BH3 *mimetics* imitent les protéines BH3-only en antagonisant les protéines de survie et en induisant l'apoptose. Ces données indiquent que les BH3 *mimetics* sont d'un grand intérêt pour des thérapies combinatoires dans la LLC.



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/blre

REVIEW

Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia

Samaher Besbes, Massoud Mirshahi, Marc Pocard, Christian Billard ^{*}INSERM U965, Hôpital Lariboisière, Paris, France
Université Paris Diderot-Paris 7, UMR 5965, Paris, France

article info

Available online xxxx

Keywords:

CLL
Apoptosis reactivation
Targeting proteins regulating apoptosis
Bcl-2 family
IAP proteins
BH3 mimetics

abstract

A typical feature of chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the impaired ability of the leukemic cells to execute their apoptotic suicide program. Various strategies have been developed to restore apoptosis in CLL cells *ex vivo*. This article reviews the strategies targeting proteins that directly regulate the mitochondrial pathway of apoptosis and caspase activation: (i) inhibiting the expression or activity of pro-survival proteins of the Bcl-2 and IAP (inhibitor of apoptosis protein) families, which are overexpressed in CLL cells and (ii) upregulating proapoptotic BH3-only members of the Bcl-2 family (which are antagonists of the pro-survival members). Preclinical and clinical data have revealed that inhibiting the activity of pro-survival Bcl-2 proteins with BH3 mimetics (so-called because they mimic BH3-only proteins) is an attractive strategy for CLL therapy. Recent results suggest that the development of BH3 mimetics capable of directly activating the apoptosis effectors Bax and Bak may also be envisaged.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Apoptosis is a cell death program occurring in either physiological or pathological conditions to eliminate useless and dangerous cells. The apoptotic program is executed by specific proteases belonging to the family of caspases, which are activated in response to various stress signals through two distinct pathways: the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway [1]. In the latter, the permeabilization of the mitochondrial outer membrane elicits the release in the cytoplasm of two critical molecules: cytochrome c that triggers the cascade of caspase activation and second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC) that neutralizes the activity of caspase antagonists called inhibitors of apoptosis proteins (IAP). The mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) is strictly regulated by proteins of the Bcl-2 family (sharing one to four domains of Bcl-2 homology, BH1 to BH4). This family is divided into three subfamilies: antiapoptotic members (Bcl-2 and the closely related Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 and A1) and two proapoptotic subfamilies: first, BH3-only proteins (so-called because they have only the BH3 domain, such as Puma, Bim, Noxa, Bid), which are antagonists of the antiapoptotic members, and second, the MOMP executioners (mainly Bax and Bak). Specific interactions between proteins of the three subfamilies control

Bax and Bak activation and thus MOMP: notably antiapoptotic members sequester Bax and Bak, and the interactions of BH3-only proteins with the antiapoptotic members induce Bax/Bak release and activation; some of the BH3-only proteins can also directly activate Bax and Bak [1].

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the clonal expansion and accumulation of a CD5-positive subpopulation of B cells in the blood, bone marrow, lymph node and spleen. This condition is thought to derive from an imbalance between proliferation and apoptosis. Contrarily to normal B lymphocytes, the leukemic cells accumulating in the blood are mostly unable to trigger their suicide program. This typical feature of CLL results from both defective mechanisms in the leukemic cells and an excess of survival signals delivered by microenvironment cells [2–6]. Hence, the transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B), the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathway (that leads to the phosphorylation of many apoptosis-related proteins) and pathways involved in the B-cell receptor (BCR) signaling are constitutively activated, which stimulates the transcription of numerous antiapoptotic proteins and their overexpression. The main overexpressed antiapoptotic factors in CLL cells are members of the IAP family such as X-linked IAP (XIAP) and the Bcl-2 family proteins Bcl-2 and Mcl-1 [4–6]. The crucial role of Mcl-1 in drug resistance, disease progression and outcome in CLL patients is now well documented [7]. In some CLL cases, losses of micro-interfering RNAs miR-15a and miR-16 due to the common deletion 13q14 (resulting in Bcl-2 overexpression) [8] and inactivation of p53 (allowing the transcription of proapoptotic molecules, including the BH3-only proteins Puma and Noxa) also contribute to the apoptosis deficiency.

^{*} Corresponding author at: INSERM U965, Hôpital Lariboisière, 41 Bd de la Chapelle, 75010 Paris, France. Tel.: + 33 1 5321 6750; fax: + 33 1 5321 6739.
E-mail address: christian.billard@inserm.fr (C. Billard).

Despite recent progress of chemo-immunotherapy [9], CLL is still incurable. Designing novel apoptosis-based therapeutic strategies thus appeared important for improving the treatment of CLL patients. Two main types of strategies have been investigated: (i) targeting proteins that directly regulate the MOMP and caspase activation in leukemic cells and (ii) indirect strategies of interfering with survival signals arising from microenvironment cells. As regards the latter, the inactivation of the PI3K/AKT, NF- κ B and BCR signaling pathways turned out to be promising in clinical trials with some agents such as idelalisib (a PI3K δ isoform inhibitor) [10] and ibrutinib (a Bruton tyrosine kinase inhibitor) [11]. The inactivation of other types of microenvironment signals with chemokine receptor inhibitors or lenalidomide for example as well as indirect activation of the p53 pathway by various agents (e.g., nutlins) also appeared of interest for CLL therapy. These indirect strategies have been extensively documented [2–6,12–17].

The present article reviews direct strategies targeting molecules that control the initial events in triggering mitochondrial apoptosis (i.e., MOMP and caspase activation): first, inhibiting the expression or activity of prosurvival Bcl-2 and IAP family proteins and second, upregulating proapoptotic BH3-only proteins. Preclinical studies showing that these strategies can reactivate apoptosis in CLL cells and available clinical data are recapitulated and perspectives for the development of novel CLL therapeutics are discussed.

2. Inhibition of prosurvival protein expression

2.1. Specific inhibition of Bcl-2 and XIAP protein expression

Attempts to specifically inhibit the expression of prosurvival proteins were performed by using antisense oligonucleotides that target mRNA for degradation. Several antisense oligonucleotides targeting Bcl-2 (e.g., oblimersen) were designed and extensively studied. However clinical trials with oblimersen in CLL were unsuccessful probably because of off-target effects [18–20]. Antisense oligonucleotides targeting caspase inhibitors of the IAP family were also generated, including an XIAP inhibitor (AEG35156), which was found to induce apoptosis in CLL cells, but no significant therapeutic effects were recorded in CLL patients with this type of compounds [21–23]. Another possibility to selectively inhibit antiapoptotic protein expression is silencing with small interfering RNA (siRNA) or short hairpin RNA (shRNA) that mimics endogenous micro-interfering RNA (miR). Actually, Mcl-1 siRNA can induce CLL cell death in vitro [24], and both miR-15a1 and miR-16-1 can downregulate Bcl-2 and provoke apoptosis in a leukemic cell model [8]. However, the treatment of patients with siRNA or shRNA comes up against difficulties [25,26].

2.2. Non-specific transcriptional inhibition of Bcl-2 and IAP family proteins

This strategy turned out to be of great interest by using notably flavopiridol, which is a well known and potent inducer of apoptosis in CLL patients' cells ex vivo [27]. Indeed, this plant-derived flavonoid can reduce the transcriptional activity of RNA Polymerase II via its property of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor [28]. This effect of flavopiridol on transcription is not specific and affects mainly short-lived proteins, including many antiapoptotic proteins such as Mcl-1 and Bcl-xL (but not Bcl-2), several IAP (XIAP, c-IAP-2, survivin), c-Myc (a transcriptional activator of Mcl-1) and Mdm-2 (a p53 antagonist) [28,29]. The transcriptional inhibition of Mcl-1 and XIAP is the major mechanism by which flavopiridol exerts its proapoptotic effects in CLL cells [27–29]. Although the first clinical trials of flavopiridol in CLL patients did not prove convincing [30], a phase II study using a novel pharmacologically based schedule has provided significant results with treatment responses in 53% of the patients and increases in progression-free survival time [31]. While predictive markers for toxicity of flavopiridol remain to be defined, its combination with chemo-immunotherapy has been recently proposed to eradicate residual CLL

disease [30]. Other CDK inhibitors such as SNS-032 and dinaciclib are also apoptosis inducers in CLL cells by downregulating mainly Mcl-1 and XIAP expression [32,33], and their clinical evaluation is ongoing. Furthermore, translation inhibition that preferably targets labile proteins is another approach to downregulate antiapoptotic proteins such as Mcl-1. Homoharringtonine and silvestrol are two translational inhibitors capable of inducing CLL cell apoptosis via Mcl-1 downregulation [34,35]. While silvestrol exerts in vivo antileukemic activity in the TCL-1 transgenic mouse model of CLL [35], it is not known whether translation inhibitors have therapeutic activity in CLL patients.

3. Inhibition of prosurvival protein activity

3.1. Bcl-2 family proteins

The BH3 mimetic concept has proposed that small molecules capable of mimicking BH3-only proteins might be useful for anticancer therapy [36,37]. This concept is based on the fact that BH3-only proteins are the natural, specific antagonists of prosurvival Bcl-2 family members (whose activity is to sequester the MOMP effectors Bax and Bak). Such BH3 mimetic compounds should bind to the prosurvival Bcl-2 proteins and antagonize their activity, resulting in Bax/Bak release and activation, and thus apoptosis induction [37]. The various BH3 mimetics that have been designed are short peptides modeled on BH3 domains or small organic molecules (identified by screening either natural product libraries or computer-designed compounds for their capacity to interact with Bcl-2 proteins). There are two main criteria to define an authentic BH3 mimetic: binding to the targets with the same high affinity as the BH3-only proteins and induction of Bax/Bak-dependent apoptosis [37]. Some putative BH3 mimetics do not fully respond to these criteria and act via off-target effects (e.g., generation of reactive oxygen species (ROS), endoplasmic reticulum stress response, induction of the BH3-only Noxa, caspase-independent or autophagic cell death) [37,38].

The organic molecule ABT-737 is an authentic BH3 mimetic [37,38]. By binding to Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w (but not Mcl-1 or A1) [39,40], it induces mitochondrial apoptosis of CLL cells [41]. Its oral derivative ABT-263 (navitoclax), which has been designed for clinical application [42], has shown significant therapeutic activity in a phase I dose-escalation study in relapsed or refractory CLL patients, with a partial response rate of 35% and satisfactory progression-free survival of 25 months [43]. The ABT-199 derivative that binds only to Bcl-2 has been further developed in order to prevent the marked thrombocytopenia caused by navitoclax (resulting from Bcl-xL inhibition) [44]. ABT-199 can also trigger CLL cell apoptosis [45,46] and has proved promising in a clinical trial with reduced tumor burden in the first three CLL patients recruited [44]. The antileukemic activity of ABT-199 in CLL was further confirmed with 84% of overall response rate, including 20% of complete responses [47].

Two putative BH3 mimetics were found to promote mitochondrial apoptosis in CLL cells: obatoclax (synthesized from screening a natural product library), which binds to all prosurvival Bcl-2 proteins albeit with low affinity [48,49], and gossypol, a plant-derived polyphenol [50,51]; both were further shown to act at least partly through off-target mechanisms [37,38,52]. The gossypol's isomer AT-101 is more active and overcomes stroma-mediated Mcl-1 induction and apoptosis resistance in vitro [53]. However, neither of these agents has shown significant therapeutic effects in clinical trials in CLL; phase II studies of obatoclax in combination with other drugs are ongoing [54,55].

3.2. IAP family proteins

The strategy to mimic SMAC (the endogenous antagonist of IAP activities) has also been developed [21]. Although a monovalent small molecule designed to bind to the IAP BIR3 domain and capable of antagonizing XIAP displays proapoptotic properties in CLL cells [22], no

therapeutic benefits in CLL patients have been so far reported with SMAC mimetics [23].

