

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE 62 – Sciences de la vie et de la santé
C2VN – INSERM UMR 1263

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Pathologie Humaine

Spécialité : Physiopathologie vasculaire et nutrition

Léa PLANTUREUX

**Conséquences de l'interaction des plaquettes avec les cellules
cancéreuses sur le développement de la tumeur et la
formation de métastases.
Cas du cancer colorectal**

Soutenue le 13/12/2018 devant le jury :

Pr Daniel OLIVE	Aix-Marseille Université	Président
Dr Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA	Université d'Angers	Rapporteur
Dr Marie-Pierre GRATACAP	Université de Toulouse	Rapporteur
Dr Peter LENTING	Université de Paris Sud	Examineur
Dr Isabelle VAN SEUNINGEN	Université de Lille	Examineur
Pr Christophe DUBOIS	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE 62 – Sciences de la vie et de la santé
C2VN – INSERM UMR 1263

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Pathologie Humaine

Spécialité : Physiopathologie vasculaire et nutrition

Léa PLANTUREUX

**Conséquences de l'interaction des plaquettes avec les cellules
cancéreuses sur le développement de la tumeur et la
formation de métastases.
Cas du cancer colorectal**

Soutenue le 13/12/2018 devant le jury :

Pr Daniel OLIVE	Aix-Marseille Université	Président
Dr Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA	Université d'Angers	Rapporteur
Dr Marie-Pierre GRATACAP	Université de Toulouse	Rapporteur
Dr Peter LENTING	Université de Paris Sud	Examineur
Dr Isabelle VAN SEUNINGEN	Université de Lille	Examineur
Pr Christophe DUBOIS	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse

Abstract

Increasing evidence has demonstrated that platelets actively participate to the progression of metastasis. However, their roles in tumor growth are still subject to controversy. Here, we investigated the interaction of platelets with colorectal tumors. We showed that platelets extravasate in the tumor microenvironment and interact with the tumor cells in a cadherin-6 dependent manner. This interaction induces the spreading of platelets, the release of their granules content and the generation of three types of microparticles named iMPs expressing makers of platelets, tumor and both. The presence of iMPs was confirmed in patients suffering from a colorectal cancer. In the microenvironment, platelets induce a significant diminution of the tumor growth and a significant increase in the number of intratumoral macrophages. iMPs participate in the recruitment of macrophages by vectorizing the cytokines RANTES, CCL2 and CXCL12 and activate their tumor cell killing capacity through IFN- γ and IL-4. This lead to the cell cycle arrest of the tumor in a P21 (Waf1/Cip1) dependent pathway. In contrast, in the bloodstream, platelets and production of iMPs induce the adhesion of tumor cells to the endothelium mainly via the transfer of β_3 integrin from platelets to tumor and the activation of endothelial cells. Altogether, our results indicate that, in the tumor microenvironment, Cadherin- 6 dependent platelet-tumor cells interactions induce the generation of iMPs leading to the recruitment and the activation of tumoricidal macrophages whereas, in bloodstream, platelets and circulating iMPs favor the interaction of tumor cells with the endothelium, promoting the formation of metastasis.

Résumé

De plus en plus d'évidences démontrent que les plaquettes participent activement à la formation de métastases. Cependant, leurs rôles dans la croissance tumorale est toujours sujet à controverse. Dans cette étude, nous avons décidé d'étudier les interactions des plaquettes avec des tumeurs colorectales. Nous avons démontré que les plaquettes s'extravasent dans le microenvironnement et interagissent avec les cellules tumorales de manière dépendante de la cadhérine-6. Cette interaction induit l'étalement des plaquettes, la libération du contenu de leur granules et la génération de trois types de microparticules, nommée iMPs, exprimant des marqueurs plaquettaires, tumoraux ou les deux. Ces iMPs ont par ailleurs été retrouvées dans le plasma et dans les tumeurs primaires de patients souffrant d'un cancer colorectal. Dans le microenvironnement tumoral, les plaquettes induisent une diminution significative de la croissance tumorale et une augmentation significative du nombre de macrophages intra-tumoraux. De par la vectorisation des chémokines RANTES, CCL2 et CXCL12, les iMPs participent au recrutement des macrophages dans le microenvironnement et activent leur capacités anti-tumorales à travers les cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et Il-4. Ce mécanisme mène à l'arrêt du cycle cellulaire dans les tumeurs via l'induction de la protéine inhibitrice des kinases dépendantes des cyclines p21 (Waf1/Cip1). En revanche, dans la circulation, les plaquettes et la production des iMPs augmentent l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium principalement par le transfert de la sous-unité d'intégrine β_3 des plaquettes aux cellules tumorales et via l'activation des cellules endothéliales. Nos résultats indiquent donc que dans le microenvironnement tumoral, les interactions cadhérine-6 dépendantes entre les plaquettes et les cellules tumorales induisent la génération de iMPs menant au recrutement et à l'activation des macrophages tumoricides, alors que dans la circulation, les plaquettes et les iMPs circulantes favorisent l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium, promouvant alors la formation de métastases.

Remerciements

Je remercie le Pr Françoise Dignat-George, directrice de l'ex-unité INSERM UMR_S 1076, de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son unité de recherche, maintenant devenue le C2VN INSERM UMR 1263.

Je remercie le Pr Daniel Olive de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Ramarason Andriantsitohaina et le Dr Marie-Pierre Gratacap d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Dr Peter Lenting et le Dr Isabelle Van Seuningen qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le Pr Christophe Dubois et le Dr Laurence Panicot-Dubois de m'avoir accueillie dans leur groupe « Thrombose et cancer », d'avoir dirigé cette thèse et de m'avoir donné la possibilité d'assister à plusieurs congrès nationaux et internationaux. Je les remercie également pour leurs conseils, leurs exigences et le temps précieux qu'ils ont consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche tout au long de ces années de travail.

Je tiens également à remercier les membres du groupe « Thrombose et Cancer » présents ou passés : Rolf (alias Caribou), Lydie, Estelle, Eva, Lise, Lisa, Caroline, Soraya, Roxane, Diane et Walid pour leur bonne humeur tous les matins, leur professionnalisme et leurs conseils.

Je remercie également tous les membres du C2VN qui m'ont aidée dans la réalisation de cette thèse et avec qui j'ai pu partager et apprendre beaucoup tant au niveau professionnel que personnel : Richard, Nathalie, Claire, Edwige, Romaric, Stéphane P, Stéphane R, Marcel, Aurélie, Karim, Célia, Annick, Samy, Stéphanie, Dylianna, Corinne

Un grand merci à tous mes coupains/coupines et ami(e)s qui m'ont aidée et soutenue tout au long de ce travail. Marie, ton rire et ta bonne humeur me manquent énormément. Merci pour tous ces supers moments passés ensemble dans le laboratoire comme en dehors, en fous rires comme en pleurs, tu es une vraie amie. Merci à Fiona, pour sa bonne humeur, ses blagues et

son humour toujours plus noir... je suis très contente de t'avoir rencontrée et tu as été d'un grand soutien pour moi.

Merci à Mathilde, alias bébé boulette, pour sa bonne humeur et ses blagues. Merci à Stéphane R pour tous ses conseils tant professionnels que personnels, tu as été d'un soutien sans limites. Je remercie également Anneline, qui m'a beaucoup aidée cette dernière année, je t'apprécie beaucoup. Merci à Loris, Amandine et Estelle pour tous ces bons moments passés ensemble.

Je remercie également tous les membres de ma famille qui ont suivi de près ou de loin mon évolution, qui m'ont soutenu. Maman, merci pour tout ce que tu m'as inculqué et apporté tout au long de ma vie, sans ton soutien je ne serai jamais arrivée jusque-là. Alexis, mon frerot, merci pour ton soutien tout au long de ces années. Papa, tu m'as donné malgré toi la force d'avancer, d'aller de l'avant, j'espère que tu serais fier de moi.

Anthony, mon amour, merci pour ta patience à toute épreuve, pour ton soutien et tes conseils avisés, et surtout pour tout l'amour que tu m'apportes tous les jours.

Table des matières

Abstract.....	1
Résumé.....	2
Remerciements	3
Publications – Communications – Posters – Bourses	6
Liste des illustrations et figures	8
Liste des abréviations	9
INTRODUCTION	12
1. Les plaquettes, cellules effectrices de l'hémostase et de la thrombose	13
1.1 <i>Plaquettes – Généralités</i>	<i>13</i>
1.2 <i>Rôles des plaquettes dans l'hémostase et la thrombose.....</i>	<i>17</i>
2. Dialogue entre les plaquettes et la tumeur primaire.....	26
2.1 <i>Impacts du cancer sur la production de plaquette, sur l'activation et l'éducation des plaquettes et mécanismes impliqués dans la thrombose associée au cancer – Révisions mineures Cancers - 2018.....</i>	<i>26</i>
2.2 <i>Effets des plaquettes sur la progression tumorale</i>	<i>50</i>
3. Les plaquettes, cellules effectrices de l'inflammation et de l'immunité.	59
3.1 <i>Plaquettes, inflammation et réponse immunitaire innée</i>	<i>60</i>
3.2 <i>Plaquettes et réponse immunitaire adaptative</i>	<i>66</i>
3.3 <i>Rôles des monocytes et macrophages dans la biologie de la tumeur.....</i>	<i>68</i>
BUT DE L'ETUDE.....	81
RESULTATS.....	83
Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer.....	84
Rôles paradoxaux des plaquettes dans le cancer colorectal.....	84
<i>Introduction</i>	<i>84</i>
<i>Résultats – article « Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer ».....</i>	<i>88</i>
DISCUSSION & PERSPECTIVES	137
1. Présence de plaquettes intra-tumorales et interactions plaquettes – cellules cancéreuses cadhérine-6 dépendantes	139
2. Rôles des plaquettes et des iMPs dans la croissance tumorale	147
2.1 <i>Attraction et activation des fonctions anti-tumorales des macrophages au sein du microenvironnement médiées par l'interaction plaquettes-cellules de CCR.</i>	<i>147</i>
2.2 <i>Activation des fonctions anti-tumorales des TAMs et immunothérapie</i>	<i>151</i>
3. Rôles des plaquettes et des iMPs dans la formation de métastases.....	156
CONCLUSION	160
BIBLIOGRAPHIE.....	162

Publications – Communications – Posters – Bourses

Publications :

Effects of platelets on cancer progression (revue). Léa Plantureux, Lydie Crescence, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois. *Thrombosis Research*, 2018.

Impacts of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer associated thrombosis (revue). Léa Plantureux, Lydie Crescence, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois. *Cancers*, 2018.

Paradoxical roles of platelet in colorectal cancer. Léa Plantureux, Diane Mège, Lydie Crescence, Stéphane Robert, Walid Ezzedine, Françoise Dignat George, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois. Soumis dans *Blood*, 2018.

Publication annexe :

Neutrophil extracellular traps are associated with the pathogenesis of diffuse intra-alveolar hemorrhage in murine lupus. Pierre André Jarrot, Edwige Tellier, Léa Plantureux, XXX Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois, Gilles Kaplanski. Soumise dans *Arthritis and Rheumatology*, 2018.

Communications :

Léa Plantureux, Lydie Crescence, Soraya Mezouar, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot Dubois, Christophe Dubois. **Involvement of K-cadherin in the interactions of platelets with colorectal cancer cells.** *Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT)*, 2015, Grenoble, France.

Léa Plantureux, Lydie Crescence, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot Dubois, Christophe Dubois. **Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer development.** *Groupe Français sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT)*, 2016, Tours, France.

Léa Plantureux, Lydie Crescence, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot Dubois, Christophe Dubois. **Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer development.** *Colloque EDSV*, 2017, Marseille, France.

Léa Plantureux, Diane Mège, Lydie Crescence, Stéphane Robert, Walid Ezzedine, Françoise Dignat George, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois. **Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer.** *European Congress of Thrombosis and Hemostasis (ECTH)*, 2018, Marseille, France.

Posters :

Léa Plantureux, Lydie Crescence, Soraya Mezouar, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot Dubois, Christophe Dubois. **Involvement of K-cadherin in the interactions of platelets with colorectal cancer cells.** *Eurothrombosis*, 2015, Como, Italy.

Léa Plantureux, Lydie Crescence, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot Dubois, Christophe Dubois. **Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer behavior.** *International Society on Thrombosis and Hemostasis*, 2017, Berlin, Allemagne.

Bourses :

2015-2018 : Bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR)

2015 : Travel Grant of Eurothrombosis congress, Como, Italy

2018 : Bourse GFHT dans le cadre d'une communication orale à l'ECTH 2018, Marseille, France.

Liste des illustrations et figures

- Figure 1 :** Les plaquettes par Osler.....
- Figure 2 :** Thrombus dans une veine mésentérique chez le cochon d'inde.....
- Figure 3 :** Etapes et facteurs impliqués dans la mégacaryocytopoïese
- Figure 4 :** Ultrastructure schématique des plaquettes.....
- Figure 5 :** Composition des différents granules plaquettaires.....
- Figure 6 :** Voies de signalisation des trois récepteurs d'adhésion principaux présents à la surface des plaquettes (GPIb-IX-V ; GPVI ; intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$).....
- Figure 7 :** Voies de signalisation des récepteurs activateurs principaux présents à la surface des plaquettes (P2Y1, P2Y12, PAR1, PAR4, 5HT2a, TP).....
- Figure 8 :** Mécanismes d'adhésion et d'activation des plaquettes dépendante du collagène sous endothélial.....
- Figure 9 :** Les différentes voies de la cascade de coagulation et leurs inhibiteurs.....
- Figure 10 :** Mécanismes de formation des microvésicules.....
- Figure 11 :** Microscopie électronique d'un thrombus sur une lame de verre coatée au collagène
- Figure 12 :** Dialogue entre les plaquettes et l'endothélium quiescent et activé.....
- Figure 13 :** Mécanismes moléculaires du recrutement des leucocytes dépendant de l'interaction entre les plaquettes et l'endothélium activé.....
- Figure 14 :** Promotion de l'athérogenèse via les interactions plaquettes – leucocytes.....
- Figure 15 :** Représentation schématique simplifiée du rôle des plaquettes dans l'inflammation et l'immunité.....
- Figure 16 :** Représentation schématique de la polarisation des macrophages.....
- Figure 17 :** Rôles des TAMs en fonction des signaux donnés par le microenvironnement tumoral.....
- Figure 18 :** La cadhérine-6 n'est pas impliquée dans l'étalement des plaquettes humaines à la surface des cellules de CCR HT29.....
- Figure 19 :** La cadhérine-6 est impliquée dans la croissance tumorale du CCR.....
- Figure 20 :** Présence de macrophages à proximité des plaquettes intra-tumorales.....

Liste des abréviations

ADAM-9 : A disintegrin And Metalloproteinase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP: Adenosine Di Phosphate
Akt : Protein kinase
ANG : Angiopoïétine
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATP : Adenosine TriPhosphate
BK : Bradykinine
BMP : Bone morphogenetic protein
BNIP3(L) : BCL2 Interacting Protein 3 (ligand)
CCLn : Chémokine Ligand
CCR : Cancer Colorectal
CD : Cluster of Differentiation
Cellules NK : Cellules Natural Killer
CLEC-2 : C-Type-Lectin- Like 2
CMF : Cytométrie en Flux
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX-1 : Cyclooxygenase -1
CPT : Carcinome Papillaire de la Thyroïde
CSF : Colony Stimulating Factor
CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DRP1 : Dynamin-Related Protein 1
EGF : Epidermal Growth Factor
EP-4 : Prostaglandin E2 receptor 4
FAK : Focal Adhesion Kinase
FAS : First Apoptosis Signal
FGF: Fibroblast Growth Factor
FoxP3 : Forkhead box P3
FT : Facteur tissulaire
G-CSF : Granulocyte - Colony Stimulating Factor
GABARAP : Gamma-AminoButyric Acid Receptor-Associated Protein
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
GP1b α : Glycoprotéine 1b α
GPCRs : Récepteurs couplés aux protéines G
GPVI : Glycoprotéine VI
GTPases : Guanosine TriPhosphatases
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HMGB1: High Mobility Group Box Protein 1
HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1
IDO-1 : Indoleamine 2,3 dioxygenase 1
IFN- γ : Interféron gamma

IL : Interleukine
 iMPs : interaction derived purified MPs
 iNOS: inducible Nitric oxide synthase
 IP-10 : IFN- γ induced protein 10
 iSN : interaction derived supernatant
 ISTH : International Society of Thrombosis and Hemostasis
 JAM-C : Junctional Adhesion Molecule C
 LIF : Leukemia Inhibitory Factor
 LPS: Lipopolysaccharide
 Mac-1 : Macrophage- 1 antigen ou $\alpha_M\beta_2$ integrin
 MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
 MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein 1
 MIF : Macrophage Migration inhibitory factor
 MIP-1 α : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha
 miR : micro ARN
 MK : Mégacaryocytes
 MMP: Métalloprotéases matricielles
 MSDCs : Myeloid Suppressive Derived Cells
 MTEV : Maladie ThromboEmbolique Veineuse
 NETs : Neutrophil Extracellular Traps
 NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B
 NO : monoxyde d'azote
 NOD: Nucleotide Binding Oligomerization Domain
 OCS: Open Canicular System
 PA : Activateur du plasminogène
 PAF : Platelet Activating Factor
 PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
 PAR : Protease activating receptor
 PD-(L)1: Programmed cell Death protein (ligand) 1
 PDA : Adénocarcinome ductal pancréatique
 PDGF: Platelet Derived Growth Factor
 PDPN : Podoplanine
 PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
 PF4 : Platelet Factor 4
 PGE2 : Prostaglandine E2
 PI3K : Phospho inositol 3 kinase
 PMPs : Platelet Microparticles
 PS : PhosphatidylSerine
 PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
 RANTES : Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted)
 Rb : Rétinoblastome
 RGDV : Peptide composé de Arg-Gly-Asp-Val
 ROS : Reactive Oxygen Species
 RPA: Réponse de phase aigue
 SAA: Serum Amyloid A
 SDF-1 : Stromal cell Derived Factor 1
 shRNA : Short hairpin RNA

siRNA: small interfering RNA
SIRP α : Signal Regulatory Protein α
STAT: Signal Transducer and activator of transcription
T+PMPs : Tumor + Platelets Microparticles
TAMs : Tumor associated macrophages
TCIPA: Tumor Cell Induced Platelet Aggregation
TCR: T Cell Receptor
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF- β : Transforming Growth Factor β
Th : T helper
TLR: Toll Like Receptor
TMPs : Tumor Microparticles
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TP : Récepteur du thromboxane
tPA : Activateur du plasminogène de type tissulaire
TPO : Thrombopoïétine
TRAIL : Tumor Necrosis Factor related apoptosis-inducing ligand
TXA₂: Thromboxane A2
uPA : Activateur du plasminogène de type urokinase
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VWF : Facteur de VonWillebrand
WT : Wild-type = sauvage

INTRODUCTION

1. Les plaquettes, cellules effectrices de l'hémostase et de la thrombose

1.1 Plaquettes – Généralités

Les plaquettes ont été découvertes en 1874 par William Osler qui décrit la présence de « corpuscules » d'origine étrangère au sein d'une veinule de rat (**Figure 1**). Ce n'est qu'en 1882, à travers des représentations des veinules de mésentère du cochon d'inde, observé par microscopie intravitale, que Bizzozzero identifie et caractérise les plaquettes et leur fonction dans l'hémostase et la thrombose. Il décrit ainsi pour la première fois la structure des plaquettes circulantes, et montre la présence de plaquettes et de leucocytes au site de formation de thrombus (**Figure 2**). Osler, quant à lui, établit en 1886, le rôle des « plaques de sang » dans les maladies thrombotiques tel que le cancer.

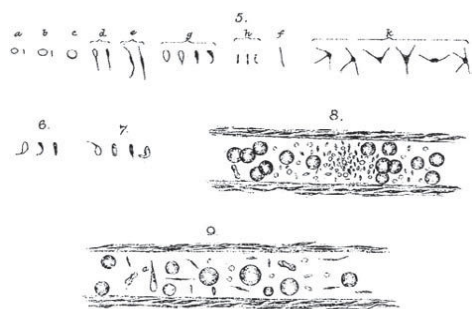


Figure 1 : Les plaquettes par Osler. Dessin de « corpuscules » ou plaquettes (5,6,7) et de veines de rat (8,9) réalisé par Osler (*D'après Osler W 1875, Proc R Soc Lond*).

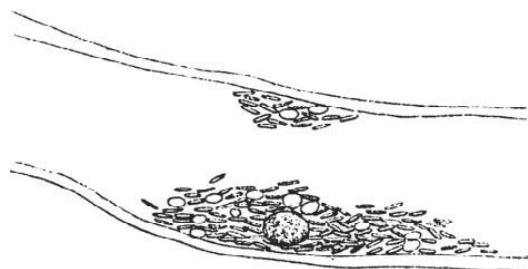


Figure 2 : Thrombus dans une veine mésentérique chez le cochon d'inde. Dessin réalisé par Bizzozzero d'un thrombus composé de plaquettes et de leucocytes au sein d'une veine du mésentère du cochon d'inde observé par microscopie intravitale. (*D'après Bizzozzero G 1882 Virchows Arch Pathol Physiol*).

Depuis, de nombreuses études se sont intéressées à la structure des plaquettes, à leur genèse dans la moelle osseuse ainsi qu'à leurs rôles physiologiques et/ou pathologiques. Les plaquettes ou thrombocytes, sont décrites comme des éléments cellulaires anucléés, de taille comprise entre 2 et 4 μm . Elles sont produites au cours de la thrombopoïèse dans la moelle osseuse, à partir des mégacaryocytes. Les mégacaryocytes sont issus de cellules souches progénitrices, qui par le biais d'un mélange complexe de facteurs de croissance et de cytokines spécifiques à chaque étape, vont se différencier pour devenir des mégacaryocytes matures polypléides¹ (**Figure 3**). Les mégacaryocytes, une fois à maturité, émettent des élongations à

travers les sinus vasculaires de la moelle osseuse dont la fragmentation donne naissance aux proplaquettes. Les proplaquettes se retrouvent alors dans la circulation, et se scindent pour donner de véritables plaquettes fonctionnelles.

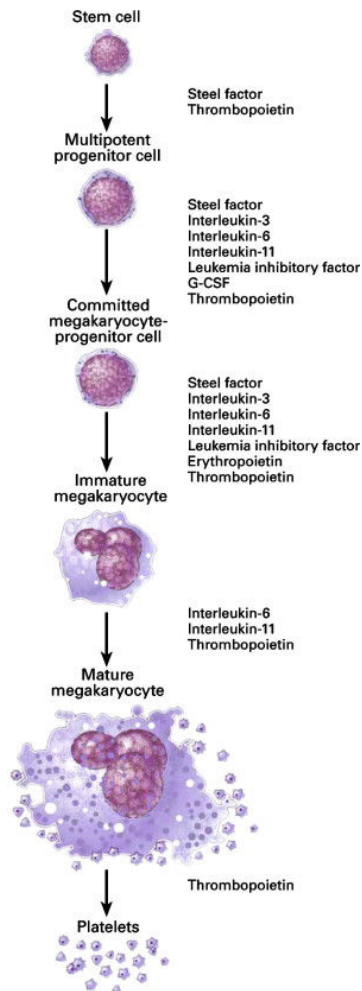


Figure 3 : Etapes et facteurs impliqués dans la mégacaryocytopoïese. La TPO joue un rôle central dans la mégacaryocytopoïese en régulant chaque étape de la maturation et du développement des MK. Elle agit de concert avec d'autres cytokines hématopoïétiques et facteurs de croissance tels que l'Il-3, l'Il-6, l'Il-11, l'érythropoïétine, le G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor), le facteur leukemia inhibitor (LIF) et le facteur steel (Steel factor) pour induire la croissance et la différenciation des mégacaryocytes à partir des cellules progénitrices de la moelle osseuse, pour *in fine* conduire à la production de plaquettes. (Adapté de N. Afdhal et al. *Journal of Hepatology* 48 (2008) 1000-1007).

Récemment, les poumons ont également été décrits comme un lieu de production de plaquettes à partir de mégacaryocytes intravasculaires provenant de sites extrapulmonaires^{2,3}. Les plaquettes sont produites à raison de 10^{11} plaquettes/jours permettant un renouvellement permanent, et ont une durée de vie comprise entre 8 et 10 jours¹. Chez l'homme, les valeurs normales de plaquettes circulantes sont comprises entre 150 et 400 000 plaquettes/ μ L.

Les plaquettes sont considérées comme de véritables « sac à protéines » puisqu'elles possèdent plus de 4 000 protéines différentes, distribuées à la membrane cellulaire ou dans des

compartiments spécifiques appelés granules ⁴ (**Figure 4**). De plus, malgré l'absence de noyau, les plaquettes possèdent toute la machinerie nécessaire à la production de protéines (traduction des ARNm) permettant leur biosynthèse et l'approvisionnement de certains granules. Trois types de granules distincts sont présents dans les plaquettes : (i) les granules alpha (40 à 80 par plaquette), riches en protéines impliquées dans l'agrégation plaquettaire, telles que le fibrinogène, la fibronectine et le facteur de VonWillebrand (VWF), des protéines de la cascade de coagulation et de la fibrinolyse, telles que les facteurs V et VIII, l' α_2 antiplasmine et le plasminogène, ainsi que des facteurs de croissance, des chemokines et des molécules d'adhésions glycoprotéiques tels que la P-sélectine, la GP1b α et l' $\alpha_{IIb}\beta_3$. (ii) Les granules denses (4 à 8 par plaquette) contenant des agonistes plaquettaires, tels que l'ADP, l'ATP et la sérotonine et (iii) les lysosomes contenant principalement des enzymes de dégradation tels que des protéases et glycosidases ⁵ (**Figure 5**).

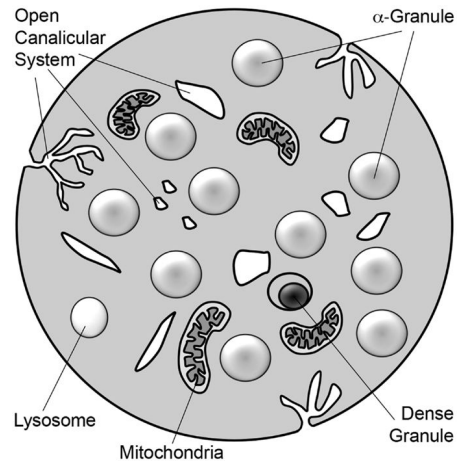


Figure 4 : Ultrastructure schématique des plaquettes. (Adapté de Fitch-Tewfik and Flaumenhaft *Frontiers in endocrinology* 2013)

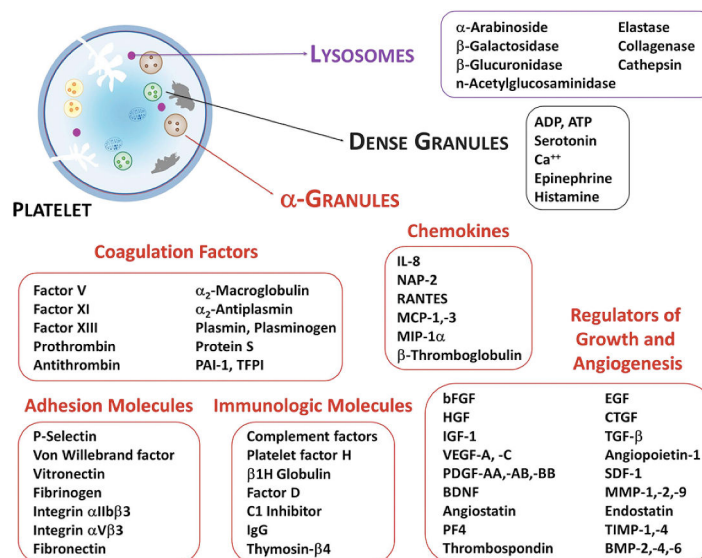


Figure 5 : Composition des différents granules plaquettaires (D'après Burnouf T. et al. *Biomaterials* 2016)

Au cours de l'activation plaquettaire, le contenu des différents granules est libéré dans le milieu extracellulaire, participant ainsi à l'amplification de l'activation et à la formation du

caillot sanguin. Les plaquettes possèdent également de nombreux récepteurs et glycoprotéines membranaires, leur permettant d'adhérer rapidement aux surfaces lésées, de s'activer et de s'agréger pour former un clou plaquettaire, ce qui est essentiel pour leur fonction hémostatique et thrombotique. Un système d'invagination membranaire, appelé OCS, pour Open Canalicular System, est présent au sein des plaquettes, facilitant leur étalement au cours de l'activation et augmentant la surface d'expression des récepteurs d'adhésion et d'activation.

Les récepteurs d'adhésion sont des glycoprotéines telles que la GPIb-IX-V, la GPVI et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, permettant d'adhérer au VWF, au collagène et au fibrinogène respectivement. Récemment, le Dr Pierre Mangin et ses collaborateurs ont montré que l'adhésion des plaquettes sur une matrice de fibrinogène et leur activation est également dépendante de la GPVI ⁶. L'adhésion des plaquettes à ces molécules, induit leur activation et la libération de leur granules, contenant des agonistes plaquettaire. Les agonistes plaquettaire vont alors se lier à leurs récepteurs présents à la surface de la plaquette, tels que les récepteurs à la thrombine (PAR1 et PAR4), les récepteurs à l'ADP (P2Y1 et P2Y12), les récepteurs au TXA₂ (TP) et autres (**Figure 6 et 7**) ayant pour conséquence une amplification de la réponse activatrice ⁷.

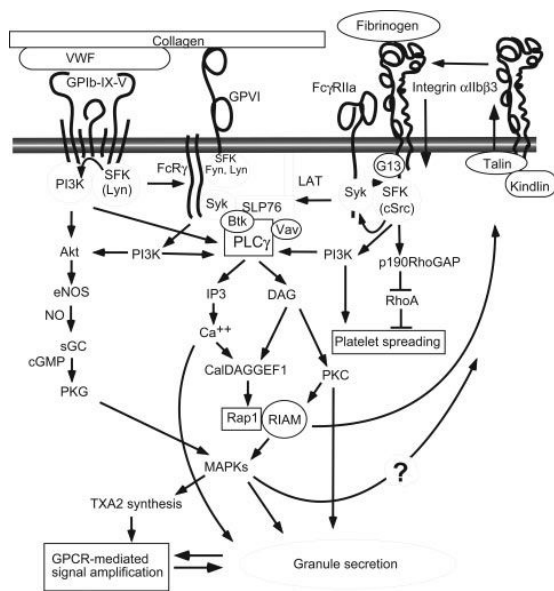


Figure 6 : Voies de signalisation des trois récepteurs d'adhésion principaux présents à la surface des plaquettes (GPIb-IX-V ; GPVI ; intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$)
(Adapté de Zhenyu Li et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010)

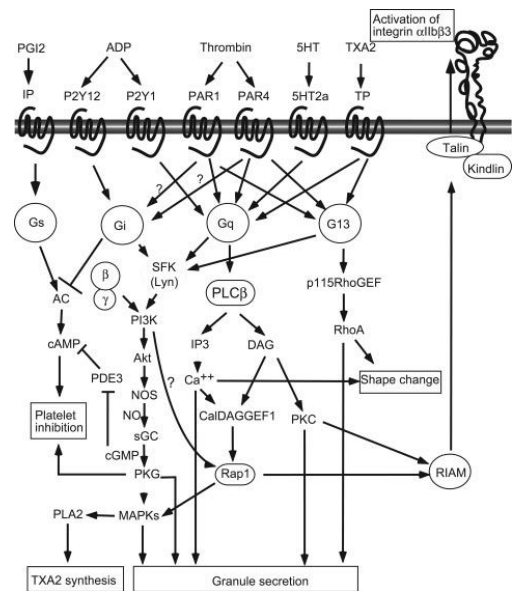


Figure 7 : Voies de signalisation des récepteurs activateurs principaux présents à la surface des plaquettes (P2Y1, P2Y12, PAR1, PAR4, 5HT2a, TP)
(Adapté de Zhenyu Li et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010)

1.2 Rôles des plaquettes dans l'hémostase et la thrombose

L'hémostase se définit comme un processus physiologique visant à arrêter le saignement au niveau d'une brèche vasculaire par la formation d'un caillot aussi appelé thrombus. En condition normale, les plaquettes circulantes n'interagissent pas avec l'endothélium quiescent et sont maintenues dans un état de repos sous forme discoïde. La présence d'une lésion vasculaire va induire une série d'événements ayant pour conséquence l'adhésion des plaquettes, leur activation accompagnée d'un changement de forme, leur agrégation et l'activation de la cascade de coagulation, pour *in fine* former un clou plaquettaire et éviter une perte trop importante de sang. Deux types de lésions vasculaires ont été décrites à ce jour, celles ayant pour conséquence l'activation des cellules endothéliales, et celles induisant l'exposition de la matrice sous endothéliale riche en collagène. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en œuvre dans l'activation plaquettaire et la formation du thrombus sont différents en fonction du type de lésion.

1.2.1 Activation plaquettaire dépendante du collagène sous endothélial

Lors d'une brèche vasculaire, le collagène, le VWF et les protéines de la matrice sous endothéliale se retrouvent exposés à tous les constituants du compartiment sanguin, ayant pour conséquence un recrutement rapide des plaquettes au site de blessure. L'exposition du VWF sous endothélial et particulièrement de son domaine A1 va permettre l'interaction rapide des plaquettes, de manière dépendante du récepteur d'adhésion plaquettaire GPIb-IX-V, avec la matrice sous endothéliale. Cette première interaction induit alors le « rolling » des plaquettes sur la paroi lésée^{8,9}. Cette étape est suivie d'une adhésion transitoire dépendante de l'interaction de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ avec le VWF^{8,9}. Puis, l'exposition du collagène sous endothélial et l'engagement des récepteurs glycoprotéiques plaquettaires GPVI-FcR γ et $\alpha_2\beta_1$ au cours du « rolling » et de l'adhésion transitoire vont induire l'arrêt des plaquettes et leur activation.