4. Upregulation of proapoptotic protein expression

The expression of a large number of proteins, including proapoptotic molecules, is regulated by the proteasome that attends to the proteolytic degradation of ubiquitin-tagged proteins [56]. The strategy of inhibiting proteasomal activity was therefore developed to increase protein stability and accumulation [56,57]. Various types of proteasome inhibitors (whose prototype is bortezomib) can increase the levels of proapoptotic proteins such as the BH3-only Bcl-2 family members Noxa, Bim and Puma, p53 and I κ B (the physiologic inhibitor of NF- κ B) [56,57]. Most proteasome inhibitors have the ability to induce caspase-dependent mitochondrial apoptosis in CLL cells through a mechanism involving mainly upregulation of the BH3-only protein Noxa [58,59]. This is also the case for plant-derived proteasome inhibitors such as the phloroglucinol hyperforin [60] or the flavonoid epigallocatechin gallate (EGCG) [56,61]. Furthermore, proapoptotic protein expression can also be enhanced by the inactivation of histone deacetylases (HDACs): these enzymes are overexpressed in many cancers, including CLL in which they mediate epigenetic silencing of miR-15a, miR-16 and miR-29b [62]. Therefore, the strategy to inactivate HDACs in CLL cells has been extensively investigated: several HDAC inhibitors are capable of inducing leukemic cell death through transcriptional activation and upregulation of the BH3-only proteins Noxa and Bim [63,64].

However, proteasome inhibitors (including bortezomib) and HDAC inhibitors (such as depsipeptide and MGCD-0103) have not shown significant therapeutic activity in phase I/II clinical trials in CLL [65–67]. This may be due to the fact that these agents upregulate various types of proteins, including the crucial prosurvival Mcl-1 [68]. In contrast, the natural proteasome inhibitor EGCG—known for its multiple effects, including Mcl-1 and XIAP downregulation [61]—was reported to reduce lymphocytosis and adenopathy in 69% of CLL patients [69]. Furthermore, clinical trials in CLL are ongoing to evaluate the effects of combining some proteasome or HDAC inhibitors with other agents such as Mcl-1 inhibitors, BH3 mimetics and chemotherapeutics.

5. Possible strategy of stimulating proapoptotic protein activity

The putative BH3 mimetic obatoclax can neither bind to prosurvival Bcl-2 proteins with high affinity nor induce Bax/Bak-dependent apoptosis [37]. Nevertheless, this agent was recently reported to directly activate the proapoptotic protein Bax (a MOMP executioner) in cholangiocarcinoma cells [70], suggesting that it could mimic an “activator” BH3-only protein. Proof of concept that BH3 mimetics may be designed to directly activate proapoptotic proteins has been provided by Gavathiotis et al.: they characterized a BH3 peptide (derived from the BH3-only protein Bim), which interacts with Bax at a site that directly triggers its activation [71], and they used this compound to identify a small molecule (BAM7) capable of activating Bax and eliciting Bax-mediated apoptosis in Bak-deficient cells [72]. Interestingly, a BH3 peptide modeled on the BH3-only protein Puma can trigger caspase activation and apoptosis in neuroblastoma cells by having the dual capacity to directly activate Bax and inhibit the antiapoptotic Bcl-2 and Mcl-1 proteins [73]. In addition, the other MOMP executioner Bak can also be directly activated by a Puma BH3 peptide resulting in induction of MOMP and cell death [74]. Although it is not presently known whether these new BH3 mimetic compounds are capable of inducing apoptosis in CLL cells, the above data indicate that the strategy to directly stimulate the activity of proapoptotic proteins such as the MOMP effectors Bax and Bak has now to be considered.

6. Discussion and perspective

The different strategies targeting molecules that directly regulate MOMP and caspase activation in CLL cells are summarized in Fig. 1. Although these strategies have attracted much attention in many biological studies, only a few clinical data in CLL are available (Table 1). Consistent antileukemic effects in CLL patients have been observed by using the strategies to inhibit either the activity of antiapoptotic Bcl-2 proteins (with authentic BH3 mimetics of the ABT series that are highly specific for their targets) or the expression of Mcl-1 and XIAP (with the CDK inhibitor flavopiridol). By contrast, the strategies to upregulate proapoptotic proteins (with proteasome or HDAC inhibitors) were disappointing with the exception of clinical data reported on the natural proteasome inhibitor EGCG, which may be due to multiple properties

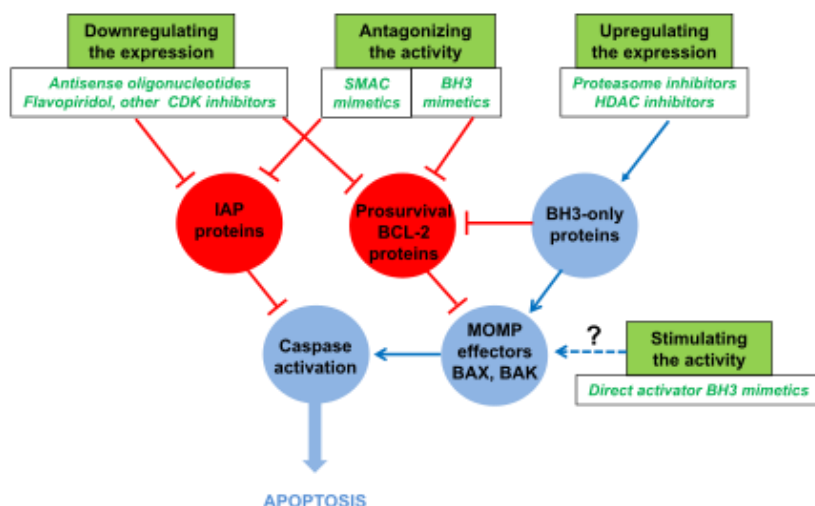


Fig. 1. Strategies targeting molecules that directly regulate MOMP and caspase activation to reactivate mitochondrial apoptosis in CLL cells. The three main strategies and a fourth possible strategy figure in green boxes; the agents used are mentioned underneath in italics. Prosurvival proteins are represented in red circles and proapoptotic molecules in blue circles. Blue arrows indicate positive effects (upregulation/activation) and red minus-ended lines represent negative effects (downregulation/inactivation). MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization; IAP: inhibitor of apoptosis protein; SMAC: second mitochondria-derived activator of caspase; BH3: Bcl-2 homology domain-3; BH3-only proteins: proapoptotic Bcl-2 family proteins having only the BH3 domain; HDAC: histone deacetylase.

Please cite this article as: Besbes S, et al, Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia, Blood Rev (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.03.005>

Table 1
Current status of agents targeting apoptosis proteins in chronic lymphocytic leukemia.

Agents	Targets	Clinical stage	Latest clinical outcomes	Reference
Antisense oligonucleotides				
Oblimersen	Bcl-2	Phase II (combinations in phase III)	NS	[19]
AEG35156	XIAP	Phase I/II (terminated)	NS	[23]
CDK inhibitors				
Mainly Mcl-1 and XIAP				
Flavopiridol				
SNS-032		Phase II (combinations ongoing)	53%ORR	[31]
Dinaciclub		Phase I	NS	[88]
		Phase II	54%ORR	[89]
BH3 mimetics				
Navitoclax		Phase II	35%ORR (0%CR)	[43]
ABT-199	Bcl-2	Phase I (combinations in phase III)	84%ORR (23%CR)	[47]
Obatodax	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1	Phase I/II (combinations ongoing)	4%ORR (0%CR)	[90]
Gossypol/AT-101	Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1	Phase I/II (combinations in phase III)	NS	[91]
SMAC mimetics				
Small molecule binding the IAP BIR3 domain		Mainly XIAP	No active trial	Not reported
Proteasome Inhibitors				
Mainly Noxa (also Bim, Puma, p53, IκB)				
Bortezomib		Phase II (combinations ongoing)	NS	[65]
Carfilzomib		Phase I (recruiting)	Not yet	[92]
EGCG		Phase II	69%hematologic responses	[69]
HDAC inhibitors				
Notably Noxa and Bim				
Depsipeptide		Phase I/II (combinations ongoing)	NS	[66]
MGCD-0103			NS	[67]

CDK = cyclin-dependent kinase, BH3 = Bcl-2 homology domain-3, SMAC = second mitochondria-derived activator of caspases, IAP = inhibitor of apoptosis protein, EGCG = epigallocatechin gallate, HDAC = histone deacetylase, NS = not significant, ORR = overall response rate, CR = complete responses.

of the compound and remain to be confirmed. From these data, it seems that targeting antiapoptotic proteins has a higher therapeutic potential for CLL than targeting proapoptotic molecules. Nevertheless, results of various ongoing clinical studies will be critical, notably trials combining agents with different mechanisms of action (BH3 mimetics, flavopiridol or other CDK inhibitors, proteasome and HDAC inhibitors).

The strategy of antagonizing the antiapoptotic activity of Bcl-2 proteins with BH3 mimetics is particularly attractive [75] and appears as a future way to improve CLL treatment. Indeed, significant clinical results were recorded with navitoclax (targeting Bcl-2 and Bcl-xL) and ABT-199 (targeting selectively Bcl-2). A recent review has discussed these data in detail and pinpointed many questions yet to be resolved for targeting Bcl-2 as part of combination therapy in CLL and several other lymphoid malignancies [76]. An important issue relates to the resistance to BH3 mimetics of the ABT series, due to the fact that they cannot antagonize the antiapoptotic proteins Mcl-1 and A1. Mcl-1 plays a crucial role in CLL pathogenesis and resistance to conventional therapy and numerous studies have suggested that navitoclax might be used in combination with various agents that can inhibit the expression of Mcl-1 [77]. The role of A1 in the resistance of CLL cells to ABT-737 and fludarabine has also been documented [78–80]. Consequently, novel types of BH3 mimetics should be generated such as antagonists specific for Mcl-1 or A1, and pan-BH3 mimetics (capable of antagonizing a wide range of prosurvival Bcl-2 family proteins, e.g., Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1). Several prototypes of these new BH3 mimetics have already been identified, as for example MIM 1 [81] and other Mcl-1-specific inhibitors [82–84], the first small molecule targeting A1 [85] and two pan-BH3 mimetics, Bim SAHB and JY-106 [86,87]. Such small molecules or their derivatives would deserve to be evaluated for their proapoptotic capacities in CLL cells and eventual therapeutic potential in patients.

Lastly, the BH3 mimetic concept has led to the recent discovery of novel compounds that can directly activate the MOMP effectors Bax and Bak [71–74]. This indicates that advances in CLL treatment may arise from strategies of not only antagonizing prosurvival proteins but also activating directly proapoptotic members of the Bcl-2 family.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- [1] Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J* 2011;30:3667–87.
- [2] Kolb JP, Kern C, Quiney C, Roman V, Billard C. Re-establishment of a normal apoptotic process as a therapeutic approach in B-CLL. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003;3:261–86.
- [3] Chen L, Balakrishnan K, Gandhi V. Inflammation and survival pathways: chronic lymphocytic leukemia as a model system. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1936–45.
- [4] Packham G, Stevenson FK. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukemia. *Immunology* 2005;114:441–9.
- [5] Pleyer L, Egle A, Hartmann TN, Greil R. Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:405–18.
- [6] Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol* 2014;24:71–81.
- [7] Pepper C, Lin TT, Pratt G, Hewamana S, Brenman P, Hillier L, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008;112:3807–17.
- [8] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;27:13944–9.
- [9] Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2013;88:804–16.
- [10] Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014;370:997–1007.
- [11] Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013;369:32–42.
- [12] Chang JE, Kahl BS. PI3K-kinase inhibitors in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2014;9:33–43.
- [13] Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:88–96.
- [14] Veliz M, Pinilla-Ibarz I. Treatment of relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control* 2012;19:37–53.
- [15] Gonzalez-Rodriguez AP, Payer AR, Acebes-Huerta A, Huergo-Zapico L, Villa-Alvarez M, Gonzalez-Garcia E, et al. Lenalidomide and chronic lymphocytic leukemia. *Biomol Res Int* 2013;2013:932010.
- [16] Badoux XC, Keating MG, Wen S, Wierda WG, O'Brien SM, Faderl S, et al. Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31:584–91.
- [17] Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, Cosialls AM, de Frias M, Castaño E, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006;107:4109–14.
- [18] O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larrat LM, Skotnicki AB, Kosiner B, et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol* 2009;27:5208–12.
- [19] Davids MS, Letai A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:3127–35.
- [20] Yu B, Mao Y, Bai LY, Herman SEM, Wang X, Ramanunni A, et al. Targeted nanoparticle delivery overcomes off-target immunostimulatory effects of

Please cite this article as: Besbes S, et al, Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia, *Blood Rev* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.03.005>

- oligonucleotides and improves therapeutic efficacy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:136–47.
- [21] LaCasse EC. Pulling the plug on a cancer cell by eliminating XIAP with AEG35156. *Cancer Lett* 2013;332:215–24.
- [22] Loeder S, Zenz T, Schnaier A, Mertens D, Winkler D, Döhner H, et al. A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2009;69:8977–86.
- [23] Fulda S. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in hematological malignancies: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 2014;28:1414–22.
- [24] Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MS, Caligiuri MA, et al. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: downregulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2007;13:144–50.
- [25] Seth S, Johns R, Templin MV. Delivery and biodistribution of siRNA for cancer therapy: challenges and future prospects. *Ther Deliv* 2012;3:245–61.
- [26] Lu PY, Xie F, Woodie MC. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet* 2005;54:117–42.
- [27] Byrd JC, Shinn C, Wasilenko JK, Fuchs EJ, Lehman TA, Nguyen PL, et al. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood* 1998;92:3804–16.
- [28] Blagosklonny MV. Flavopiridol, an inhibitor of transcription. *Cell Cycle* 2004;3:1537–42.
- [29] Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 2005;10:2513–9.
- [30] Christian BA, Grever MR, Byrd JC, Lin TS. Flavopiridol in chronic lymphocytic leukemia: a concise review. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9(Suppl. 3):S179–85.
- [31] Lin TS, Ruppert AS, Johnson AJ, Fischer B, Heerema NA, Andritsos LA, et al. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J Clin Oncol* 2009;27:6012–8.
- [32] Chen R, Wierda WG, Chubb S, Hawtin RE, Fox JA, Keating MJ, et al. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:4637–45.
- [33] Johnson AJ, Yeh YY, Smith LL, Wagner AJ, Hessler J, Gupta S, et al. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (SCH727965) promotes apoptosis and abrogates microenvironmental cytokine protection in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2012;26:2554–7.
- [34] Chen R, Guo L, Chen Y, Tang Y, Wierda WG, Plunkett W. Homoharringtonine reduced Mcl-1 expression and induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117:156–64.
- [35] Lucas DM, Edwards RB, Lozanski G, West DA, Shin JD, Vargo MA, et al. The novel plant-derived agent silvestrol has B-cell selective activity in chronic lymphocytic leukemia and acute lymphoblastic leukemia in vitro and in vivo. *Blood* 2009;113:4656–66.
- [36] Baell JB, Huang DCS. Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochem Pharmacol* 2002;64:851–63.
- [37] Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:989–1000.
- [38] Billard C. BH3 mimetics: status of the field and new developments. *Mol Cancer Ther* 2013;12:1691–700.
- [39] Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DG, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumors. *Nature* 2005;435:677–81.
- [40] van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 2006;10:389–99.
- [41] Moore V, Del Gaizo, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007;117:112–21.
- [42] Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Chen J, Jin S, Johnson EF, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008;68:3421–8.
- [43] Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Carney DA, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 2012;30:488–96.
- [44] Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Adickes SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013;19:202–8.
- [45] Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJS, Cohen GM. ABT-199 selectively inhibits BCL2 but not BCL2L1 and efficiently induces apoptosis of chronic lymphocytic leukaemic cells but not platelets. *Br J Haematol* 2013;163:139–42.
- [46] Khaw SL, Mérimo D, Anderson MA, Glaser SP, Bouillet P, Roberts AW, et al. Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of pro-survival Bcl-2 with ABT-199. *Leukemia* 2014;28:1207–15.
- [47] Seymour JF, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Miller TP, et al. Bcl-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) monotherapy shows anti-tumor activity including complete remissions in high-risk relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL). Presented at: 55th ASH annual meeting, New Orleans LA, USA, 7–10 December; 2013 [Abstract 872].
- [48] Nguyen M, Marcellus RC, Rouillon A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju ST, et al. Small molecule obatodax (GX15-070) antagonizes Mcl-1 and overcomes Mcl-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19512–7.
- [49] Perez-Galan P, Roué G, Lopez-Guerra M, Nguyen M, Villamor N, Montserrat E, et al. BCL-2 phosphorylation modulates sensitivity to the BH3 mimetic GX15-070 (Obatodax) and reduces its synergistic interaction with bortezomib in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2008;22:1712–20.
- [50] Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:61–75.
- [51] Balakrishnan K, Wierda WG, Keating MJ, Gandhi V. Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;117:1971–80.
- [52] Espina-Fiedler M, Soto-Carrato V, Hosseini A, Lizcano JM, Guallar V, Quesada R, et al. Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: progidiosin vs. obatodax. *Biochem Pharmacol* 2012;83:489–96.
- [53] Balakrishnan K, Burger JA, Wierda WG, Gandhi V. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* 2009;113:149–53.
- [54] Joudet J, Claxton D. Obatodax mesylate: pharmacology and potential for therapy of hematological neoplasms. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21:363–73.
- [55] Khaw SL, Huang DCS, Roberts AW. Overcoming blocks in apoptosis with BH3-mimetic therapy in hematological malignancies. *Pathology* 2011;43:525–35.
- [56] Frankland-Searby S, Bhaumik SR. The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1825;2012:64–76.
- [57] Fennell DA, Chadko A, Muttli L. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* 2008;27:1189–97.
- [58] Almond JB, Snowden RT, Hunter A, Dinsdale D, Cain K, Cohen GM. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an approximately 700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. *Leukemia* 2001;15:1388–97.
- [59] Baou M, Kohlhaas SL, Butterworth M, Vogler M, Dinsdale B, Walenska R, et al. Role of Noxa and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2010;95:1510–8.
- [60] Zaher M, Tang R, Bombarda I, Merhi F, Fauvois B, Billard C. Hyperforin induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells through upregulation of the BH3-only protein Noxa. *Int J Oncol* 2012;40:269–76.
- [61] Kanwar J, Taskeen M, Mohammad I, Huo C, Chan TH, Dou QP. Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci* 2012;4:111–31.
- [62] Sampath D, Liu C, Vasan K, Sulda M, Puduvali VK, Wierda WG, et al. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;119:1162–72.
- [63] Inoue S, Riley J, Gant TW, Dyer MJS, Cohen GM. Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa. *Leukemia* 2007;21:1773–82.
- [64] El-Khoury V, Moussay E, Janji B, Palissot V, Aouali N, Brons NH, et al. The histone deacetylase inhibitor MGDC0103 induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a mitochondria-mediated caspase activation cascade. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1349–60.
- [65] Faderl S, Rai K, Gribben J, Byrd JC, Flinn IW, O'Brien S, et al. Phase II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with fludarabine-refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2006;107:916–24.
- [66] Byrd JC, Marucci G, Parthun MR, Xiao JJ, Klisovic RB, Moran M, et al. A phase 1 and pharmacodynamic study of deipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;105:959–67.
- [67] Blum KA, Advani A, Fernandez L, Van der Jagt R, Brandwein J, Kambhampati S, et al. Phase II study of the histone deacetylase inhibitor MGDC0103 in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2009;147:507–14.
- [68] Billard C. Development of Noxa-like BH3 mimetics for apoptosis-based therapeutic strategy in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res* 2012;10:673–6.
- [69] Shanafelt TD, Call TG, Zent CS, Leis JF, LaPlant B, Bowen DA, et al. Phase 2 trial of daily, oral Polyphenon E in patients with asymptomatic, Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2013;119:363–70.
- [70] Smoot RL, Blechacz BRA, Werneburg NW, Bronk SF, Sinicrope FA, Sinica AE, et al. A Bax-mediated mechanism for obatodax-induced apoptosis of cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 2010;70:1960–9.
- [71] Gavathiotis E, Suzuki M, Davies ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 2006;455:1076–82.
- [72] Gavathiotis E, Reya DE, Bellairs JA, Leshchiner ES, Walensky LD. Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat Chem Biol* 2012;8:639–45.
- [73] Edwards AL, Gavathiotis E, LaBelle JL, Braun CR, Opoku-Niah KA, Bird GH, et al. Multimodal interaction with BCL-2 family proteins underlies the proapoptotic activity of PUMA BH3. *Chem Biol* 2013;20:888–902.
- [74] Dai H, Pang YP, Ramirez-Alvaredo M, Kaufmann SH. Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bax activator. *J Biol Chem* 2014;289:89–99.
- [75] Roy M, Vom A, Czabotar PE, Lessene G. Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br J Pharmacol* 2014;171:1973–87.
- [76] Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL-2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol* 2014;51:219–27.
- [77] Tromp JM, Geest CR, Breij ECW, Elias JA, van Laar J, Luijckx DM, et al. Tipping the Noxa/Mcl-1 balance overcomes ABT-737 resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2011;18:487–98.
- [78] Morales AA, Olsson A, Celsing F, Osterberg A, Jondal M, Osorio LM. High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 2005;113:730–7.
- [79] Hallaert DY, Jaspers A, van Noesel CJ, van Oers MH, Kater AP, Eldering E. c-Abi kinase inhibitors overcome CD-40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches. *Blood* 2008;112:5141–9.
- [80] Vogler M, Butterworth M, Majid A, Walevska RJ, Sun XM, Dyer M, et al. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:4403–13.
- [81] Cohen NA, Stewart ML, Gavathiotis E, Tepper JL, Bruekner SR, Koss B, et al. A competitive stapled peptide screen identifies a selective small molecule that overcomes Mcl-1-dependent leukemia cell survival. *Chem Biol* 2012;19:1175–86.

- [82] Friberg A, Vigil D, Zhao B, Daniels RN, Burke JP, Garcia-Barrantes PM, et al. Discovery of potent myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) inhibitors using fragment-based methods and structure-based design. *J Med Chem* 2013;56:15–30.
- [83] Belmar J, Fesik SW. Small molecules Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer. *Pharmacol Ther* 2015;145:76–84.
- [84] Varadarajan S, Vogler M, Battenworth M, Dinsdale M, Walensky LD, Cohen GM. Evaluation and critical assessment of putative MCL-1 inhibitors. *Cell Death Differ* 2013;20:1475–84.
- [85] Mathieu AL, Sperandio O, Pottiez V, Balzarini S, Herlédan A, Elkaim JO, et al. Identification of small inhibitory molecules targeting the Bcl-1 anti-apoptotic protein that alleviates resistance to ABT-737. *J Biomol Screen* 2014;19:1035–46.
- [86] LaBelle JL, Katz SG, Bird GH, Gavathiotis E, Stewart ML, Lawrence C, et al. A stapled Bim peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. *J Clin Invest* 2012;122:2018–31.
- [87] Cao X, Yap JL, Newell-Rogers MK, Peddaboina C, Jiang W, Papaconstantinou HT, et al. The novel BH3 helix mimetic JY-1-106 induces apoptosis in a subset of cancer cells (lung cancer, colon cancer and mesothelioma) by disrupting Bcl-xL and Mcl-1 protein-protein interactions with Bak. *Mol Cancer* 2013;12:42.
- [88] Tong WG, Chen R, Plunkett W, Siegel D, Sinha R, Harvey RD, et al. Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Gdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010;28:3015–22.
- [89] Flynn J, Jones J, Johnson AJ, Andritsos L, Maddocks K, Jaglowski S, et al. Dinaciclib is a novel cyclin dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* Feb 24 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2015.31> [Epub ahead of print].
- [90] O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, Federl S, Kipps T, Keating M, et al. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:299–305.
- [91] James DF, Castro JE, Loria O, Prada CE, Aguilon RA, Kipps TJ. AT-101, a small Bcl-2 antagonist, in treatment naïve CLL patients with high risk features; preliminary results from an ongoing phase I trial. *J Clin Oncol* 2006;24(18S):6605.
- [92] Gupta SV, Hertlein E, Lu Y, Saes E, Lapalombella R, Chen TL, et al. The proteasome inhibitor carfilzomib functions independently of p53 to induce cytotoxicity and an atypical NF-κB response in chronic lymphocytic leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2013;19:2406–19.