Les interactions des récepteurs d'adhésion plaquettaire GPIb-IX-V et GPVI avec leurs substrats sous endothéliaux respectifs, sont responsables de l'activation de la voie de signalisation dite « inside-out » dans la plaquette induisant (i) l'étalement des plaquettes avec l'émission de filopodes, permettant d'augmenter la surface de recouvrement ; (ii) la sécrétion du contenu de leurs granules tels que des agonistes plaquettaires (ADP, TXA₂, Thrombine...),

permettant de recruter les plaquettes circulantes et d'amplifier la réaction d'activation plaquettaire ; (iii) la sécrétion de molécules de fibrinogène accompagnée d'une augmentation de l'expression membranaire de l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ (iv) l'interaction avec le fibrinogène et/ou le VWF va induire son activation (changement de conformation), et permettre le pontage des plaquettes entre elles, induire leur agrégation et assurer la stabilité du thrombus ainsi formé ¹⁰.

En effet, la liaison de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ activée à ses ligands, tels que le fibrinogène principalement et le VWF induit en retour la signalisation « outside-in » au sein des plaquettes assurant la stabilité du thrombus. La signalisation « outside-in » induit une réorganisation du cytosquelette, la formation et la stabilisation de larges agrégats plaquettaires, le développement d'une surface pro-coagulante et une rétractation du clou plaquettaire afin de combler les espaces inter-plaquettaires et de concentrer les agonistes plaquettaires ¹¹. Dans un modèle de thrombose au chlorure de fer, les souris déficientes en fibrinogène forment des thrombi instables dont le détachement induit le développement d'embolies occlusives. De plus, dans ce même modèle de thrombose, l'absence de VWF a pour conséquence un retard dans l'initiation de la formation du thrombus et une diminution de la taille des thrombi. Les souris doubles déficientes pour ces deux facteurs ont les caractéristiques de chaque modèle isolé. Le VWF et le fibrinogène agissent donc en synergie pour assurer la stabilité du thrombus ¹⁰. Ces mécanismes ont pu être découverts et caractérisés grâce aux progrès technologiques réalisés au cours de ces dernières décennies, dont l'avancée majeure correspond à la microscopie intravivante. Le modèle de thrombose au chlorure de fer induisant une dénudation de l'endothélium dans des conditions expérimentales bien définies, a permis de reproduire et de comprendre l'activation plaquettaire dépendante du collagène sous endothélial (**Figure 8**).

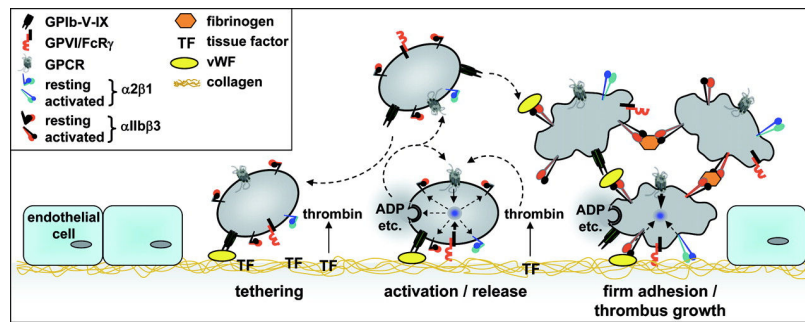


Figure 8 : Mécanismes d'adhésion et d'activation des plaquettes dépendante du collagène sous endothélial. L'interaction GPIb α -VWF induit l'adhésion et le rolling des plaquettes sur la paroi lésée. Cette étape est suivie de l'arrêt des plaquettes sur la paroi lésée et de leur activation de manière dépendante de l'interaction du GPIV/FcR γ avec le collagène sous endothélial. L'activation des plaquettes induit un changement de forme des plaquettes, la libération des agonistes contenus dans leurs granules, tels que l'ADP et la thrombine, permettant d'amplifier la réaction d'activation plaquettaire et l'activation des intégrines assurant la stabilité du thrombus en formation (D'après Varga-szabo D. et al. ATVB 2009).

1.2.2 Activation plaquettaire dépendante de la cascade de coagulation

L'activation des cellules endothéliales correspond à un autre type de lésion vasculaire responsable du recrutement des plaquettes et de la formation d'un thrombus. La microscopie intravitale, et surtout la mise au point d'un modèle murin d'activation endothéliale au rayon laser, dans lequel la matrice sous endothéliale n'est pas exposée, a permis une compréhension approfondie des mécanismes impliqués dans l'activation des plaquettes et la formation du thrombus *in vivo*, dépendants de la cascade de coagulation et indépendants des récepteurs GPVI et vWF¹².

La cascade de coagulation a été décrite pour la première fois en 1964 par Davie, Ratnoff et MacFarlane^{13,14}. Elle est caractérisée par deux voies d'activations indépendantes, la voie extrinsèque ou exogène dépendante du facteur tissulaire (FT) et la voie intrinsèque ou endogène dépendante du facteur XII (fXII). Ces deux voies convergent vers une voie commune dont le but final est la production de thrombine favorisant d'une part l'activation plaquettaire et d'autre part le clivage du fibrinogène en fibrine responsable de la stabilisation du thrombus ainsi formé (**Figure 10**). La cascade de coagulation correspond à un ensemble de réactions enzymatiques en chaîne qui ne peuvent avoir lieu que sur une surface phospholipidique chargée négativement. Ces réactions enzymatiques correspondent à des protéolyses limitées transformant les pro-enzymes en enzymes actives (facteurs de coagulation). Au cours de l'activation plaquettaire, la

mobilisation de calcium intra-cytoplasmique permet d'activer un ensemble d'enzymes membranaires induisant un flip-flop de la phosphatidylserine (PS) et l'externalisation des phospholipides chargés négativement¹⁵. L'activation des plaquettes induit également l'émission de microvésicules exprimant la PS à leur surface. La surface des plaquettes activées ou de leurs microvésicules et des cellules endothéliales activées permet alors la fixation des facteurs de la cascade de coagulation à la PS chargée négativement.

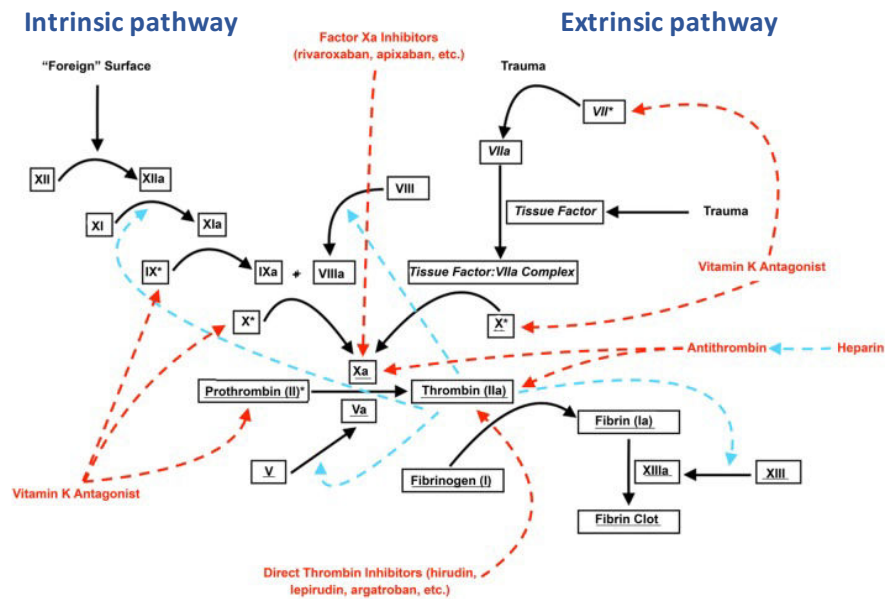


Figure 9 : Les différentes voies de la cascade de coagulation et leurs inhibiteurs.
(Adapté de J Guan et al. Front Neurol 2016)

La voie extrinsèque ou exogène de la cascade de coagulation est une voie dépendante du FT (aussi appelé CD142, fIII, thrombokinasé ou thromboplastine). Le FT est une protéine membranaire de 50 kDa exprimée constitutivement à la surface de certains types cellulaires incluant par exemple les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules cancéreuses^{16,17}. Son expression est également observée à la surface des cellules endothéliales, des leucocytes et de leurs microparticules lorsque ceux-ci sont activés^{18,19}. Une faible quantité de FT activé est suffisante pour initier la voie extrinsèque de la cascade de coagulation. Le FT est capable de se lier au facteur VII pour former un complexe actif (FT/fVIIa) responsable de l'activation protéolytique du facteur IX et du facteur X. L'activation du facteur X (fXa) a pour conséquence le clivage de la pro-thrombine (fII) en thrombine (fIIa). La génération locale de thrombine est une étape très importante et va participer à trois processus essentiels dans la formation du thrombus. Premièrement, par le biais de son activité protéolytique sur les récepteurs PAR1 et

PAR4 des plaquettes, la thrombine va induire le recrutement, l'activation et l'agrégation des plaquettes environnantes permettant ainsi de recouvrir et protéger toute la surface lésée. Deuxièmement, l'accumulation locale de thrombine est responsable d'une boucle de retro-activation des différents facteurs de la cascade coagulation induisant l'amplification de la réponse activatrice. Enfin, l'activité protéolytique de la thrombine va également permettre de cliver le fibrinogène en fibrine favorisant ainsi la stabilité du thrombus ainsi formé²⁰.

La voie intrinsèque ou endogène de la cascade de coagulation, aussi appelée phase contact, est une voie dépendante du facteur XII (fXII). Le facteur XII est une glycoprotéine plasmatique de type zymogène, d'environ 80 kDa dont l'activation dépend de son contact direct avec une surface chargée négativement. Son adhésion à une surface anionique, comme les plaquettes activées, induit un changement conformationnel du fXII, générant ainsi une faible quantité de fXII activé (fXIIa). Une fois activé, le fXIIa induit le clivage de la prékallikréine plasmatique (PKP) pour former la kallikréine plasmatique (KP) responsable (i) d'une boucle de retro-activation du fXII et (ii) de la digestion du kininogène, un cofacteur non enzymatique de haut poids moléculaire, en bradykinine (BK)²¹. La BK correspond au produit final de la voie kallikréine-kinine et par le biais de l'activation de certaines voies de signalisation, est responsable d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, de la vasodilatation vasculaire et du chimiotactisme des neutrophiles²². Le fXIIa, clive et active le fXI qui induit ainsi l'activation de la voie endogène de la cascade de coagulation. Une fois activé, le fXIa initie une série d'évènements protéolytiques séquentiels calcium dépendants menant à la production de thrombine et de fibrine, et la formation d'un thrombus stable riche en fibrine insoluble²³.

Alors que l'activation du fXII est responsable de l'induction de la voie endogène de la cascade de coagulation et la formation d'un thrombus, sa déficience chez l'homme comme chez la souris n'altère pas les capacités hémostatiques normales et n'augmente pas le risque de saignement²⁴. Ces observations ont permis de faire l'hypothèse que la voie extrinsèque de la cascade de coagulation, dépendante du FT, était la voie principale mais non exclusive, initiant la génération de fibrine *in vivo*. De plus, des taux faibles de FT sont responsables de l'augmentation du saignement chez la souris et sa déficience complète est létale au niveau embryonnaire, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, indiquant que le FT est essentiel pour le développement embryonnaire et/ou la survie^{25,26}. En l'absence de lésion, le FT est absent du compartiment vasculaire. Cependant, après une blessure au rayon laser, le FT est détecté au niveau du site de formation du thrombus et son expression est immédiatement suivie

par l'accumulation de plaquettes au site de blessure^{27,28}. L'origine cellulaire de la source de FT initiant la cascade de coagulation a fait l'objet de nombreuses études dont les conclusions sont controversées. En effet, la génération de fibrine au cours de la formation du thrombus *in vivo* est altérée dans des modèles murin déficients en FT endothélium-spécifique²⁹, indiquant un rôle du FT endothélial dans l'activation plaquettaire. Au contraire, notre équipe a montré en 2012 que les neutrophiles, premières cellules recrutées au site de blessure, étaient la source primaire de FT, initiatrice de la cascade de coagulation et de l'activation plaquettaire³⁰.

Dans des conditions physiologiques, la cascade de coagulation est un processus hautement contrôlé. En effet, des inhibiteurs physiologiques plasmatiques et membranaires de la cascade de coagulation sont présents en circulation et à la surface endothéliale, comme les protéines C-protéine S, l'antithrombine, le tissue factor pathway inhibitor (TFPI) et la thrombomoduline^{31,32}. Ces inhibiteurs permettent de réguler négativement la cascade de coagulation pour (i) conserver l'endothélium dans un état quiescent et non thrombogène en l'absence de lésion, (ii) éviter la formation d'un thrombus occlusif pouvant être délétère pour l'organisme en cas de lésion. Lorsque la cicatrisation de l'endothélium lésé est achevée, la lyse du thrombus peut alors commencer. Ce processus, appelé la fibrinolyse, constitue la troisième et ultime étape de l'hémostase. Elle correspond à la lyse séquentielle des polymères de fibrine stabilisant le thrombus, en fragments solubles, dont les produits finaux sont les D-Dimères³³. La protéolyse de la fibrine est assurée par la plasmine, dont l'activité dépend principalement de deux sérines protéases, le tPA (activateur du plasminogène tissulaire) et l'uPA (activateur du plasminogène de type urokinase), à l'origine du clivage du plasminogène en plasmine active³². La génération de plasmine est régulée par des inhibiteurs physiologiques, principalement de la famille des serpins, tel que le PAI-1 responsable de l'inhibition du tPA et de l'uPA, et l' α 2-antiplasmine inhibant la plasmine directement. La fibrinolyse, dont la fonction principale est la lyse du caillot, permet également d'activer certaines protéines matricielles de type métalloprotéinases, participant ainsi au remodelage de la matrice et à la cicatrisation de la paroi lésée.

1.2.3 Rôles des microparticules dans la coagulation et la formation de thrombus

1.2.3.1 Généralités

Les microparticules (MPs), ont été observées pour la première fois dans le plasma en 1947 et ont été appelées « cell dust » pour poussière cellulaire. Le nom de microparticule ne leur a été attribué que dans les années 1980, époque à laquelle a été découvert leur énorme potentiel en tant que biomarqueurs de certaines maladies et vecteurs d'informations biologiques.

Les microparticules sont définies comme des structures vésiculaires issues du bourgeonnement de la membrane plasmique cellulaire, de taille comprise entre 0.1 à 1 μm , produites en réponse à une activation cellulaire, un phénomène d'apoptose ou à une transformation oncogénique. Tous les types cellulaires peuvent produire des microparticules suite à leur activation ou pendant le processus d'apoptose. Au cours de l'activation cellulaire, la mobilisation de calcium intracellulaire va permettre (i) la dérégulation d'enzymes assurant l'asymétrie phospholipidique membranaire : la scramblase, la floppase et la translocase ayant pour conséquence l'externalisation des phospholipides négatifs (phosphatidylserine principalement) et la formation de bourgeon membranaire et (ii) l'activation de la calpaïne assurant la digestion des filaments du cytosquelette d'actine et la libération de la microparticule³⁴ (Figure 10).

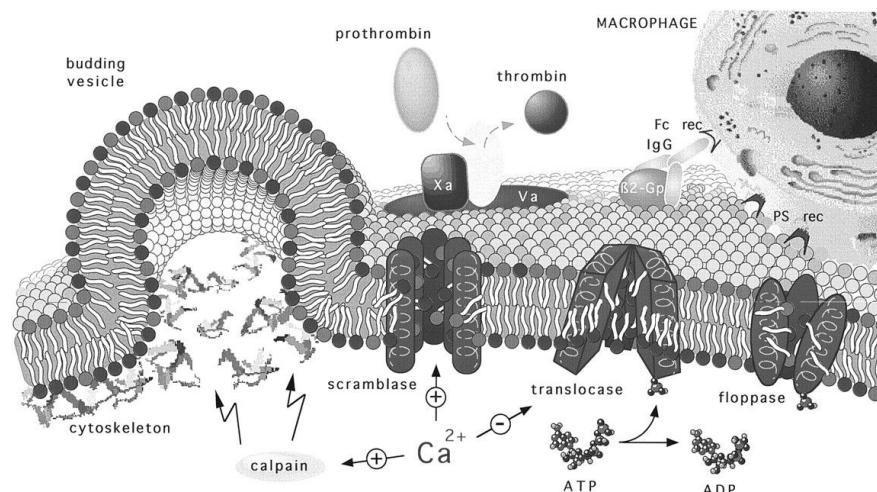


Figure 10 : Mécanismes de formation des microvésicules. (D'après RFA Zwaal et AJ Schroit. Blood 1997)

Ces vésicules diffèrent des autres vésicules (exosomes et corps apoptotiques) par leur taille et leur composition. En effet, les corps apoptotiques ont une taille comprise entre 1 et 5 μm et résultent de la fragmentation de la cellule apoptotique, alors que les exosomes, de taille comprise entre 30 et 100 nm, résultent de la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique cellulaire. Ces trois types de vésicules sont regroupés sous le terme générique de microvésicules. Les microparticules sont composées de protéines, d'ARN et de



microARN provenant de la cellule d'origine. Du fait de leur nature phospholipidique, les microparticules sont capables de fusionner avec des cellules cibles et représentent ainsi de véritables vecteurs d'informations biologiques.

Figure 11. Microscopie électronique d'un thrombus sur une lame de verre recouverte de collagène : Immunomarquage du TF à l'or colloïdal. Présence de vésicules positives pour le TF adjacentes à la membrane plaquettaire. (D'après Giesen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999))

1.2.3.2 Initiation de la cascade de coagulation et formation de thrombus

Les travaux de PL Giesen en 1999 sur le « blood-borne tissue factor » ont permis de mettre en évidence le rôle des microparticules dans l'initiation de la cascade de coagulation et la formation du thrombus. En effet, après avoir perfusé une lame de verre recouverte de collagène avec du sang humain, les auteurs ont observé la formation d'un thrombus riche en microvésicules exprimant du FT (**Figure 11**). L'inhibition du FT par le biais d'anticorps bloquants ou de fVIIa inhibé était alors responsable d'une diminution de la masse des thrombi et de la production de fibrine³⁵. Depuis, grâce aux progrès technologiques et à l'apparition de la microscopie intravitale, de nombreuses études ont montré que les microparticules portant du FT activé à leur surface sont capables d'activer la cascade de coagulation et de participer à la formation du thrombus *in vivo*. En effet, l'équipe de Furie B. a montré en 2003 par des expériences de microscopie intravitale, que les MPs s'accumulent au site de blessure et interagissent avec les plaquettes activées via l'expression de PSGL-1, ligand de la P-sélectine

présente à la surface des plaquettes activées²⁷. L'accumulation de ces microparticules au niveau du thrombus en formation permet d'augmenter la concentration en FT actif et accélère la formation de fibrine. De plus, les microparticules représentent des surfaces idéales pour l'initiation et le support de la cascade de coagulation du fait de leur expression de phospholipides négatifs tels que la phosphatidylserine (PS).

Les cellules tumorales, comme les MPs qui en dérivent, peuvent exprimer le FT et activer la cascade de coagulation^{36,37}. En effet, par l'utilisation du modèle de thrombose artérielle par blessure au rayon laser, une étude réalisée au sein de notre laboratoire a montré que les MPs issues de cellules tumorales pancréatiques exprimant le FT s'accumulent au site de lésion vasculaire et accélèrent la formation du thrombus *in vivo*³⁸. Depuis, les MPs dérivées des cellules tumorales exprimant le FT ont été décrites, dans différents modèles de thrombose veineuse, comme des effecteurs de l'activation plaquettaire et de la formation de thrombus dépendante de la thrombine. Les MPs tumorales participent donc activement à l'état pro-thrombotique observé chez les patients atteints de cancer^{39,40}.

2. Dialogue entre les plaquettes et la tumeur primaire.

2.1 Impacts du cancer sur la production de plaquette, sur l'activation et l'éducation des plaquettes et mécanismes impliqués dans la thrombose associée au cancer –
Publiée dans Cancers - 2018

Review

Impacts of Cancer on Platelet Production, Activation and Education and Mechanisms of Cancer-Associated Thrombosis

Léa Plantureux ¹, Diane Mège ^{1,2}, Lydie Crescence ¹, Françoise Dignat-George ¹, Christophe Dubois ¹ and Laurence Panicot-Dubois ^{1,*}

¹ Aix Marseille Univ, INSERM 1263, INRA 1260, C2VN, Faculty of pharmacy, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France; l.plantureux@gmail.com (L.P.); dr.dianemege@gmail.com (D.M.); lydie.crescence@univ-amu.fr (L.C.); francoise.dignat-george@univ-amu.fr (F.D.-G.); christophe.dubois@univ-amu.fr (C.D.)

² Department of Digestive Surgery, Timone University Hospital, 13385 Marseille, France

* Correspondence: laurence.panicot-dubois@univ-amu.fr; Tel.: +33-049-183-5561

Received: 30 September 2018; Accepted: 10 November 2018; Published: 14 November 2018



Abstract: Platelets are small anucleate cells that are traditionally described as the major effectors of hemostasis and thrombosis. However, increasing evidence indicates that platelets play several roles in the progression of malignancies and in cancer-associated thrombosis. A notable cross-communication exists between platelets and cancer cells. On one hand, cancer can “educate” platelets, influencing their RNA profiles, the numbers of circulating platelets and their activation states. On the other hand, tumor-educated platelets contain a plethora of active biomolecules, including platelet-specific and circulating ingested biomolecules, that are released upon platelet activation and participate in the progression of malignancy. The numerous mechanisms by which the primary tumor induces the production, activation and aggregation of platelets (also known as tumor cell induced platelet aggregation, or TCIPA) are directly related to the pro-thrombotic state of cancer patients. Moreover, the activation of platelets is critical for tumor growth and successful metastatic outbreak. The development or use of existing drugs targeting the activation of platelets, adhesive proteins responsible for cancer cell-platelet interactions and platelet agonists should be used to reduce cancer-associated thrombosis and tumor progression.

Keywords: platelets; cancer cells; tumor cell induced platelet aggregation (TCIPA); tumor educated platelets (TEP); cancer-associated thrombosis

1. Introduction

Platelets are small (2–4 μm) anucleate hematopoietic cells released by bone marrow megakaryocytes into the bloodstream. In healthy humans, the concentration of circulating platelets is approximately 150 to $350 \times 10^9/\text{L}$. For a long time, platelets were described as the major effectors of hemostasis and thrombosis. The hemostatic functions of platelets were first described in 1873 by Osler, who showed the presence of “blood plaques” in white thrombi.

The platelet membrane is composed of phospholipids and many receptors and glycoproteins, which enable their quick adhesion, activation and aggregation that is essential for their hemostatic function. After vascular injury, platelets rapidly interact with the vessel wall in a glycoprotein (GP)Ib-V-IX–Von Willebrand Factor (VWF)-dependent manner. This interaction is followed by a firm adhesion on the subendothelial collagen through platelet-specific collagen receptor GPIV (Glycoprotein VI) and integrin $\alpha_2\beta_1$. Platelets become activated, exhibiting first an intracellular

mobilization of calcium followed by shape change and degranulation. Platelets contain three types of granules: (i) dense granules containing platelet agonists, such as ADP (Adenosine diphosphate), ATP (Adenosine triphosphate) and serotonin; (ii) alpha granules containing adhesive molecules, such as fibronectin, fibrinogen, GPIb and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, coagulation factors, growth factors and chemokines; and (iii) lysosomal granules that contain proteases and glycosidases, such as collagenase and cathepsin.

During the process of platelet activation, platelets release their granules containing platelet agonists that lead to an amplification of the activation response through specific G-coupled receptors. Moreover, local thrombin generation increases the activation response of platelets by its proteolytic activity on protease-activated receptors (PARs) present on platelets. The release of these platelet agonists enables the recruitment, adhesion and activation of neighboring platelets. Finally, this process leads to the aggregation of platelets through the linking of $\alpha_{IIb}\beta_3$ with fibrinogen and to the formation of a hemostatic plug that avoids blood loss.

In addition to their physiological hemostatic functions, in 1865, Armand Trousseau demonstrated a close relation between thrombosis and cancer [1]. In recent years, significant clinical and experimental evidence supports the finding that platelets play several roles in the progression of malignancies and in cancer-associated thrombosis [2]. Moreover, cancer can influence the platelet count, physiology, activation state and RNA profile. The abilities of tumor cells to activate and aggregate platelets give them numerous advantages in the bloodstream. Platelets may protect circulating cancer cells against the immune system, favor pro-survival signals, induce invasive properties and transfer adhesive molecules which will interact with the endothelium participating in the early metastatic niches [3–6]. Recent studies have demonstrated that cancer can educate platelets (tumor-educated platelets), providing interesting tools for cancer diagnostics. Platelets are indeed able to sequester tumor derived biomolecules including mRNA and proteins. The activation of platelets by external signals induced specific splice variants of premRNA into platelets, providing a specific spliced mRNA signature into platelets. In this review, we will discuss the impacts of cancer on platelet physiology and phenotype and its association with the pro-thrombotic states of cancer patients.

2. Effects of Cancer on Platelets and Mechanisms Involved in Cancer-Associated Thrombosis

2.1. Thrombocytosis

In 1968, Gasic and collaborators were the first group to associate platelet counts with the number of metastases [7]. Using an experimental mouse model, this group showed a close relation between neuraminidase-induced thrombocytopenia and the reduction of metastasis of TA3 ascites tumor cells through an unexpected effect of neuraminidase. This relationship was confirmed by Kapartkin et al. [8] in 1981. These researchers demonstrated that the injection of cancer cells into the bloodstream of mice induces thrombocytopenia, and it was closely correlated to their metastatic potential. However, a portion of cancer cells failed to aggregate platelets *in vitro* and were unable to metastasize *in vivo*.

Alternatively, several clinical studies have demonstrated the presence of an elevated platelet count or thrombocytosis (greater than $400 \times 10^9/L$) in 2.7% to 49.8% of gastrointestinal cancer patients [9], as well as in other types of solid cancer, including renal, breast, lung, colorectal and urogenital cancers [10–15]. The notion of cancer-associated thrombocytosis was first described in 1872 by Reiss et al. [16] and is now correlated with shortened survival and poor prognosis [11,17] in various types of cancer. Thrombocytosis is also positively correlated with venous thromboembolism events in cancer patients [10]. All the mechanisms of cancer-induced thrombocytosis have not been thoroughly elucidated to date. To date, based on the literature, primary tumors influenced platelet production through a direct paracrine activity on megakaryocytes and via their abilities to educate and activate platelets (Figure 1).

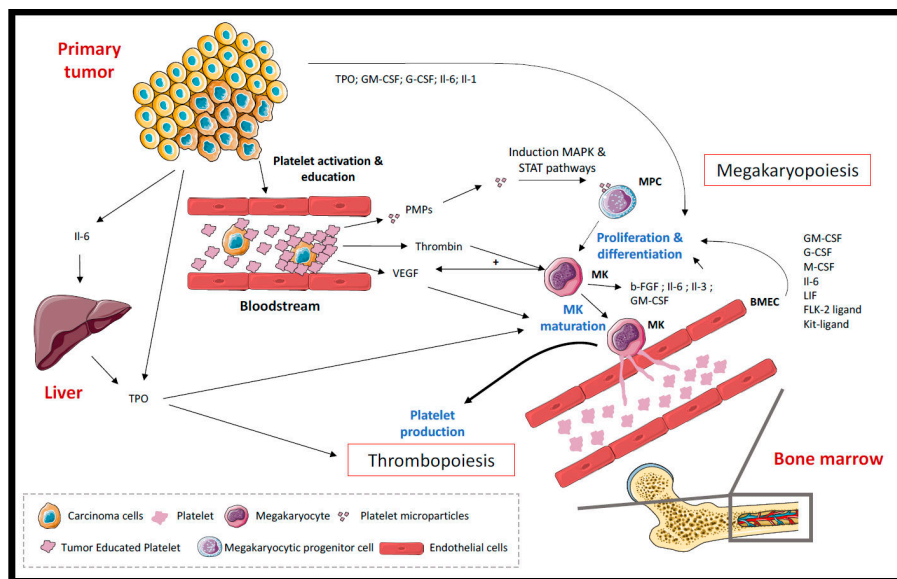


Figure 1. Mechanisms of cancer-associated thrombocytosis. This figure summarizes all the mechanisms involved in the production of platelets mediated by the primary tumor. BMEC: Bone Marrow Endothelial Cells. This figure was obtained using Servier medical art. <http://smart.servier.com/>. GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor; M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor; IL-6: Interleukin-6; LIF: Leukemia Inhibitory Factor; FLK-2: Fetal Liver Kinase-2; Kit-ligand (Steel factor); TPO: thrombopoietin.

During cancer progression, a variety of tumor-related humoral factors and cytokines directly or indirectly influence megakaryopoiesis and thrombopoiesis. The most-described factors are granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factors (GM-CSF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1), and thrombopoietin (TPO). It has been shown that primary tumors can produce and secrete G-CSF and GM-CSF into the bloodstream, resulting in the stimulation of megakaryopoiesis and, subsequently, thrombopoiesis in cancer patients [18]. In addition to CSF, high levels of IL-6 and IL-1 were found in the plasma and in the culture supernatant of GM-CSF- and/or G-CSF-producing tumors obtained from patients [18]. Increasing evidence has demonstrated that IL-6 actively contributes to inflammatory and cancer-associated thrombocytosis through a thrombopoietin (TPO)-dependent mechanism [19,20]. Indeed, Stone et al. demonstrated in an ovarian cancer mouse model that the increase of hepatic thrombopoietin (TPO) production in response to tumor-derived interleukin-6 (IL-6) was responsible for elevated platelet counts [19]. The inhibition of TPO and IL-6 in tumor-bearing mice was sufficient to reverse thrombocytosis. Plasma levels of IL-6 and TPO were significantly higher in ovarian cancer patients with thrombocytosis. Moreover, platelet counts were positively correlated with plasma IL-6 and TPO levels [19]. Furthermore, TPO may be directly produced by carcinoma cells, including ovarian and hepatocellular cancer cells [21,22]. The elevation of TPO production promotes bone marrow megakaryocyte growth, differentiation and platelet production [18–22].

Within the bone marrow, a strong cooperation occurred between endothelial cells and megakaryocytes. Bone marrow endothelial cells (BMEC) released several cytokines and factors, and induced *in vitro* and *in vivo* the proliferation and differentiation of hematopoietic and megakaryocytic progenitor cells supporting megakaryopoiesis [23,24]. Megakaryocytes also secreted inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-1, IL-3 and GM-CSF, which can in turn support megakaryopoiesis [25].

Beyond their direct abilities to secrete megakaryopoietic and thrombopoietic factors, the primary tumors can also influence platelet production through the activation of platelets. For example, platelet microparticles (PMPs), released after platelet activation, can stimulate the proliferation, survival,

adhesion and chemotaxis of hematopoietic cells through the activation of various intracellular signaling cascades, such as MAPK p42/44, and STAT pathways [26]. Thus, PMPs support the intercellular cross-talk during hematopoiesis. Megakaryocytes produce essential angiogenic factors as well, such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and basic Fibroblast Growth factor (b-FGF) [25,27]. VEGF is a specific endothelial cell mitogen and a potent angiogenic factor. Once again, the activation state of platelets within the cancer patients and the excessive thrombin generation participate in cancer-associated thrombocytosis. Indeed, the thrombin stimulation of megakaryocytes increases their secretion of VEGF three-fold [27]. Moreover, in the case of breast cancer, the education of platelets by the primary tumors enhances the ability of platelets to secrete pro-angiogenic proteins, such as VEGF, following platelet activation [28]. Within the bone marrow microenvironment, VEGF potentiates the maturation of megakaryocytes through autocrine-paracrine loops in a VEGFR-1 dependent mechanism [29]. In turn, b-FGF has been described to increase megakaryocyte colony formation *in vitro* [30] and to induce megakaryocyte differentiation via the regulation of megakaryocyte-stromal interactions and the increased secretion of megakaryocyte cytokines [31].

2.2. Platelets and Hemostatic System Activation

Different studies have shown that the plasma levels of soluble P-selectin (sP-sel), soluble CD40 ligand (sCD40L), thrombospondin-1 (TSP1) and β -thromboglobulin were significantly higher in cancer patients than in healthy controls, strongly suggesting that platelets get activated during cancer progression [32–36]. One study also suggested that high amounts of PF-4 (Platelet Factor-4) were associated with an increased risk of venous thromboembolism (VTE) in pancreatic cancer patients [37]. Circulating platelets also expressed high levels of P-selectin at their surface in cancer patients [38]. Recently, Riedl et al. investigated the association between platelet activation biomarkers and the development of cancer-associated VTE within a cohort of 1779 patients with different types of cancer. These patients had been included in the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS), a prospective and observational study on patients with newly diagnosed or progressive cancer after remission. Their results showed that sP-selectin, but not sCD40L, TSP1 nor PF-4 were associated with the risk of VTE in cancer patients [39]. Cancer cells themselves can activate platelets and the coagulation system by direct interaction in the bloodstream or indirectly via microvesicles and/or secreted factors and cytokines. The ability of cancer cells to activate platelets and the coagulation system is partly responsible for the pro-thrombotic state of cancer patients and is directly correlate with their metastatic potential *in vivo* and *in vitro* [40,41]. All of the mechanisms that induce platelets activation and aggregation are called tumor cell induced platelet aggregation (TCIPA).

2.2.1. Released Factors

- ADP

Platelet adenosine diphosphate (ADP) pools are stored in the dense granules and are released upon platelet activation. Platelets express two major ADP-specific G-coupled receptors, P2Y1 and P2Y12, which are both involved in platelet shape changes, thromboxane A₂ (TXA₂) release and aggregation. Various cancer cell lines, including melanoma, neuroblastoma, ovarian and breast carcinoma cells, can release ADP, which contributes to TCIPA [42–45]. Moreover, the inhibition of ADP or ADP receptor P2Y12 activity by apyrase and 2-methylthio-AMP (2-MeSAMP), respectively, reduces platelet aggregation induced by MCF-7 breast carcinoma cells [46].

- Thrombin

Thrombin, or factor IIa, is a serine protease that represents one of the most important factors of the coagulation system. This serine protease converts soluble fibrinogen in insoluble strands of fibrin during clot formation and retraction. Thrombin also activates other coagulation factors, such as factors V, VIII, XI and XII, that amplify the coagulation response. Thrombin represents the most potent activator of platelets. By thrombin's proteolytic activity, it can cleave platelet PAR receptors PAR1 and

PAR4, which lead to platelet activation and aggregation. The secretion of thrombin by non-small-cell lung cancer cell lines is responsible for platelet aggregation. In contrast, TCIPA in small-cell lung cancer cell lines was fully abolished only after inhibition of ADP and thrombin activity using apyrase and hirudin [47].

- Thromboxane A2

TXA₂ is a platelet agonist, and its receptor TXR is expressed on platelets. Overexpression of thromboxane receptors and thromboxane synthase (TXS) has been reported in various types of cancers including colorectal, prostate, bladder, papillary thyroid and non-small-cell lung carcinomas [48–52]. Thromboxane synthase catalyzes the conversion of PGH₂ to TXA₂. Sakai and collaborators showed that TXS was up-regulated in the tissue of human colorectal carcinomas and that TXA₂ increased cancer cell proliferation. The inhibition of TXS activity reduced tumor proliferation and induced apoptosis, which was rescued by addition of TXA₂ [48]. Leval and collaborators also demonstrated that different cancer cells, including osteosarcoma cells MG-63, secreted TXA₂ [53]. The pharmacological inhibition of TXA₂ synthesis or of its receptor suppressed MG-63 cell TCIPA and the secretion of TXA₂ by activated platelets. Furthermore, inhibition of TXA₂ synthesis reduced formation of metastasis *in vivo* in a metastasis experimental mouse model [54]. These observations indicate a role of tumor cell-released TXA₂ in the aggregation of platelets and in successful metastatic outbreak [53,54].

- CD40/CD40L

CD40, a member of Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor superfamily, is constitutively expressed on the surface of resting and activated platelet, endothelial cells, monocytes, dendritic cells, B cells, fibroblast and renal epithelial cells [55,56]. It was originally identified in a bladder carcinoma cell line [57]. Subsequently, it was described in numerous cancer types, including ovarian, bladder, nasopharyngeal, colon, lung and breast carcinomas and in melanoma [58–60]. Its ligand, CD40L (also named CD154), is present in resting platelets. Following platelet activation, CD40L is quickly translocated to the membrane where it is cleaved and released in soluble form (sCD40L or sCD154) in a CD40 dependent manner [56,61]. CD40L has been shown to play several roles in inflammation and immune activation including the induction of inflammatory response in endothelial cells and the activation of immunoglobulin class switching [62]. Platelet CD40 interaction with sCD40L induces platelet activation and aggregation [63]. CD40 and CD40L are co-expressed in melanoma cells and in some carcinomas [64–66]. In 2002, Bussolati and collaborators demonstrated that renal carcinoma cells released sCD40L in the culture supernatant [60]. Moreover, the plasma levels of sCD40L was significantly increased in cancer patients [32–36]. However, the cellular origin of the measured sCD40L in the plasma of patients was not clearly identified [58], although 95% of circulating sCD40L may come from platelets [67].

- Cathepsin and MMPs

Matrix metalloproteinases (MMPs) are members of zinc- and calcium-dependent endopeptidases that can degrade most of the components of the extracellular matrix. These enzymes are involved in all of the steps of cancer progression from primary tumor development to metastasis in distant organs. Cancer cell MMP-2 membrane expression was observed in different cancer types, such as fibrosarcoma, colorectal and breast carcinomas. In all of these studies, authors have showed that platelet and cancer cell MMP-2 cell surface expression contribute to TCIPA [46,68,69]. Paul Jurasz et al. demonstrated that the MMP-2 dependent mechanism of the HT-1080 fibrosarcoma cell to induce TCIPA interacts with thromboxane and ADP [68]. Thus, the major pathways of platelet aggregation interact to induce TCIPA. Moreover, in this study, authors showed that nitric oxide inhibits HT-1080 cell TCIPA through the cyclic GMP dependent mechanism [68].

Cancer cells can also secrete cathepsin cysteine protease, such as cathepsin B and K. Cathepsin B levels are raised in the serum of cancer patients with different types of cancer [70]. B16 and B16a melanotic melanoma cells are known to release cathepsin B-like cysteine proteinase, and its level is

positively correlated with the metastatic potential. Cathepsin B and K are both described to contribute to TCIPA in melanotic melanoma and in breast carcinoma [70,71].

2.2.2. Tumor Cell Procoagulant Proteins

- Tissue Factor

Tissue factor (TF) is a transmembrane glycoprotein involved in the initiation of the extrinsic pathway of normal blood coagulation. TF can bind factor VIIa (TF/fVIIa) to form an active complex responsible for the proteolytic activation of factors IX and X. Once activated, factor Xa converts pro-thrombin to thrombin. This extrinsic pathway activation is required for normal blood coagulation. In normal cells, such as endothelial cells and monocytes, TF is expressed only after adequate stimulation [72]. However, TF's overexpression is described in numerous malignant tissues and is correlated with progression to invasive cancer [73]. The expression of TF by tumor cells in the tumor microenvironment is correlated with increased levels of circulating TF antigen in cancer patients [40]. TF represents the major effector of TCIPA and is mostly responsible for the pro-thrombotic state of cancer patients [74].

- Fibrinolysis proteins

Fibrinolytic system molecules play an important role in the maintenance of hemostatic balance. In the same way as the coagulation system, cancer cells express numerous molecules involved in the fibrinolytic system. For example, urokinase type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1) are both expressed in various tumor types, including prostate, colorectal, breast and ovarian carcinomas [75–78]. The increased production of fibrinolysis inhibitor PAI-1 constitutes another mechanism involved in TCIPA and in cancer-associated thrombosis [79]. Moreover, based on Cox analysis, elevated plasma levels of PAI-1 had a negative prognostic impact in terms of relapse free survival (hazard ratio: 2.5 $p_{\text{value}} = 0.021$) and overall survival (hazard ratio: 2.7 $p_{\text{value}} = 0.002$) in breast cancer patients [78].

2.2.3. Microvesicles

Microvesicle is a generic term regrouping three types of vesicles: microparticles, exosomes and apoptotic bodies. Microparticles (MPs) are small membrane vesicles (0.1 to 1 μm of diameter) released from eukaryotic cells upon stimulation, apoptosis or oncogenic transformation. These particles are composed of anionic phospholipids, including phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine, that represent an adequate surface to initiate and support the coagulation and the fibrinolytic system. The particles also express cellular origin antigens, cytokines, matrix metalloproteinases and content mRNA and miRNA. Plasma MPs in healthy patients are generally derived from circulating blood cells, such as platelets, red blood cells, leukocytes and endothelial cells. Platelet MPs (PMPs) represent 70% to 90% of plasma-born MPs [80].

Chargaff et al. described a precipitable factor for the first time in 1949, which were PMPs that could accelerate thrombin generation in platelet-free plasma [81]. Today, it is well-established that TF positive tumor-derived MPs are associated with the pro-thrombotic state of cancer patients [82–84]. Numerous studies reported an increase of circulating MPs levels, including platelet, endothelial cell and tumor-derived MPs in different types of cancer, including gastric, pancreatic, colorectal, lung, ovarian and breast cancers and an increased procoagulant activity [84–89]. Cancer cell-derived MPs, as well as origin cells, can express all of the molecules involved in platelet activation and aggregation and in the activation of the coagulation cascade. By the exposure of phosphatidylserine and the expression of procoagulant proteins, such as TF, cancer cell-derived MPs contribute to intravascular thrombin generation. Hron et al. demonstrated a two-fold increase of TF bearing MPs in colorectal patients in comparison to control. The level of TF bearing MPs were positively correlated with the D-dimer level as a marker of clotting activation [84]. More recently, our team described a specific signature of MPs in colorectal and pancreatic cancer patients compared to inflammatory bowel or

pancreatic diseases and healthy patients. The microparticulosome signature showed a significant increase of plasma fibrin positive MPs in pancreatic cancer patients in comparison with the other groups [90]. These results were in accordance with the higher risk of thrombosis in this type of cancer. Moreover, we showed in a mouse arterial thrombosis model that pancreatic cancer cell-derived MPs bearing PSGL-1 (P-selectin ligand 1) and TF accumulate to the site of injury and accelerate thrombus formation *in vivo*. In addition, in different mouse model of venous thrombosis, TF positive tumor cell-derived MPs were described as effectors of platelet activation and thrombus formation in a thrombin-dependent manner [91,92]. These MPs were able to interact with neutrophil extracellular traps (NETs) that are known to play several roles in cancer-associated thrombosis [93]. TF positive cancer cell-derived MPs are also able to transfer TF to endothelial cells, increasing the procoagulant potential of endothelial cells [94]. Thus, TF cancer cell derived MPs seem to actively participate in thrombotic events in cancer patients.

Exosomes are smaller vesicles than microparticles with a diameter of 40 nm to 100 nm. Exosomes differ from microparticles by their size, formation process and protein expression. Recently, it has been shown that exosomes derived from 4T1 breast cancer cells were able to induce NET formation on neutrophils from G-CSF treated mice. In different mouse model of arterial and venous thrombosis, a blood infusion of 4T1 tumor derived exosomes in G-CSF treated mice reduced the occlusion time and accelerated thrombus formation *in vivo* [95]. Thus, tumor-derived exosomes and neutrophils can cooperate *in vivo* to contribute to cancer-associated thrombosis.

2.2.4. Adhesive Proteins

Cancer cells express many adhesive molecules that enable their interaction with the blood host cells, including platelets, endothelial cells and immune cells. To date, there are few mechanisms described for the interaction of cancer cells with platelets in the bloodstream.

In 1988, Karpatkin et al. showed the existence of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ inhibition by blocking antibody reduced colorectal and melanoma cancer cell–platelet interactions *in vitro* and reduced metastasis *in vivo*. A fibronectin and Von Willebrand factor blockade by RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser peptide) also decreased the interactions between platelets and cancer cells, suggesting an interaction via these adhesive proteins in an $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent manner [41]. Moreover, it has been shown that tumor cell integrin $\alpha v\beta_3$ can bind platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and mediates cancer cell–platelet interaction and aggregation [96,97]. More recently, Mammadova-Bach et al. showed that platelet integrin $\alpha_6\beta_1$ directly interacts with colorectal MC-38 and breast cancer AT3 cell ADAM9. Using an orthotopic cancer model and metastasis experimental model, they demonstrated that these interactions actively control lung metastasis but not tumor growth. Platelet integrin $\alpha_6\beta_1$ –tumor cell ADAM9-dependent interaction leads to platelet activation, granule secretion and extravasation of cancer cells in the lungs [98].

P-selectin (CD62P) is a member of Ca^{2+} -dependent adhesion molecules belonging to the family of the animal lectins (C-type lectins). In general, selectins are adhesion molecules that mediate intercellular interactions among leukocytes, platelets, cancer cells and vascular endothelial cells. P-selectin is stored in alpha granules of platelets and in Weibel Palade bodies of endothelial cells. Following cellular activation and degranulation, P-selectin is rapidly expressed on the membrane of platelets and endothelial cells. P-selectin interacts with mucinous ligand PSGL-1 expressed mostly on leukocytes and cancer cells. P-selectin can also bind a small glycoprotein, known as sialyl-Lewis X (s-Le X), mostly present on mucinous cancer cells. Using P-selectin knock-out mice, Kim et al. showed that platelets can interact with cancer cells in a P-selectin-dependent manner [99]. P-selectin deficiency reduced tumor growth and lung homing metastasis *in vivo*. This effect was due to an abolition of platelets infiltrating into solid tumors, a decrease of angiogenic factor secretion, such as VEGF, and a decrease in the number of platelets–cancer cells aggregates in the bloodstream [99,100]. Moreover, it has been shown that P-selectin dependent aggregation of platelets around tumor cells led to the transfer of procoagulant MPs between cells that subsequently contributes to fibrin deposition

and microthrombi formation [101]. In addition, up-regulation of P-selectin in cancer patients was identified in 1991 and was proposed as a biomarker for cancer associated thrombosis [32,102].

Glycoproteins (GPs), expressed on both platelets and cancer cells, are known to mediate cancer cell–platelet interactions. The GPIb α , which is a component of the platelet receptor GPIb-V-IX, was reported to contribute to TCIPA and tumor progression, but its specific role remains contradictory. On one hand, the inhibition of GPIb α by blocking antibodies partially blocks TCIPA in a dose dependent manner [103,104]. Moreover, mice that lack functional GPIb-IX receptors showed a 15-fold reduction of lung metastasis using B16F10.1 melanoma cells in comparison to control mice [105]. Furthermore, MCF-7 breast cancer cell GPIb α expression and its role in TCIPA was also reported [106]. On the other hand, Karpatkin et al. showed that inhibition of GPIb α by blocking antibodies has no effect on colorectal cancer cell induced platelet aggregation [41]. In addition, in vivo antibody mediated GPIb α inhibition increases the lung metastasis of melanoma cells, which was abolished in P-selectin deficient mice [107]. Thus, the contribution of GPIb α in the interaction of platelets with cancer cells and in TCIPA remains unclear and should be verified in the future.

Podoplanin (PDPN) is a mucin-type sialoglycoprotein. PDPN, which was initially described in the lymphatic vessel formation during embryogenesis, is upregulated in various types of cancer, including colorectal, bladder and lung carcinomas and contributes to TCIPA, tumor growth and metastasis. Podoplanin can directly bind the platelet receptor C-type lectin-like receptor (CLEC-2) and induces platelet activation and aggregation [108–112].

2.2.5. Involvement of Activated Platelets in Cancer-Associated Thrombosis

As discussed below, tumor cells can activate platelets and the coagulation system by direct interaction in the bloodstream or indirectly via microvesicles and/or secreted factors. Once activated, platelets display a procoagulant surface by the expression of anionic phospholipids participating in thrombin generation, fibrin formation and clotting [113]. The generation of Platelet-rich microthrombi in adenocarcinoma bearing mice appeared to be dependent on platelet-leukocyte interactions since the formation of microthrombi was diminished in P- or L-selectin deficient mice [114]. Furthermore, platelets-neutrophils interactions were required for NETs formation [115]. In a mouse model of transfusion-related acute lung injury (TRALI), the inhibition of platelet activation by both aspirin and tirofiban significantly decreased NETs formation, indicating that platelet activation is required for NETs formation [116]. Using P-selectin deficient mice, Etulain et al. recently showed that, platelet P-selectin–neutrophil P-selectin Ligand 1 (PSGL-1) interactions were necessary for the induction of NETs [117]. Subsequently, in different animal models, it was demonstrated that platelet-induced NETs formation also involved the adhesive proteins GP1b and the β 2-integrin [118,119]. Alternatively, platelets could also secrete inflammatory molecules, such as HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), β -defensin and CXCL4 (CXC chemokine ligand 4) involved in the formation of NETs in vitro and in vivo [118,120–122].

Using CD40 melanoma positive cells, Amirkhosravi and collaborators demonstrated that activated platelet supernatants containing sCD40L, recombinant soluble CD40L, as well as activated platelets-tumor cells interactions increased procoagulant activity and TF antigen expression in tumor cells and in monocytes [123]. The increased procoagulant TF activity was inhibited by anti-CD40L antibody, indicating that the CD40-CD40L interaction may possibly enhance intravascular coagulation and hematogenous metastasis [123]. Altogether these findings indicate a cross-talk between inflammation and platelet-dependent thrombosis in cancer, confirming the emerging concept of immunothrombosis. Thus, activated platelets, by providing pro-coagulant surface, by releasing inflammatory molecules, by interacting with neutrophils and by inducing NETosis, actively participate to cancer- associated thrombosis.

2.3. Tumor Educated Platelets

The notion of tumor-educated platelets (TEPs) is an emerging concept that provides interesting tools for cancer diagnostics. Indeed, platelet RNA profile changes were reported in several cancer types, including lung, prostate, glioma and breast carcinomas [124–126]. However, the molecular mechanisms involved in the RNA and protein profiles modifications during cancer progression have not yet been well elucidated.

2.3.1. Platelet RNA Profiles in Cancer Patients

Platelets contain a rich repertoire of RNA species, including mRNA (pre-mRNA and mRNA), ribosomal RNA (rRNA), microRNA (miRNAs), small nuclear RNA (snRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), antisense RNAs (asRNA) and transfer RNA (tRNA) [127–133]; the ability of platelets to translate mRNA into proteins has long been known [134,135]. Indeed, platelets possess a functional spliceosome and spliceosome factors that process the pre-mRNAs within the nuclei of other cell types. External stimuli, such as activation of platelet receptors, induce the specific splicing of pre-mRNAs in circulating platelets. For example, Denis et al. showed that the activation of platelets by thrombin in the presence of a fibrinogen matrix induced specific splicing and translation of II1- β pre-mRNA [127]. In LPS-stimulated platelets, the splicing initiation of II-1 β pre-mRNA appears to be dependent on Jun and Akt phosphorylation [136]. The stimulation of platelets with bacteria such as staphylococcal alpha-toxin or LPS was also shown to induce the splicing of platelet TF-pre-mRNA in a Cdc2-like kinase phosphorylation-dependent manner [137]. In nucleated cells, snoRNAs accumulate in the nucleolus and are implicated in translation and splicing by their abilities to modify the nucleotides of snRNA and rRNA molecules [138]. In nucleated cells, the snoRNA SNORD-115 was recently described to influence the alternative splicing of the serotonin receptor 2C pre-mRNA [139]. As indicated below, platelets contain snoRNAs and splice factors which may indicate that platelet snoRNAs mediate alternative splicing [132]. Thus, the activation of platelets by external signals induces specific splice variants of pre-mRNA into platelets, providing platelets with a specific mRNA signature that enables potential applications in cancer diagnostics. However, the direct effects of tumor cells and/or tumor microenvironment signals on the specific splicing and translation of platelet pre-mRNAs remains unknown and must be investigated.

In the literature, the main way in which primary tumors influence platelet RNA profiles appears to be through the uptake of tumor-derived microvesicles. For example, Calverey et al. reported in 2010 that platelet gene expression was significantly downregulated in metastatic lung cancer [124]. Indeed, microarray analysis of platelet RNA profiles from healthy individuals and metastatic lung cancer patients have revealed 200 affected RNAs, with 197 downregulated RNAs in cancer patients, and the authors proposed that platelet RNA profiles may be useful for the detection of metastatic lung cancer. Subsequently, Nilsson et al. demonstrated that the *in vitro* platelet uptake of U87/U87-EGFRvIII glioma and 22Rv1 prostate cancer-derived microvesicles contained mutant RNA [84]. Moreover, these researchers showed that blood platelets isolated from glioma and prostate cancer patients contain tumor-derived RNA biomarkers EGFRvIII and PCA3, respectively. Interestingly, the researchers also revealed a distinct RNA signature in platelets from glioma patients compared to healthy individuals, which may be attractive for glioma detection [125]. Furthermore, this team recently showed by RT-PCR the presence of EML4-ALK (Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4—Anaplastic Lymphoma Kinase) RNA rearrangement in blood platelets from non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with 100% specificity and 65% sensitivity. In this study, RNA detection by RT-PCR of plasma EML4-ALK rearrangements exhibited a lower sensitivity than platelets (21%), which demonstrates the usefulness of platelets in the detection of cancer biomarkers [140]. The team also demonstrated by confocal microscopy and RT-PCR that tumor-derived exosomes are able to transfer EML4-ALK rearranged RNA into platelets *in vitro*. EML4-ALK rearrangements in platelets were correlated with progression-free and overall survival in 29 crizotinib treated patients. Among the 29 crizotinib treated patients, the progression-free survival was 3.7 months and 16 months for

patients with EML4-ALK positive platelets and EML4-ALK negative platelets, respectively. Moreover, the authors demonstrated, in the platelets of one representative patient, that the monitoring of EML4-ALK rearrangements over a period of 30 months may predict crizotinib outcomes two months prior to radiographic disease progression [140].

Best et al. using RNA-seq analysis, termed ThromboSeq technique, evaluated TEPs mRNA profiles in 228 patients with localized and metastasized tumors in comparison to 55 healthy individuals. After the selection of spliced RNA reads and the exclusion of genes with low coverage, 5003 different protein coding and non-coding RNAs in platelets of healthy donors and cancer patients were detected. Among the 5003 RNAs, 1,453 were increased and 793 were decreased in TEPs compared to healthy donor platelet samples. DAVID and CAGE gene ontology algorithms revealed a downregulation of RNAs involved in RNA metabolism and RNA splicing in TEPs. The gene ontologies also correlated to platelet activation, platelet vesicle transport, ATP signaling and cytoskeleton activation, all of which potentially reveal the activation status of platelets during cancer progression.

In this study, the authors were able to distinguish cancer patients from healthy individuals with 96% accuracy. Moreover, they correctly identified the location of tumors across six tumor types (NSCLC, glioblastoma, colorectal carcinoma, breast cancer, hepatobiliary cancer and pancreatic cancer) with 71% accuracy. Furthermore, using surrogate TEP mRNA profiles, mutant oncogenic drivers including KRAS, EGFR, PIK3C4, MET and HER-2 positive tumors were precisely distinguished, demonstrating that platelets can also assist in determining the tumor type and molecular subclass and in selecting patients for targeted therapies [126]. Recently, Best et al. demonstrated that particle-swarm optimization algorithms enable efficient selection of RNA biomarker panels to diagnose early and late-stage NSCLC from TEPs independently of age, smoking habits, whole-blood storage time and various inflammatory conditions [141].

In addition to mRNA, platelets also contain non-coding RNAs and small RNAs. Best and colleagues also analyzed the differentially expressed non-coding RNAs and revealed 20 altered genes that showed a tumor-specific profile. Among the 20 differentially expressed non-coding RNAs, 16 were upregulated in TEPs. Interestingly, two of the downregulated non-coding RNA are associated with proliferation of tumor cells. For example, one of the downregulated RNAs is the growth arrest specific transcript 5 (GAS5), involved in cell proliferation, and its downregulation has been shown to be pro-cancerous in several tumor types [142,143]. Recently, Luo et al. evaluated the differential expression of lncRNA, including MAGI2 antisense RNA (MAGI2-AS3) and ZNF1 antisense RNA1 (ZFAS1), in platelets from healthy individuals and NSCLC patients. Their results showed that MAGI2-AS3 and ZFAS1 were significantly downregulated in platelets from NSCLC patients compared to healthy controls. In this study, the clinicopathologic characteristics analysis revealed that the level of MAGI2-AS3 correlated with tumor-node-metastasis stage (TNM), lymph-node metastasis and distant metastasis, while ZFAS1 level was correlated only with TNM [144].

Increasing evidence has demonstrated the roles of microRNA in cancer biology. In 2012, Plé et al. described 532 different microRNAs in platelets [133]. MicroRNA also play important roles in platelet function. For example, the miR-126 has been shown to directly and indirectly affect ADAM-9 and P2Y12 expression. Its inhibition in mice significantly reduced platelet aggregation, suggesting that micro-RNAs are linked to platelet reactivity [145]. Moreover, in cardiovascular disease, platelets from myocardial infarction patients differentially expressed nine microRNAs compared to healthy controls [146]. These observations suggest that microRNA signatures in platelets could be useful as diagnostic tools in cardiovascular diseases and cancer.

Thus, the blood-based “liquid biopsies” and the thromboSeq techniques constitute effective tools for pan-cancer, multiclass cancer and companion diagnosis and for the monitoring of treatment response. However, microvesicle independent mechanisms of RNA transfer, miRNA transfer and their role in platelet biology and cancer remain to be investigated.

2.3.2. Platelet Protein Profiles in Cancer Patients

As described below, platelets exhibit the ability to translate mature, spliced RNA into proteins [147–149]. During the previous decades, numerous studies investigated the extensive protein profiles of platelets. However, Londin et al. showed that no corresponding protein was identified for almost 60% of platelet detected mRNA [147,150]. This suggests that not all mRNAs are translated in proteins in platelets. Moreover, there is no study showing the translation of tumor-derived mRNA transferred into platelets. To date, studies only elucidated the transfer of tumor-derived RNA into platelets and their potential applicability to cancer diagnostics, but no associations with the protein profile of platelets were examined [124,125,140]. Only a few studies demonstrated that platelets, by their abilities to ingest biomolecules, express or sequester protein from the primary tumors.

The most described mechanism of platelet protein uptake and storage is through the endocytic pathway. Indeed, endocytosis is the key pathway to fibrinogen uptake and the trafficking of integrins and purinergic receptors into platelets. In 2012, Hung and collaborators reported that fibrinogen uptake is associated with the expression, mediated through a clathrin-dependent manner, of integrin α IIb β 3 and of the endocytic adaptor protein Disabled-2 (DAB2). The knockdown of DAB2 as well as clathrin inhibitor chlorpromazine significantly reduced the uptake of fibrinogen [151]. More recently, the cellubrevin/vesicle-associated membrane protein-3 (VAMP-3) was identified as an element of the platelet endocytic machinery involved in fibrinogen uptake. In vitro and in vivo experiments showed that loss of VAMP-3 led to a robust defect in the uptake and storage of fibrinogen into platelets. Moreover, VAMP-3 null mice display lower levels of platelet-associated fibrinogen than control mice [152]. It is possible that platelets utilize endocytic machinery to ingest tumor-derived biomolecules; however, further studies are required to understand the exact mechanisms.

Klement et al. demonstrated that platelets actively sequester angiogenesis regulators, such as VEGF and bFGF, in vitro and in vivo in cancer bearing hosts. In vitro, the incubation of platelets with VEGF, bFGF and endostatin revealed that platelets accumulate these proteins into their cytoplasmic and granular compartments. Using subcutaneous Matrigel pellets containing 125 I-labeled VEGF, it was confirmed that platelets accumulated 125 I-VEGF at higher concentrations than those found in plasma or various organs. Moreover, they showed that tumor bearing mice possessed an elevation of VEGF levels in platelets compared to control mice [153]. Furthermore, this higher level of VEGF into cancer patient platelets compared to healthy control was also observed in breast cancer by Holmes and collaborators. They also showed that breast cancer and its treatment induce platelet phenotype changes. Indeed, agonist induced release of VEGF was greater in cancer patients compared to healthy controls despite a decrease in the efficiency of VEGF secretion in patients with cancer (21% of the total VEGF platelet pool for cancer patients using ADP stimulation versus 37% for healthy controls). Intriguingly, in patients with breast cancer, platelet inhibition by cangrelor was greater in patients with breast cancer compared to healthy controls, suggesting that lower doses of cangrelor could be used in patients to avoid bleeding risks [28].

Another example was recently showed in the field of cancer immunotherapy. Regarding the large fraction of patients who do not respond to checkpoint inhibitors, some authors have focused on platelet and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) programmed death-ligand 1 expression (PD-L1). Interestingly, these authors showed that platelets and PBMC from smokers and patients with lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) express and upregulate PD-L1 independently of tumor stage. In four patients with lung cancer, treatment with a fully humanized monoclonal antibody against PD-L1, atezolizumab, induced a decrease of PD-L1 platelet expression which was restored over 20 days. These findings could partially explain why some patients respond poorly, or not at all, to checkpoint immunotherapies; the results also strongly suggest that PD-L1 platelet expression could be used as a biomarker to predict successful therapeutic outcome [154].

2.4. Antiplatelet and Platelet Based Therapies

2.4.1. Antiplatelet Therapies

The role of platelet activation in cancer-associated immuno-thrombosis and in successful metastatic outbreak suggests that TCIPA represents a potential therapeutic target in the management of CAT and tumor progression. Over the last few decades, numerous clinical studies suggested that taking daily aspirin reduced cancer incidence, metastasis and mortality, especially for colorectal cancer [155]. However, these findings were discussed and debated during the last century. The acetylsalicylic acid, which correspond to the active substance of aspirin, inhibits COX enzymes involved in the generation of TXA₂. Aspirin is commonly used in clinic to treat patients with coagulopathies. Recently, using an experimental metastasis mouse model in immunodeficient mice, Guillem-Lobat P and collaborators demonstrated that low-dose aspirin reduced lung metastatic seeding by averting the enhanced proaggregatory effects induced by platelet-tumor cells interactions [156]. In 2016, two large US prospective studies performed on more than 130,000 patients with a follow-up time of 30 years showed that regular use of low-dose aspirin (two times per week) was associated with a lowered risk for overall cancer incidence, and especially for gastrointestinal tracts cancers [157]. These observations suggest that low-dose aspirin could be used to prevent cancer development with limited risks of bleeding or other side effects. Numerous other studies are currently in progress to evaluate the potential role of aspirin in cancer treatment [158]. However, the exact mechanisms by which aspirin exerts antitumor effects have to be investigated. Another way to inhibit platelet activation in cancer patients is to target the ADP-receptors on platelets with P2Y₁₂ inhibitors such as clopidogrel or ticagrelor. Some studies performed on cancer mouse models have demonstrated that the use P2Y₁₂ inhibitors, such as ticagrelor or clopidogrel, reduced tumor growth and metastasis in vivo [159,160]. The use of clopidogrel in combination with chemotherapeutic drugs enhanced vascular permeability and drug delivery [161]. Other studies, however, showed no effect of clopidogrel alone on the tumor growth of three cancer types, including breast, colorectal and prostate cancer, or, even worse, a pro-tumoral effect of prasugrel [161,162]. Altogether the results observed may depend on the model studied and the design of the study. Recently, a large retrospective study performed on more than 180,000 patients revealed that the use of clopidogrel with or without aspirin was associated with lower incidence of cancer [163,164]. Additional clinical studies are needed to determine the anti-cancer potential of P2Y₁₂ inhibitors.

2.4.2. Platelet-Based Therapies

Platelets and platelets released factors play several roles in cancer progression including immune tumor evasion, tumor growth and metastasis [164]. In numerous inflammatory pathologies, including atherosclerosis and graft reject, platelets seem to actively participate to the inflammatory and immune response [165–168]. Moreover, it was recently showed that platelets extravasated in tumor microenvironment and were associated with the tumor vessel structure [19,42,100,169]. Based on these observations, some experimental studies investigated the abilities of platelets to deliver potential anti-tumoral signals into the microenvironment or in the bloodstream during their interaction with circulating cancer cells. Li and col. recently showed that intravenous infusion of IFN- γ (Interferon- γ) induced protein 10 (IP-10) rich platelets in a mouse model of melanoma significantly reduced tumor growth in vivo. They demonstrated that platelets directly delivered IP-10 in the microenvironment of the tumors and suppressed the recruitment of the immunosuppressive FoxP3 positives T cells [170]. The genetic engineering of platelet which were able to express the tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), was shown to induce the apoptosis of cancer cells in vitro and significantly reduced metastasis in vivo [171]. In front of these promising experimental results, the potential of platelets to deliver chemotherapeutic drugs or anti-tumoral signals directly in the microenvironment should be deeper investigate in the future.

3. Conclusions

Finally, in response to all of the biomolecules released and/or expressed by tumor cells and tumor microenvironment, the notion of tumor-educated platelets is particularly appropriate. Cancer cells can mediate a paracrine activity to increase platelet production that is not harmless. In addition, through oncogenic transformation, cancer cells have the ability to constantly produce MPs, which are released in the bloodstream and participate in (i) platelet activation and RNA profile changes and (ii) contribute to pro-thrombotic states in cancer patients. Thus, directly and indirectly, cancer cells can modify the physiology and the phenotype of platelets that is closely associated with the pro-thrombotic state of cancer patients (summarized in Figure 2). Furthermore, the mechanisms of TCIPA provide numerous advantages to the primary tumor and the circulating cancer cells. Indeed, platelet activation leads to the release of active biomolecules content on their granules, all of which participate in tumor progression and successful metastatic outbreak. As discussed in this review, platelet RNA profile changes constitute a new and promising area of cancer diagnostics even if larger cohort studies are necessary for the future clinical utilization of TEPs. However, the functionality in cancer biology of platelet RNA profile changes is still unknown and must be investigated. The expression of clinically targetable oncogenic proteins by platelets should be further investigated in the future in order to predict therapeutic outcomes.