Nouvelle dimension dans le ciblage thérapeutique de la famille des protéines BCL-2

New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins

Samaher Besbes, Massoud Mirshahi, Marc Pocard and Christian Billard

Oncotarget, 2015

Le ciblage des protéines de la famille BCL-2 apparait être une stratégie attractive pour assister les traitements des cancers. Ceci a suscité le développement d'agents dits « BH3 *mimetics* » qui imitent les membres proapoptotiques BH3-only de la famille en interagissant spécifiquement avec les membres pro-survie et en inhibant leur activité anti-apoptotique ; ceci induit l'activation des effecteurs BAX et BAK et par conséquent l'apoptose dans les cellules malignes. Des résultats cliniques significatifs ont été obtenus surtout avec l'ABT-199, un inhibiteur spécifique de la protéine BCL-2. Un certain nombre des composés identifiés ne lient pas leurs cibles avec une haute affinité (nanomolaire) nécessaire pour induire l'apoptose via le mécanisme qui permet l'activation de BAX/BAK. Toutefois, les dernières recherches ont permis la découverte de, non seulement plusieurs nouveaux BH3 *mimetics* authentiques du type inhibiteur des protéines de survie, mais aussi des BH3 *mimetics* novateurs : certains sont capables d'activer directement les effecteurs BAX et BAK, et un composé est à la fois activateur de BAX et inhibiteur de BCL-2. De nouvelles perspectives sont donc envisageables pour améliorer les thérapies anti-cancer.

New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins

Samaher Besbes^{1,2}, Massoud Mirshahi^{1,2}, Marc Pocard^{1,2} and Christian Billard^{1,2}

¹ INSERM U 965, Hôpital Lariboisière, Paris, France

² Université Paris Diderot, UMR S965, Paris, France

Correspondence to: Christian Billard, email: christian.billard@inserm.fr

Keywords: anticancer therapy; apoptosis; targeting BCL-2 family proteins; BH3 mimetics; prosurvival protein antagonists

Received: February 12, 2015

Accepted: April 01, 2015

Published: April 19, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Proteins of the BCL-2 family control the mitochondrial pathway of apoptosis. Targeting these proteins proves to be an attractive strategy for anticancer therapy. The biological context is based on the fact that BH3-only members of the family are specific antagonists of prosurvival members. This prompted the identification of "BH3 mimetic" compounds. These small peptides or organic molecules indeed mimic the BH3 domain of BH3-only proteins: by selectively binding and antagonizing prosurvival proteins, they can induce apoptosis in malignant cells. Some small-molecule inhibitors of prosurvival proteins have already entered clinical trials in cancer patients and two of them have shown significant therapeutic effects. The latest developments in the field of targeting BCL-2 family proteins highlight several new antagonists of prosurvival proteins as well as direct activators of proapoptotic proteins. These compounds open up novel prospects for the development of BH3 mimetic anticancer drugs.

INTRODUCTION

Apoptosis is a cell death program intended for regulating cell number during development and tissue homeostasis as well as eliminating damaged/dangerous cells [1]. Evasion of apoptosis is typical of many cancers and a frequent cause of therapeutic resistance [2, 3]. This evasion is mostly due to impairment in the mitochondrial pathway of apoptosis. Proteins of the BCL-2 family strictly control this pathway by inducing the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). The latter indeed allows the release of apoptogenic factors responsible for the activation of caspases that are the executioners of the cellular demolition program [1, 2].

The BCL-2 family proteins are characterized by their domains of homology to BCL-2 (BH1 to 4) and their functional activities. They comprise the prosurvival members (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1 and A1) and the proapoptotic members. The latter include the MOMP effectors (mainly BAX and BAK) and the BH3-only proteins, so-called because they have only the BH3 domain (e.g., BIM, BID, PUMA, BAD, NOXA). The activity of the prosurvival proteins is to bind to proapoptotic molecules, notably the MOMP effectors BAX and BAK which are thus sequestered in an inactive

form. All prosurvivals can bind BAX whereas only BCL-X_L and MCL-1 bind to BAK. This antiapoptotic activity is antagonized by the BH3-only members: by inserting their helical BH3 region into the hydrophobic groove of the prosurvival proteins, they provoke the release of the sequestered BAX and BAK that are thus activated. These interactions are selective: for example NOXA binds only to MCL-1 and A1, BAD binds only to BCL-2, BCL-X_L and BCL-W, whereas BIM, BID and PUMA can bind to all prosurvival proteins [1, 2]. Certain BH3-only proteins (such as BIM, BID and probably PUMA) can directly activate the proapoptotic proteins BAX and BAK.

Hence, the BCL-2 family proteins govern the MOMP by their specific interactions, and thus the fate of cells to either live or die. Targeting these proteins therefore appeared as an attractive apoptosis-based strategy to assist anticancer therapy [1, 2]. A particular attention has been focused on the development of agents capable of inhibiting the activity of prosurvival BCL-2 family members that are overexpressed in various malignancies [1, 2, 4]. This has led to the characterization of small molecules mimicking the BH3 domain of BH3-only proteins, likely to selectively bind to and antagonize prosurvival family members and thus induce apoptosis. These "BH3 mimetic" compounds are short peptides modeled on BH3 domains and small

organic molecules. The latter are identified by screening libraries of either natural products or computer-designed molecules for binding to BCL-2 proteins [5-16]. Two major criteria were proposed by Lessene *et al* to define an authentic BH3 mimetic: high affinity binding to the targets (in the nM range) and induction of BAX/BAK-dependent apoptosis [5]. Some compounds have shown significant therapeutic effects in cancer patients.

The preclinical and clinical properties of the small molecules inhibiting prosurvival BCL-2 family proteins have been extensively reviewed [5-16]. Two of the most recent reviews have described the biological context to targeting these proteins and advances in therapeutic approaches with BH3 mimetics. In the one, Anderson *et al* have focused on the four agents that are in clinical evaluation, discussed the data in detail and pinpointed questions yet to be resolved for using these agents as part of combination therapy [15]. In the other, Roy *et al* have presented a comprehensive review of compounds that target the BCL-2 family-driven pathway [16]. The present article updates the small molecules targeting proteins of the BCL-2 family with the discovery of not only highly potent antagonists of prosurvival members but also direct activators of the MOMP effectors BAX and BAK and a dual prosurvival inhibitor/proapoptotic activator. These data bring a new dimension to the therapeutic targeting of BCL-2 family proteins.

INHIBITORS OF PROSURVIVAL BCL-2 PROTEINS

Small organic molecules

Obatoclox

This synthetic indol bipyrrrole molecule derived from the natural product prodigiosin is capable of binding to all prosurvival BCL-2 family proteins with low affinity (in the μM range) and inducing apoptosis in tumor cells *in vitro* [17]. This putative pan-BH3 mimetic (or BIM-like BH3 mimetic) was the first to enter clinical trials but has shown only modest therapeutic effects [15, 18]. It is now known that obatoclox does not meet the two main criteria defining an authentic BH3 mimetic and that its proapoptotic activities result from off-target mechanisms [19, 20].

Gossypol family

Gossypol, a natural polyphenol, and its synthetic isomer AT-101 [21, 22] are also putative pan-BH3 mimetics: they do not fully meet the criteria for a *bona fide* BH3 mimetic and induce apoptosis via multiple mechanisms [19, 20, 23]. Like obatoclox, they showed limited anticancer activity in clinical trials [15]. Several gossypol and AT-101 derivatives such as sabutoclox (BI-

97C1) and BI-97D6 were characterized in preclinical studies as exhibiting higher binding affinities (in the sub- μM range) and triggering predominantly BAX/BAK-dependent apoptosis; both sabutoclox and BI-97D6 show *in vivo* antitumor effects in animal models [24, 25]. Interestingly, sabutoclox has turned out to be a pan-BCL-2 inhibitor in some but not all cellular systems, displaying its best activity in inhibiting MCL-1 [26].

TW-37, a rationally designed benzoylsulphonyl analog of gossypol [22, 27], was also known to operate only in part as a pan-BH3 mimetic: it binds to BCL-2, BCL-X_L and MCL-1 with moderate affinity (sub- μM), induces apoptosis depending partially on BAX/BAK activation and shows several off-target effects. However, a recent careful analysis has demonstrated that TW-37 (i) induces several typical features of mitochondrial apoptosis in MCL-1-dependent cells [but not BCL-2 or BCL-X_L-dependent cells] and (ii) exhibits all the hallmarks of a NOXA-like BH3 mimetic antagonizing selectively MCL-1, although only at high concentrations [26]. This study suggested that derivatives of TW-37 with higher affinity for MCL-1 might be developed [26].

Abt-737 and navitoclox

The fragment-screening approach based on structure/activity relationship (SAR) by nuclear magnetic resonance (NMR) - initially described by Fesik and colleagues [28] - led to the discovery of ABT-737, a molecule with an acylsulfonamide moiety [29]. Its orally-bioavailable derivative ABT-263 (now navitoclox) was designed for clinical use [30]. Both molecules are authentic BH3 mimetics targeting BCL-2, BCL-X_L and BCL-W but not MCL-1 or A1 (as the BH3-only protein BAD, so they are referred to as BAD-like BH3 mimetics). They were extensively characterized in preclinical studies [5, 16, 23]. The therapeutic activity of navitoclox in patients with hematologic malignancies (particularly chronic lymphocytic leukemia) and some solid cancers is now well established [15, 16].

Abt-199

Thrombocytopenia (i.e., an abnormal decrease in number of platelets in the blood) is a dose-limiting effect of navitoclox due to the inhibition of BCL-X_L (a survival factor for platelets). To circumvent this side effect, navitoclox derivatives that bind specifically to BCL-2 (without significant binding to BCL-X_L or BCL-W) were designed, leading to ABT-199. This true BH3 mimetic is the first highly selective inhibitor of BCL-2 [31]. Initial clinical studies of ABT-199 in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and non-Hodgkin's lymphoma have already shown impressive antitumor efficacy, with higher response rates than navitoclox and without thrombocytopenia [15, 16, 31]. The latest results from the trial in refractory or relapsed CLL patients have confirmed the effectiveness of ABT-199: 23% of the 78 patients recruited for 2 years had complete response (with

no evidence of cancer in some patients), 54 % achieved a partial response and overall, 59% of the patients have survived for 2 years without leukemia progression; in addition, the complete response rates were similar in high-risk patients including those having p53 deficiency due to the deletion in chromosome 17 [32]. Moreover, several promising clinical data have been lastly reported: notably in phase I/II trials of ABT-199 in acute myeloid leukemia, and of its combination with bendamustine, rituximab or obinituzumab in non-Hodgkin's lymphoma and CLL [33-36]. Phase III studies of ABT-199 (now venetoclax) are ongoing.

Other Abt -737 derivatives

Isosteric analogs of ABT-737 in which the acylsulfonamide moiety is replaced by a quinazoline group were synthesized: these quinazoline derivatives have reduced capacities to bind BCL-W while keeping their high-affinity binding to BCL-2 and BCL-X_L [37]. The same characteristics were observed with other acylsulfonamide derivatives, as previously reviewed [16].

BM-957 and BM-1197

BM-957 is another ABT-737 derivative (a diphenylpyrrole-carboxamide scaffold linked to the nitrobenzene sulfonamide half of ABT-737): it also binds to BCL-2 and BCL-X_L with sub-nM affinity, induces caspase 3-dependent apoptosis in tumor cell lines and causes tumor regression in xenograft models [38]. In order to optimize their compound BM-957, Wang and colleagues performed modifications of the pyrrole-carboxylic acid core structure leading to the new small molecule BM-1197 [39]. This compound binds to BCL-2 and BCL-X_L with sub-nM affinity, inhibits their antiapoptotic activities and induces BAX/BAK-dependent apoptosis in small cell lung cancer cell lines. In addition, BM-1197 shows improved solubility and pharmacokinetic properties and elicits complete and long-term tumor regression in two different small cell lung cancer xenograft models [39]. Consequently, BM-1197 proves to be a new BAD-like BH3 mimetic.

WEHI-539 and A-1155463

High-throughput screening of small molecules targeting BCL-X_L and structure-guided design led to the discovery of WEHI-539, a molecule with a benzothiazole hydrazone scaffold. This compound was the first highly selective antagonist of BCL-X_L (through high affinity binding) over BCL-2 and BCL-W. Careful analysis of its mechanism of action has shown that WEHI-539 induces BAK-mediated apoptosis [40]. NMR fragment screening and structure-based design further led to the characterization of A-1155463, a more potent BCL-X_L inhibitor than WEHI-539 while possessing none of its pharmaceutical liabilities. Importantly, this compound acts through an on-target mechanism and shows *in vivo* antitumor activity in mice [41]. The new small molecule

A-155463 constitutes an actual BH3 mimetic specific for BCL-X_L.

Arylsulfonamide derivatives

Hybridization of the arylsulfonamide portion of ABT-737 with an MCL-1 inhibitor resulted in a dual BCL-X_L/MCL-1 ligand with moderate (sub- μ M) affinity [42]. A substituted arylsulfonamide has shown selectivity for MCL-1 (albeit with sub- μ M binding affinity): this molecule induces caspase-9 activation and apoptosis [43]. Interestingly, an approach similar to that used for the ABT series has recently allowed the design of a biphenyl arylsulfonamide molecule also targeting MCL-1 with an apparent affinity of 30 nM; despite it is not known whether this compound can induce apoptosis, it might serve as a promising lead for optimized effects [44].

MCL-1 inhibitor molecule-1 (MIM-1)

High-throughput screening of small molecules displacing a stapled peptide derived from the BH3 domain of MCL-1 has yielded a substituted thiazol molecule called MIM-1 (for MCL-1 inhibitor molecule-1); this small molecule specifically engages the binding groove of MCL-1 and induces BAK-dependent apoptosis in MCL-1-dependent cells [45]. However, the binding affinity for MCL-1 is modest (4.8 μ M), high concentrations of MIM-1 are required for apoptosis, and this activity depends on the cell type [26].

Small molecule MCL-1 inhibitor

Using their NMR-based fragment screen approach (having led to ABT-737), Fesik and colleagues recently identified two chemically distinct compounds that bind to different sites of MCL-1; they then merged these compounds together to produce molecules binding MCL-1 selectively over BCL-2 and BCL-X_L [46]. After optimization, they obtained a lead compound [indole-2-carboxylic acid] which binds and inhibits MCL-1 (with an affinity of 55 nM) and induces apoptosis. Crystal structure of the complex validates the strategy and provides detailed information to design more potent inhibitors [46].

A-1210477

A series of specific MCL-1 inhibitors exhibiting sub-nM affinity were obtained by high throughput screening and structure-guided design [47]. The compounds are indole-2-carboxylic acids like the small molecule MCL-1 inhibitor described by Fesik and colleagues [46], but have a 100-fold higher binding affinity. Leverson *et al* have further characterized the most potent of the compounds, A-1210477: it binds selectively to MCL-1 with an affinity of 0.45 nM, disrupts BIM/MCL-1 complexes in living cells, induces the hallmarks of mitochondrial apoptosis in MCL-1-dependent cancer cells and synergizes with navitoclax to induce apoptosis in various malignant cell lines [48]. Data also demonstrate that the compound acts through an on-target mechanism. Therefore, A-1210477

Table 1: Main small molecules targeting BCL-2 family proteins and their characteristics.

Compounds	Ref.	Targets	BH3 mimicry	Affinity	BAX/BAK apoptosis	Antitumor in vivo	Clinical data/efficacy
<i>Antagonists of prosurvival proteins:</i>							
Obetolox	17	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1	Pan	µM	No	Yes	Yes/No
AT-101	22	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1	Pan	sub-µM	Partly	Yes	Yes/No
Sabiroclax	24,26	BCL-2, BCL-XL, MCL-1, A1	Pan	sub-µM	Preliminarily	Yes	
BIM SAHB	72	BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1	Pan	nM	Yes	Yes	
JY-1-106	58	BCL-XL, MCL-1	Pan	ND	Yes	Yes	
S1 derivative	54	BCL-2, BCL-XL, MCL-1	Pan	10-20 nM	Yes*	Yes*	
ADT-737	29	BCL-2, BCL-XL, BCL-W	BAD-like	nM	Yes	Yes	
Navitoclax	30	BCL-2, BCL-XL, BCL-W	BAD-like	nM	Yes	Yes	Yes/Yes
BM-1197	39	BCL-2, BCL-XL	BAD-like	sub-nM	Yes	Yes	
ABT-199	31,33	BCL-2	BCL-2-specific	sub-nM	Yes	Yes	Yes/Yes
WEHI-539	40	BCL-XL	BCL-XL-specific	nM	BAK-dependent		
A-1155463	41	BCL-XL	BCL-XL-specific	sub-nM	On-target mechanism	Yes	
XXA1	79	BCL-XL	BCL-XL-specific	sub-nM	MOMP-dependent		
Small molecule Mcl-1 inhibitor	46	MCL-1	NOXA-like	55 nM	Yes		
MIM-1	45	MCL-1	NOXA-like	µM	BAK-dependent		
JW-37	22,26	MCL-1	NOXA-like	sub-µM	Yes	Yes	
A-1210477	48	MCL-1	NOXA-like	sub-nM	On-target mechanism		
Biphenyl-NOXA BH3 peptide	69,70	MCL-1	NOXA-like	nM	ND		
<i>Direct activators of proapoptotic proteins:</i>							
BAM-7	80	BAX	BAX activator	ND	Yes		
PUMA BH3 peptide	82	BAK	BAK activator	nM	BAK-dependent		
<i>Dual prosurvival inhibitor and proapoptotic direct activator:</i>							
PUMA SAHB analog	86	BCL-2, MCL-1, BAX	Both pan-inhibitor and BAX activator	ND	Yes		

*Yes for the parental S1 compound but not determined for the S1 derivative; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization, ND: not determined.

appears as the first BH3 mimetic targeting MCL-1.

Mcl-1 inhibitor-9

A high-throughput screening approach culminated in the characterization of a piperazine-substituted hydroxyquinoline that inhibits selectively MCL-1. This molecule called Mcl-1 inhibitor-9 was proposed to function as a BH3 mimetic in inducing mitochondrial apoptosis in cell lines [49] although the binding affinity and mechanism of action have not been evaluated.

sesquiterpenoid derivatives

Screening a library of natural sesquiterpenoids for disrupting the MCL-1/BIM BH3 complex led to the identification of hexahydronaphthalene and the synthesis of substituted derivatives. The most potent MCL-1 inhibitor can engage the binding groove of MCL-1 in computational docking experiments, and it shows antagonizing activity in cancer cells [50]. This possible new class of MCL-1 inhibitor yet needs further development and biological characterization.

s1 family

The small molecule S1 (an oxo-phenalene-dicarbonitrile) binds to both BCL-2 and MCL-1 albeit with moderate affinity (in the sub-µM range), triggers BAX/BAK-dependent apoptosis, and shows antitumor activity in an animal model [51]. Although initially proposed as a pan-BH3 mimetic, S1 was reportedly

found to act via multiple and off-target mechanisms [20, 52, 53]. A substituted derivative of S1 was designed and characterized as showing a higher affinity for binding MCL-1 (10 nM) and BCL-2 (20 nM) and a better apoptotic activity in tumor cell lines than the parental S1 [54]. Unless the demonstration that this activity is BAX/BAK-dependent, S1-derivative should be considered as a putative pan-BH3 mimetic. Other S1-derivatives were described as novel MCL-1 inhibitors [55, 56].

Acylsulfonamide molecules

A fragment-based NMR method (other than the Fesik's approach) has allowed the generation of a series of acylsulfonamides (different from the ABT series). The small molecules exhibit high affinity (nM) for both BCL-X_L and MCL-1 [57]. However, their biological validation has not been provided.

compound JY-1-106

SAR analysis of oligoamide foldamers led to the design of JY-1-106, a substituted trisarylamide having the ability to induce apoptosis *in vitro* and to repress tumor growth in an animal model. Computational analyses indicate that JY-1-106 engages the BH3-binding grooves of both BCL-X_L and MCL-1, suggesting that it may be a pan-BH3 mimetic [58]. Whether JY-1-106 meets the two criteria that define an authentic BH3 mimetic yet remains to be stated.

Other new small molecules

A number of small organic molecules designed to mimic BH3 peptides have just been reported such as a series of molecules containing a benzoylurea scaffold which selectively bind to BCL-X_L albeit with μ M affinity [59]. It is also the case for several MCL-1 inhibitors including marinopyrrole derivatives, a single diastereomer of a macrolactam core and compounds with a 3-phenylthiophene-2-sulfonamide core moiety or with a phenyl-piperazine-triazine scaffold [60-63]. Interestingly, a small molecule targeting the prosurvival BCL-2 family protein A1 has been identified for the first time [64]. Although these compounds require further characterization and improvements, they may represent starting points for developing new classes of inhibitors.

bH3 domain-derived peptides

Peptides hardly penetrate into cells and are prone to rapid proteolytic degradation. Efforts focused to modify peptides in order to increase the cell penetration and stability and also to reproduce the helicity of BH3 domains needed for high affinity binding.

α/β foldamers

BIM and PUMA BH3 peptides were modified by incorporating non-natural amino acids: this resulted in α/β foldamer-peptides capable of binding to BCL-X_L [65] and to both BCL-X_L and MCL-1 with high affinity [66], as previously discussed [16]. It is furthermore noteworthy that peptides with non-canonical BH3 domain sequences were found to bind selectively to MCL-1, such as reverse BH3 motifs with helical conformation [67] and a variant of the BIM BH3 region, Bim_s2A [68]. However, the proapoptotic properties of these peptides have not been characterized with the exception of Bim_s2A which can induce BAK-dependent apoptosis when BCL-X_L is absent or neutralized [68].

cross-linked NOXA-bH3 peptide

A short peptide derived from the BH3-only protein NOXA was biphenyl cross-linked in order to stabilize the helical conformation. The cross-linked BH3 peptide is capable of binding selectively to MCL-1 with an affinity comparable to that of NOXA (in the nM range) and it can induce death in a lymphoma cell line [69]. Conjugating this compound with ubiquitin further led to a MCL-1 antagonist with increased cell penetration and killing activity [70]. Whether the biphenyl-NOXA BH3 peptide actually induces BAX/BAK-dependent apoptosis is not known.

bIM sAHB and other stapled bH3 peptides

Another approach to stabilize the helical conformation has been to staple BH3 peptides. The first "stabilized α -helix of BCL-2 domain" (SAHB) was

generated from the BH3 domain of BID [71]. A SAHB derived from the BH3 helix of BIM was recently described [72]. This BIM SAHB (BIM 21-mer, residues 146-166) binds with high affinity to BCL-X_L, BCL-W, MCL-1 and A1, and it induces mitochondrial apoptosis in leukemia/lymphoma cell lines and tumor regression in an animal model of human leukemia [72]. Data indicate that the BIM SAHB displays the hallmarks of an authentic pan-BH3 mimetic. However, the cell permeability, binding affinity and biological activity of SAHB compounds are much debated issues [73, 74]. They seem to depend on the cell type inasmuch as BIM SAHB (residues 146-166) shows activity in hematologic but not fibroblastic cell lines [75].