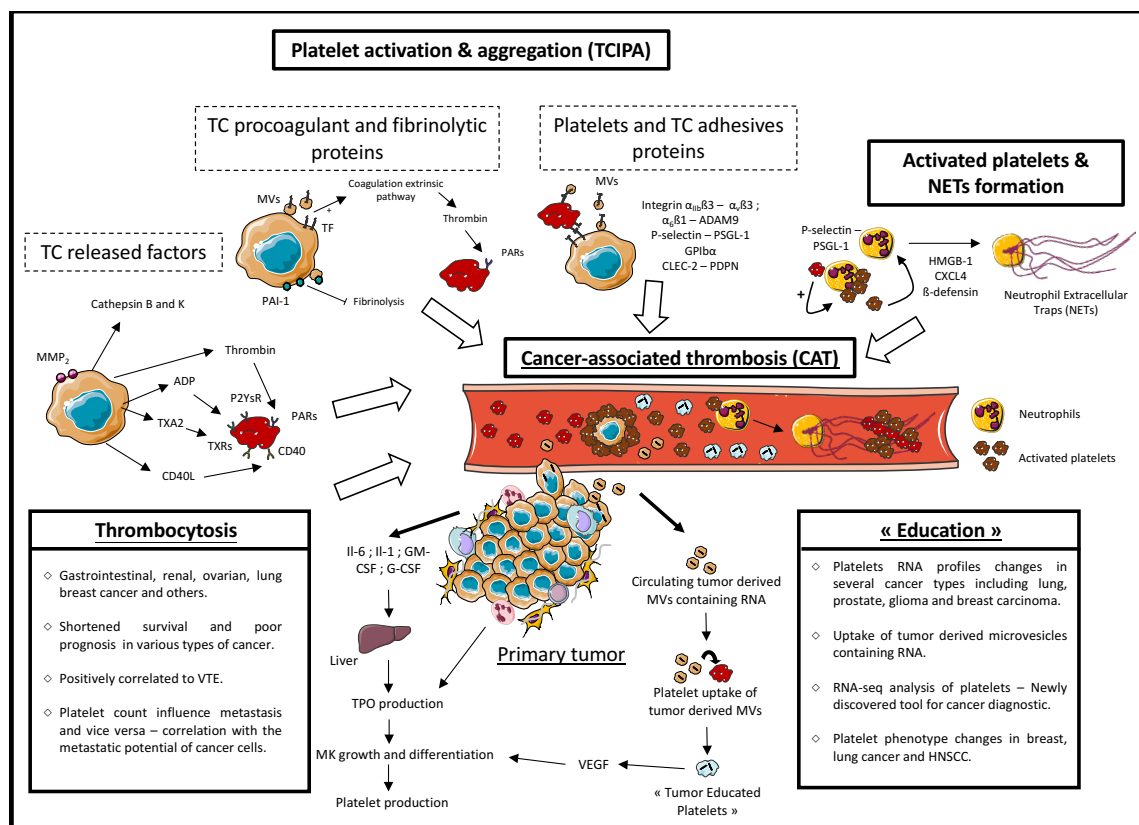


Figure 2. Impacts of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer-associated thrombosis. This figure summarizes all the mechanisms involved in the production, the activation and the education of platelets mediated by the primary tumor and the mechanisms of cancer-associated thrombosis. TC: Tumor Cell. This figure was obtained using Servier medical art. <http://smart.servier.com/>.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Varki, A. Trousseau's syndrome: Multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* **2007**, *110*, 1723–1729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mezouar, S.; Frère, C.; Darbousset, R.; Mege, D.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: Experimental and clinical evidences. *Thromb. Res.* **2016**, *139*, 65–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Palumbo, J.S.; Talmage, K.E.; Massari, J.V.; Jeunesse, C.M.L.; Flick, M.J.; Kombrinck, K.W.; Jirousková, M.; Degen, J.L. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* **2005**, *105*, 178–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Labelle, M.; Begum, S.; Hynes, R.O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 576–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Labelle, M.; Begum, S.; Hynes, R.O. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3053–3061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Plantureux, L.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Effects of platelets on cancer progression. *Thromb. Res.* **2018**, *164* (Suppl. 1), S40–S47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gasic, G.J.; Gasic, T.B.; Stewart, C.C. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *61*, 46–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Karpatkin, S.; Pearlstein, E. Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann. Intern. Med.* **1981**, *95*, 636–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baranyai, Z.; Jóna, V.; Tóth, A.; Szilasi, Z.; Tihanyi, B.; Zaránd, A.; Harsanyi, L.; Szállási, Z. Paraneoplastic thrombocytosis in gastrointestinal cancer. *Platelets* **2016**, *27*, 269–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Khorana, A.A.; Francis, C.W.; Culakova, E.; Lyman, G.H. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* **2005**, *104*, 2822–2829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ikeda, M.; Furukawa, H.; Imamura, H.; Shimizu, J.; Ishida, H.; Masutani, S.; Tatsuta, M.; Satomi, T. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2002**, *9*, 287–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gücer, F.; Moser, F.; Tamussino, K.; Reich, O.; Haas, J.; Arikan, G.; Petru, E.; Winter, R. Thrombocytosis as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **1998**, *70*, 210–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chadha, A.S.; Kocak-Uzel, E.; Das, P.; Minsky, B.D.; Delclos, M.E.; Mahmood, U.; Guha, S.; Ahmad, M.; Varadhachary, G.R.; Javle, M.; et al. Paraneoplastic thrombocytosis independently predicts poor prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Acta Oncol.* **2015**, *54*, 971–978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Monreal, M.; Fernandez-Llamazares, J.; Piñol, M.; Julian, J.F.; Broggi, M.; Escola, D.; Abad, A. Platelet count and survival in patients with colorectal cancer—A preliminary study. *Thromb. Haemost.* **1998**, *79*, 916–918. [[PubMed](#)]
- Jefferson, K.; Persad, R. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int.* **2001**, *87*, 715–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tranum, B.L.; Haut, A. Thrombocytosis: Platelet kinetics in neoplasia. *J. Lab. Clin. Med.* **1974**, *84*, 615–619. [[PubMed](#)]
- Ji, Y.; Sheng, L.; Du, X.; Qiu, G.; Su, D. Elevated platelet count is a strong predictor of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer patients. *Platelets* **2015**, *26*, 138–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Suzuki, A.; Takahashi, T.; Nakamura, K.; Tsuyuoka, R.; Okuno, Y.; Enomoto, T.; Fukumoto, M.; Imura, H. Thrombocytosis in patients with tumors producing colony-stimulating factor. *Blood* **1992**, *80*, 2052–2059. [[PubMed](#)]
- Stone, R.L.; Nick, A.M.; McNeish, I.A.; Balkwill, F.; Han, H.D.; Bottsford-Miller, J.; Rupairmoole, R.; Armaiz-Pena, G.N.; Pecot, C.V.; Coward, J.; et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 610–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kaser, A.; Brandacher, G.; Steurer, W.; Kaser, S.; Offner, F.A.; Zoller, H.; Theurl, I.; Widder, W.; Molnar, C.; Ludwiczek, O.; et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: Role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* **2001**, *98*, 2720–2725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

21. Sasaki, Y.; Takahashi, T.; Miyazaki, H.; Matsumoto, A.; Kato, T.; Nakamura, K.; Iho, S.; Okuno, Y.; Nakao, K. Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms. *Blood* **1999**, *94*, 1952–1960. [[PubMed](#)]
22. Ryu, T.; Nishimura, S.; Miura, H.; Yamada, H.; Morita, H.; Miyazaki, H.; Kitamura, S.; Miura, Y.; Saito, T. Thrombopoietin-producing hepatocellular carcinoma. *Intern. Med.* **2003**, *42*, 730–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rafii, S.; Shapiro, F.; Pettengell, R.; Ferris, B.; Nachman, R.L.; Moore, M.A.; Asch, A.S. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* **1995**, *86*, 3353–3363. [[PubMed](#)]
24. Rafii, S.; Mohle, R.; Shapiro, F.; Frey, B.M.; Moore, M.A.S. Regulation of Hematopoiesis by Microvascular Endothelium. *Leuk. Lymphoma* **1997**, *27*, 375–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wickenhauser, C.; Lorenzen, J.; Thiele, J.; Hillienhof, A.; Jungheim, K.; Schmitz, B.; Hansmann, M.L.; Fischer, R. Secretion of cytokines (interleukins-1 alpha, -3, and -6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) by normal human bone marrow megakaryocytes. *Blood* **1995**, *85*, 685–691. [[PubMed](#)]
26. Baj-Krzyworzeka, M.; Majka, M.; Pratico, D.; Ratajczak, J.; Vilaire, G.; Kijowski, J.; Reca, R.; Janowska-Wieczorek, A.; Ratajczak, M.Z. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.* **2002**, *30*, 450–459. [[CrossRef](#)]
27. Möhle, R.; Green, D.; Moore, M.A.; Nachman, R.L.; Rafii, S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 663–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Holmes, C.E.; Levis, J.E.; Schneider, D.J.; Bambace, N.M.; Sharma, D.; Lal, I.; Wood, M.E.; Muss, H.B. Platelet phenotype changes associated with breast cancer and its treatment. *Platelets* **2016**, *27*, 703–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Casella, I.; Feccia, T.; Chelucci, C.; Samoggia, P.; Castelli, G.; Guerriero, R.; Parolini, I.; Petrucci, E.; Pelosi, E.; Morsilli, O.; et al. Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood* **2003**, *101*, 1316–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Broxmeyer, H.E.; Cooper, S.; Li, Z.H.; Lu, L.; Song, H.Y.; Kwon, B.S.; Warren, R.E.; Donner, D.B. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int. J. Hematol.* **1995**, *62*, 203–215. [[CrossRef](#)]
31. Avraham, H.; Banu, N.; Scadden, D.T.; Abraham, J.; Groopman, J.E. Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood* **1994**, *83*, 2126–2132. [[PubMed](#)]
32. Ay, C.; Pabinger, I. Predictive potential of haemostatic biomarkers for venous thromboembolism in cancer patients. *Thromb. Res.* **2012**, *129*, S6–S9. [[CrossRef](#)]
33. Starlinger, P.; Moll, H.P.; Assinger, A.; Nemeth, C.; Hoetzenecker, K.; Gruenberger, B.; Gruenberger, T.; Kuehrer, I.; Schoppmann, S.F.; Gnant, M.; et al. Thrombospondin-1: A unique marker to identify in vitro platelet activation when monitoring in vivo processes. *J. Thromb. Haemost.* **2010**, *8*, 1809–1819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Suh, E.J.; Kabir, M.H.; Kang, U.-B.; Lee, J.W.; Yu, J.; Noh, D.-Y.; Lee, C. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Exp. Mol. Med.* **2012**, *44*, 36–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Huang, J.; Jochems, C.; Talaie, T.; Anderson, A.; Jales, A.; Tsang, K.Y.; Madan, R.A.; Gulley, J.L.; Schlom, J. Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role. *Blood* **2012**, *120*, 3030–3038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Benedetti Panici, P.; Scambia, G.; Massidda, B.; Chessa, P.; Tarquini, A.; Mancuso, S. Elevated plasma levels of beta-thromboglobulin in breast cancer. *Oncology* **1986**, *43*, 208–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Poruk, K.E.; Firpo, M.A.; Huerter, L.M.; Scaife, C.L.; Emerson, L.L.; Boucher, K.M.; Jones, K.A.; Mulvihill, S.J. Serum platelet factor 4 is an independent predictor of survival and venous thromboembolism in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2010**, *19*, 2605–2610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Mantur, M.; Kemona, H.; Kozłowski, R.; Kemona-Chetnik, I. Effect of tumor stage and nephrectomy on CD62P expression and sP-selectin concentration in renal cancer. *Neoplasma* **2003**, *50*, 262–265. [[PubMed](#)]
39. Riedl, J.; Hell, L.; Kaider, A.; Koder, S.; Marosi, C.; Zielinski, C.; Panzer, S.; Pabinger, I.; Ay, C. Association of platelet activation markers with cancer-associated venous thromboembolism. *Platelets* **2016**, *27*, 80–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Falanga, A.; Panova-Noeva, M.; Russo, L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2009**, *22*, 49–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Karpatkin, S.; Pearlstein, E.; Ambrogio, C.; Collier, B.S. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J. Clin. Investig.* **1988**, *81*, 1012–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Haemmerle, M.; Bottsford-Miller, J.; Pradeep, S.; Taylor, M.L.; Choi, H.-J.; Hansen, J.M.; Dalton, H.J.; Stone, R.L.; Cho, M.S.; Nick, A.M.; et al. FAK regulates platelet extravasation and tumor growth after antiangiogenic therapy withdrawal. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1885–1896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Camez, A.; Dupuy, E.; Bellucci, S.; Calvo, F.; Bryckaert, M.C.; Tobelem, G. Human platelet-tumor cell interactions vary with the tumor cell lines. *Invasion Metastasis* **1986**, *6*, 321–334. [[PubMed](#)]
44. Bastida, E.; Escolar, G.; Almirall, L.; Ordinas, A. Platelet activation induced by a human neuroblastoma tumor cell line is reduced by prior administration of ticlopidine. *Thromb. Haemost.* **1986**, *55*, 333–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Boukerche, H.; Berthier-Vergnes, O.; Penin, F.; Tabone, E.; Lizard, G.; Bailly, M.; McGregor, J.L. Human melanoma cell lines differ in their capacity to release ADP and aggregate platelets. *Br. J. Haematol.* **1994**, *87*, 763–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Alonso-Escolano, D.; Strongin, A.Y.; Chung, A.W.; Deryugina, E.I.; Radomski, M.W. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: Role of receptor glycoproteins. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 241–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Heinmöller, E.; Weinel, R.J.; Heidtmann, H.H.; Salge, U.; Seitz, R.; Schmitz, I.; Müller, K.M.; Zirngibl, H. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1996**, *122*, 735–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Sakai, H.; Suzuki, T.; Takahashi, Y.; Ukai, M.; Tauchi, K.; Fujii, T.; Horikawa, N.; Minamimura, T.; Tabuchi, Y.; Morii, M.; et al. Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A2. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 3368–3374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Cathcart, M.-C.; Gately, K.; Cummins, R.; Kay, E.; O’Byrne, K.J.; Pidgeon, G.P. Examination of thromboxane synthase as a prognostic factor and therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kajita, S.; Ruebel, K.H.; Casey, M.B.; Nakamura, N.; Lloyd, R.V. Role of COX-2, thromboxane A2 synthase, and prostaglandin I2 synthase in papillary thyroid carcinoma growth. *Mod. Pathol.* **2005**, *18*, 221–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Moussa, O.; Yordy, J.S.; Abol-Enein, H.; Sinha, D.; Bissada, N.K.; Halushka, P.V.; Ghoneim, M.A.; Watson, D.K. Prognostic and functional significance of thromboxane synthase gene overexpression in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11581–11587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nie, D.; Che, M.; Zacharek, A.; Qiao, Y.; Li, L.; Li, X.; Lamberti, M.; Tang, K.; Cai, Y.; Guo, Y.; et al. Differential expression of thromboxane synthase in prostate carcinoma: Role in tumor cell motility. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 429–439. [[CrossRef](#)]
53. de Leval, X.; Benoit, V.; Delarge, J.; Julémont, F.; Masereel, B.; Pirotte, B.; Merville, M.P.; David, J.L.; Dogné, J.M. Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (II/II). Effects of BM-567 on osteogenic sarcoma-cell-induced platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2003**, *68*, 55–59. [[CrossRef](#)]
54. Nie, D.; Lamberti, M.; Zacharek, A.; Li, L.; Szekeres, K.; Tang, K.; Chen, Y.; Honn, K.V. Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267*, 245–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Stout, R.D.; Suttles, J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol. Today* **1996**, *17*, 487–492. [[CrossRef](#)]
56. Henn, V.; Slupsky, J.R.; Gräfe, M.; Anagnostopoulos, I.; Förster, R.; Müller-Berghaus, G.; Kroczeck, R.A. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **1998**, *391*, 591–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Braesch-Andersen, S.; Paulie, S.; Koho, H.; Nika, H.; Aspenström, P.; Perlmann, P. Biochemical characteristics and partial amino acid sequence of the receptor-like human B cell and carcinoma antigen CDw40. *J. Immunol.* **1989**, *142*, 562–567. [[PubMed](#)]

58. Ingersoll, S.B.; Langer, F.; Walker, J.M.; Meyer, T.; Robson, T.; Amaya, M.; Desai, H.; Francis, J.L.; Amirkhosravi, A. Deficiencies in the CD40 and CD154 receptor-ligand system reduce experimental lung metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2009**, *26*, 829–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Young, L.S.; Dawson, C.W.; Brown, K.W.; Rickinson, A.B. Identification of a human epithelial cell surface protein sharing an epitope with the C3d/Epstein-Barr virus receptor molecule of B lymphocytes. *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 786–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Bussolati, B.; Russo, S.; Deambrosio, I.; Cantaluppi, V.; Volpe, A.; Ferrando, U.; Camussi, G. Expression of CD154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis. *Int. J. Cancer* **2002**, *100*, 654–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Henn, V.; Steinbach, S.; Büchner, K.; Presek, P.; Kroczeck, R.A. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* **2001**, *98*, 1047–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. McNicol, A.; Israels, S.J. Beyond hemostasis: The role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* **2008**, *8*, 99–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Inwald, D.P.; McDowall, A.; Peters, M.J.; Callard, R.E.; Klein, N.J. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ. Res.* **2003**, *92*, 1041–1048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Tong, A.W.; Papayoti, M.H.; Netto, G.; Armstrong, D.T.; Ordonez, G.; Lawson, J.M.; Stone, M.J. Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 691–703. [[PubMed](#)]
65. Yamada, M.; Shiroko, T.; Kawaguchi, Y.; Sugiyama, Y.; Egilmez, N.K.; Chen, F.A.; Bankert, R.B. CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but not sufficient for modulating MHC class I, ICAM-1 and Fas expression and proliferation of human non-small cell lung tumors. *Int. J. Cancer* **2001**, *92*, 589–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. van den Oord, J.J.; Maes, A.; Stas, M.; Nuyts, J.; Battocchio, S.; Kasran, A.; Garmyn, M.; De Wever, I.; De Wolf-Peeters, C. CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am. J. Pathol.* **1996**, *149*, 1953–1961. [[PubMed](#)]
67. Santilli, F.; Basili, S.; Ferroni, P.; Davì, G. CD40/CD40L system and vascular disease. *Intern. Emerg. Med.* **2007**, *2*, 256–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Jurasz, P.; Sawicki, G.; Duszyk, M.; Sawicka, J.; Miranda, C.; Mayers, I.; Radomski, M.W. Matrix metalloproteinase 2 in tumor cell-induced platelet aggregation: Regulation by nitric oxide. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 376–382. [[PubMed](#)]
69. Medina, C.; Jurasz, P.; Santos-Martinez, M.J.; Jeong, S.S.; Mitsky, T.; Chen, R.; Radomski, M.W. Platelet aggregation-induced by caco-2 cells: Regulation by matrix metalloproteinase-2 and adenosine diphosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 739–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Honn, K.V.; Cavanaugh, P.; Evens, C.; Taylor, J.D.; Sloane, B.F. Tumor cell-platelet aggregation: Induced by cathepsin B-like proteinase and inhibited by prostacyclin. *Science* **1982**, *217*, 540–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Andrade, S.S.; Gouvea, I.E.; Silva, M.C.C.; Castro, E.D.; de Paula, C.A.A.; Okamoto, D.; Oliveira, L.; Peres, G.B.; Ottaiano, T.; Facina, G.; et al. Cathepsin K induces platelet dysfunction and affects cell signaling in breast cancer—Molecularly distinct behavior of cathepsin K in breast cancer. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Bode, M.; Mackman, N. Regulation of tissue factor gene expression in monocytes and endothelial cells: Thromboxane A2 as a new player. *Vascul. Pharmacol.* **2014**, *62*, 57–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Liu, Y.; Jiang, P.; Capkova, K.; Xue, D.; Ye, L.; Sinha, S.C.; Mackman, N.; Janda, K.D.; Liu, C. Tissue factor-activated coagulation cascade in the tumor microenvironment is critical for tumor progression and an effective target for therapy. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 6492–6502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Ruf, W.; Yokota, N.; Schaffner, F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb. Res.* **2010**, *125*, S36–S38. [[CrossRef](#)]
75. Böhm, L.; Serafin, A.; Akudugu, J.; Fernandez, P.; van der Merwe, A.; Aziz, N.A. uPA/PAI-1 ratios distinguish benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2013**, *139*, 1221–1228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Zhang, W.; Ling, D.; Tan, J.; Zhang, J.; Li, L. Expression of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in ovarian cancer and its clinical significance. *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 637–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Chen, H.; Peng, H.; Liu, W.; Sun, Y.; Su, N.; Tang, W.; Zhang, X.; Wang, J.; Cui, L.; Hu, P.; et al. Silencing of plasminogen activator inhibitor-1 suppresses colorectal cancer progression and liver metastasis. *Surgery* **2015**, *158*, 1704–1713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Ferroni, P.; Roselli, M.; Portarena, I.; Formica, V.; Riondino, S.; LA Farina, F.; Costarelli, L.; Melino, A.; Massimiani, G.; Cavaliere, F.; et al. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels in breast cancer—Relationship with clinical outcome. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 1153–1161. [[PubMed](#)]
79. Rickles, F.R.; Falanga, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res.* **2001**, *102*, V215–V224. [[CrossRef](#)]
80. Mezouar, S.; Mege, D.; Darbousset, R.; Farge, D.; Debourdeau, P.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis. *Semin. Oncol.* **2014**, *41*, 346–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Chargaff, E.; West, R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J. Biol. Chem.* **1946**, *166*, 189–197. [[PubMed](#)]
82. Nomura, S.; Niki, M.; Nisizawa, T.; Tamaki, T.; Shimizu, M. Microparticles as Biomarkers of Blood Coagulation in Cancer. *Biomark. Cancer* **2015**, *7*, 51–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Geddings, J.E.; Mackman, N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood* **2013**, *122*, 1873–1880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hron, G.; Kollars, M.; Weber, H.; Sagaster, V.; Quehenberger, P.; Eichinger, S.; Kyrle, P.A.; Weltermann, A. Tissue factor-positive microparticles: Cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb. Haemost.* **2007**, *97*, 119–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Baran, J.; Baj-Krzyworzeka, M.; Weglarczyk, K.; Szatanek, R.; Zembala, M.; Barbasz, J.; Czupryna, A.; Szczepanik, A.; Zembala, M. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 841–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Yates, K.R.; Welsh, J.; Echrish, H.H.; Greenman, J.; Maraveyas, A.; Madden, L.A. Pancreatic cancer cell and microparticle procoagulant surface characterization: Involvement of membrane-expressed tissue factor, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2011**, *22*, 680–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Fleitas, T.; Martínez-Sales, V.; Vila, V.; Reganon, E.; Mesado, D.; Martín, M.; Gómez-Codina, J.; Montalar, J.; Reynés, G. Circulating Endothelial Cells and Microparticles as Prognostic Markers in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Graves, L.E.; Ariztia, E.V.; Navari, J.R.; Matzel, H.J.; Stack, M.S.; Fishman, D.A. Proinvasive Properties of Ovarian Cancer Ascites-Derived Membrane Vesicles. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7045–7049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Liebhardt, S.; Ditsch, N.; Nieuwland, R.; Rank, A.; Jeschke, U.; Von Koch, F.; Friese, K.; Toth, B. CEA-, Her2/neu-, BCRP- and Hsp27-positive microparticles in breast cancer patients. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 1707–1712. [[PubMed](#)]
90. Mege, D.; Panicot-Dubois, L.; Ouaiissi, M.; Robert, S.; Sielezneff, I.; Sastre, B.; Dignat-George, F.; Dubois, C. The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 939–948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Thomas, G.M.; Brill, A.; Mezouar, S.; Crescence, L.; Gallant, M.; Dubois, C.; Wagner, D.D. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost.* **2015**, *13*, 1310–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Hisada, Y.; Ay, C.; Auriemma, A.C.; Cooley, B.C.; Mackman, N. Human pancreatic tumors grown in mice release tissue factor-positive microvesicles that increase venous clot size. *J. Thromb. Haemost.* **2017**, *15*, 2208–2217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Demers, M.; Wagner, D.D. NETosis: A new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* **2014**, *40*, 277–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Collier, M.E.W.; Mah, P.-M.; Xiao, Y.; Maraveyas, A.; Ettlalaie, C. Microparticle-associated tissue factor is recycled by endothelial cells resulting in enhanced surface tissue factor activity. *Thromb. Haemost.* **2013**, *110*, 966–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Leal, A.C.; Mizurini, D.M.; Gomes, T.; Rochael, N.C.; Saraiva, E.M.; Dias, M.S.; Werneck, C.C.; Sielski, M.S.; Vicente, C.P.; Monteiro, R.Q. Tumor-Derived Exosomes Induce the Formation of Neutrophil Extracellular Traps: Implications For The Establishment of Cancer-Associated Thrombosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Engebraaten, O.; Trikha, M.; Juell, S.; Garman-Vik, S.; Fodstad, Ø. Inhibition of in vivo tumour growth by the blocking of host alpha(v)beta3 and alphaII(b)beta3 integrins. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 131–137. [[PubMed](#)]
97. Weber, M.R.; Zuka, M.; Lorger, M.; Tschan, M.; Torbett, B.E.; Zijlstra, A.; Quigley, J.P.; Staffin, K.; Eliceiri, B.P.; Krueger, J.S.; et al. Activated tumor cell integrin $\alpha v \beta 3$ cooperates with platelets to promote extravasation and metastasis from the blood stream. *Thromb. Res.* **2016**, *140* (Suppl. 1), S27–S36. [[CrossRef](#)]
98. Mammadova-Bach, E.; Zigrino, P.; Brucker, C.; Bourdon, C.; Freund, M.; De Arcangelis, A.; Abrams, S.I.; Orend, G.; Gachet, C.; Mangin, P.H. Platelet integrin $\alpha 6 \beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* **2016**, *1*, e88245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Kim, Y.J.; Borsig, L.; Varki, N.M.; Varki, A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *PNAS* **1998**, *95*, 9325–9330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Qi, C.; Wei, B.; Zhou, W.; Yang, Y.; Li, B.; Guo, S.; Li, J.; Ye, J.; Li, J.; Zhang, Q.; et al. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth. *Oncotarget* **2015**, *6*, 6584–6596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Chen, M.; Geng, J.-G. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2006**, *54*, 75–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Wehmeier, A.; Tschöpe, D.; Esser, J.; Menzel, C.; Nieuwenhuis, H.K.; Schneider, W. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. *Thromb. Res.* **1991**, *61*, 271–278. [[CrossRef](#)]
103. Bastida, E.; Almirall, L.; Ordinas, A. Tumor-cell-induced platelet aggregation is a glycoprotein-dependent and lipoxygenase-associated process. *Int. J. Cancer* **1987**, *39*, 760–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Grossi, I.M.; Fitzgerald, L.A.; Kendall, A.; Taylor, J.D.; Sloane, B.F.; Honn, K.V. Inhibition of Human Tumor Cell Induced Platelet Aggregation by Antibodies to Platelet Glycoproteins Ib and IIb/IIIa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1987**, *186*, 378–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Jain, S.; Zuka, M.; Liu, J.; Russell, S.; Dent, J.; Guerrero, J.A.; Forsyth, J.; Maruszak, B.; Gartner, T.K.; Felding-Habermann, B.; et al. Platelet glycoprotein Ib α supports experimental lung metastasis. *PNAS* **2007**, *104*, 9024–9028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Oleksowicz, L.; Mrowiec, Z.; Schwartz, E.; Khorshidi, M.; Dutcher, J.P.; Puszkin, E. Characterization of tumor-induced platelet aggregation: The role of immunorelated GPIb and GPIIb IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. *Thromb. Res.* **1995**, *79*, 261–274. [[CrossRef](#)]
107. Erpenbeck, L.; Nieswandt, B.; Schön, M.; Pozgajova, M.; Schön, M.P. Inhibition of Platelet GPIb α and Promotion of Melanoma Metastasis. *J. Investig. Dermatol.* **2010**, *130*, 576–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Fujita, N.; Takagi, S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J. Biochem.* **2012**, *152*, 407–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Kato, Y.; Kaneko, M.; Sata, M.; Fujita, N.; Tsuruo, T.; Osawa, M. Enhanced Expression of Aggrus (T1alpha/Podoplanin), a Platelet-Aggregation-Inducing Factor in Lung Squamous Cell Carcinoma. *TBI* **2005**, *26*, 195–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Takagi, S.; Oh-hara, T.; Sato, S.; Gong, B.; Takami, M.; Fujita, N. Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 2605–2614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Kato, Y.; Fujita, N.; Kunita, A.; Sato, S.; Kaneko, M.; Osawa, M.; Tsuruo, T. Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51599–51605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Takagi, S.; Sato, S.; Oh-hara, T.; Takami, M.; Koike, S.; Mishima, Y.; Hatake, K.; Fujita, N. Platelets Promote Tumor Growth and Metastasis via Direct Interaction between Aggrus/Podoplanin and CLEC-2. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Vanschoonbeek, K.; Feijge, M. a. H.; Kampen, R.J.W.V.; Kenis, H.; Hemker, H.C.; Giesen, P.L.A.; Heemsker, J.W.M. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: Subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *J. Thromb. Haemost.* **2004**, *2*, 476–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

114. Wahrenbrock, M.; Borsig, L.; Le, D.; Varki, N.; Varki, A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 853–862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Cedervall, J.; Hamidi, A.; Olsson, A.-K. Platelets, NETs and cancer. *Thromb. Res.* **2018**, *164* (Suppl. 1), S148–S152. [[CrossRef](#)]
116. Caudrillier, A.; Kessenbrock, K.; Gilliss, B.M.; Nguyen, J.X.; Marques, M.B.; Monestier, M.; Toy, P.; Werb, Z.; Looney, M.R. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2661–2671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Etulain, J.; Fondevila, C.; Negrotto, S.; Schattner, M. Platelet-mediated angiogenesis is independent of VEGF and fully inhibited by aspirin. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *170*, 255–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Rossaint, J.; Herter, J.M.; Aken, H.V.; Napirei, M.; Döring, Y.; Weber, C.; Soehnlein, O.; Zarbock, A. Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. *Blood* **2014**, *123*, 2573–2584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. von Brühl, M.-L.; Stark, K.; Steinhart, A.; Chandraratne, S.; Konrad, I.; Lorenz, M.; Khandoga, A.; Tirniceriu, A.; Coletti, R.; Köllnberger, M.; et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 819–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Maugeri, N.; Campana, L.; Gavina, M.; Covino, C.; Metrio, M.D.; Panciroli, C.; Maiuri, L.; Maseri, A.; D’Angelo, A.; Bianchi, M.E.; et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 2074–2088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Kraemer, B.F.; Campbell, R.A.; Schwertz, H.; Cody, M.J.; Franks, Z.; Tolley, N.D.; Kahr, W.H.A.; Lindemann, S.; Seizer, P.; Yost, C.C.; et al. Novel Anti-bacterial Activities of β -defensin 1 in Human Platelets: Suppression of Pathogen Growth and Signaling of Neutrophil Extracellular Trap Formation. *PLOS Pathog.* **2011**, *7*, e1002355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Carestia, A.; Kaufman, T.; Rivadeneyra, L.; Landoni, V.I.; Pozner, R.G.; Negrotto, S.; D’Atri, L.P.; Gómez, R.M.; Schattner, M. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J. Leuk. Biol.* **2016**, *99*, 153–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Amirkhosravi, A.; Amaya, M.; Desai, H.; Francis, J.L. Platelet-CD40 ligand interaction with melanoma cell and monocyte CD40 enhances cellular procoagulant activity. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2002**, *13*, 505–512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Calverley, D.C.; Phang, T.L.; Choudhury, Q.G.; Gao, B.; Oton, A.B.; Weyant, M.J.; Geraci, M.W. Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer. *Clin. Transl. Sci.* **2010**, *3*, 227–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Nilsson, R.J.A.; Balaj, L.; Hulleman, E.; van Rijn, S.; Pegtel, D.M.; Walraven, M.; Widmark, A.; Gerritsen, W.R.; Verheul, H.M.; Vandertop, W.P.; et al. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* **2011**, *118*, 3680–3683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Best, M.G.; Sol, N.; Kooi, I.; Tannous, J.; Westerman, B.A.; Rustenburg, F.; Schellen, P.; Verschuere, H.; Post, E.; Koster, J.; et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 666–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Denis, M.M.; Tolley, N.D.; Bunting, M.; Schwertz, H.; Jiang, H.; Lindemann, S.; Yost, C.C.; Rubner, F.J.; Albertine, K.H.; Swoboda, K.J.; et al. Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. *Cell* **2005**, *122*, 379–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Alhasan, A.A.; Izuogu, O.G.; Al-Balool, H.H.; Steyn, J.S.; Evans, A.; Colzani, M.; Ghevaert, C.; Mountford, J.C.; Marenah, L.; Elliott, D.J.; et al. Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation. *Blood* **2016**, *127*, e1–e11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Rowley, J.W.; Oler, A.J.; Tolley, N.D.; Hunter, B.N.; Low, E.N.; Nix, D.A.; Yost, C.C.; Zimmerman, G.A.; Weyrich, A.S. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* **2011**, *118*, e101–e111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Schubert, S.; Weyrich, A.S.; Rowley, J.W. A tour through the transcriptional landscape of platelets. *Blood* **2014**, *124*, 493–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Landry, P.; Plante, I.; Ouellet, D.L.; Perron, M.P.; Rousseau, G.; Provost, P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 961–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

132. Bray, P.F.; McKenzie, S.E.; Edelstein, L.C.; Nagalla, S.; Delgrosso, K.; Ertel, A.; Kupper, J.; Jing, Y.; Londin, E.; Loher, P.; et al. The complex transcriptional landscape of the anucleate human platelet. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 1. [CrossRef] [PubMed]
133. Plé, H.; Landry, P.; Benham, A.; Coarfa, C.; Gunaratne, P.H.; Provost, P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50746. [CrossRef] [PubMed]
134. Agam, G.; Bessler, H.; Djaldetti, M. In vitro DNA and RNA synthesis by human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *425*, 41–48. [CrossRef]
135. Booyse, F.M.; Rafelson, M.E. Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *145*, 188–190. [CrossRef]
136. Brown, G.T.; McIntyre, T.M. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: Kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 5489–5496. [CrossRef] [PubMed]
137. Schwertz, H.; Tolley, N.D.; Foulks, J.M.; Denis, M.M.; Risenmay, B.W.; Buerke, M.; Tilley, R.E.; Rondina, M.T.; Harris, E.M.; Kraiss, L.W.; et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2433–2440. [CrossRef] [PubMed]
138. Rosenwald, I.B.; Pechet, L.; Han, A.; Lu, L.; Pihan, G.; Woda, B.; Chen, J.J.; Szymanski, I. Expression of translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 α and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thromb. Haemost.* **2001**, *85*, 142–151. [PubMed]
139. Kishore, S.; Khanna, A.; Zhang, Z.; Hui, J.; Balwierz, P.J.; Stefan, M.; Beach, C.; Nicholls, R.D.; Zavolan, M.; Stamm, S. The snoRNA MBII-52 (SNORD 115) is processed into smaller RNAs and regulates alternative splicing. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 1153–1164. [CrossRef] [PubMed]
140. Nilsson, R.J.A.; Karachaliou, N.; Berenguer, J.; Gimenez-Capitan, A.; Schellen, P.; Teixido, C.; Tannous, J.; Kuiper, J.L.; Drees, E.; Grabowska, M.; et al. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* **2015**, *7*, 1066–1075. [CrossRef] [PubMed]
141. Best, M.G.; Sol, N.; In't Veld, S.G.J.G.; Vancura, A.; Muller, M.; Niemeijer, A.-L.N.; Fejes, A.V.; Tjon Kon Fat, L.-A.; Huis In 't Veld, A.E.; Leurs, C.; et al. Swarm Intelligence-Enhanced Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer Using Tumor-Educated Platelets. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 238–252. [CrossRef] [PubMed]
142. Bian, D.; Shi, W.; Shao, Y.; Li, P.; Song, G. Long non-coding RNA GAS5 inhibits tumorigenesis via miR-137 in melanoma. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 1509–1520. [PubMed]
143. Luo, G.; Liu, D.; Huang, C.; Wang, M.; Xiao, X.; Zeng, F.; Wang, L.; Jiang, G. LncRNA GAS5 Inhibits Cellular Proliferation by Targeting P27Kip1. *Mol. Cancer Res.* **2017**, *15*, 789–799. [CrossRef] [PubMed]
144. Luo, C.-L.; Xu, Z.-G.; Chen, H.; Ji, J.; Wang, Y.-H.; Hu, W.; Wang, K.; Zhang, W.-W.; Yuan, C.-H.; Wang, F.-B. LncRNAs and *EGFRvIII* sequestered in TEPs enable blood-based NSCLC diagnosis. *Cancer Manag. Res.* **2018**, *10*, 1449–1459. Available online: <https://www.dovepress.com/lncrnas-and-egfrviii-sequestered-in-teps-enable-blood-based-nsclc-diag-peer-reviewed-article-CMAR> (accessed on 5 September 2018).
145. Kaudewitz, D.; Skroblin, P.; Bender, L.H.; Barwari, T.; Willeit, P.; Pechlaner, R.; Sunderland, N.P.; Willeit, K.; Morton, A.C.; Armstrong, P.C.; et al. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function Novelty and Significance. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 420–432. [CrossRef] [PubMed]
146. Gidlöf, O.; van der Brug, M.; Ohman, J.; Gilje, P.; Olde, B.; Wahlestedt, C.; Erlinge, D. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood* **2013**, *121*, 3908–3917. [CrossRef] [PubMed]
147. Londin, E.R.; Hatzimichael, E.; Loher, P.; Edelstein, L.; Shaw, C.; Delgrosso, K.; Fortina, P.; Bray, P.F.; McKenzie, S.E.; Rigoutsos, I. The human platelet: Strong transcriptome correlations among individuals associate weakly with the platelet proteome. *Biol. Direct* **2014**, *9*, 3. [CrossRef] [PubMed]
148. McRedmond, J.P.; Park, S.D.; Reilly, D.F.; Coppinger, J.A.; Maguire, P.B.; Shields, D.C.; Fitzgerald, D.J. Integration of proteomics and genomics in platelets: A profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol. Cell Proteomics* **2004**, *3*, 133–144. [CrossRef] [PubMed]
149. Burkhart, J.M.; Vaudel, M.; Gambaryan, S.; Radau, S.; Walter, U.; Martens, L.; Geiger, J.; Sickmann, A.; Zahedi, R.P. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood* **2012**, *120*, e73–e82. [CrossRef] [PubMed]

150. Rowley, J.W.; Weyrich, A.S. Coordinate expression of transcripts and proteins in platelets. *Blood* **2013**, *121*, 5255–5256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Hung, W.S.; Hung, C.L.; Fan, J.T.; Huang, D.Y.; Yeh, C.F.; Cheng, J.C.; Tseng, C.P. The endocytic adaptor protein Disabled-2 is required for cellular uptake of fibrinogen. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, *1823*, 1778–1788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Banerjee, M.; Joshi, S.; Zhang, J.; Moncman, C.L.; Yadav, S.; Bouchard, B.A.; Storrie, B.; Whiteheart, S.W. Cellubrevin/vesicle-associated membrane protein-3—Mediated endocytosis and trafficking regulate platelet functions. *Blood* **2017**, *130*, 2872–2883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Klement, G.L.; Yip, T.-T.; Cassiola, F.; Kikuchi, L.; Cervi, D.; Podust, V.; Italiano, J.E.; Wheatley, E.; Abou-Slaybi, A.; Bender, E.; et al. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood* **2009**, *113*, 2835–2842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Rolfes, V.; Idel, C.; Pries, R.; Plötze-Martin, K.; Habermann, J.; Gemoll, T.; Bohnet, S.; Latz, E.; Ribbat-Idel, J.; Franklin, B.S.; et al. PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget* **2018**, *9*, 27460–27470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Rothwell, P.M.; Wilson, M.; Price, J.F.; Belch, J.F.; Meade, T.W.; Mehta, Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: A study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* **2012**, *379*, 1591–1601. [[CrossRef](#)]
156. Guillem-Llobat, P.; Dovizio, M.; Bruno, A.; Ricciotti, E.; Cufino, V.; Sacco, A.; Grande, R.; Alberti, S.; Arena, V.; Cirillo, M.; et al. Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 32462–32477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Cao, Y.; Nishihara, R.; Wu, K.; Wang, M.; Ogino, S.; Willett, W.C.; Spiegelman, D.; Fuchs, C.S.; Giovannucci, E.L.; Chan, A.T. Population-wide Impact of Long-term Use of Aspirin and the Risk for Cancer. *JAMA Oncol.* **2016**, *2*, 762–769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Santilli, F.; Boccatonda, A.; Davì, G. Aspirin, platelets, and cancer: The point of view of the internist. *Eur. J. Intern. Med.* **2016**, *34*, 11–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Gebremeskel, S.; LeVatte, T.; Liwski, R.S.; Johnston, B.; Bezuhly, M. The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 234–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Mezouar, S.; Darbousset, R.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 462–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Denslow, A.; Świtalska, M.; Jarosz, J.; Papiernik, D.; Porshneva, K.; Nowak, M.; Wietrzyk, J. Clopidogrel in a combined therapy with anticancer drugs—Effect on tumor growth, metastasis, and treatment toxicity: Studies in animal models. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Serebruany, V.L. Platelet Inhibition with Prasugrel and Increased Cancer Risks: Potential Causes and Implications. *Am. J. Med.* **2009**, *122*, 407–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Leader, A.; Zelikson-Saporta, R.; Pereg, D.; Spectre, G.; Rozovski, U.; Raanani, P.; Hermoni, D.; Lishner, M. The Effect of Combined Aspirin and Clopidogrel Treatment on Cancer Incidence. *Am. J. Med.* **2017**, *130*, 826–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Leader, A.; Zelikson-Saporta, R.; Rozovski, U.; Pereg, D.; Raanani, P.; Spectre, G.; Lishner, M.; Hermoni, D. Clopidogrel Treatment Is Associated with a Decrease in Cancer Incidence. *Blood* **2015**, *126*, 1124.
165. Huo, Y.; Schober, A.; Forlow, S.B.; Smith, D.F.; Hyman, M.C.; Jung, S.; Littman, D.R.; Weber, C.; Ley, K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 61–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Sachais, B.S.; Turrentine, T.; Dawicki McKenna, J.M.; Rux, A.H.; Rader, D.; Kowalska, M.A. Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice. *Thromb. Haemost.* **2007**, *98*, 1108–1113. [[PubMed](#)]
167. Swaim, A.F.; Field, D.J.; Fox-Talbot, K.; Baldwin, W.M.; Morrell, C.N. Platelets Contribute to Allograft Rejection through Glutamate Receptor Signaling. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 6999–7006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Xu, H.; Zhang, X.; Mannon, R.B.; Kirk, A.D. Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 769–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Li, R.; Ren, M.; Chen, N.; Luo, M.; Deng, X.; Xia, J.; Yu, G.; Liu, J.; He, B.; Zhang, X.; et al. Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

170. Li, Y.-T.; Nishikawa, T.; Kaneda, Y. Platelet-cytokine Complex Suppresses Tumour Growth by Exploiting Intratumoural Thrombin-dependent Platelet Aggregation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Li, J.; Sharkey, C.C.; Wun, B.; Liesveld, J.; King, M.R. Genetic engineering of platelets to neutralize circulating tumor cells. *J. Control. Release* **2016**, *228*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.2 Effets des plaquettes sur la progression tumorale

Effects of platelets on cancer progression (revue). Léa Plantureux, Lydie Crescence, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois. Publiée dans *Thrombosis Research*, 2018.



Full Length Article

Effects of platelets on cancer progression

Léa Plantureux, Lydie Crescence, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois*

Aix Marseille Univ, INSERM, VRCM, Marseille, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Platelets
Cancer
Angiogenesis
Tumor growth
Metastasis
Cancer-associated thrombosis

ABSTRACT

Platelets are small (2–4 μm), anucleate, hematopoietic cells released by bone marrow megakaryocytes in the bloodstream. For a long time, platelets were described as the major effectors of hemostasis and thrombosis.

In 1865, Armand Trousseau demonstrated a close relation between thrombosis and cancer. Subsequently, much clinical and experimental evidence supports the idea that platelets play several roles in the progression of malignancies and in cancer-associated thrombosis.

In this review, we will discuss the roles of tumor-educated platelets (TEPs) in the progression of cancer from primary tumors to secondary metastatic outbreaks.

1. Introduction

Platelets are small (2–4 μm), anucleate, hematopoietic cells released by bone marrow megakaryocytes in the bloodstream. In healthy humans, the concentration of circulating platelets is approximately $150 \times 10^9/L$. Recently, in a mouse model, it was shown that platelets can also be produced in the lung, by intravascular megakaryocytes originating from extrapulmonary sites [1]. For a long time, platelets were described as the major effectors of hemostasis and thrombosis. The hemostatic functions of platelets were first described in 1873 by Osler, who showed the presence of “blood plaques” in white thrombi.

In 1865, Armand Trousseau demonstrated a close relation between thrombosis and cancer [2]. Subsequently, much clinical and experimental evidence supports the idea that platelets play several roles in the progression of malignancies and in cancer-associated thrombosis [3].

Platelets are a huge reservoir of biomolecules, including platelet-specific and circulating ingested biomolecules. Upon activation, platelets release the biomolecule content on their granules that participates in the progression of malignancy. A real cross-talk exists between platelets and cancer. Indeed, cancer itself can influence platelet count and activation state which is critical for cancer progression. Inhibition of thrombocytosis or induction of thrombocytopenia are related to a decrease in tumor growth and metastasis, indicating that the ability of cancer cells to enhance platelet count is not harmless [7,8]. However, the roles of platelets in tumor growth are subjects of controversy. On one hand, much evidence has demonstrated that platelets enhance

cancer cell proliferation, pro-survival signaling, angiogenesis and invasiveness. For example, Egan and collaborators showed that platelet adhesion and degranulation induced pro-survival and pro-angiogenic signaling in ovarian cancer cells [9]. In addition, platelet adhesion and platelet-released factors seem to actively participate in the epithelial to mesenchymal transition (EMT) of cancer cells, promoting their invasiveness and metastatic potential [10]. On the other hand, a few studies demonstrated an anti-proliferative role of platelets or platelet-derived microparticles on cancer cells, with the induction of cell cycle arrest and inhibition of DNA synthesis, and the induction of apoptosis, respectively [11,12].

Cancer cells can also “educate” platelets by modulating their RNA profiles and phenotypes. Platelets RNA profiles changes were reported in several cancer types including lung, prostate, glioma and breast carcinoma [4–6]. Using RNA-seq analysis, Best et al. were able to distinguish cancer patients from healthy individuals with 96% of accuracy, suggesting that the emerging concept of tumor educated platelets (TEPs) may provide interesting tools for cancer diagnostic [6]. In this review, we will discuss the roles of platelets and tumor-educated platelets (TEPs) in the progression of cancer from primary tumors to secondary metastatic outbreaks.

2. Growth and angiogenic factors in tumor growth, angiogenesis and metastasis

Platelet alpha granules are enriched in mitogens and growth factors

Abbreviations: TAN, tumor associated neutrophils; TAM, tumor associated macrophages; CAF, cancer associated fibroblast; ECM, extracellular matrix; PMPs, platelets microparticles; TCIPA, tumor cell induced platelet aggregation

* Corresponding author.

E-mail addresses: christophe.dubois@univ-amu.fr, christophe.dubois@inserm.fr (C. Dubois).

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.01.035>

Received 26 November 2017; Received in revised form 17 January 2018; Accepted 18 January 2018
0049-3848/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

such as TGF- β (transforming growth factor β), EGF (epidermal growth factor) and PDGF (platelet-derived growth factor). Platelet-derived growth factors are peptides that signal through cell-surface receptor tyrosine kinases (PDGFR) and activate various cellular functions such as proliferation, growth and differentiation. Upon activation, platelets release mitogens including PDGF and EGF that are both involved in the regulation of proteolytic enzyme activity and are released by cancer cells, mediating their invasive behavior [13]. PDGF, through its signaling, is also involved in the acceleration of growth of some metastatic breast tumors. Furthermore, the elevated serum level of PDGF in breast cancer patients is associated with a significantly greater degree of metastasis and shortened survival [14]. PDGF overexpression was proposed as prognostic marker in colorectal cancer [15]. Its expression has also been identified in various types of solid tumors, including glioblastomas and prostate carcinomas [16].

Platelet alpha granules also contain vascular endothelial growth factor (VEGF), a growth factor involved in the induction of vasculogenesis and angiogenesis. The notion of tumor angiogenesis was first described by Folkman and collaborators in 1974 [17]. They demonstrated that tumors cannot reach more than 2 mm without forming new blood vessels to support the diffusion of oxygen and nutrients required for tumor growth. VEGF, the strongest angiogenic factor, and its signaling, through its VEGF-R, stimulates endothelial cell migration, proliferation and vessel formation in the tumor microenvironment. Platelets contain a plethora of angiogenesis-regulating proteins in their granules: (i) proteins that positively regulate angiogenesis, including VEGF, PDGF, TGF, EGF, angiopoietin-1, IGF-1, sphingosine-1-phosphate and MMPs and (ii) proteins that negatively regulate angiogenesis, including platelet factor-4 (PF4), thrombospondin-1 (TSP-1), endostatin, serotonin, PAI-1 and angiostatin [18]. In addition, Rong Li and colleagues demonstrated that intratumoral platelets are implicated in the regulation of vessel density and the maturation of blood vessels, mainly by VEGF and TGF- β released by the platelets [19]. The angiogenic role of VEGF has been demonstrated in various type of cancers, including colorectal, breast, lung and ovarian carcinomas, which led to the development of therapeutic VEGF monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors [16,20].

TGF- β is another mitogen contained in alpha granules and released upon platelet activation. TGF- β signaling, through its serin/threonine protein kinase receptor, is involved in several biological processes. Overexpression of TGF- β has been demonstrated in various cancer types, including colon, breast, esophageal, gastric, hepatocellular, lung and pancreatic cancer, and has been correlated with tumor progression, metastasis and poor prognostic outcome. However, depending on cancer stages and microenvironment, TGF- β can have the opposite effects. For example, in early stages, TGF- β can act as a tumor suppressor and potently inhibit cancer cell proliferation and tumor growth [21]. However, TGF- β released by platelets into the microenvironment is mostly considered a tumor growth and metastasis promoter [22]. Platelet-derived TGF- β 1 has been described as increasing human and mouse ovarian cancer cell proliferation [23]. Furthermore, the inhibition of TGF- β signaling in cancer cells (induced by an overexpression of dominant negative TGF- β receptor II) strongly reduced intravasation and lung metastasis [24,25]. Direct interaction between platelets and cancer cells and the release of platelet-derived TGF- β synergistically activates TGF- β /smad and NF- κ B pathways in cancer cells, resulting in the acquisition of an invasive mesenchymal-like phenotype *in vitro* and the enhancement of metastasis *in vivo* [10].

3. Platelet agonists, hemostatic factors and procoagulant proteins in tumor growth, angiogenesis and metastasis

Some cancer cells can release platelet agonists, including ADP, TXA2 and thrombin, that have all been shown to induce platelet activation and to contribute to tumor growth and metastasis [26–28]. Cho et al. demonstrated that platelets enhance ovarian cancer cell

proliferation in a TGF- β 1-dependent manner [23]. Moreover, this team recently showed that inhibition of the platelet ADP receptor P2Y12 by ticagrelor reduced ovarian tumor growth by 60% in comparison to aspirin and by 75% in comparison with placebo-treated mice [29]. Using an orthotopic pancreatic cancer mouse model, our team demonstrated that inhibition of platelet activation by clopidogrel, another P2Y12 inhibitor, reduces pancreatic tumor growth and metastasis [30]. In addition, Simon Gebremeskel and colleagues showed that reversible inhibition of P2Y12 by ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in a mouse model of melanoma [31]. These findings support a role of P2Y12-mediated platelet activation in promoting tumor growth and metastasis and provide proof of concept for the clinical use of P2Y12 inhibitors such as clopidogrel and ticagrelor for the prevention of tumor progression and metastasis. In addition, platelet-tumor cell interaction-dependent release of ATP has been shown to enhance vascular permeability through activation of the endothelial P2Y2 receptor, facilitating tumor cell extravasation and metastatic seeding [32].

Thromboxane released following platelet activation by cancer cells has been highlighted since the 1980s and is positively associated with ovarian cancer advancement. Overexpression of thromboxane receptors and thromboxane synthase has been reported in various types of cancers, including colorectal, prostate, bladder and non-small-cell lung carcinomas. The inhibition of thromboxane synthase activity reduced tumor proliferation, which was rescued by TXA2 addition, and induced apoptosis [33,34].

Thrombin generation following platelet activation that is mediated by cancer cells and thrombin secretion by cancer cells themselves play several roles in tumor growth, angiogenesis and invasion. Thrombin treatment up-regulates cathepsin D (CD) mRNA and protein expression in different cancer cell lines, including human and mouse breast carcinomas and prostate carcinomas and melanomas, and in primary endothelial cells, also called HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). In these cell lines, up-regulation of CD expression and secretion was responsible for the enhancement of cancer cell chemotaxis and migration, and HUVEC Matrigel tube formation. In addition, pharmacological inhibition of thrombin by hirudin and the use of CD knocked-down cancer cells strongly reduces tumor growth and metastasis [35,36]. Thrombin also promotes tumor invasion through the induction and association of MMP-9 and β 1-integrin on the cell surface via a PI3K-dependent pathway [37]. Furthermore, thrombin can induce EMT in SKOV3 ovarian cancer cells, promoting their invasive properties [38]. In addition, thrombin up-regulates Tissue Factor (TF) activity and VEGF released by MDA-231 breast cancer cells that enhanced their metastatic potential [39].

TF is a transmembrane glycoprotein involved in the initiation of the extrinsic pathway of normal blood coagulation protease cascade. TF can bind factor VIIa (TF/FVIIa) to form an active complex responsible for the proteolytic activation of factor IX and X, thrombin generation and fibrin deposition. Extravasation of coagulation factors, mostly due to an enhanced tumor vasculature permeability, were observed in the tumor microenvironment. Liu and colleagues demonstrate that TF expressed by cancer cells and the TF-activated coagulation cascade in the tumor microenvironment play critical roles in tumor growth. Treatment of mice bearing breast tumors with an inhibitor of TF/FVIIa, led to growth retardation, whereas treatment with doxorubicin-based prodrugs that are selectively activated by the protease activity of TF, FVIIa, FXa and thrombin, totally eliminated primary tumors and metastasis [40]. The deposition of the non-coagulant alternatively spliced isoform of TF into the tumor stroma led to the induction of angiogenesis through the ligation of endothelial integrins α v β 3 and α 6 β 1. Moreover, this team showed that inhibition of TF-VIIa-PAR2 signaling but not TF-initiated coagulation suppressed breast tumor growth and angiogenesis [41]. Taken together these studies demonstrate that TF plays critical roles in tumor growth and angiogenesis and that the protease activity of the coagulation cascade in the tumor microenvironment may serve as an enzymatic target to chemotherapeutic pro-drugs.

The platelet-activating factors (PAFs) are synthesized into the platelet peroxisomes and are released upon platelet activation. Some melanoma cell lines have been demonstrated to express a functional platelet activating factor receptor (PAF-R) that mediates a pro-survival program through its signaling. In addition, PAFs were shown to induce VEGF expression in immortalized vascular cells, mainly via the activation of the NF-kappaB pathway and the decrease of p53 activity [42]. Furthermore, in breast, prostate, colitis-associated cancer and Kaposi's sarcoma, inhibition of PAFR signaling by antagonists seems to reduce tumor growth and suppress angiogenesis [43–46].

4. Roles of adhesive proteins in tumor growth, spreading and metastasis

Cancer cells can activate platelets in two major ways: indirectly by numerous released factors and directly by their adhesion to circulating platelets. The direct interaction between platelets and cancer cells seems to be essential for the progression of cancer. First, the aggregation of platelets around tumor cells is critical for their survival in the bloodstream. Indeed, platelet coating of tumor cells and fibrin(ogen) deposition has been shown to form a physical barrier that protects tumor cells against the cytotoxic activity of natural killer cells (NK) in the lungs of mice [47]. Moreover, the release of platelet-derived TGF- β following platelet activation induced a down-regulation of the activating immunoreceptor NKG2D on NK cells, impairing their anti-tumor activity [48]. In addition to its ability to inhibit immune surveillance, platelet aggregation around cancer cells is also essential for the protection of cancer cells against high shear stress in the bloodstream [49]. Second, platelet adhesion and degranulation seem to be essential to induce pro-survival and pro-angiogenic signaling in ovarian cancer cells [9]. In the same way, Labelle et al. demonstrated that direct interaction between platelets and cancer cells followed by the release of platelet-derived TGF- β is required for the synergistic activation of TGF- β /smad and NF-kB pathways in breast and colorectal cancer cells. The activation of these pathways results in the acquisition of an invasive mesenchymal-like phenotype *in vitro* and enhanced metastasis *in vivo* [10]. In addition, the ability of cancer cells to induced platelet aggregation, also called Tumor Cell Induced Platelet Aggregation (TCIPA), and thrombocytopenia in mice has been shown to be directly correlated to their metastatic potential *in vivo* [50]. Thus, together, these observations demonstrate that platelet-cancer cell interactions are essential for tumor progression. However, few studies have investigated the role of platelet and cancer cell adhesive proteins and their therapeutic potential in the progression of malignancies.

4.1. Integrins

In 1988, Karpatkin et al. demonstrated that platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ inhibition by blocking antibodies reduced colorectal and melanoma cancer cell-platelet interactions *in vitro* and reduced metastasis *in vivo*. The addition of RGDS also reduced the interactions between platelets and cancer cells, suggesting an interaction via fibronectin and the Von Willebrand factor (VWF) in an $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent manner [50]. In addition, tumor cell integrin $\alpha v\beta_3$ has been shown to bind platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, to mediate the cancer cell-platelet interaction and aggregation and to promote tumor growth and metastasis *in vivo* [51–53]. More recently, Mammadova-Bach et al. showed that platelet integrin $\alpha_6\beta_1$ directly interacts with colorectal MC-38 and breast cancer AT3 cell ADAM9. Platelet integrin $\alpha_6\beta_1$ -tumor cell ADAM9-dependent interactions lead to platelet activation, granule secretion and the promotion of cancer cell extravasation in the lungs [54].

4.2. Selectins and mucins

P-selectin, expressed on the surface of activated platelets, is known to mediate the binding of platelets with various human and mouse

cancer cell lines, including colorectal, lung, breast, gastric carcinomas and melanomas. Increasing evidence indicates that P-selectin plays an important role in tumor growth and metastasis. P-selectin deficiency abolished platelet infiltration into solid tumors, decreased the secretion of angiogenic factors such as VEGF, and decreased the number of platelet-cancer cell aggregates in the bloodstream, leading to reduced tumor growth and lung-homing metastasis *in vivo* [55,56]. In addition, organ-specific tumor metastasis seems to be controlled by platelets and P-selectin independent of natural killer cells or other immune modulatory cells [57].

Podoplanin (PDPN) is up-regulated in various types of cancer, including colorectal, bladder and lung carcinomas. Podoplanin-CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2)-dependent platelet-cancer cell interactions lead to platelet activation, resulting in an increase in tumor growth and metastasis [58–62]. Recently, several monoclonal antibodies that block PDPN-CLEC-2 interactions have been developed, and they inhibit platelet-induced tumor growth, metastasis and tumor emboli formation *in vitro* and *in vivo* [63–65].

These adhesive proteins have sequential roles during tumor cell arrest on the vessel wall and the process of extravasation. The arrest of platelet-cancer cell aggregates on the vessel wall is a dynamic process but can also be due to microvasculature embolization and physical arrest [66]. The rolling and tethering of platelet-cancer cell aggregates to the endothelium is first mediated by P-selectin [67]. Then, platelet adhesives proteins GP1b α , $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin and VWF participate in the firm adhesion of cancer cells to the endothelium [68]. In addition, some cancer cells can express several platelet receptors, such as $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, $\alpha v\beta_3$ integrin and GP1ba, that contribute to their interaction with leukocytes, platelets and endothelial cells and promote extravasation [69,70].

5. Platelet chemokines and immunosuppression in tumor growth, angiogenesis and metastasis

Platelet chemokines seem to play crucial roles in immunosuppression and cancer progression. The role of platelet factor-4 (PF4), or chemokine CXCL4, in the inhibition of angiogenesis has been highlighted since the early 1990s. PF4/CXCL4 is an angiostatic chemokine stored in platelet alpha granules and released upon platelet activation. Using chicken chorioallantoic membrane assays, Maione et al. demonstrated that recombinant PF4 inhibits blood vessel proliferation in a dose-dependent manner [71]. Subsequently, in 2004, Struyf and collaborators isolated from thrombin-activated platelets a new, nonallelic variant of PF4/CXCL4, PF4_{var}/CXCL4L1. Although these two secreted variants differ in only three amino acids, PF4_{var}/CXCL4L1 seems to be a more potent inhibitor of angiogenesis than PF4/CXCL4 and other angiostatic chemokines [72]. Furthermore, PF4_{var}/CXCL4L1 more efficiently inhibited tumor growth and metastasis in animal models of melanoma and lung carcinomas than PF4/CXCL4 or other angiostatic chemokines, such as interferon gamma (IFN_{gamma}), by inhibiting angiogenesis [73,74].

TGF- β is a growth factor and a powerful immunosuppressive chemokine. Platelets represent the major source of TGF- β in the bloodstream [10]. In addition to its role in the promotion of cancer cell proliferation and invasiveness, TGF- β can modulate the activity of several immune cells in the tumor microenvironment. However, direct evidence of platelet-derived TGF- β effects on tumor microenvironment immunomodulation has not yet been demonstrated. Only a few studies have shown the role of platelet-derived TGF- β in immunomodulation, including down-regulation of the NKG2D receptor and inhibition of the anti-tumor reactivity of NK cells [48]. However, numerous studies have demonstrated the role of TGF- β in tumor microenvironment immunosuppression (reviewed in [75]). Tumor-associated macrophages have a phenotype and a function similar to those of M2 macrophages. TAMs are associated with weak anti-tumor activity and promote tumor cell proliferation [76,77]. A TGF- β blockade significantly reduces

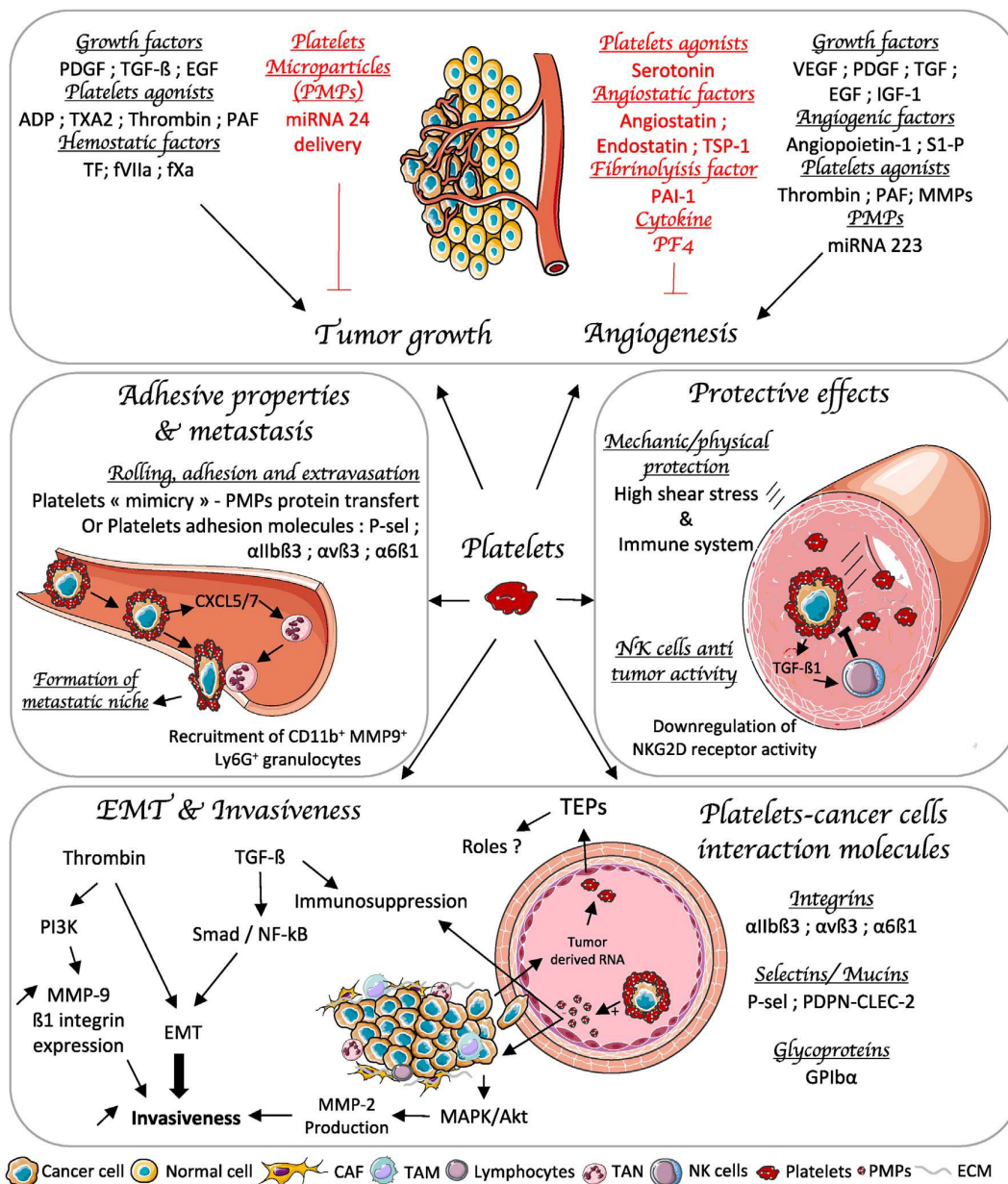


Fig. 1. Effects of platelets and PMPs on cancer progression. Platelets are involved in each step of cancer progression. Firstly, platelets express a lot of adhesion molecules allowing them to interact with cancer cells in the bloodstream (bottom right). These interactions lead to platelet activation and the release of active biomolecules such as growth and angiogenic factors which participate to tumor growth and angiogenesis (top). Secondly, the formation of intravascular platelet-tumor cell microthrombi confer to cancer cells adhesive properties to interact with the endothelium, a process involved in the extravasation. The recruitment of granulocytes by platelets derived chemokine CXCL5/7 is critical for the formation of metastatic niches (middle left). Thirdly, the aggregation of platelets around tumor cells provides a physical barrier to protect cancer cells against high shear stress and immune system surveillance. The release of platelet-derived TGF-β following platelet activation down-regulates the activating immunoreceptor NKG2D on NK cells, impairing their anti-tumor activity (middle right). Fourthly, platelet activation lead to platelets microparticles (PMPs) generation, thrombin and TGF-β release participating to the induction of epithelial to mesenchymal transition and enhancing the invasiveness of cancer cells in tumor microenvironment (bottom left). Lastly, via the uptake of circulating tumor derived RNA, platelets can also be “educated” by tumors (Tumor educated platelets TEPs) and represent a promising tool for cancer diagnostic. However, the roles of TEPs in cancer progression remain to be elucidated. This figure was obtained using Servier medical art. <http://smart.servier.com/>.

tumor growth through many mechanisms, including the recruitment and activation of CD8⁺ T lymphocytes, macrophages, neutrophils and NK cells [21,78–83].

During the dissemination of cancer cells through the blood, platelets actively participate in the survival of cancer cells and their arrest on the vessel walls. Additionally, Labelle and collaborators demonstrated in the lungs of mice that platelet-derived chemokines CXCL5/7 released by intravascular platelet-tumor cell microthrombi recruit

CD11b⁺MMP9⁺LY6G⁺ granulocyte cells to form early metastatic niches. Granulocyte recruitment and metastatic seeding were impeded by inhibiting CXCR2 (the CXL5/7 receptor on granulocytes), indicating that the recruitment of granulocytes by platelets is critical for the formation of metastatic niches [84].