Other relevant stapled peptides were described such as a SAHB modeled on the MCL-1 BH3 domain which was characterized as a selective MCL-1 inhibitor with proapoptotic properties in leukemia cell lines [76]. A SAHB derived from the BIM BH3 region was reported to be able to bind the MOMP effector BAX at a site that directly triggers its activation [77, 78]. These two compounds have further served as probes to identify small molecules with BH3 mimicry properties, respectively MIM-1 (see previous section Small organic molecules) and BAM-7 (described in next section Activators of proapoptotic BCL-2 proteins.).

bIM bH3-derived peptides of the XXA series

By combining computational design, combinatorial library screening and rational mutagenesis, a series of peptides derived from the BH3 region of BIM were engineered. The lead compound XXA1 binds to BCL-X_L with sub-nM affinity (and selectivity up to 1000-fold over other prosurvival proteins); it induces MOMP-dependent apoptosis in human platelets (for which BCL-X_L is a survival factor) and malignant cell lines [79]. Therefore, XXA1 may be considered as a new, putative BH3 mimetic highly specific for BCL-X_L.

ActIVA tors OF PrOAPOptOtic bcL-2 PrOtEINs

Recent studies have used the BH3 mimetic concept to design small molecules having the ability to directly bind and activate proapoptotic members of the BCL-2 family, as described below.

bAM-7

Walensky and colleagues first characterized a SAHB modeled on the BIM BH3 region and capable of binding the MOMP effector BAX at a site that directly triggers its activation [77, 78]. They then used a computational screen of small molecules for displacing their SAHB from its ligand BAX, to obtain a substituted pirazolone molecule called BAM-7; this compound can engage the

BAX trigger site and induce BAX activation and apoptosis [80]. This was the first description of a small molecule capable of directly activating a proapoptotic BCL-2 family protein. The compound BAM-7 could be used to generate direct activators of BAX with high binding affinity.

PUMA-BH3 peptide

Investigating the ability of the BH3-only proteins NOXA and PUMA to directly activate the MOMP effector BAK has highlighted a PUMA BH3 peptide that binds with nM affinity to the canonical binding pocket of BAK and induces its activation, leading to BAK-dependent MOMP and cell death [81, 82]. This study supports and extends others having indicated that different BH3 peptides as well as a BID SAHB can directly activate BAK [83-85]. These data therefore provide proof-of-concept that direct activators of BAK may be designed.

PUMA sAHB

A SAHB derived from the PUMA-BH3 helix was found to display a dual activity: it can both engage all the prosurvival BCL-2 family proteins (and inhibit their activity) and directly bind and activate the proapoptotic BAX [86]. In addition, a cell permeable analog of this PUMA SAHB (capable of binding to BCL-2, MCL-1 and BAX) induces mitochondrial apoptosis in neuroblastoma cells [86]. These data demonstrate for the first time that PUMA BH3 is a dual prosurvival inhibitor and proapoptotic direct activator. It is therefore conceivable to design BH3 mimetics having such a dual capacity.

c ONc LU s IONs AND PE r s PE c t IVEs

Since the emergence of the BH3 mimetic concept [4], targeting BCL-2 family proteins is considered to have a promising therapeutic potential especially for treating cancers [1, 2, 5]. Much progress has been made in this field of research with the identification of numerous inhibitors of prosurvival BCL-2 family proteins [6-16]. This field yet remains very challenging. The nature of the interaction between these compounds and their targets (protein/protein interaction, large and hydrophobic pockets) makes any program of drug discovery still difficult. Moreover, many putative BH3 mimetics were reported with minimal evidence of on-target effects. The low or modest binding affinity of some compounds is notably responsible for off-target effects. The difficulty to assess their mechanism of action can also be misleading [87].

Nevertheless, four small organic molecules targeting prosurvival BCL-2 family proteins have already entered clinical trials in cancer patients [15]. The clinical results with the two putative pan-BH3 mimetics obatoclax and AT-101 (that are now known to induce apoptosis mainly

via off-target mechanisms) were disappointing. In contrast, the two authentic BH3 mimetics navitoclax and ABT-199 (which are both derived from the pioneer molecule ABT-737) proved to display anticancer efficacy particularly in hematologic malignancies: significant therapeutic effects were first observed with the BAD-like mimetic navitoclax and impressive results were further recorded with the BCL-2-specific ABT-199 that does not induce the thrombocytopenia exhibited by navitoclax (due to BCL-X_L inhibition). These data have unequivocally demonstrated that BH3 mimetic agents can expand the anticancer armamentarium in combination with conventional treatments.

None of the characterized BH3-derived peptides have so far progressed towards clinical evaluation. This does not mean that the approach to identifying BH3-derived peptides is less promising than the approach of screening small organic molecules. The former compounds indeed display liability and pharmacologic difficulties, whereas the latter are often prone to off-target effects. To achieve high affinity binding to the targets is a frequent issue for both types of compounds. A general conclusion favoring either approach cannot be drawn yet.

Updating the small molecules targeting BCL-2 family proteins (as recapitulated in Table 1) highlights not only new antagonists of prosurvival proteins but also the possibility to design novel types of BH3 mimetics capable of directly activating proapoptotic proteins.

As regards the newly identified antagonists of prosurvival proteins, the first BH3 mimetic specific for BCL-X_L has been discovered with the highly potent small-molecule inhibitor A-1155463 displaying on-target, antitumor activity *in vivo*. The BH3 peptide derivative XXA1 also appears as a candidate of interest. The emergence of the compound A-1210477 - a potent MCL-1 inhibitor with a high binding affinity and an on-target mechanism of action - indicates that a NOXA-like BH3 mimetic specific for MCL-1 will rapidly be obtained. Other MCL-1 antagonists might likewise be probed such as the pioneer MIM-1, the remarkable Small Molecule Mcl-1 Inhibitor, and a biphenyl cross-linked NOXA peptide. The further characterization of TW-37 has revealed that modifications enhancing its affinity for MCL-1 could also lead to an authentic NOXA-like BH3 mimetic. The generation of pan-BH3 mimetics (which are needed for replacing obatoclax and AT-101) seems possible from the BIM SAHB or the gossypol derivative sabutoclax that are known to inhibit a broad range of prosurvival proteins. The small molecules S1-derivative and JY-1-106 were also described as starting points for designing pan-BH3 mimetics. Therefore, after the emergence of the BAD-like BH3 mimetic navitoclax and the BCL-2-specific ABT-199, the developments of NOXA-like, BCL-X_L-specific and pan-BH3 mimetics will likely be achieved. Lastly, BM-1197 is added to navitoclax as another, potent BAD-like BH3 mimetic displaying a

particular therapeutic potential for small cell lung cancer.

Moreover, a new dimension to targeting BCL-2 family proteins is provided by the discovery of two novel types of small molecules capable of directly activating proapoptotic members of the family. First, after the identification of the small molecule BAM-7 as a BAX activator, the finding that a PUMA BH3 peptide can activate BAK confirms the possibility to generate BH3 mimetics capable of directly activating the MOMP effectors. Second, the characterization of a PUMA SAHB analog which both activates BAX and antagonizes BCL-2 and MCL-1 indicates that it is possible to design BH3 mimetics having the dual activity of prosurvival inhibitor and proapoptotic activator.

Many efforts are obviously required to implement the clinical application of the novel types of BH3 mimetics. Nevertheless, the therapeutic targeting of BCL-2 family proteins already appears as a potent weapon for overcoming the apoptotic resistance in cancers and improving the treatments of patients.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J*. 2011; 30: 3667-3683.
2. Kelly GL, Strasser A. The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res*. 2011; 111: 39-96.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
4. Baell JB, Huang DCS. Prospects for targeting the Bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64: 851-863.
5. Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature Rev*. 2008; 7: 989-1000.
6. Azmi AA, Wang Z, Philip PA, Mohammad RM, Sarkar FH. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. *Expert Opin Emerging Drugs*. 2011; 16: 59-70.
7. Khaw SL, Huang DCS, Roberts AW. Overcoming blocks in apoptosis with BH3-mimetic therapy in hematological malignancies. *Pathology*. 2011; 43: 525-535.
8. Bajwa N, Chenzong L, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Patents*. 2012; 22: 37-55.
9. Davids MS, Letai A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 3127-3135.
10. Balakrishnan K, Gandhi V. Bcl-2 antagonists: a proof of concept for CLL therapy. *Invest New Drugs*. 2013; 31: 1384-1393.
11. Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013; 17: 61-75.
12. Scarfo L, Ghia P. Reprogramming cell death: Bcl-2 family inhibition in hematological malignancies. *Immun Lett*. 2013; 155: 36-39.
13. Billard C. BH3 mimetics: status of the field and new developments. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12: 1691-1700.
14. Belmar J, Fesik SW. Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer. *Pharmacol Ther*. 2015; 145: 76-84.
15. Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Sem Hematol*. 2014; 51: 219-227.
16. Roy MJ, Vom A, Czabotar PE, Lessene G. Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br J Pharmacol*. 2014; 171: 1973-1987.
17. Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Madiraju SRM, et al. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 19512-19517.
18. Joudeh J, Claxton D. Obatoclax mesylate: pharmacology and potential for therapy of hematological neoplasms. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012; 21: 363-373.
19. Vogler M, Weber K, Dinsdale D, Schmitz I, Schultze-Hosthoff K, Dyer MJS, et al. Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Diff*. 2009; 16: 1030-1039.
20. Albershardt TC, Salerni BL, Soderquist RS, Bates DJP, Pletnev AA, Kisselev AF, et al. Multiple BH3 mimetics antagonize antiapoptotic MCL-1 protein by inducing the endoplasmic reticulum stress response and up-regulating BH3-only protein NOXA. *J Biol Chem*. 2011; 286: 24882-24895.
21. Kitada S, Leone M, Sareth S, Zhai D, Reed JC, Pellecchia M. Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J Med Chem*. 2003; 46: 4259-4264.
22. Wang G, Nikolovska-Coleska Z, Yang CY, Wang R, Tang G, Guo J, et al. Structure-based design of potent small molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Med Chem*. 2006; 49: 6139-6142.
23. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*. 2006; 10: 389-399.
24. Wei J, Stebbins JL, Kitada S, Dash R, Placzek W, Rega M, et al. BI-97C1, an optically pure apogossypol derivative as pan-active inhibitor of antiapoptotic B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) family proteins. *J Med Chem*. 2010; 53:

- 4166-4176.
25. Wei J, Stebbins JL, Kitada S, Sash R, Zhai D, Placzek WJ, et al. An optically pure apogossypolone derivative as potent pan-active inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Front Oncol.* 2011; 1: 28.
 26. Varadarajan S, Vogler M, Butterworth M, Dinsdale D, Walensky LD, Cohen GM. Evaluation and critical assessment of putative MCL-1 inhibitors. *Cell Death Diff.* 2013; 11: 1475-1484.
 27. Mohammad RM, Goustin AS, Aboukameel A, Chen B, Banerjee S, Wang G, et al. Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 2226-2235.
 28. Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows PP, Fesik SW. Discovery high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science.* 1996; 274: 1531-1534.
 29. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumors. *Nature.* 2005; 435: 677-681.
 30. Tse C, Shoemaker AR, Adickers J, Chen J, Jin S, Johnson EF, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008; 68: 3421-3428.
 31. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* 2013; 19: 202-208.
 32. Seymour JF, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Puvvada S, et al. ABT-199 (GDC-0199) in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma: high response rates among patients with high risk disease features including unmutated IGVH. Presented at: 19th Congress of the European Hematology Association. Milan, Italy, June 12-16, 2014 (Abstract S702).
 33. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla BJ, Busman T, McKeegan E, et al. A phase 2 study of ABT-199 (GDC-0199) in patients with acute myelogenous leukemia (AML). Presented at: 56th ASH annual meeting and exposition. San Francisco, CA, December 6-9, 2014 (Abstract 118).
 34. de Vos S, Flowers CR, Wang D, Swinnen LJ, Fowler N, Reid E, et al. The BCL-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. Presented at: 56th ASH annual meeting and exposition. San Francisco, CA, December 6-9, 2014 (Abstract 1722).
 35. Roberts AW, Ma S, Brander DM, Kipps TJ, Barrientos JC, Davids MS, et al. Determination of recommended phase 2 dose of ABT-199 (GDC-0199) combined with rituximab (R) in patients with relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia. Presented at: 56th ASH annual meeting and exposition. San Francisco, CA, December 6-9, 2014 (Abstract 325).
 36. Flinn I, Brunvand M, Dyer MJS, Hillman P, Jones J, Lymp J, et al. Preliminary results of a phase 1b study (GP28331) combining GDC-0199 (ABT-199) and obinutuzumab in patients with relapsed/refractory or previously untreated chronic lymphocytic leukemia. Presented at: 56th ASH annual meeting and exposition. San Francisco, CA, December 6-9, 2014 (Abstract 4687).
 37. Sleebs BE, Czabotar PE, Fairbrother WJ, Fairlie WD, Flygare JA, Huang DC, et al. Quinazoline sulfonamides as dual binders of the B-cell lymphoma 2 and B-cell lymphoma extra long with potent proapoptotic cell-based activity. *J Med Chem.* 2011; 54: 1914-1926.
 38. Chen J, Zhou H, Aguilar A, Liu L, Bai L, McEachern D, et al. Structure-based discovery of BM-957 as a potent small molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xL capable of achieving complete tumor regression. *J Med Chem.* 2012; 55: 8502-8514.
 39. Bai L, Chen J, McEachern D, Liu L, Zhou H, Aguilar A, et al. BM-1197: a novel and specific Bcl-2/Bcl-xL inhibitor inducing complete and long-lasting tumor regression *in vivo*. *PLoS One.* 2014; 9: e99404.
 40. Lessene G, Czabotar PE, Sleebs BE, Zobel K, Lowes KN, Adams JM, et al. Structure-guided design of a selective BCL-XL inhibitor. *Nat Chem Biol.* 2013; 9: 390-397.
 41. Tao ZF, Hasvold L, Wang L, Wang X, Petros AM, Park CH, et al. Discovery of a potent and selective BCL-XL inhibitor with *in vivo* activity. *ACS Med Chem Lett.* 2014; 5: 1088-1093.
 42. Tanaka Y, Aikawa K, Nishida G, Homma S, Sogabe S, Igaki S, et al. Discovery of potent Mcl-1/Bcl-xL dual inhibitors by using a hybridization strategy based on structural analysis of target proteins. *J Med Chem.* 2013; 56: 9635-9645.
 43. Abulwerdi FA, Liao C, Mady AS, Gavin J, Shen C, Cierpicki T, et al. 3-substituted-N-(4-hydroxynaphtalen-1-yl)arylsulfonamides as a novel class of selective Mcl-1 inhibitors: structure-based design, synthesis, SAR, and biological evaluation. *J Med Chem.* 2014; 57: 4111-4133.
 44. Petros AM, Swann SL, Song D, Swinger K, Park C, Zhang H, et al. Fragment-based discovery of potent inhibitors of the anti-apoptotic MCL-1 protein. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24: 1484-1488.
 45. Cohen NA, Stewart ML, Gavathiotis E, Tepper JL, Bruekner SL, Koss B, et al. A competitive stapled peptide screen identifies a selective small molecule that overcomes Mcl-1-dependent leukemia cell survival. *Chem Biol.* 2012; 19: 1175-1186.
 46. Friberg A, Vigil D, Zhao B, Daniels RN, Burke JP, Garcia-Barrantes PM, et al. Discovery of potent myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) inhibitors using fragment-based methods and structure-based design. *J Med Chem.* 2012; 56: 15-30.
 47. Bruncko M, Wang L, Sheppard GS, Phillips DC, Tahir SK,

- Xue J, et al. Structure-guided design of a series of MCL-1 inhibitors with high affinity and selectivity. *J Med Chem.* 2015; 58: 2180-2194.
48. Levenson JD, Zhang H, Chen J, Tahir SK, Phillips DC, Xue J, et al. Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis.* 2015; 6: e1590.
 49. Richards DJ, Lena R, Bannister T, Blake N, Perceall WE, Carlson NE, et al. Hydroxyquinoline-derived compounds and analoguing of selective Mcl-1 inhibitors using a functional biomarker. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21: 6642-6649.
 50. Kim YB, Balasis MA, Doi K, Berndt N, DuBoulay C, Hu CA, et al. Synthesis and evaluation of substituted hexahydronaphthalenes as novel inhibitors of the Mcl-1/BimBH3 interaction. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012; 22: 5961-5965.
 51. Zhang Z, Song T, Zhang T, Gao J, Wu G, An L, et al. A novel BH3 mimetic S1 potently induces Bax/Bak-dependent apoptosis by targeting both Bcl-2 and Mcl-1. *Int J Cancer.* 2011; 128: 1724-1735.
 52. Soderquist R, Pletnev AA, Danilov AV, Eastman A. The putative BH3 mimetic S1 sensitizes leukemia to ABT-737 by increasing reactive oxygen species including endoplasmic reticulum stress, and upregulating the BH3-only protein NOXA. *Apoptosis.* 2014; 19: 201-209.
 53. Zhong JT, Xu Y, Yi HW, Su J, Yu HM, Xiang XY, et al. The BH3 mimetic S1 induces autophagy through ER stress and disruption of Bcl-2/Beclin 1 interaction in human glioma U251 cells. *Cancer Lett.* 2012; 323: 180-187.
 54. Song T, Li X, Chang X, Liang X, Zhao Y, Wu G, et al. 3-thiomorpholin-8-oxo-8H-acenaphtho (1, 2-b) pyrrole-9-carbonitrile (S1) derivatives as pan-Bcl-2-inhibitors of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21: 11-20.
 55. Zhang Z, Song T, Li X, Wu Z, Feng Y, Xie F, et al. Novel soluble myeloid leukemia sequence 1 (Mcl-1) inhibitor (E, E)-2-(benzylaminocarbonyl)-3-styrylacrylonitrile (4g) developed using a fragment-based approach. *Eur J Med Chem.* 2013; 59: 141-149.
 56. Zhang Z, Liu L; Li X, Song T, Wu Z, Liang X, et al. Fragment-based design, synthesis, and biological evaluation of N-substituted-5-(4-isopropylthiophenol)-2-hydroxynicotinamide derivatives as novel Mcl-1 inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2013; 60: 410-420.
 57. Rega MF, Wu B, Wei J, Zhang Z, Cellitti JF, Pellecchia M. SAR by interligand nuclear Overhauser effects (ILOEs) based discovery of acylsulfonamide compounds active against Bcl-xL and Mcl-1. *J Med Chem.* 2011; 54: 6000-6013.
 58. Cao X, Yap JL, Newell-Rogers MK, Peddaboina C, Jiang W, Papaconstantinou HT, et al. The novel BH3 α -helix mimetic JY-1-106 induces apoptosis in a subset of cancer cells (lung cancer, colon cancer and mesothelioma) by disrupting Bcl-xL and Mcl-1 protein-protein interactions with Bak. *Mol Cancer.* 2013; 12: 42 (1-16).
 59. Brady RM, Vom A, Roy MJ, Toovey N, Smith BJ, Moss RM, et al. De-novo designed library of benzoylureas as inhibitors of BCL-XL: synthesis, structural and biochemical characterization. *J Med Chem.* 2014; 57: 1323-1343.
 60. Li R, Cheng C, Balasis ME, Liu Y, Garner TP, Daniel KG, et al. Design, synthesis and evaluation of marinopyrrole derivatives as selective inhibitors of Mcl-1 binding to proapoptotic Bim and dual Mcl-1/Bcl-xL inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2015; 90: 315-331.
 61. Fang C, D'Souza B, Thompson CF, Clifton MC, Fairman JW, Fulroth B, et al. Single diastereomer of a macrolactam core binds specifically to myeloid cell leukemia 1 (MCL1). *ACS Med Chem Lett.* 2014; 5: 1308-1312.
 62. Yang C, Chen S, Zhou M, Li Y, Zhang Z, Liu Z, et al. Development of 3-phenyl-N-(2-(3-phenylureido)ethyl)-thiophene-2-sulfonamide compounds as inhibitors of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *ChemMedChem.* 2014; 9: 1436-1452.
 63. Moon H, Lee WS, Oh M, Lee H, Im W, et al. Design, solid-phase synthesis, and evaluation of a phenyl-piperazine-triazine scaffold as α -helix mimetics. *ACS Com Sci.* 2014; 16: 695-701.
 64. Mathieu AL, Sperandio O, Pottiez V, Balzarín S, Herledan A, Elkaïm JO, et al. Identification of small inhibitory molecules targeting the Bcl-2 anti-apoptotic protein that alleviates resistance to ABT-737. *J Biomol Screen.* 2014; 19: 1035-1046.
 65. Boersma MD, Haase HS, Peterson-Kaufman KJ, Lee EF, Clarke OB, Colman PM, et al. Evaluation of diverse α - β -backbone patterns for functional α -helix mimicry: analogues of the Bim BH3 domain. *J Am Chem Soc.* 2012; 134: 315-323.
 66. Smith BJ, Lee EF, Checco JW, Evangelista M, Gellman SH, Fairlie WD. Structure-guided rational design of α/β -peptide foldamers with high affinity for BCL-2 family prosurvival proteins. *Chembiochem.* 2013; 14: 1564-1572.
 67. Placzek WJ, Sturlese M, Wu B, Cellitti JF, Wei J, Pellecchia M. Identification of a novel Mcl-1 Protein binding motif. *J Biol Chem.* 2011; 286: 39829-39835.
 68. Lee EF, Czabotar PE, van Delft MF, Michalak EM, Boyle MJ, Willis SN, et al. A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation. *J Cell Biol.* 2008; 180: 341-355.
 69. Muppidi A, Doi K, Edwardraja S, Drake EJ, Gulick AM, Wang HG, et al. Rational design of proteolytically stable, cell-permeable peptide-based selective Mcl-1 inhibitors. *J Am Chem Soc.* 2012; 134: 14734-14737.
 70. Muppidi A, Doi K, Edwardraja S, Pulavarti SW, Szyperski T, Wang HG, et al. Targeted delivery of ubiquitin-conjugated BH3 peptide-based Mcl-1 inhibitors into cancer cells. *Bioconjug Chem.* 2014; 25: 424-432.
 71. Walensky LD, Kung AL, Escher I, Malia TJ, Barbuto S,