6. Platelet microparticles (PMPs)

Platelet microparticles are constantly released by platelets and megakaryocytes. Platelet microparticles (PMPs) represent 70 to 90% of plasma-born MPs [85]. Elevated levels of PMPs are observed in several cancer types, including oral, lung, gastric, ovarian, colon and breast cancers, and are correlated with aggressive tumors and poor clinical outcomes [86–92]. In addition, elevation of the levels of these circulating MPs is related to the enhancement of the pro-coagulant state in cancer patients [86,90–92]. Cancer cells can activate platelets through many mechanisms that lead to platelet shape changes, degranulation and the generation of PMPs. PMPs, such as platelets, contain a plethora of active biomolecules that contribute to cancer progression and cancer-associated thrombosis [85,93,94].

PMPs express several adhesive proteins on their surface, including integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and P-selectin, and may also contain bioactive lipids, including sphingosine 1 phosphate (S1P) and arachidonic acids (AA). Interactions of PMPs with target cells can induce some biological responses, such as the activation of platelets, endothelial cells and leukocytes [95,96]. PMPs also have the ability to stimulate the proliferation, survival, adhesion and chemotaxis of hematopoietic cells [97]. Kim and collaborators were the first team to demonstrate the roles of PMPs in angiogenesis. *In vitro* treatment of endothelial cells with PMPs increased proliferation, chemotactic migration, and the formation of the capillary-like tubes of HUVECs through protein- and lipid growth factor-dependent mechanisms based on VEGF, FGF-2 and S1P, respectively. Endothelial cell-dependent stimulation of PMPs was reversed by the inhibition of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and Gi proteins [98]. Additionally, Brill and colleagues reported a few years later that direct *in vivo* injection of PMPs into the myocardium of rats induced angiogenesis and stimulated post-ischemic revascularization. Growth factors such as VEGF, bFGF, and PDGF and signaling pathways mediated by PI3K, Src and ERK were involved in the angiogenesis mediated by PMPs. In the case of cancer, the Janowska's team demonstrated that PMPs increased angiogenesis, invasiveness and metastasis in lung and breast cancers [99,100]. In lung cancer cell lines, PMPs stimulated mRNA expression of angiogenic factors such as VEGF, MMP-9, interleukine-8 (IL-8), HGF and enhanced the adhesion of cancer cells to fibrinogen and endothelial cell HUVECs. Moreover, *in vitro* treatment with PMPs was responsible for the enhancement of proliferation and chemotactic migration in the lung cancer cell lines. Furthermore, they found that PMPs can transfer platelet-derived CD41 (αIIb integrin) in the six lung cancer cell lines tested [99]. Platelet receptor expression by cancer cells, also called “platelet mimicry”, is known to enhance their metastatic potential with an increased ability to adhere to endothelial cells [99,100]. In several breast and lung cancer cell lines, *in vitro* PMP treatment induced the activation of mitogen-activated protein kinase p42/44 (MAPK) and AKT signaling pathways, resulting in the enhanced expression and secretion of membrane type-1 MMP, which is involved in invasion behavior. Intravenous injection of PMP-coated cancer cells showed an increased number of metastatic lung foci in comparison to untreated cells [99]. PMPs have also been shown to promote the invasiveness of prostate cancer cells via the up-regulation of MMP-2 production [101].

In addition, PMPs can also transfer nucleic acids into cancer cells. Liang et al. demonstrated that the delivery of microRNA-223 into lung cancer cells by PMPs promoted the invasiveness of the cancer cells via the targeting of tumor suppressor EPB41L3 (erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3) [102]. In that study, they showed that platelets and PMP- miR-223 levels were significantly higher in patients with non-small-cell lung carcinomas in comparison to healthy subjects. MicroRNA-223 is the most abundant miRNA in platelets and PMPs and seems to be up-regulated in several types of cancer [103,104]. It is considered part of the growing family of tumor-promoting miRNAs, also called oncomiR. In contrast, a recent study demonstrated that PMPs can infiltrate solid tumors and transfer miRNAs that suppress

tumor growth. PMPs can interact with and be internalized by cancer cells, where they deliver mainly miR-24. PMP-treated cells show mitochondrial dysfunction, growth inhibition and *in vivo* apoptotic features mediated by PMP-derived miR-24 [12]. Depending on the context, PMPs can have pro- or anti-tumor activity.

PMPs can also act indirectly on tumor progression by their ability to modulate immune cell activity. On one hand, PMPs seem to induce differentiation of resident macrophages toward becoming M2 macrophages, which have pro-tumorigenic functions [105]. On the other hand, Sprague and collaborators studied the role of PMPs in the modulation of adaptive immunity and demonstrated the communication between PMPs and B cells through the delivery of CD154 (CD40L), which stimulates antigen-specific IgG and triggers the adaptive immune response [106].

7. Conclusion

A real crosstalk exists between platelets and cancer during cancer progression. On one hand, cancer cells release numerous platelet agonists, including ADP, thrombin and thromboxane. In addition, cancer cells, through their oncogenic transformation, have the ability to constantly produce MPs, which are released in the bloodstream and (i) participate in platelet activation and RNA profile changes and (ii) contribute to the pro-thrombotic states in cancer patients. On the other hand, platelet activation leads to the release of the active biomolecule content on their granules that all participate in cancer progression. Platelets contain a plethora of growth and angiogenic factors that all contribute to tumor growth and angiogenesis. Moreover, platelet aggregation around tumor cells (TCIPA) gives numerous advantages to the cancer cells: immune surveillance escape, shear stress protection, pro-survival signals, adhesion to the endothelium and extravasation (Fig. 1). Activation of platelets seems to be critical for tumor growth and successful metastatic outbreak. Based on these observations, many studies should specifically target the activation of platelets, adhesive proteins responsible for cancer cell-platelet interactions and alpha granule contents to reduce tumor progression (reviewed in [3]).

Statement of conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] E. Lefrançois, G. Ortiz-Muñoz, A. Caudrillier, B. Mallavia, F. Liu, D.M. Sayah, E.E. Thornton, M.B. Headley, T. David, S.R. Coughlin, M.F. Krummel, A.D. Leavitt, E. Passegué, M.R. Looney, The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors, *Nature* 544 (2017) 105–109, <http://dx.doi.org/10.1038/nature21706>.
- [2] A. Varki, Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms, *Blood* 110 (2007) 1723–1729, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-10-053736>.
- [3] S. Mezouar, C. Frère, R. Darbousset, D. Mege, L. Crescence, F. Dignat-George, L. Panicot-Dubois, C. Dubois, Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: experimental and clinical evidences, *Thromb. Res.* 139 (2016) 65–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2016.01.006>.
- [4] D.C. Calverley, T.L. Phang, Q.G. Choudhury, B. Gao, A.B. Oton, M.J. Weyant, M.W. Geraci, Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer, *Clin. Transl. Sci.* 3 (2010) 227–232.
- [5] R.J.A. Nilsson, L. Balaj, E. Hulleman, S. van Rijn, D.M. Pegtel, M. Walraven, A. Widmark, W.R. Gerritsen, H.M. Verheul, W.P. Vandertop, D.P. Noske, J. Skog, T. Würdinger, Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers, *Blood* 118 (2011) 3680–3683, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-03-344408>.
- [6] M.G. Best, N. Sol, I. Kooi, J. Tannous, B.A. Westerman, F. Rustenburg, P. Schellen, H. Verschuuren, E. Post, J. Koster, B. Ylstra, N. Ameziane, J. Dorsman, E.F. Smit, H.M. Verheul, D.P. Noske, J.C. Reijneveld, R.J.A. Nilsson, B.A. Tannous, P. Wesseling, T. Würdinger, RNA-Seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics, *Cancer Cell* 28 (2015) 666–676, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.018>.
- [7] G.J. Gasic, T.B. Gasic, C.C. Stewart, Antimetastatic effects associated with platelet reduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 61 (1968) 46–52.
- [8] S. Karpatkin, E. Pearlstein, Role of platelets in tumor cell metastases, *Ann. Intern. Med.* 95 (1981) 636–641.
- [9] K. Egan, D. Crowley, P. Smyth, S. O'Toole, C. Spillane, C. Martin, M. Gallagher,

- A. Canney, L. Norris, N. Conlon, L. McEvoy, B. Ffrench, B. Stordal, H. Keegan, S. Finn, V. McEneaney, A. Laios, J. Ducr e, E. Dunne, L. Smith, M. Berndt, O. Sheils, D. Kenny, J. O'Leary, Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells, *PLoS One* 6 (2011) e26125, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026125>.
- [10] M. Labelle, S. Begum, R.O. Hynes, Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis, *Cancer Cell* 20 (2011) 576–590, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.009>.
- [11] Y. Wang, H. Zhang, Platelet-induced inhibition of tumor cell growth, *Thromb. Res.* 123 (2008) 324–330, <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2008.06.021>.
- [12] J.V. Michael, J.G.T. Wurtzel, G.F. Mao, A.K. Rao, M.A. Kolpakov, A. Sabri, N.E. Hoffman, S. Rajan, D. Tomar, M. Madesh, M.T. Nieman, J. Yu, L.C. Edelstein, J.W. Rowley, A.S. Weyrich, L.E. Goldfinger, Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth, *Blood* 130 (2017) 567–580, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-11-751099>.
- [13] J.F. Di Stefano, M. Kirchner, K. Dagenhardt, N. Hagag, Activation of cancer cell proteases and cytotoxicity by EGF and PDGF growth factors, *Am J Med Sci* 300 (1990) 9–15.
- [14] S. Ariad, L. Seymour, W.R. Bezwoda, Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate of progression, *Breast Cancer Res. Treat.* 20 (1991) 11–17.
- [15] Y. Nakamura, F. Tanaka, Y. Yoshikawa, K. Mimori, H. Inoue, K. Yanaga, M. Mori, PDGF-BB is a novel prognostic factor in colorectal cancer, *Ann. Surg. Oncol.* 15 (2008) 2129–2136, <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-008-9943-9>.
- [16] D. George, Targeting PDGF receptors in cancer—rationales and proof of concept clinical trials, *Adv. Exp. Med. Biol.* 532 (2003) 141–151.
- [17] J. Folkman, Proceedings: tumor angiogenesis factor, *Cancer Res.* 34 (1974) 2109–2113.
- [18] S. Sabrkhany, A.W. Griffioen, M.G.A. oude Egbrink, The role of blood platelets in tumor angiogenesis, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1815 (2011) 189–196, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.12.001>.
- [19] R. Li, M. Ren, N. Chen, M. Luo, X. Deng, J. Xia, G. Yu, J. Liu, B. He, X. Zhang, Z. Zhang, X. Zhang, B. Ran, J. Wu, Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis, *BMC Cancer* 14 (2014) 167, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-14-167>.
- [20] J. Zhang, P.L. Yang, N.S. Gray, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009) 28–39, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2559>.
- [21] B. Bierie, H.L. Moses, Tumour microenvironment, TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer, *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 506–520, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1926>.
- [22] M. Oft, K.H. Heider, H. Beug, TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis, *Curr. Biol.* 8 (1998) 1243–1252.
- [23] M.S. Cho, J. Bottsford-Miller, H.G. Vasquez, R. Stone, B. Zand, M.H. Kroll, A.K. Sood, V. Afshar-Kharghan, Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells, *Blood* 120 (2012) 4869–4872, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-06-438598>.
- [24] D. Padua, X.H.-F. Zhang, Q. Wang, C. Nadal, W.L. Gerald, R.R. Gomis, J. Massagu , TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4, *Cell* 133 (2008) 66–77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.046>.
- [25] S. Biswas, M. Guix, C. Rinehart, T.C. Dugger, A. Chytil, H.L. Moses, M.L. Freeman, C.L. Arteaga, Inhibition of TGF-β with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1305–1313, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI30740>.
- [26] H. Boukerche, O. Berthier-Vergnes, F. Penin, E. Tabone, G. Lizard, M. Bailly, J.L. McGregor, Human melanoma cell lines differ in their capacity to release ADP and aggregate platelets, *Br. J. Haematol.* 87 (1994) 763–772.
- [27] E. Heinmöller, R.J. Weinel, H.H. Heidtmann, U. Salge, R. Seitz, I. Schmitz, K.M. M ller, H. Zirngibl, Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122 (1996) 735–744, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01209121>.
- [28] X. de Leval, V. Benoit, J. Delarge, F. Jul mont, B. Masereel, B. Pirotte, M.P. Merville, J.L. David, J.M. Dogn , Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (II/II). Effects of BM-567 on osteogenic sarcoma-cell-induced platelet aggregation, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 68 (2003) 55–59.
- [29] M.S. Cho, K. Noh, M. Haemmerle, D. Li, H. Park, Q. Hu, T. Hisamatsu, T. Mitamura, S.L.C. Mak, S. Kunaipuli, Q. Ma, A.K. Sood, V. Afshar-Kharghan, Role of ADP receptors on platelets in the growth of ovarian cancer, *Blood* 130 (2017) 1235–1242, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2017-02-769893>.
- [30] S. Mezouar, R. Darbousset, F. Dignat-George, L. Panicot-Dubois, C. Dubois, Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo, *Int. J. Cancer* 136 (2015) 462–475, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28997>.
- [31] S. Gebremeskel, T. LeVatte, R.S. Liwski, B. Johnston, M. Bezuhly, The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer, *Int. J. Cancer* 136 (2015) 234–240, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28947>.
- [32] D. Schumacher, B. Strilic, K.K. Sivaraj, N. Wettschureck, S. Offermanns, Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor, *Cancer Cell* 24 (2013) 130–137, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.008>.
- [33] H. Sakai, T. Suzuki, Y. Takahashi, M. Ukai, K. Tauchi, T. Fujii, N. Horikawa, T. Minamimura, Y. Tabuchi, M. Morii, K. Tsukada, N. Takeguchi, Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A2, *FEBS Lett.* 580 (2006) 3368–3374, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.007>.
- [34] M.-C. Cathcart, K. Gately, R. Cummins, E. Kay, K.J. O'Byrne, G.P. Pidgeon, Examination of thromboxane synthase as a prognostic factor and therapeutic target in non-small cell lung cancer, *Mol. Cancer* 10 (2011) 25, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-10-25>.
- [35] L. Hu, J.M. Roth, P. Brooks, J. Luty, S. Karpatkin, Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis, *Cancer Res.* 68 (2008) 4666–4673, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6276>.
- [36] E.T. Alexander, A.R. Minton, C.S. Hayes, A. Goss, J.V. Ryn, S.K. Gilmour, Thrombin inhibition and cyclophosphamide synergistically block tumor progression and metastasis, *Cancer Biol. Ther.* 16 (2015) 1802–1811, <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2015.1078025>.
- [37] A.R. Radjabi, K. Sawada, S. Jagadeeswaran, A. Eichbichler, H.A. Kenny, A. Montag, K. Bruno, E. Lengyel, Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 2822–2834, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M704855200>.
- [38] Y.-C. Zhong, T. Zhang, W. Di, W.-P. Li, Thrombin promotes epithelial ovarian cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition, *J. Gynecol. Oncol.* 24 (2013) 265–272, <http://dx.doi.org/10.3802/jgo.2013.24.3.265>.
- [39] K. Asanuma, H. Wakabayashi, T. Okamoto, Y. Asanuma, N. Akita, T. Yoshikawa, T. Hayashi, A. Matsumine, A. Uchida, A. Sudo, The thrombin inhibitor, argatroban, inhibits breast cancer metastasis to bone, *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 20 (2011) 241–246, <http://dx.doi.org/10.1007/s12282-012-0334-5>.
- [40] Y. Liu, P. Jiang, K. Capkova, D. Xue, L. Ye, S.C. Sinha, N. Mackman, K.D. Janda, C. Liu, Tissue factor-activated coagulation cascade in the tumor microenvironment is critical for tumor progression and an effective target for therapy, *Cancer Res.* 71 (2011) 6492–6502, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1145>.
- [41] W. Ruf, N. Yokota, F. Schaffner, Tissue factor in cancer progression and angiogenesis, *Thromb. Res.* 125 (2010) S36–S38, [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(10\)70010-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70010-4).
- [42] H.-M. Ko, H.H. Jung, K.H. Seo, Y.-R. Kang, H.-A. Kim, S.J. Park, H.-K. Lee, S.-Y. Im, Platelet-activating factor-induced NF-kappaB activation enhances VEGF expression through a decrease in p53 activity, *FEBS Lett.* 580 (2006) 3006–3012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.042>.
- [43] L. Sun, Z. He, J. Ke, S. Li, X. Wu, L. Lian, X. He, X. He, J. Hu, Y. Zou, X. Wu, P. Lan, PAF receptor antagonist Ginkgolide B inhibits tumorigenesis and angiogenesis in colitis-associated cancer, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 432–440.
- [44] B. Bussolati, L. Biancone, P. Cassoni, S. Russo, M. Rola-Pleszczynski, G. Montrucchio, G. Camussi, PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 1713–1725, [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64808-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64808-0).
- [45] F. Bussolino, M. Arese, G. Montrucchio, L. Barra, L. Primo, R. Benelli, F. Sanavio, M. Aglietta, D. Ghigo, M.R. Rola-Pleszczynski, Platelet activating factor produced in vitro by Kaposi's sarcoma cells induces and sustains in vivo angiogenesis, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 940–952, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118142>.
- [46] E.G. Robert, J.D. Hunt, Lipid messengers as targets for antiangiogenic therapy, *Curr. Pharm. Des.* 7 (2001) 1615–1626.
- [47] J.S. Palumbo, K.E. Talmage, J.V. Massari, C.M.L. Jeunesse, M.J. Flick, K.W. Kombrinck, M. Jirouskova, J.L. Degen, Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells, *Blood* 105 (2005) 178–185, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-06-2272>.
- [48] H.-G. Kopp, T. Placke, H.R. Salih, Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity, *Cancer Res.* 69 (2009) 7775–7783, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2123>.
- [49] K. Egan, N. Cooke, D. Kenny, Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage, *Clin. Exp. Metastasis* 31 (2014) 697–704, <http://dx.doi.org/10.1007/s10585-014-9660-7>.
- [50] S. Karpatkin, E. Pearlstein, C. Ambrogio, B.S. Collier, Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo, *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 1012–1019, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI113411>.
- [51] O. Engebraaten, M. Trikha, S. Juell, S. Garman-Vik, Ø. Fodstad, Inhibition of in vivo tumour growth by the blocking of host alpha(v)beta3 and alphaII(b)beta3 integrins, *Anticancer Res.* 29 (2009) 131–137.
- [52] M.R. Weber, M. Zuka, M. Lorgner, M. Tschan, B.E. Torbett, A. Zijlstra, J.P. Quigley, K. Staffin, B.P. Eliceiri, J.S. Krueger, P. Marchese, Z.M. Ruggeri, B.H. Felding, Activated tumor cell integrin alphaVbeta3 cooperates with platelets to promote extravasation and metastasis from the blood stream, *Thromb. Res.* 140 (Suppl. 1) (2016) S27–36, [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30095-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30095-0).
- [53] B. Felding-Habermann, T.E. O'Toole, J.W. Smith, E. Fransvea, Z.M. Ruggeri, M.H. Ginsberg, P.E. Hughes, N. Pampori, S.J. Shattil, A. Saven, B.M. Mueller, Integrin activation controls metastasis in human breast cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 1853–1858, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.98.4.1853>.
- [54] E. Mammadova-Bach, P. Zigrino, C. Brucker, C. Bourdon, M. Freund, A. De Arcangelis, S.I. Abrams, G. Orend, C. Gachet, P.H. Mangin, Platelet integrin alpha6beta1 controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9, *JCI Insight* 1 (2016) e88245, <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.88245>.
- [55] Y.J. Kim, L. Borsig, N.M. Varki, A. Varki, P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 9325–9330.
- [56] C. Qi, B. Wei, W. Zhou, Y. Geng, L. Wang, C. Qi, B. Wei, W. Zhou, Y. Yang, B. Li, S. Guo, J. Li, J. Ye, J. Li, Q. Zhang, T. Lan, X. He, L. Cao, J. Zhou, J. Geng, L. Wang, C. Qi, B. Wei, W. Zhou, Y. Yang, B. Li, S. Guo, J. Li, J. Ye, J. Li, Q. Zhang, T. Lan, X. He, L. Cao, J. Zhou, J. Geng, L. Wang, P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth, *Oncotarget* 6

- (2015) 6584–6596, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3164>.
- [57] L.A. Coupland, B.H. Chong, C.R. Parish, Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells, *Cancer Res.* 72 (2012) 4662–4671, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4010>.
- [58] N. Fujita, S. Takagi, The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis, *J. Biochem. (Tokyo)* 152 (2012) 407–413, <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvs108>.
- [59] Y. Kato, M. Kaneko, M. Sata, N. Fujita, T. Tsuruo, M. Osawa, Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/Podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma, *Tumor Biol.* 26 (2005) 195–200, <http://dx.doi.org/10.1159/000086952>.
- [60] S. Takagi, T. Oh-hara, S. Sato, B. Gong, M. Takami, N. Fujita, Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis, *Int. J. Cancer* 134 (2014) 2605–2614, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28602>.
- [61] Y. Kato, N. Fujita, A. Kunita, S. Sato, M. Kaneko, M. Osawa, T. Tsuruo, Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 51599–51605, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M309935200>.
- [62] S. Takagi, S. Sato, T. Oh-hara, M. Takami, S. Koike, Y. Mishima, K. Hatake, N. Fujita, Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between Aggrus/Podoplanin and CLEC-2, *PLoS One* 8 (2013) e73609, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073609>.
- [63] K. Miyata, S. Takagi, S. Sato, H. Morioka, K. Shiba, T. Minamisawa, M. Takami, N. Fujita, Suppression of Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and pulmonary metastasis by a single-chain antibody variable region fragment, *Cancer Med.* 3 (2014) 1595–1604, <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.320>.
- [64] Y. Nakazawa, S. Takagi, S. Sato, T. Oh-hara, S. Koike, M. Takami, H. Arai, N. Fujita, Prevention of hematogenous metastasis by neutralizing mice and its chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies, *Cancer Sci.* 102 (2011) 2051–2057, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02058.x>.
- [65] T. Sekiguchi, A. Takemoto, S. Takagi, K. Takatori, S. Sato, M. Takami, N. Fujita, Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis, *Oncotarget* 7 (2016) 3934–3946, <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6598>.
- [66] C.L. Chaffer, R.A. Weinberg, A perspective on cancer cell metastasis, *Science* 331 (2011) 1559–1564, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203543>.
- [67] H. Läubli, L. Borsig, Selectins as mediators of lung metastasis, *Cancer Microenviron.* 3 (2010) 97–105, <http://dx.doi.org/10.1007/s12307-010-0043-6>.
- [68] S.J. Shattil, C. Kim, M.H. Ginsberg, The final steps of integrin activation: the end game, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 288–300, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2871>.
- [69] J. Timár, J. Tóvári, E. Rásó, L. Mészáros, B. Bereczky, K. Lapis, Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance, *Oncology* 69 (2005) 185–201, <http://dx.doi.org/10.1159/000088069>.
- [70] J.S. Desgrosellier, D.A. Cheresh, Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 9–22, <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2748>.
- [71] T.E. Maione, G.S. Gray, J. Petro, A.J. Hunt, A.L. Donner, S.I. Bauer, H.F. Carson, R.J. Sharpe, Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides, *Science* 247 (1990) 77–79, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1688470>.
- [72] S. Struyf, M.D. Burdick, P. Proost, J.V. Damme, R.M. Strieter, Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet Factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis, *Circ. Res.* 95 (2004) 855–857, <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000146674.38319.07>.
- [73] S. Struyf, M.D. Burdick, E. Peeters, K.V. den Broeck, C. Dillen, P. Proost, J.V. Damme, R.M. Strieter, Platelet Factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis, *Cancer Res.* 67 (2007) 5940–5948, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4682>.
- [74] J. Vandercappellen, S. Liekens, A. Bronckaers, S. Noppen, I. Ronsse, C. Dillen, M. Belleri, S. Mitola, P. Proost, M. Presta, S. Struyf, J. Van Damme, The COOH-terminal peptide of platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var47-70) strongly inhibits angiogenesis and suppresses B16 melanoma growth in vivo, *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 322–334, <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0176>.
- [75] P. Papageorgis, T. Stylianopoulos, Role of TGFβ in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review), *Int. J. Oncol.* 46 (2015) 933–943, <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2015.2816>.
- [76] A. Mantovani, S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, A. Sica, Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, *Trends Immunol.* 23 (2002) 549–555, [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02302-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02302-5).
- [77] M.R. Dinapoli, C.L. Calderon, D.M. Lopez, The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 1323–1329.
- [78] Z.G. Fridlender, J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G.S. Worthen, S.M. Albelda, Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-β: “N1” versus “N2” TAN, *Cancer Cell* 16 (2009) 183–194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.06.017>.
- [79] R. Ge, V. Rajeev, P. Ray, E. Lattime, S. Rittling, S. Medicherla, A. Protter, A. Murphy, J. Chakravarty, S. Dugar, G. Schreiner, N. Barnard, M. Reiss, Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptor kinase in vivo, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 4315–4330, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0162>.
- [80] J.-S. Nam, M. Terabe, M. Mamura, M.-J. Kang, H. Chae, C. Stuelten, E. Kohn, B. Tang, H. Sabzevari, M.R. Anver, S. Lawrence, D. Danielpour, S. Lonning, J.A. Berzofsky, L.M. Wakefield, An anti-transforming growth factor β antibody suppresses metastasis via cooperative effects on multiple cell compartments, *Cancer Res.* 68 (2008) 3835–3843, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0215>.
- [81] P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, A. Mantovani, The yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance, *Immunol. Rev.* 222 (2008) 155–161, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x>.
- [82] G.T. Lee, J.H. Hong, C. Kwak, J. Woo, V. Liu, C. Lee, I.Y. Kim, Effect of dominant negative transforming growth factor-beta receptor type II on cytotoxic activity of RAW 264.7, a murine macrophage cell line, *Cancer Res.* 67 (2007) 6717–6724, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4263>.
- [83] L. Shen, J.M. Smith, Z. Shen, M. Eriksson, C. Sentman, C.R. Wira, Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-β1, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 155–161, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03376.x>.
- [84] M. Labelle, S. Begum, R.O. Hynes, Platelets guide the formation of early metastatic niches, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) E3053–3061, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1411082111>.
- [85] S. Mezouar, D. Mege, R. Darbousset, D. Farge, P. Deboureau, F. Dignat-George, L. Panicot-Dubois, C. Dubois, Involvement of platelet-derived microparticles in tumor progression and thrombosis, *Semin. Oncol.* 41 (2014) 346–358, <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.04.010>.
- [86] C. Yang, R. Ma, T. Jiang, M. Cao, L. Zhao, Y. Bi, J. Kou, J. Shi, X. Zou, Contributions of phosphatidylserine-positive platelets and leukocytes and microparticles to hypercoagulable state in gastric cancer patients, *Tumor Biol.* 37 (2016) 7881–7891, <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4667-5>.
- [87] A. Rank, S. Liebhardt, J. Zwimer, A. Burges, R. Nieuwland, B. Toth, Circulating microparticles in patients with benign and malignant ovarian tumors, *Anticancer Res.* 32 (2012) 2009–2014.
- [88] J.G. Ren, Q.W. Man, W. Zhang, C. Li, X.P. Xiong, J.Y. Zhu, W.M. Wang, Z.J. Sun, J. Jia, W.F. Zhang, Y.F. Zhao, G. Chen, B. Liu, Elevated level of circulating platelet-derived microparticles in oral cancer, *J. Dent. Res.* 95 (2016) 87–93, <http://dx.doi.org/10.1177/0022034515592593>.
- [89] C.-C. Tseng, C.-C. Wang, H.-C. Chang, T.-H. Tsai, L.-T. Chang, K.-T. Huang, S. Leu, C.-H. Yen, S.-F. Liu, C.-H. Chen, C.-T. Yang, H.-K. Yip, M.-C. Lin, Levels of circulating microparticles in lung cancer patients and possible prognostic value, *Dis. Markers* 35 (2013) 301–310, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/715472>.
- [90] L. Zhao, Y. Bi, J. Kou, J. Shi, D. Piao, Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35 (2016), <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-016-0328-9>.
- [91] B. Toth, S. Liebhardt, K. Steinig, N. Ditsch, A. Rank, I. Bauerfeind, M. Spannagl, K. Friese, A.J. Reininger, Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients, *Thromb. Haemost.* 100 (2008) 663–669.
- [92] K. Haubold, M. Rink, B. Spath, M. Friedrich, F.K.-H. Chung, G. Marx, A. Amirhosravi, J.L. Francis, C. Bokemeyer, B. Eifrig, F. Langer, Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate cancer, *Thromb. Haemost.* 101 (2009) 1147–1155.
- [93] F. van Doormaal, A. Kleinjan, R.J. Berckmans, N. Mackman, D. Manly, P.W. Kamphuisen, D.J. Richel, H.R. Büller, A. Sturk, R. Nieuwland, Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients, *Thromb. Haemost.* 108 (2012) 160–165, <http://dx.doi.org/10.1160/TH12-02-0099>.
- [94] E. Campello, L. Spiezia, C.M. Radu, C. Bulato, M. Castelli, S. Gavasso, P. Simioni, Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism, *Thromb. Res.* 127 (2011) 473–477, <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.01.002>.
- [95] O.P. Barry, D. Pratico, J.A. Lawson, G.A. FitzGerald, Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2118–2127, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI119385>.
- [96] S. Miyamoto, M.A. Kowalska, C. Marcinkiewicz, M.M. Marcinkiewicz, D. Mosser, L.H. Edmunds, S. Niewiarowski, Interaction of leukocytes with platelet microparticles derived from outdated platelet concentrates, *Thromb. Haemost.* 80 (1998) 982–988.
- [97] M. Baj-Krzyworzeka, M. Majka, D. Pratico, J. Ratajczak, G. Vilaire, J. Kijowski, R. Reza, A. Janowska-Wieczorek, M.Z. Ratajczak, Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells, *Exp. Hematol.* 30 (2002) 450–459.
- [98] H.K. Kim, K.S. Song, J.-H. Chung, K.R. Lee, S.-N. Lee, Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro, *Br. J. Haematol.* 124 (2004) 376–384.
- [99] A. Janowska-Wieczorek, M. Wyszczynski, J. Kijowski, L. Marquez-Curtis, B. Machalinski, J. Ratajczak, M.Z. Ratajczak, Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer, *Int. J. Cancer* 113 (2005) 752–760, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20657>.
- [100] A. Janowska-Wieczorek, L.A. Marquez-Curtis, M. Wyszczynski, M.Z. Ratajczak, Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells, *Transfusion (Paris)* 46 (2006) 1199–1209, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00871.x>.
- [101] O. Dashevsky, D. Varon, A. Brill, Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production, *Int. J. Cancer* 124 (2009) 1773–1777, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24016>.
- [102] H. Liang, X. Yan, Y. Pan, Y. Wang, N. Wang, L. Li, Y. Liu, X. Chen, C.-Y. Zhang, H. Gu, K. Zen, MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3, *Mol. Cancer* 14 (2015) 58, <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-015-0327-z>.
- [103] A. Laios, S. O'Toole, R. Flavin, C. Martin, L. Kelly, M. Ring, S.P. Finn, C. Barrett, M. Loda, N. Gleeson, T. D'Arcy, E. McGuinness, O. Sheils, B. Sheppard, J.O' Leary,

- Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer, *Mol. Cancer* 7 (2008) 35, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-7-35>.
- [104] X. Li, Y. Zhang, H. Zhang, X. Liu, T. Gong, M. Li, L. Sun, G. Ji, Y. Shi, Z. Han, S. Han, Y. Nie, X. Chen, Q. Zhao, J. Ding, K. Wu, F. Daiming, miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3, *Mol. Cancer Res.* 9 (2011) 824–833, <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0529>.
- [105] E.M. Vasina, S. Cauwenberghs, M.A.H. Feijge, J.W.M. Heemskerk, C. Weber, R.R. Koenen, Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e210, <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2011.94>.
- [106] D.L. Sprague, B.D. Elzey, S.A. Crist, T.J. Waldschmidt, R.J. Jensen, T.L. Ratliff, Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles, *Blood* 111 (2008) 5028–5036, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-097410>.

3. Les plaquettes, cellules effectrices de l'inflammation et de l'immunité.

Comme décrit précédemment, les plaquettes représentent les médiateurs principaux de l'hémostase et de la thrombose. Cependant, depuis plusieurs années, de nombreuses études suggèrent une participation active des plaquettes dans les processus d'inflammation et d'immunité que ce soit en conditions physiologiques ou pathologiques. En effet, de nombreuses études ont démontré une implication des plaquettes dans les processus inflammatoires de certaines pathologies telles que l'athérosclérose et les maladies infectieuses. Les plaquettes ont la capacité d'interagir avec les cellules endothéliales et les leucocytes par des mécanismes directs d'interaction, mais également à distance, par le biais de molécules inflammatoires sécrétées dans la circulation ⁴¹. L'interaction des plaquettes avec les cellules de l'inflammation peut avoir pour conséquence l'induction d'un programme pro-inflammatoire limitant ainsi l'évolution de l'infection. Par exemple, lors d'une blessure superficielle, l'exposition aux pathogènes et leur invasion sont limitées d'une part par les fonctions hémostatiques des plaquettes, et d'autre part par leur fonction immune et inflammatoire. Cependant, une interaction prolongée ou chronique entre les plaquettes et les cellules inflammatoires peut conduire à une stimulation excessive du processus inflammatoire et immunitaire et ainsi être délétère pour l'organisme ⁴².

Dans le cas du cancer et notamment des métastases, comme cela a été abordé dans la revue n°2, les plaquettes semblent moduler le système immunitaire de façon à favoriser la dissémination métastatique, avec d'une part un effet immunosuppresseur sur les cellules NK dans la circulation sanguine assurant la survie des cellules tumorales circulantes ⁴³, et d'autre part la sécrétion de chémokines attirant une population de granulocytes CD11b⁺ MMP9⁺ Ly6G⁺ permettant la formation précoce de niches métastatiques ⁴⁴. Cependant, le rôle des plaquettes dans la modulation du système immunitaire au sein même du microenvironnement tumoral n'a jamais été étudié. Le microenvironnement tumoral est composé de différents types cellulaires incluant des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules adipeuses, des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires tels que des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes T ⁴⁵.

Au cours de la progression tumorale, les monocytes circulants et les macrophages sont massivement recrutés dans la tumeur primaire et représentent la sous-population immunitaire la plus abondante au sein du microenvironnement tumoral ⁴⁶. L'impact des macrophages sur la biologie de la tumeur est largement dépendant des signaux délivrés par le microenvironnement

tumoral ⁴⁶. Du fait de la présence des plaquettes dans le microenvironnement tumoral ⁴⁷⁻⁴⁹ et de leurs capacités à attirer et activer les cellules immunitaires tels que les monocytes et macrophages ^{50,51}, il semble légitime de penser que les plaquettes sont impliquées dans la modulation immunitaire du microenvironnement tumoral.

Dans cette partie nous aborderons donc plusieurs concepts selon l'ordre suivant : le rôle des plaquettes dans l'inflammation et la réponse immunitaire innée, le rôle des plaquettes dans la réponse immunitaire adaptative, et enfin le rôle des monocytes et macrophages intratumoraux sur la biologie de la tumeur.

3.1 Plaquettes, inflammation et réponse immunitaire innée

3.1.1 Induction de la réponse de phase aigüe

La réponse de phase aiguë (RPA) correspond à la réponse précoce de l'organisme à une infection ou une lésion vasculaire. Les travaux de Morrell et collaborateurs ont démontré que les plaquettes sont capables d'initier la réponse de phase aiguë ⁵². En effet, dans un modèle murin de malaria cérébrale, les auteurs ont montré que les plaquettes sont activées très précocement au cours de l'infection puis rapidement recrutées dans le foie (dans les 24h post infection). Elles initient alors la RPA en sécrétant de l'Il-1 β . L'initiation de la RPA médiée par les plaquettes limite le développement du pathogène (diminution de la parasitémie) et la mort des animaux due à l'infection et est donc protectrice. L'activation de la réponse de phase aiguë est dépendante de la sécrétion locale d'inducteurs comme par exemple l'Il-6, l'Il-8 et l'Il-1 β .

Les plaquettes représentent une source majeure d'Il-1 β ⁵². De manière surprenante, l'Il-1 β n'est pas stockée dans les granules des plaquettes, elle est produite lors de la stimulation des plaquettes à partir de pré-ARN messagers polysomiaux ⁵³. Les plaquettes expriment des récepteurs de reconnaissance des pathogènes conservés au cours de l'évolution, les Toll Like Receptors (TLRs) dont le TLR2 et le TLR4. L'induction du signaling TLR4 via le LPS au sein de la plaquette induit l'activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPK conduisant à la production d'Il-6, de COX-2 et de PGE₂ ⁵⁴. La liaison du LPS au TLR4 à la surface plaquettaire augmente également leur adhésion via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et induit l'épissage, la traduction et le relargage d'Il-1 β ⁵⁵. Mécanistiquement, le pré-ARNm est épissé puis traduit en pro-Il-1 β dont le clivage en Il-1 β active est dépendant de la caspase-1 ⁵⁵. La libération d'Il-1 β ne semble pas

suivre la cinétique d'activation classiquement décrite, puisqu'elle n'est pas associée à une dégranulation rapide des plaquettes, comme en témoigne l'expression de la P-sélectine, mais nécessite plusieurs heures^{55,56}. Ces observations suggèrent que les plaquettes sont capables de distinguer leurs rôles dans l'hémostase de leurs rôles dans l'immunité et d'y répondre différemment. Depuis, de nombreuses autres protéines initialement absentes des plaquettes au repos ont été décrites pour être synthétisées *de novo* suite à l'activation plaquettaire⁵⁷.

3.1.2 Interaction entre les plaquettes et les cellules endothéliales et recrutement des cellules de l'immunité innée

L'interaction entre les plaquettes et les cellules endothéliales est un processus très important pour induire le recrutement des cellules de l'immunité innée telles que les neutrophiles et les monocytes. En conditions non inflammatoires, les cellules endothéliales inhibent l'adhésion des plaquettes en sécrétant différents médiateurs incluant des diphosphohydrolases, responsables de la dégradation de l'ADP, des aminooxidasases permettant la désactivation des vasoconstricteurs locaux, le monoxyde d'azote (NO) maintenant un tonus vasculaire normal et des prostacyclines inhibant l'adhésion et l'activation des plaquettes en abaissant leur taux de GMPc intracellulaire⁵⁸. L'activation des

cellules endothéliales induit une régulation négative de ces mécanismes protecteurs, permettant l'adhésion et l'activation des plaquettes (**Figure 12**)⁵⁹. L'interaction suivie de l'activation des plaquettes avec l'endothélium activé fournit rapidement une grande surface riche en P-sélectine, ligand principal du PSGL-1 exprimé à la surface des leucocytes. De plus, l'activation des plaquettes dépendante de

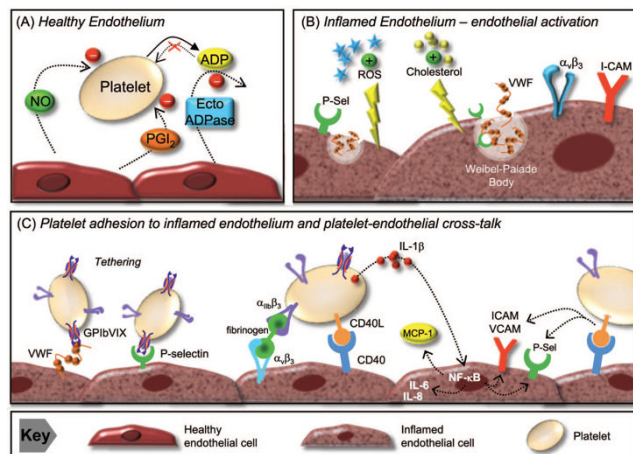


Figure 12 : Dialogue entre les plaquettes et l'endothélium quiescent (A) et activé (B et C).
(D'après Zane S Kaplan et al. Hematology 2011).

l'interaction avec les cellules endothéliales activées, induit la libération de médiateurs solubles de l'inflammation contenus dans les granules plaquettaires participant ainsi à l'activation locale des cellules endothéliales et au recrutement des cellules inflammatoires (**Figure 13**).

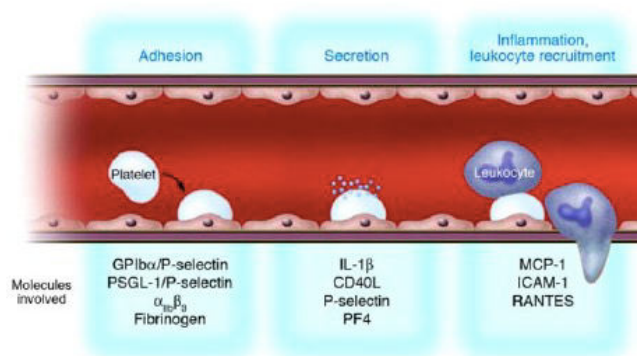


Figure 13 : Mécanismes moléculaires du recrutement des leucocytes dépendant de l'interaction entre les plaquettes et l'endothélium activé. (Adapté de Price Blair and Flaumenhaft Blood 2009)

Les granules alpha plaquettaire sont riches en molécules pro-inflammatoires telles que des chémokines et des cytokines. En effet, un nombre important de chémokines est retrouvé au sein des granules alpha dont CXCL1 (GRO-a), CXCL4 (PF-4), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (clivée en PBP, β -TG, CTAP_III, NAP-2), CXCL8 (IL-8), CXCL12 (SDF1-a), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1a) et CCL5 (RANTES)⁶⁰. Parmi celles-ci, les chémokines CXCL4 et CXCL7 sont les plus abondantes⁶¹. La chémokine CXCL4 participe à l'adhésion et la dégranulation des neutrophiles, à l'activation des monocytes et à leur différenciation en macrophages et cellules spumeuses⁶²⁻⁶⁴. En coordination avec CCL5 (RANTES), CXCL4 induit également le recrutement et l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales⁶⁵.

La sécrétion locale d'IL-1 β par les plaquettes stimule les cellules endothéliales, induisant d'une part la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 et augmentant d'autre part l'expression membranaire d'ICAM-1, $\alpha_v\beta_3$ et de MCP-1 à la surface endothéliale⁶⁶⁻⁶⁸. La surexpression d'ICAM-1 et de MCP-1 en réponse à l'IL-1 β est dépendante de l'activation de NF- κ B⁶⁹. A travers ces mécanismes, les plaquettes sont donc capables d'augmenter l'adhésion des monocytes et des neutrophiles à l'endothélium. De plus, l'interaction du récepteur CD40 à la surface endothéliale avec le CD40L plaquettaire résulte en une surexpression endothéliale d'ICAM-1, VCAM-1, des E- et P-sélectines accompagnée d'une libération d'IL-6 et de FT⁷⁰. Le CD40L inhibe également la production de NO en déstabilisant l'ARN messager de la NO synthase^{71,72}. De ce fait, l'engagement du CD40 endothélial induit un phénotype pro-athérogénique et pro-inflammatoire⁷¹.

Certains constituants des granules denses, tels que l'ADP, la sérotonine, les polyphosphates et le glutamate, très largement décrits pour leurs fonctions dans la formation du thrombus, participent également à l'inflammation et à la régulation des cellules immunitaires. En effet, les cellules dendritiques (CD) expriment le récepteur à l'ADP P_2Y_{12} , dont l'activation augmente leur capacité d'endocytose et de processing des antigènes⁷³. De plus, l'inhibition pharmacologique des récepteurs à l'ADP par l'utilisation de clopidogrel ou de prasugrel permet de réduire l'inflammation au cours du sepsis dans des modèles de choc septique chez le rat et la souris, respectivement^{74,75}. Cependant, cet effet anti-inflammatoire est partiellement attribuable aux blocages des récepteurs P_2Ys présents sur l'endothélium et les neutrophiles. La sérotonine quant à elle augmente la différenciation des monocytes en CD et participe à l'activation précoce des cellules T naïves^{76,77}.

3.1.3 Interaction avec les cellules de l'immunité innée

Les neutrophiles et les monocytes sont les cellules majoritaires de l'immunité innée et sont capables d'interagir avec les plaquettes activées en exprimant du PSGL-1 qui va interagir avec la P-sélectine à la surface plaquettaire. Cette interaction ne permet pas seulement l'arrêt des neutrophiles et des monocytes au site de lésion, mais participe également à leur activation et à la formation de MPs exprimant du FT actif⁷⁸⁻⁸⁰. La formation d'agrégats plaquettes-leucocytes (APL) est un témoin de l'inflammation et ceux-ci sont utilisés comme paramètres cliniques pour l'évaluation de la sévérité du sepsis⁸¹. Les interactions des plaquettes avec les neutrophiles dans la circulation induisent l'activation des intégrines à la surface des neutrophiles, leur dégranulation et augmente leur capacité de phagocytose^{78,79}. L'adhésion ferme des neutrophiles aux plaquettes est médiée par la liaison entre Mac-1 à la surface des neutrophiles et la GPIIb α ou l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquettaire de manière dépendante du fibrinogène. Cette adhésion ferme déclenche la libération des chémokines CXCL4 et CCL5 induisant à leur tour l'activation des neutrophiles⁸².

Un lien étroit entre la coagulation et l'immunité a été démontré ces dernières années, notamment par une étude réalisée dans notre laboratoire dans laquelle notre équipe a montré que les neutrophiles sont les premières cellules recrutées lors de l'activation endothéliale induite par une blessure au rayon laser et qu'elles sont responsables de l'initiation de la formation du thrombus³⁰. Même en l'absence d'inflammation, les macrophages et les neutrophiles sont recrutés au site de formation du thrombus et sont activés via la cascade de

coagulation⁸³. L'interaction des plaquettes avec les neutrophiles adhérents, induit également à la formation de NETs (Neutrophil extracellular traps). En effet, l'activation des plaquettes par du LPS (ligand du TLR4) ou l'utilisation de plasmas dérivés de patients en choc septique sur un tapis de neutrophiles adhérents en condition dynamique, augmente significativement l'interaction des plaquettes avec les neutrophiles, de manière dépendante de l'activation du TLR4. Ces interactions mènent à une activation robuste des neutrophiles et à la formation de NETs⁸⁴. La formation de NETs, aussi appelée NETose, est un mécanisme clé de l'immuno-thrombose⁸³⁻⁸⁵. En effet, le dépôt de chromatine décondensée dans le milieu extracellulaire participe activement à la capture et à la mort des pathogènes bactériens et viraux *in vivo*^{86,87}. L'interaction des plaquettes avec les neutrophiles semblent être essentielle pour la formation de NETs, puisque l'inhibition de ces interactions dans différents modèles murins d'inflammation, est suffisante pour supprimer la NETose^{84,87-89}. Même si les mécanismes exacts de cette coopération ne sont pas très bien compris, l'induction de la NETose par les plaquettes induit le recrutement des cellules immunitaires au site d'inflammation très précocement ce qui montre l'importance de cette coopération dans la réponse immunitaire^{84,88}. Cependant, l'immuno-thrombose induite par l'inflammation locale semble être la cause d'une variété de désordres thrombotiques cliniquement relevant comme l'athérosclérose (**Figure 14**) et la thrombose associée au cancer^{83,90}.

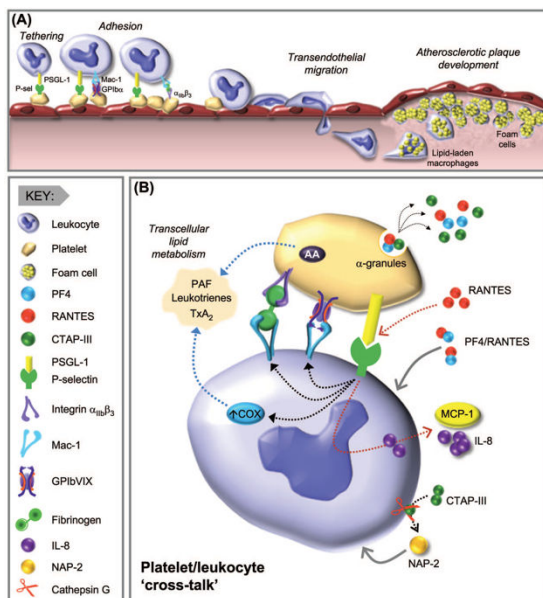


Figure 14 : Promotion de l'athérogenèse via les interactions plaquettes – leucocytes. (A) Recrutement et adhésion des leucocytes médiés par les plaquettes. (B) Dialogue entre les plaquettes et les leucocytes. (D'après Zane S Kaplan et al. *Hematology* 2011).

En effet, des études portant sur le développement des plaques d'athérosclérose, ont montré que les plaquettes induisent une réponse inflammatoire des cellules endothéliales accompagnée

d'une augmentation de la perméabilité vasculaire permettant ainsi l'entrée de lipides dans la paroi vasculaire⁹¹⁻⁹⁴. L'adhésion des plaquettes à la surface des monocytes, médiée elle aussi principalement par le PSGL-1 monocyttaire et la P-sélectine plaquettaire, est responsable de l'activation des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$, de la voie de signalisation NF- κ B⁹⁵ au sein des monocytes. L'engagement du PSGL-1 et l'activation des récepteurs à protéine G (GPCRs) par les facteurs plaquettaires PAF, IL-1 β et RANTES induit la synthèse et la sécrétion des facteurs monocytaires MCP-1, TNF- α , IL-8, PGE2 et FT ayant pour conséquence l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire⁹⁶. Une fois dans le tissu ces monocytes inflammatoires tendent à se différencier en cellules dendritiques⁹⁵. Dans différents modèles murins d'athérosclérose, la sécrétion de molécules inflammatoires par les plaquettes au site d'inflammation vasculaire, comme par exemple RANTES et PF4, accélère le développement et l'évolution de la lésion⁹⁷⁻⁹⁹. Chez les patients atteints d'athérosclérose, une augmentation du taux circulant d'agrégats plaquettes-monocytes est observée témoignant de l'inflammation induite par la lésion^{100,101}.

Les plaquettes peuvent également interagir avec les macrophages pro-inflammatoires et augmenter leur activation. Les macrophages inflammatoires dérivés de monocytes sont capables de piéger et de phagocyter des plaquettes activées autologues. La phagocytose des plaquettes activées par ces macrophages inflammatoires stimulés au LPS augmentent de manière significative leur production de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-23¹⁰² et ainsi leur état d'activation. Cependant, certaines études montrent que les plaquettes peuvent avoir l'effet contraire, et induire une réponse anti-inflammatoire. En effet, il a été montré que les médiateurs libérés lors de l'activation des plaquettes à la thrombine peuvent induire l'augmentation de l'expression du récepteur CXCR5 (récepteur de la cytokine CXCL13) dépendante de la voie de signalisation NF- κ B, augmentant ainsi l'effet anti-inflammatoire de CXCL13 sur les monocytes¹⁰³. De plus, la transfusion de plaquettes dans des souris septiques permet de diminuer la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 par les macrophages, et protège du choc septique en inhibant l'inflammation dépendante des macrophages via la voie de signalisation COX1/PGE₂/EP-4¹⁰⁴. Ces observations semblent donc indiquer que le rôle des plaquettes sur les macrophages et dans l'inflammation pourrait être dépendante du contexte cellulaire.

Enfin, les plaquettes ont également été décrites pour interagir directement avec les cellules dendritiques et pour moduler leur différenciation, leur maturation et leur activation de manière contact dépendante ou à distance. Ces interactions sont initialement médiées par le PSGL-1 et

Mac-1 présents à la surface des cellules dendritiques et la P-sélectine et JAM-C présentes à la surface plaquettaire^{105,106}. Cette première interaction est suivie par l'adhésion ferme des plaquettes à la surface des cellules dendritiques de manière dépendante des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquettaire et de $\alpha_M\beta_2$ de la cellule dendritique. D'après une étude réalisée par l'équipe du Pr Gachet, seules les plaquettes activées peuvent interagir avec les cellules dendritiques immatures en suspension et sous condition de flux faible, représentant potentiellement le flux dans un contexte d'athérombose (150 s^{-1}). En utilisant des micro-capillaires en verre tapissés de collagène, les auteurs montrent que les cellules dendritiques adhèrent aux plaquettes activées formant un thrombus et éliminent les plaquettes en marge du thrombus¹⁰⁶. Dans un modèle murin de microscopie intravitale de blessure de la carotide, les plaquettes activées à la surface des cellules dendritiques permettent d'activer les CD, d'adhérer à la paroi lésée, et d'induire leur maturation comme en atteste l'augmentation de l'expression du marqueur CD83^{105,107}. Cependant, d'autres études montrent que les plaquettes activées, et non au repos, peuvent par le biais des molécules qu'elles sécrètent, moduler l'activité et la différenciation des cellules dendritiques et ce indépendamment de leur contact¹⁰⁸. En effet, certaines études montrent que les molécules de nature nucléotidique libérées par les plaquettes activées à la thrombine induisent la maturation des cellules dendritiques avec une augmentation de leur expression des molécules de co-stimulation des lymphocytes T (CD80, CD86), une production d'Il-12(p70), et une stimulation autologue efficace de la prolifération des LT CD4+^{107,108}. Le CD40L soluble libéré lors de l'activation plaquettaire a également été décrit pour induire la maturation des cellules dendritiques et activer leurs capacités à stimuler les lymphocytes^{107,109}. Cependant, des mécanismes de maturation des cellules dendritiques dépendants de facteurs protéiques plaquettaires et indépendants du CD40L ont été découverts, induisant une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'Il-12(p70) et le TNF- α et augmentant la production de cytokine immuno-régulatrice telle que l'Il-10^{110,111}.

Les plaquettes participent donc activement à la réponse immunitaire innée, et en fonction du contexte, vont conditionner la réponse immunitaire adaptative.

3.2 Plaquettes et réponse immunitaire adaptative

Les plaquettes semblent également capables d'influencer la réponse immunitaire adaptative et notamment l'activation et la différenciation des lymphocytes T. Les lymphocytes T sont divisés en deux groupes, les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et les lymphocytes T CD4+,

eux-mêmes subdivisés en cellules effectrices ou régulatrices de type Th1, Th2 ou Th17 (h pour helper). Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent les antigènes présentés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type I induisant la mort de la cellule infectée par le biais de la sécrétion de cytokines cytotoxiques. Les CD4⁺ sont quant à eux les lymphocytes régulateurs de la réponse immunitaire. Ils reconnaissent les antigènes présentés par les CMH de type II et sécrètent des cytokines régulant l'activité d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes B et les cellules de l'immunité innée ⁴².

Le récepteur CXCR3, dont les ligands sont la chémokine ligand 10 (CXCL10) et le facteur PF4, est fortement exprimé par les lymphocytes Th1 activés ^{112,113}. L'utilisation de souris déficientes en PF4 dans un modèle de malaria cérébrale a permis de montrer que le PF4, principalement libéré par les plaquettes, module positivement l'expression du CXCR3 sur les lymphocytes T et permet ainsi leur transport et leur recrutement ¹¹⁴. Dans un modèle de greffe cardiaque, les souris déficientes en plaquettes ou en PF4 montrent une réponse immunitaire exagérée en réponse à la transplantation avec une augmentation massive de l'infiltration de lymphocytes Th17 et une augmentation de l'Il-17 plasmatique. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'expression de PF4 n'est pas spécifique des plaquettes puisqu'elle est également retrouvée à la surface des lymphocytes T activés. Le PF4 dérivé des plaquettes et des lymphocytes T activés semble donc jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T CD4⁺ en limitant la différenciation et l'expansion des LT CD4⁺ Th17 ¹¹⁵.

D'autres chémokines dérivées des plaquettes sont connues pour recruter et activer les lymphocytes T sur le site d'inflammation vasculaire. En effet, l'activation du récepteur CXCR5 médiée par les chémokines MIP-1 α et RANTES présentes dans les granules alpha des plaquettes a pour conséquence le recrutement des lymphocytes T au site d'inflammation et leur activation. Les lymphocytes T peuvent également activer les plaquettes par le biais de leur interaction CD40/CD40L dépendante, induisant la sécrétion de RANTES et permettant ainsi une amplification du recrutement des lymphocytes T ¹¹⁶. Enfin, une étude portant sur la greffe de peau a montré l'implication des plaquettes dans l'augmentation des infiltrats de lymphocytes T responsables du rejet de la greffe et cela en partie via le thromboxane qu'elles libèrent ^{117,118}.

Les plaquettes représentent la source majeure de CD40L soluble. Le CD40L est stocké dans les granules alpha. Lors de l'activation plaquettaire, le CD40L est exprimé à la surface des plaquettes et est sécrété sous forme soluble dans le milieu extracellulaire. Dans un modèle de

xénogreffe cardiaque, le CD40L soluble dérivé des plaquettes semble être responsable de l'initiation d'un rejet de la greffe ¹¹⁹. Le CD40L peut également être véhiculé par les PMPs, augmentant ainsi les interactions à distance entre les plaquettes et d'autres cellules immunitaires ¹²⁰. Le CD40L plaquettaire est connu pour augmenter l'immunité des lymphocytes T après une infection virale et est nécessaire pour une production optimale d'immunoglobuline de type G en induisant la maturation des cellules dendritiques et le switch isotypique des lymphocytes B ^{121,122}.

Il a également été décrit que l'activation du signaling dépendant de l'ATP via le récepteur P2X7 sur les lymphocytes T, augmente la différenciation des lymphocytes Th CD4⁺ en cellules pro-inflammatoires de type Th17 ¹²³.

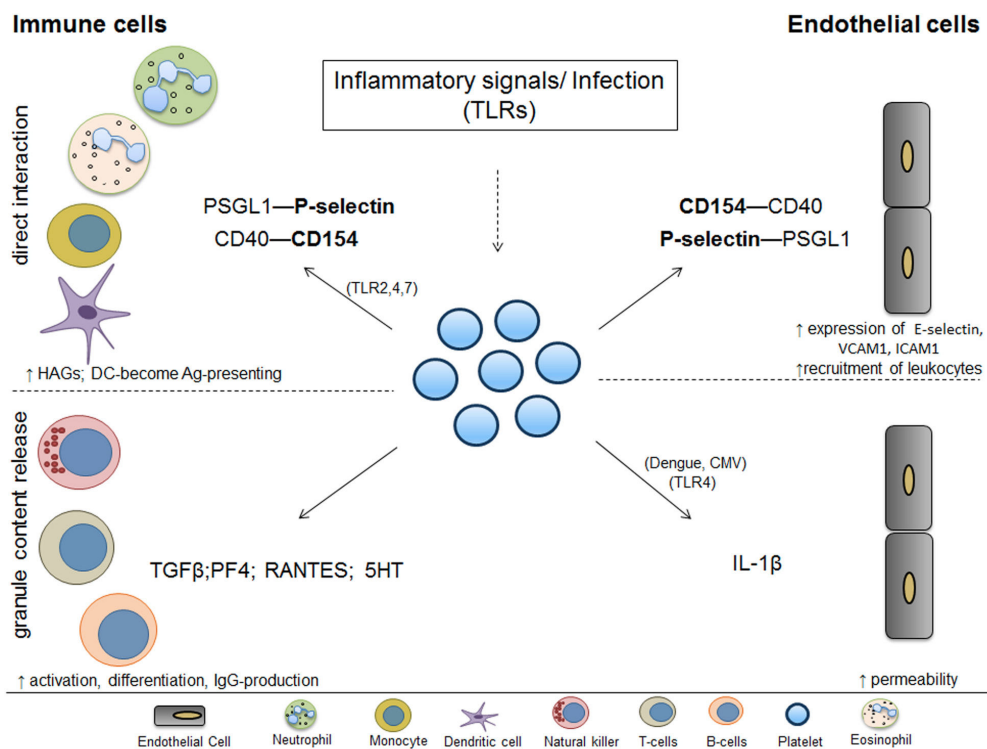


Figure 15 : Représentation schématique simplifiée du rôle des plaquettes dans l'inflammation et l'immunité. (D'après Koupenova et al. *Circulation Research* 2018)

3.3 Rôles des monocytes et macrophages dans la biologie de la tumeur

Les monocytes sont des cellules myéloïdes provenant de la moelle osseuse retrouvées à raison de 0,20 à 0,70 Giga/L dans la circulation en condition normale. Ils jouent de multiples

rôles dans la réponse immunitaire et sont responsables, en condition normale, du remplacement des macrophages résidents (macrophages alvéolaires, cellules Kupffer) et des cellules dendritiques. En réponse à une inflammation, les monocytes migrent rapidement (8 à 12h) au site d'infection/lésion et se différencient en macrophages et cellules dendritiques pour induire la réponse immunitaire et nettoyer les débris nécrotiques et/ou les pathogènes ¹²⁴. De par leur capacité à produire et sécréter des cytokines et des molécules cytotoxiques, les monocytes et les macrophages représentent des cellules essentielles effectrices et régulatrices de l'inflammation et de la réponse immunitaire innée.

Au cours de la progression tumorale, les monocytes circulants et les macrophages sont massivement recrutés au sein du microenvironnement tumoral. Ils représentent la sous-population immunitaire la plus abondante dans le microenvironnement tumoral ⁴⁶. L'impact des macrophages sur la biologie de la tumeur est largement dépendant des signaux délivrés par le microenvironnement tumoral ¹²⁵. Ces signaux ont pour conséquence la production de populations hétérogènes de macrophages au sein du microenvironnement, communément appelés macrophages de type M1 (activés classiquement) ou macrophages de type M2 (activés alternativement) ¹²⁴.

Dans la plupart des tumeurs solides, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont polarisés en macrophage de phénotype M2 par le microenvironnement tumoral ¹²⁶. L'augmentation des infiltrats de macrophages de type M2 dans les tumeurs est de mauvais pronostic. En effet, de par leur action sur l'angiogenèse, la croissance, la survie et l'invasion des cellules tumorales, ces macrophages participent activement à la progression de la tumeur. De par leur fonction immunosuppressive, ils permettent à la tumeur d'être protégée de la pression imposée par l'immunité adaptative. Cependant, en fonction des signaux qu'ils reçoivent, les macrophages peuvent se polariser en phénotype M1 ayant des fonctions anti-tumorales. Dans des études précliniques et cliniques, la reprogrammation des macrophages de type M2 infiltrés dans la tumeur en macrophage de type M1 inhibe la progression de la tumeur en augmentant l'élimination des cellules tumorales, l'inhibition de l'angiogenèse et en réduisant la fibrose associée à la tumeur ¹²⁷. L'éducation des macrophages avec des propriétés de suppression tumorale représente donc une approche thérapeutique intéressante et a été évaluée par diverses études cliniques et précliniques.

3.3.1 Propriétés des macrophages de type M1 et M2

Les macrophages de type M1 sont caractérisés par une production élevée d'Il-12, d'Il-23 et faible d'Il-10^{124,128-130} et sont activés par l'IFN- γ , les ligands des TLR, les agonistes spécifiques de NOD (Nucleotide Binding Oligomerization Domain) et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α . Au contraire, les macrophages de type M2 sont caractérisés par une production faible d'Il-12, d'Il-23 et élevée d'Il-10^{130,131}. Ils sont induits par une stimulation dépendante de l'Il-4 et de l'Il-13 et ont un rôle immunosuppresseur. L'Il-12 produite par les macrophages de type M1 induit la différenciation des lymphocytes Th1 qui peuvent en retour agir positivement sur la phagocytose des antigènes^{128,132}. L'Il-23, quant à elle, est associée au développement et à l'expansion des lymphocytes Th17 et contribue à l'inflammation^{133,134}. Au contraire l'Il-10, sécrétée par les macrophages de type M2, induit la production d'Il-4 et d'Il-13 par les lymphocytes Th2¹³⁵. L'Il-4 est un promoteur majeur de la cicatrisation, active l'enzyme de dégradation de l'arginine, l'arginase qui contribue à la production de matrice extracellulaire¹³⁶.

Une des différences majeures entre les macrophages de type M1 et de type M2 est leur métabolisme de la L-arginine. Les macrophages de type M1 surexpriment iNOS (nitric oxyde synthase) qui catabolise la L-arginine en monoxyde d'azote (NO) et citrulline, alors que les macrophages de type M2 induisent l'arginase I, métabolisant l'arginine en ornithine et polyamines participant ainsi à la synthèse de collagène et à la prolifération cellulaire¹³⁷. Le NO exerce de nombreuses fonctions immunitaires effectrices et régulatrices comme le contrôle ou la mort des pathogènes, l'inhibition ou la promotion de la croissance tumorale, la modulation de la production de cytokines et le développement des LT¹³⁸. L'activité tumoricide des macrophages de type M1 avec une haute activité iNOS a été décrite dans de nombreuses tumeurs¹³⁸.

La distinction entre les macrophages de type M1 ou M2 se base également sur l'expression de différentes chémokines et dépend des signaux reçus. Le LPS et l'IFN- γ induisent l'expression de CXCL9, CXCL10 et CXCL5 via l'activation du facteur de transcription INF regulatory factor 3 (IRF-3) ayant pour conséquence la production d'IFN- β et l'activation de STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1). Ces cytokines sont également responsables du recrutement des lymphocytes Th1, Tc1 et des cellules NK, et augmentent leur capacité microbicide¹³⁹. Au contraire, les macrophages de type M2 inhibent

CXCL9, CXCL10 et CXCL5 en sous-régulant NF- κ B et STAT1^{140,141}. Parmi les macrophages de type M2, trois sous types sont décrits et exercent des effets différents. Les macrophages M2a, induits par l'IL-4 et l'IL-13, augmentent l'expression de CCL24, CCL17 et CCL22, chémokines qui se combinent spécifiquement avec les récepteurs CCR3 et CCR4 et accélèrent le recrutement des éosinophiles, basophiles et LTh2 ce qui mène à une réponse de type 2. Les M2b sont également responsables de l'induction de la réponse Th2 soit une réponse immuno-régulatrice par le biais de la sécrétion de la chémokine CCL1 permettant le recrutement et l'infiltration des éosinophiles, LTh2 et LT régulateurs. Enfin l'IL-10 sécrétée par les M2c induit la production de CXCL13, CCL16 et CCL18 conduisant à l'accumulation des éosinophiles et des lymphocytes T naïfs dont le rôle prédominant est de supprimer la réponse immunitaire et de promouvoir le remodelage tissulaire¹³⁹.

Le rôle des macrophages semblent donc être totalement opposés et dépendants des cytokines qu'ils expriment. Les chémokines dérivées des macrophages de type M1 sont très importantes pour l'inflammation, la clairance des pathogènes et des cellules tumorales alors que les chémokines dérivées des macrophages de type M2 induisent le recrutement de leucocytes et lymphocytes impliqués dans la réparation et le remodelage tissulaire.