- Wright RD, et al. Activation of apoptosis *in vivo* by an hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*. 2004; 305: 1466-1470.
72. LaBelle JL, Katz SG, Bird GH, Gavathiotis E, Stewart ML, Lawrence C, et al. A stapled Bim peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. *J Clin Invest*. 2012; 122: 2018-2031.
73. Okamoto T, Zobel K, Federova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, et al. Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3 helix (BimSAHB) does not necessarily enhance affinity or biological activity. *ACS Chem Biol*. 2013; 8: 297-302.
74. Bird GH, Gavathiotis E, LaBelle JL, Katz SG, Walensky LD. Distinct BimBH3 (BimSAHB) stapled peptides for structural and cellular studies. *ACS Chem Biol*. 2014; 9: 831-837.
75. Okamoto T, Segal D, Zobel K, Fedorova A, Yang H, Fairbrother WJ, et al. Further insights into the effects of pre-organizing the BimBH3 helix. *ACS Chem Biol*. 2014; 9: 838-839.
76. Stewart ML, Fire E, Keating AE, Walensky LD. The MCL-1 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat Chem Biol*. 2010; 6: 595-601.
77. Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*. 2008; 455: 1076-1082.
78. Gavathiotis E, Reyna DE, Davis ML, Bird GH, Walensky LD. BH3-triggered structural reorganization drives the interaction of proapoptotic BAX. *Mol Cell*. 2010; 40: 481-492.
79. Dutta S, Ryan J, Chen TS, Kougentakis C, Letai A, Keating AE. Potent and specific peptide inhibitors of human pro-survival protein Bcl-XL. *J Mol Biol*. 2015; 427: 1241-1253.
80. Gavathiotis E, Reyna DE, Bellairs JA, Leshchiner ES, Walensky LD. Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat Chem Biol*. 2012; 8: 639-645.
81. Dai H, Smith A, Meng W, Schneider PA, Pang YP, Kaufmann SH. Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *J Cell Biol*. 2011; 194: 39-48.
82. Dai H, Pang YP, Ramirez-Alvarado M, Kaufmann SH. Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. *J Biol Chem*. 2014; 289: 89-99.
83. Du H, Wolf J, Schafer B, Moldoveanu T, Chipuk JE, Kuwana T. BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem*. 2011; 286: 491-501.
84. Moldoveanu T, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Fitzgerald P, Gehring K, et al. BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nat Struct Mol Biol*. 2013; 20: 589-597.
85. Leshchiner ES, Braun CR, Bird GH, Walensky LD. Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2013; 110: E986-E995.
86. Edwards AL, Gavathiotis E, LaBelle JL, Braun CR, Opoku Nsiah KA, Bird GH, et al. Multimodal interaction with BCL-2 family proteins underlies the proapoptotic activity of PUMA BH3. *Chem Biol*. 2013; 20: 888-902.
87. Erlanson DA. Learning from PAINful lessons. *J Med Chem*. 2015; 58: 2088-2090.

Premiers "BH3 mimetics" ciblant MCL-1 comme thérapeutiques potentiels pour viser les traitements du cancer

First MCL-1-selective BH3 mimetics as potential therapeutics for targeted treatment of cancer

Samaher Besbes and Christian Billard

Cell Death and Disease, 2015

Aucun des "BH3 *mimetics*" identifiés jusqu'à présent (qu'ils soient authentiques ou putatifs) n'étaient capables de cibler spécifiquement MCL-1 (et avec une affinité suffisamment élevée), une protéine anti-apoptotique très particulière de la famille BCL-2. En effet : les régulations de MCL-1 sont différentes des autres membres de la famille ; MCL-1 est un facteur de survie dans de nombreux types cellulaires ; son gène est l'un des plus amplifiés dans les cancers humains ; la surexpression constitutive de cette protéine est fréquemment impliquée dans le développement tumoral et dans les résistances thérapeutiques ; et enfin, son « silencing » induit l'apoptose dans certains types de cellules cancéreuses *in vitro*. Les approches visant à inhiber l'expression de MCL-1 avec des inhibiteurs de CDK se sont avérées décevantes en clinique à cause de leur faible spécificité et de leur mécanisme d'action indirect. Les premiers BH3 *mimetics* authentiques ciblant spécifiquement MCL-1 viennent d'être découverts. Ils interagissent avec la cible avec une affinité très élevée (sub-nanomolaire) et induisent l'apoptose mitochondriale dans des lignées dépendantes de MCL-1 pour la survie par un mécanisme « *on-target* » impliquant l'activation de BAX/BAK. La découverte de ces BH3 *mimetics* constitue un grand pas en avant dans la lutte contre les résistances thérapeutiques de cancers qui dépendent au moins en partie de MCL-1.

News and Commentary

First MCL-1-selective BH3 mimetics as potential therapeutics for targeted treatment of cancer

S Besbes^{1,2} and C Billard^{*1,2}

Cell Death and Disease (2015) 6, e1810; doi:10.1038/cddis.2015.168; published online 9 July 2015

In a recent issue of Cell Death and Disease, Leveson et al.¹ have identified for the first time several potent and selective small-molecules MCL-1 inhibitors displaying on-target cellular activity and inducing mitochondrial apoptosis in cancer cells. The discovery of these inhibitors exemplified by the compound A-1210477 constitutes a milestone in the development of MCL-1-specific BH3 mimetics for anticancer therapy.

Prosurvival members of the BCL-2 family such as BCL-2, BCL-X_L and MCL-1 are overexpressed in many cancers.² The antiapoptotic activity of these proteins is to bind and sequester their propapoptotic counterparts, notably the effectors of apoptosis BAX and BAK. Targeting the prosurvival BCL-2 family proteins therefore appeared as an attractive strategy to improve cancer therapy. One of the approaches to identify inhibitors of the prosurvival proteins has been to design small molecules capable of mimicking the BH3 domain of BH3-only BCL-2 family members.^{3,4} The latter are indeed antagonists of the prosurvival members. The so-called BH3 mimetics include short BH3 peptides and organic molecules. Their prototype ABT-737 and its orally bioavailable derivative navitoclax bind with high affinity (in the nM range) to BCL-2, BCL-X_L and BCL-W, inhibit their activity and induce BAX and BAK-dependent apoptosis in tumor cells.^{5,6} Navitoclax displays significant therapeutic effects especially in patients with hematologic malignancies but with a dose-limiting thrombocytopenia resulting from inhibition of BCL-X_L (that is a prosurvival factor for platelets).⁷ The BCL-2-specific derivative ABT-199 (venetoclax) was further designed.⁸ This agent has already shown impressive clinical results while sparing platelets, and is currently in phase III trials.⁷ Other authentic BH3 mimetics have been recently identified such as BM-1197, that displays characteristics similar to those of navitoclax, and the BCL-X_L-selective A-1155463.^{9,10}

None of these compounds can bind and antagonize MCL-1, whereas this unique prosurvival BCL-2 family protein is known to have a crucial role in the development of many cancers and/or their resistance to chemotherapy.^{11,12} It is also a key factor in the resistance of malignant cells to ABT-737 and navitoclax. Moreover, MCL-1 silencing has repeatedly been found to elicit tumor regression and cell death in various models. Therefore, a highly specific MCL-1 inhibitor would be greatly valuable in malignancies for which survival depends mainly or partly on MCL-1. The approach of inhibiting MCL-1 expression has been developed with cyclin-dependent kinase

inhibitors (e.g., flavopiridol, roscovitine and dinaciclib) but their action is indirect and non-specific.¹³ Several small molecules and BH3 peptides capable of directly binding MCL-1 and antagonizing its activity have been characterized such as MIM-1 and small molecule Mcl-1 inhibitor.¹⁴ However, none of them are considered as bona fide BH3 mimetics. Actually, high binding affinity is difficult to achieve, which may be due to the nature of the protein/protein interaction and the conformational rigidity of the hydrophobic binding groove of MCL-1.¹⁵ There are also difficulties to assess the mechanism of action. This gap just comes to be filled with the discovery of A-1210477 and related analogs.

Bruncko et al.¹⁶ first described a series of MCL-1 inhibitors derived from an indole-2-carboxylic acid core by high-throughput screening and structure-guided design. The compounds bind to MCL-1 with sub-nanomolar affinity (0.45 nM) and excellent selectivity over other BCL-2 family proteins. They have a 100-fold higher affinity than the indole-2-carboxylic acid previously identified by Friberg et al.¹⁷ (using NMR-based fragment screen approach); indeed, this small molecule Mcl-1 inhibitor has a binding affinity of 55 nM (which seems too low to confer on-target cellular effects). In a thorough mechanistic study on the series of MCL-1 inhibitors from Bruncko et al.,¹⁶ Leveson et al.¹ have shown that the compound A-1210477 and several related analogs disrupt MCL-1-BIM and MCL-1-NOXA complexes. In contrast, no effect was observed with another analog, which binds MCL-1 with a low affinity (130 nM) comparable to that of MCL-1 inhibitors described elsewhere. By using different methods and experimental conditions, Leveson et al.¹ also demonstrated that A-1210477 and its related analogs penetrate living cells and act directly on their target MCL-1. The compounds trigger apoptosis in multiple myeloma and non-small cell lung cancer cell lines that have been validated to be MCL-1-dependent. They induce hallmarks of the intrinsic pathway of apoptosis (mitochondrial membrane depolarization, cytochrome c release, caspase-3/7 activation and caspase-dependent phosphatidylserine externalization at the cell surface). In addition, apoptosis induction depends on BAX/BAK activation, confirming that the compounds act through an on-target mechanism. Consequently, A-1210477 and related analogs are the first bona fide BH3 mimetics specific for MCL-1 (Table 1). Furthermore, A-1210477 synergizes with navitoclax to induce apoptosis in various

¹INSERM U965, Hôpital Lariboisière, Paris, France and ²Université Paris Diderot-Paris 7, Paris, France

*Corresponding author: C Billard, INSERM U965, Hôpital Lariboisière, 41 Bd de la Chapelle, 75010 Paris, France. Tel: +33 1 6321 6750; Fax: +33 1 6321 6739; E-mail: christian.billard@inserm.fr

Table 1 Comparison of A-1210477 and related analogs with previous small-molecule inhibitors of prosurvival BCL-2 family proteins acting as authentic BH3 mimetics

Compounds	Specific targets	Status
ABT-737 ⁵	BCL-2, BCL-XL and BCL-W	Preclinical
Navitoclax ⁶	BCL-2, BCL-XL and BCL-W	Phase II trials ⁷
ABT-199 ⁸	BCL-2	Phase III trials ⁷
BM-1197 ⁹	BCL-2 and BCL-XL	Preclinical
A-1155463 ¹⁰	BCL-XL	Preclinical
A-1210477 and analogs ^{1,16}	MCL-1	Preclinical

cancer cell lines, indicating that the MCL-1-selective inhibitors might circumvent the resistance to navitoclax (or ABT-199) when used in combination.¹

An important issue is whether normal tissues could tolerate MCL-1 inhibition at the level required for therapeutic benefit. Indeed, MCL-1 knockout models suggest a number of toxic side effects. However, it is possible that inhibiting the functional activity of MCL-1 could be less toxic than the complete loss of the protein.

Whereas derivatives with appropriate pharmacologic properties are needed for the clinical application, the discovery of A-1210477 and related small molecules already appears as a great step forward in overcoming the therapeutic resistance of cancers that are at least in part dependent on MCL-1. Thus, these latest data on BH3 mimetic research are undoubtedly crucial to advance the targeted treatment of patients.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

- Leveson JD et al. *Cell Death Dis* 2015; 6: e1990.
- Kelly GL, Strasser A. *Adv Cancer Res* 2011; 30: 39-96.
- Billard C. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 1691-1700.
- Roy M et al. *Br J Pharmacol* 2014; 171: 1973-1987.
- Oltersdorf et al. *Nature* 2005; 435: 677-681.
- Tse C et al. *Cancer Res* 2008; 68: 3421-3428.
- Anderson MA, Huang D, Roberts A. *Semin Hematol* 2014; 51: 219-227.
- Souers AJ et al. *Nat Med* 2013; 19: 202-208.
- Bai L et al. *PLoS One* 2014; 9: e99404.
- Tao ZF et al. *ACS Med Chem Lett* 2014; 5: 1088-1093.
- Beroukhim R et al. *Nature* 2010; 463: 899-905.
- Periclavalle RM, Opferman JT. *Trends Cell Biol* 2013; 23: 22-29.
- Billard C. *Oncotarget* 2014; 5: 309-325.
- Belmar J, Fesik SW. *Pharmacol Ther* 2015; 145: 76-84.
- Shamas-Din A et al. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 508-520.
- Brundio M et al. *J Med Chem* 2015; 58: 2180-2194.
- Frlberg A et al. *J Med Chem* 2012; 55: 15-30.



Cell Death and Disease is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>