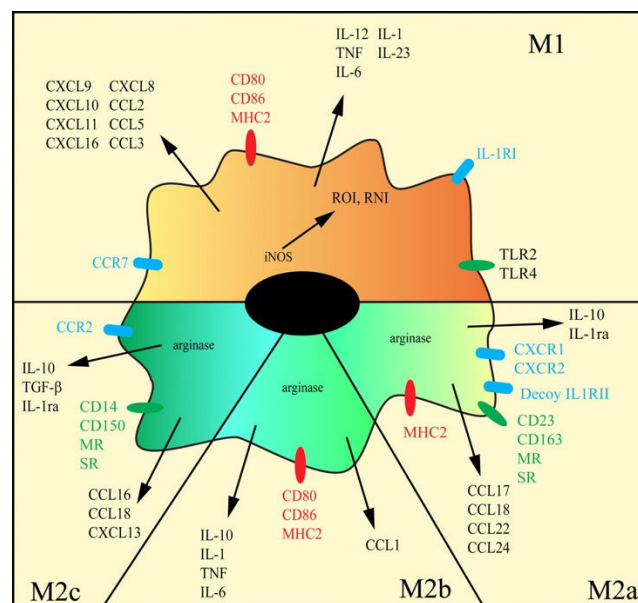


Figure 16 : Représentation schématique de la polarisation des macrophages.
(D'après Marie Benoit et al. J Immunol 2008)

3.3.2 Rôles des TAMs dans la progression tumorale.

Le rôle des TAMs dans les tumeurs est toujours sujet à controverse. En effet, il a été rapporté que dans le CCR, les TAMs sont pro-inflammatoires et jouent des rôles anti-tumoraux ce qui en fait un facteur de bon pronostic ^{142,143}. De plus, les TAMs peuvent exprimer une série de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , l'Il-1 et l'Il-6 activant la réponse lymphocytaire T de type 1 associée à une réponse anti-tumorale ¹⁴². Dans un modèle de mélanome, le NO et l'Il-12 dérivés des macrophages ont également été décrits pour leur action anti-tumorale ¹⁴⁴. Cependant, dans la plupart des cancers, tels que le cancer du sein, de la prostate, de l'ovaire, du col de l'utérus et des poumons, les TAMs sont considérés comme cellules anti-inflammatoires et corrèlent avec un mauvais pronostic ¹⁴⁵.

3.3.2.1 Recrutement des monocytes au niveau du microenvironnement tumoral

Les TAMs se différencient à partir des monocytes circulants et sont recrutés au sein du microenvironnement tumoral par différents chémo-attractants produits par les cellules tumorales et les cellules stromales. Par exemple, la chémokine CCL2 produite par les cellules tumorales, les macrophages et les fibroblastes, aussi connue sous le nom de MCP pour monocyte chemotactic protein, est essentielle pour le recrutement des macrophages ^{146,147}. Un taux élevé de CCL2 chez les patients est corrélé à une augmentation du nombre de TAMs et à un mauvais pronostic ¹⁴⁸. D'autres chémokines, telles que CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CXCL12 et cytokines incluant le VEGF, le PDGF et l'Il-10 ont aussi été décrites pour induire le recrutement des macrophages au sein du microenvironnement tumoral ^{130,149-151}. Enfin, un dernier groupe de chémoattractant monocyttaire, les alarmines, participent au recrutement des monocytes et autres cellules myéloïdes. Par exemple, la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box Protein 1), relarguée par les cellules tumorales mourantes, est retrouvée dans les zones nécrotiques, endroits préférentiels de résidence des TAMs au sein de la tumeur ¹⁵². D'autres alarmines telles que S100A8, S100A9, Serum Amyloid A3 (SAA3) et la fibronectine sont connues pour attirer les cellules myéloïdes CD11b⁺ ¹⁵³.

3.3.2.2 Rôles des TAMs dans l'angiogenèse.

De plus en plus d'études suggèrent un rôle actif des TAMs dans l'angiogenèse tumorale. En effet, les TAMs contribuent significativement à l'initiation de l'angiogenèse dans les tumeurs solides. En l'absence de TAMs, les cellules tumorales produisent les signaux nécessaires à l'initiation de l'angiogenèse, mais celle-ci est retardée ¹⁵⁴. L'inhibition pharmacologique des TAMs induit une diminution de la densité des vaisseaux sanguins présents dans la tumeur ¹⁵⁵. Ces observations montrent donc que les TAMs présents dans le microenvironnement participent activement à l'angiogenèse tumorale.

Mécanistiquement, lorsque les TAMs sont activés, ils sécrètent de nombreux facteurs participant au processus d'angiogenèse, tels que le VEGF, le PDGF, le TGF- β et des membres de la famille des FGF. Leur participation dans l'angiogenèse tumorale a été décrite dans différents cancers comme le gliome, le cancer de l'œsophage, du sein, de la vessie et de la prostate ^{130,148,156}. De plus, la surexpression de CSF-1 (colony stimulating factor 1) observée dans différents types de cancer dont le cancer du sein, permet d'augmenter l'infiltration des TAMs, la vascularité tumorale et d'accélérer ainsi le développement tumoral ¹⁵⁷. La suppression de l'expression de CSF-1 par le biais de siRNAs dans des modèles de xénogreffes de cancer du sein et du colon chez la souris inhibe la croissance tumorale en diminuant (i) la vascularisation de la tumeur, (ii) l'expression de facteurs angiogéniques et de MMPs et (iii) le recrutement des macrophages au sein des tumeurs ¹⁵⁸.

Les TAMs produisent également de nombreuses protéases, comme les MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 et MMP-12), la plasmine et l'uPA qui sont importantes pour la dégradation matricielle et la libération d'autres facteurs de croissance agissant sur l'angiogenèse ^{159,160}. La MMP-9 est l'une des protéases matricielles des plus importantes dans l'angiogenèse. En condition hypoxique, la MMP-9 sécrétée par les TAMs mobilise le VEGF produit par les cellules tumorales et les cellules stromales, ce qui stimule l'angiogenèse via l'induction de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales ¹⁶¹. La surexpression de MMP-2 est quant à elle observée dans différentes tumeurs et est corrélée au statut nodal et au stade de la tumeur ¹⁶².

Les TAMs s'accumulent énormément dans les régions hypoxiques de la tumeur, zones dans lesquelles les signaux leur permettent de surexprimer des gènes pro-angiogéniques tels que le VEGF, le pFGF, la CXCL8 et des enzymes glycolytiques, dont la transcription est sous

le contrôle des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2¹⁶³. De plus, la chémokine CXCL12 induite de manière dépendante de HIF-1, permet l'attraction et l'infiltration des cellules endothéliales lorsqu'elle est spécifiquement combinée à son récepteur CXCR4¹⁶⁴. Les cellules endothéliales infiltrées vont ainsi générer une niche servant à la différenciation et à la polarisation des macrophages¹⁶⁵. Par exemple, les monocytes exprimant le récepteur à l'angiopoïétine (ANG) connu sous le nom de Tie2, constituent une sous-population de monocytes dérivés du sang, recrutée par la tumeur primaire pour induire et promouvoir l'angiogenèse¹⁶⁶. En effet, Dr Murdoch et collaborateurs ont montré que les cellules endothéliales présentes dans les tumeurs sur-expriment l'angiopoïétine-2 responsable de l'attraction des monocytes et macrophages Tie2+. *In vitro*, le traitement des monocytes Tie2+ par l'angiopoïétine 2 inhibe significativement leur capacité à libérer des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ¹⁶⁷. De manière intéressante, dans un modèle murin de cancer du sein, de faibles doses de traitements anti-angiogéniques de type anti-VEGFR-2 induisent une reprogrammation des TAMs en phénotype M1 qui deviennent alors anti-angiogéniques et facilitent l'infiltration de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans les tumeurs.

De plus, toujours en condition hypoxique, les facteurs sécrétés par les cellules tumorales, comme le GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) ont été décrits pour induire une sécrétion importante de VEGFR-1 soluble par les macrophages de manière dépendante du facteur de transcription HIF2- α . Le VEGFR-1 soluble neutralise le VEGF et donc supprime l'angiogenèse¹⁶⁸. Dans un modèle de mélanome murin, la stabilisation du HIF2- α au sein des TAMs induit la sécrétion de VEGFR-1 soluble et permet ainsi de diminuer l'angiogenèse et la croissance de la tumeur¹⁶⁹. Ces observations soulignent l'importance du dialogue entre les cellules du microenvironnement tumoral et les TAMs dans l'induction de leur phénotype et de l'angiogenèse.

Les TAMs ne semblent pas participer seulement à l'angiogenèse tumorale mais également à la lymphangiogenèse et donc à la formation de métastases lymphatiques, un facteur de très mauvais pronostic. En effet, les TAMs produisent et sécrètent du VEGF-C et du VEGF-D, qui via leur récepteur VEGFR3, activent la lymphangiogenèse¹⁷⁰. Par exemple, dans les cancers du col de l'utérus, le VEGF-C libéré par les TAMs induit la lymphangiogenèse péri-tumorale et participe donc à la formation de métastases lymphatiques¹⁷⁰.

3.3.2.3 Rôles des TAMs dans la croissance tumorale

En plus de leur action sur l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale, les TAMs sont capables d'agir sur la croissance tumorale. Dans le cancer du sein, du col de l'utérus et du rein, l'infiltration des TAMs est positivement corrélée avec la prolifération des cellules tumorales^{171,172}. Les macrophages sécrètent de nombreux facteurs et enzymes agissant positivement sur la prolifération cellulaire¹⁶³. Par exemple, la MMP-9 qui participe activement à l'angiogenèse, joue également un rôle dans la croissance tumorale. En effet, dans un modèle murin ectopique de cancer ovarien chez la souris nude, la déficience en MMP-9 diminue significativement l'incidence et la croissance tumorale. Les tumeurs des souris déficientes en MMP-9 sont caractérisées par une diminution de la densité vasculaire et de l'infiltration des macrophages en comparaison aux souris WT (MMP-9⁺). Dans ce modèle de souris déficientes en MMP-9, l'injection de cellules spléniques provenant de souris MMP-9⁺ avant l'induction des tumeurs augmente l'angiogenèse et la tumorigenèse des cellules cancéreuses. De plus, les auteurs ont montré que ces tumeurs en pleine croissance contenaient des macrophages MMP-9⁺¹⁷³. La cytokine Il-23 promeut également l'incidence et la croissance tumorale en stimulant la réponse inflammatoire et en sur-régulant l'expression de la MMP-9¹⁷⁴.

Dans un modèle de mélanome, l'adrénomedulline dérivée des TAMs a également été décrite pour son implication dans l'angiogenèse et la croissance tumorale. En effet, l'inhibition des récepteurs à l'adrénomedulline sur les TAMs affecte l'angiogenèse et la croissance tumorale^{175,176}.

Au contraire, en fonction des signaux qu'ils reçoivent, comme des cytokines pro-inflammatoires de type IFN- γ et TNF- α , les monocytes et les macrophages peuvent se polariser en type M1 et posséder des propriétés anti-tumorales¹²⁷. Les macrophages peuvent reconnaître et éliminer les cellules tumorales de différentes manières. Les macrophages de type M1 sécrètent des facteurs solubles, tels que le NO et le TNF- α , pouvant induire l'apoptose des cellules tumorales¹⁷⁷⁻¹⁸¹. L'IFN- γ augmente la lyse des cellules tumorales médiées par les monocytes, d'une part en agissant sur les cellules tumorales, et d'autre part sur les monocytes. En effet, il a été montré que l'addition d'IFN- γ et de lignées cellulaires tumorales, les A375 (mélanome) et les HT29 (CCR), à des monocytes induit la libération de TNF- α et augmente la cytotoxicité et la lyse des cellules tumorales¹⁸². L'activité cytotoxique des monocytes activés à l'IFN- γ a également été observée dans d'autres lignées tumorales humaines. En effet, la co-

culture de monocytes activés à l'IFN- γ avec les cellules d'ostéosarcome HOS, de mélanome LOX, et du cancer du poumon A549 inhibent jusqu'à 95 à 100% la croissance tumorale¹⁸³.

D'autre part, les macrophages peuvent éliminer les cellules tumorales par phagocytose, mécanismes basés sur l'expression de molécules « eat-me » à la surface des cellules tumorales. C'est le cas de la phosphatidylserine, cependant son signal n'est pas suffisant pour induire la phagocytose de la cellule tumorale^{184,185}. Toutefois, les macrophages ont la capacité de reconnaître et de phagocyter des cellules tumorales viables. Ceci est possible par exemple à travers l'interaction des récepteurs des Low density lipoprotein (LDD LRP) présents sur les macrophages et la calréticuline exposée à la surface des cellules tumorale^{186,187}. La calréticuline est une protéine chaperonne impliquée dans le contrôle homéostatique des taux de calcium cytosolique et réticulaire et est souvent surexprimée à la surface des cellules tumorales¹⁸⁶. Les macrophages, du fait de leur expression de récepteurs aux fragments Fc des anticorps, peuvent également reconnaître et ingérer les cellules tumorales recouvertes d'anticorps^{188,189}.

Cependant, les signaux pro-phagocytiques reçus par les macrophages peuvent être contre-balançés par des signaux « don't eat me » et permettre à la cellule tumorale d'échapper à la phagocytose. Par exemple, l'intégrine CD47, un marqueur du « soi » exprimé à la surface des cellules normales peut interagir avec la protéine SIRP α (Signal Regulatory Protein α) sur les macrophages et inhiber la phagocytose^{190,191}. Pour échapper au phénomène de phagocytose, certaines cellules tumorales, comme par exemple les cellules leucémiques, peuvent surexprimer l'intégrine CD47 à leur surface^{192,193}. Ces observations suggèrent que le rôle des macrophages dans l'immunosurveillance et la croissance tumorale est régulé par les différents signaux que procure le microenvironnement tumoral et la balance entre les signaux « eat-me » et « don't eat me » présents à la surface des cellules tumorales. De plus, les TAMs de type M2 limitent la cytotoxicité du microenvironnement ce qui aide la croissance tumorale.

3.3.2.4 Rôles immunosuppresseurs des TAMs

L'immunosuppression au sein du microenvironnement tumoral est un mécanisme bien établi participant à la régulation de la croissance tumorale. Plusieurs études ont montré que les cytokines et protéases dérivées des TAMs, comme le TGF- β , l'Il-10 et l'arginase 1 contribuent significativement à l'immunosuppression au sein du microenvironnement¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Le TGF- β joue un rôle crucial dans l'immunosuppression et agit à la fois sur les cellules de l'immunité innée comme sur les cellules de l'immunité adaptative. Le TGF- β induit la

polarisation des macrophages de type M1 en macrophage de type M2, eux-mêmes responsables de la production de TGF- β ce qui renforce l'immunosuppression au sein du microenvironnement¹⁹⁷. Le TGF- β inhibe également l'activité cytolytique des cellules NK *in vitro* en régulant négativement leur expression membranaire du récepteur activateur NKG2D et NKp30, limitant ainsi leur réponse anti-tumorale^{198,199}. De surcroît, le TGF- β diminue la migration des cellules dendritiques et augmente leur apoptose, ayant pour conséquence une diminution de la présentation des antigènes et donc une atténuation de la réponse immunitaire adaptative^{200,201}. Concernant la réponse immunitaire adaptative, le TGF- β induit la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes Th2 participants à la régulation négative de l'immunité et donc à l'immunosuppression²⁰². En effet, le Dr Maeda et collaborateurs ont montré que l'injection d'anticorps neutralisants le TGF- β dans des souris portant une tumeur du thymus permet aux macrophages de retrouver leurs fonctions et notamment leur capacité à produire du TNF- α et du NO²⁰³. Ce traitement permet également de diminuer le taux d'Il-10 circulant en comparaison aux souris non traitées, indiquant que le TGF- β est responsable de la surproduction de la cytokine immunosuppressive Il-10²⁰⁴. *In vivo*, la surproduction d'Il-10 médiée par le TGF- β conduit au passage d'une réponse Th1/Th2 à une réponse Th2 en favorisant d'une part le développement des cellules T de type Th2 et d'autre part en inhibant la réponse Th1 via la sous-régulation de la production de cytokines et de l'expression d'Il2-R²⁰². L'activité anti tumorale des lymphocytes T CD8⁺ est également inhibée par le TGF- β . En effet, le TGF- β permet de supprimer l'expression de différents gènes cytolytiques tels que les gènes codant pour les granzymes A, granzymes B, IFN- γ et FAS ligand^{198,205}.

L'Il-10 est une cytokine importante présente dans le microenvironnement tumoral et est exprimée par les TAMs, les LT CD8⁺ et les cellules tumorales. L'Il-10 est une cytokine considérée comme anti-inflammatoire et immunosuppressive favorisant l'échappement de la tumeur à la surveillance immunitaire. L'Il-10 dérivée des TAMs agit premièrement de manière autocrine sur les TAMs en supprimant l'expression d'Il-12, cytokine à potentiel anti-tumoral²⁰⁶. L'Il-10 dérivée des TAMs prévient également la maturation des cellules dendritiques et augmente la différenciation des macrophages, diminuant ainsi la présentation des antigènes^{195,207}. L'Il-10 peut par ailleurs inhiber la libération d'IFN- γ , facteur principal responsable de la stimulation des lymphocytes T naïfs, ce qui participe une fois de plus à l'évasion de la tumeur à la réponse immunitaire²⁰⁸. Cependant, il n'existe pas de consensus scientifique portant sur

l'activité immunosuppressive de l'Il-10. En effet, certaines études ont montré que l'Il-10 possède des propriétés stimulant l'immunité anti-tumorale²⁰⁹⁻²¹¹. Par exemple, dans le cancer du poumon non à petites cellules de stade I, il a été montré que plus il y a de cellules CD8⁺/Il-10⁺ infiltrées dans le microenvironnement, meilleure sera la survie totale²⁰⁹. De plus, Lopez et collaborateurs montrent dans des modèles murins ectopiques de cancer colorectal (CT26) et mammaire (LM-3) que l'Il-10 et l'Il-12 agissent en synergie pour induire une réponse immunitaire anti-tumorale²¹⁰. Le rôle de l'Il-10 est donc sujet à controverse et nécessite d'être étudié plus précisément dans la thérapie du cancer.

L'arginase 1, un marqueur de la polarisation des TAMs en phénotype M2, est hautement exprimée dans le microenvironnement tumoral. Elle catabolise la L-arginine en polyamine et proline, ayant pour conséquence la dérégulation des signaux en deçà du récepteur des cellules T (TCR) ce qui induit *in fine* une absence de réactivité des lymphocytes T CD8⁺^{196,212}. De plus, l'activation de l'arginase 1 est associée à une production d'H₂O₂ par les cellules suppressives dérivées des cellules myéloïdes (MSDCs). Les MSDCs présentent aux LT CD8⁺ des épitopes restreints et inhibent leur libération d'IFN- γ à travers un contact dépendant de la production d'H₂O₂²¹³.

Enfin, plusieurs études ont montré que certaines cytokines jouent un rôle important dans l'immunosuppression. C'est le cas par exemple des chémokines CCL17 et CCL22, qui préviennent l'infiltration des lymphocytes T cytotoxiques et induisent la différenciation des LT en Treg et Th2^{150,214}. La chémokine CCL18 dérivée des TAMs a la capacité de recruter les lymphocytes T naïfs et de causer leur anergie¹³⁰. Une étude a également montré que les chémokines CCL2 et CCL5, responsables de l'attraction des monocytes au sein du microenvironnement, induisent la suppression de la réponse immunitaire dépendante des lymphocytes T¹⁹⁵.

3.3.2.5 Rôles des TAMs dans la formation de métastases

La formation de métastases est une des finalités évolutives du processus cancéreux. C'est un marqueur déterminant de la sévérité du cancer. Les cellules tumorales peuvent métastaser à travers les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques ce qui mène à la formation de tumeurs ectopiques dans d'autres organes. Le Dr Gorelik et ses collaborateurs furent les premiers auteurs à décrire le rôle promoteur des TAMs dans la formation de métastases. Après l'injection intraveineuse de cellules tumorales murines, ils ont observé une augmentation de la population de macrophages pendant la formation des nodules tumoraux

pulmonaires²¹⁵. Suite à ces travaux, une étude a démontré une relation synergique entre les cellules tumorales du sein et les TAMs dans la migration cellulaire²¹⁶. En effet, de par l'utilisation d'un modèle de migration cellulaire *in vivo* basée sur l'introduction d'aiguilles contenant des gradients d'EGF et de CSF-1 au sein de la tumeur et sur la microscopie intravitale multiphotonique, les auteurs montrent que l'interaction entre les macrophages et les cellules tumorales facilite la migration des cellules tumorales dans la tumeur primaire. Les gradients d'EGF et de CSF-1 contenus dans les seringues stimulent la migration des cellules tumorales et des macrophages dans les seringues sachant que les cellules tumorales n'expriment que le récepteur à l'EGF et les macrophages le récepteur au CSF1 uniquement. Depuis, d'autres études ont montré que le facteur de croissance épidermique (EGF) libéré par les TAMs interagit avec le CSF-1 relargué par les cellules tumorales promouvant ainsi la migration des cellules tumorales¹⁵³. De plus, de nombreuses études ont montré que les cellules malignes migrent toujours à proximité des TAMs, aidant ainsi les cellules tumorales à réaliser le processus d'intravasation²¹⁷.

D'autre part, les TAMs semblent augmenter l'invasion des cellules tumorales au sein du microenvironnement. En effet, la co-culture de TAMs avec différentes lignées de cellules cancéreuses du sein augmente l'expression macrophagique de MMPs, et spécialement des MMP-2 et MMP-9 d'une manière dépendante du TNF- α ²¹⁸. Les MMP-2 et MMP-9 sont responsables de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et facilitent ainsi la formation de métastases¹⁶³. D'autres molécules dérivées des TAMs, telles que l'Il-1 β , la cathépsine B, Wnt5a et la sémaphorine 4D, ont été décrites pour promouvoir les métastases¹⁵³.

L'invasion des cellules tumorales peut également être régulée par le biais de microARN dérivés des TAMs. Yang et collaborateurs ont montré que les macrophages peuvent transférer le miR-233 à des cellules tumorales du sein par le biais d'exosomes. Le miR-233 semble réguler l'invasion des cellules tumorales à travers la voie de signalisation *mef2c*- β -catenin²¹⁹. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin d'étudier ce mécanisme de transfert de miRNA dérivés des TAMs dans la progression tumorale.

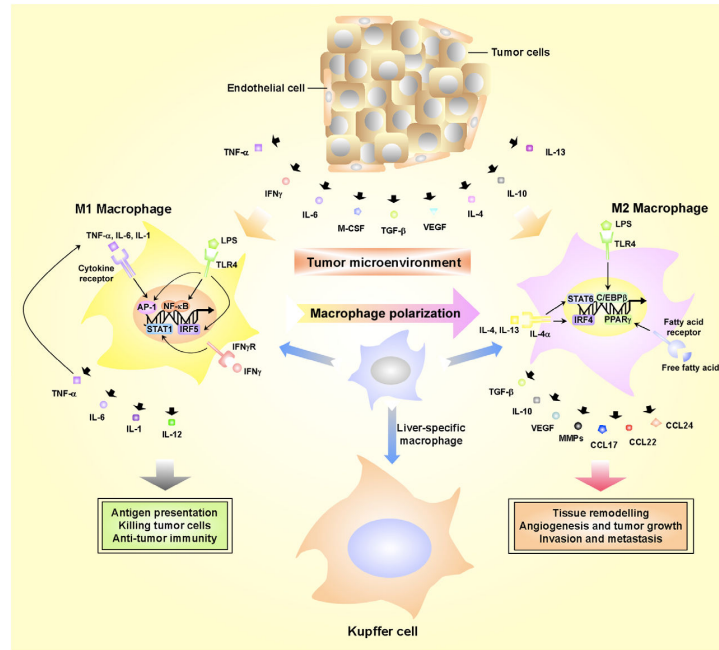


Figure 17 : Rôles des TAMs en fonction des signaux donnés par le microenvironnement tumoral. (D'après Ke Jin et al. Oncotarget 2017)

BUT DE L'ETUDE

Les plaquettes sont décrites comme les cellules effectrices de l'hémostase et de la thrombose depuis plus d'un siècle. Cependant, ces dernières années, de nombreuses études ont pu établir un lien étroit entre l'immunité et la thrombose, processus dans lesquels les plaquettes participent activement via leurs capacités d'interaction multiples avec les cellules de l'immunité et les cellules endothéliales. De ce fait, les plaquettes sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques inflammatoires tels que les maladies cardiovasculaires et le cancer.

Depuis la première étude réalisée par le Dr Gasic et al. en 1968²²⁰, montrant une corrélation entre le nombre de plaquettes circulantes et la formation de métastases, un nombre incroyable de publications ont rapporté une participation active des plaquettes dans la progression tumorale et particulièrement dans la formation de métastases. Alors que l'implication des plaquettes dans la formation de métastases est fortement documentée et bien établie, leur rôle dans la croissance tumorale est toujours sujet à controverse. En effet, de nombreuses études montrent que les facteurs libérés par les plaquettes sont responsables de la survie et de la prolifération des cellules tumorales, de l'angiogenèse tumorale et de l'augmentation des capacités d'invasion des cellules tumorales^{221,222}. A l'inverse, des études ont montré que les plaquettes, et les microparticules qui en dérivent peuvent diminuer la prolifération des cellules tumorales et induire leur apoptose^{223,224}. De plus, des études rétrospectives ont rapporté en 2012 dans la célèbre revue *The Lancet*, que la prise quotidienne d'antiplaquettaire telle que l'aspirine réduirait à long terme l'incidence du cancer et notamment du cancer colorectal, et la formation de métastases²²⁵. Cependant, des études prospectives semblent indiquer que la prise quotidienne d'aspirine n'a aucun effet sur l'incidence du cancer²²⁶.

En s'appuyant sur ces observations contradictoires, et afin de comprendre le rôle des plaquettes dans le cancer colorectal, nous avons décidé d'étudier les interactions entre les plaquettes et les cellules de cancer colorectal et leurs conséquences sur la croissance tumorale et les métastases. Au cours de cette étude, nous avons fait l'hypothèse que les plaquettes pourraient jouer des rôles distincts en fonction de leur localisation intravasculaire ou intratumorale. En effet, la présence de plaquettes extravasées au sein du microenvironnement tumoral a été rapportée pour la première fois en 2012 dans un modèle murin de cancer des ovaires, puis décrite par la suite dans des modèles murins de cancers du sein et de mélanome^{47,48}. Nous avons donc, dans un premier temps étudié la présence de plaquettes dans le microenvironnement de tumeurs colorectales pour ensuite déterminer leurs rôles dans la croissance tumorale et la formation de métastases.

RESULTATS

Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer.
Rôles paradoxaux des plaquettes dans le cancer colorectal

Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique du fait de sa fréquence et de sa mortalité élevées (42152 cas en 2012 dont 17722 décès, données INCa). En effet, il se place en seconde position chez la femme, et en troisième chez l'homme après le cancer du sein, et les cancers du poumon et de la prostate. Ce cancer touche autant les deux sexes et survient le plus souvent après 50 ans. Le taux de mortalité qui lui est associé a diminué de 21% en 20 ans grâce aux progrès réalisés dans le diagnostic plus précoce et dans la prise en charge thérapeutique. Cependant en cas d'évolution métastatique (foie, poumon, cerveau) son pronostic est défavorable avec une survie globale à 5 ans passant alors de 90% à 55%.²²⁷.

La relation entre thrombose et cancer a été établie pour la première fois par le Dr Armand Trousseau. En effet, ce dernier montre dès 1865 que la survenue de thrombophlébite peut être le signe d'une malignité viscérale occulte²²⁸. Depuis, la maladie thromboembolique veineuse (MTEV) est connue pour être une des complications fréquentes chez les patients atteints de cancer (15 à 20%), et constitue la seconde cause de mortalité au cours de la progression de la maladie, après le cancer lui-même²²⁹⁻²³¹. Cependant l'incidence de la MTEV est fortement dépendante du type de cancer. En effet, son incidence dans les deux ans suivant le diagnostic du cancer varie de 20% dans le cas du cancer pancréatique, à 3% dans le cas du CCR²³¹.

Comme décrit dans la revue n°1, « Impact of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer associated thrombosis », le FT constitue le facteur principal responsable de l'état pro-coagulant observé chez les patients. En effet, le FT exprimé à la surface des cellules tumorales et de leurs microparticules, peut initier la cascade de coagulation et ainsi activer et agréger les plaquettes. Certaines cellules tumorales ont également la capacité de sécréter des agonistes plaquettaires, tels que l'ADP et la thrombine, participant ainsi à l'activation et l'agrégation des plaquettes dans la circulation²³²⁻²³⁵. Ce mécanisme d'activation et d'agrégation, appelé TCIPA pour Tumor Cell Induced Platelet Aggregation, participe activement à l'état pro-thrombotique observé chez les patients²³⁶ mais pas seulement.

La présence d'un état procoagulant / prothrombotique lié au développement d'un cancer est associée à une survie diminuée, en particulier chez les patients atteints de CCR métastatiques

^{237,238}. Au cours de la progression tumorale, un dialogue s'installe entre les plaquettes et la tumeur primaire. Le cancer lui-même est capable (i) d'activer la thrombopoïèse et d'augmenter la production de plaquettes et (ii) d'activer les plaquettes par différents mécanismes. L'élévation du nombre circulant de plaquettes, ou thrombocytose est observée dans 2,7 à 49,8% des patients atteints de cancer gastro-intestinaux et dans d'autres cancers tels que le cancer du rein, du sein, du cerveau, du colon et du rectum et enfin dans les cancers urogénitaux et est positivement associée à une survie diminuée ^{48,239-242}. L'augmentation des molécules d'adhésion à la surface des plaquettes et du nombre de microparticules plaquettaires circulantes au sein des patients atteints de malignité témoigne également de l'activation plaquettaire au cours de la progression tumorale ²⁴³. Au-delà de sa conséquence sur la génération de thrombose, le TCIPA semble être un élément clé participant à la croissance tumorale mais également à la formation de métastases. En effet, l'activation plaquettaire permet la libération des nombreux facteurs de croissance et facteurs angiogéniques contenus dans leurs granules, tels que le PDGF, l'EGF et le VEGF, favorisant ainsi la croissance et l'angiogénèse tumorale. L'agrégation des plaquettes autour des cellules métastatiques permet de protéger la cellule cancéreuse vis à vis des hautes forces de cisaillement et du système immunitaire, et leur confère également des molécules d'adhésions pour interagir avec l'endothélium et s'extravaser dans le but de créer des foyers secondaires. La tumeur primaire tire donc avantage de l'activation des plaquettes.

L'implication des plaquettes dans la formation de métastases est à ce jour bien établie ²⁴⁴. Dans différents modèles de cancer murins, l'inhibition pharmacologique de l'activation plaquettaire par le clopidogrel et le ticagrelor, deux inhibiteurs des récepteurs à l'ADP P2Y₁₂, diminue significativement la formation de métastases ^{245,246}. De plus, des méta-analyses réalisées sur plus de 17 000 patients, ont montré que la prise quotidienne d'aspirine réduit la formation de métastases à court comme à long terme, et notamment dans le cas du CCR ²²⁵.

Les plaquettes expriment de nombreuses molécules d'adhésion et récepteurs glycoprotéiques, dont les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_6\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$, la GPIb α , la P-sélectine et CLEC-2, leur permettant d'adhérer et d'interagir rapidement avec les cellules cancéreuses circulantes ²⁴⁷⁻²⁵⁴. En 2012, Dunne et collaborateurs ont découvert l'expression d'une nouvelle molécule d'adhésion à la surface plaquettaire, impliquée dans l'agrégation et la formation de thrombus, la cadhérine-6. La cadhérine-6, aussi appelée K-cadhérine, est une cadhérine de type II qui a la particularité de posséder un motif RGD lui permettant d'interagir de manière hétérophylle avec les intégrines, et notamment avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ²⁵⁵. Cette cadhérine est un gène cible du TGF- β et a été décrite pour induire et promouvoir la TEM et les métastases dans des

carcinomes thyroïdiens papillaires^{256,257}. Cependant, son implication dans les interactions plaquettes-cellules cancéreuses n'a jamais été étudiée.

Alors que l'implication des plaquettes dans les métastases est fortement documentée, leur rôle dans la croissance tumorale est toujours sujet à controverse. En effet, de nombreuses études montrent que les plaquettes augmentent, dans un contexte circulatoire et par le biais des facteurs qu'elles sécrètent, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses et leurs capacités d'invasion via l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dépendante du TGF- β qu'elles libèrent^{221,222,258}. Au contraire, d'autres études rapportent un effet anti-prolifératif et/ou cytotoxique des plaquettes et des microparticules qui en dérivent sur les cellules cancéreuses^{223,224,259}. En effet, par exemple, le Dr Michael et ses collaborateurs ont montré récemment que les PMPs infiltrent les tumeurs solides de type colorectales et pulmonaires et via le transfert du miR-24 inhibent la synthèse d'ADN et induisent l'apoptose des cellules tumorales²²⁴. Jusqu'en 2012, aucune étude ne s'était intéressée à la présence de plaquette intra-tumorale et à leur probable rôle dans le microenvironnement des tumeurs. Le Dr Stone et ses collaborateurs furent les premiers auteurs à décrire, dans un modèle de cancer ovarien, la présence de plaquettes intra-tumorales en dehors du compartiment vasculaire⁴⁸. Depuis, la présence de plaquettes intra-tumorales a été confirmée par l'équipe du Dr Li et collaborateurs qui montrent, dans des modèles murins de mélanome et de cancer du sein que les plaquettes intra-tumorales sont associées à la structure des vaisseaux et à la formation de métastases⁴⁷. Récemment, une étude a montré que l'infiltration des plaquettes dans le microenvironnement tumoral du cancer ovarien fragilisé par des thérapies anti-angiogéniques est dépendante de la protéine FAK⁴⁹.

Devant les différentes observations qu'apporte la littérature, nous avons décidé d'étudier (i) le rôle des interactions entre plaquettes et cellules cancéreuses au sein du microenvironnement tumoral de tumeurs colorectales et leurs effets sur la croissance tumorale et la formation de métastases et (ii) le rôle de la cadhérine-6 dans les interactions plaquettes - cellules de CCR. Pour cela nous avons développé un modèle de cancer colorectal syngénique ectopique chez la souris Balb/c, en utilisant la lignée de cellules de cancer colorectales murines, les CT26, que nous avons modifiées génétiquement de manière à ce qu'elles expriment la GFP et la luciférase (infection par des particules lentivirales), ainsi nommée CT26 GFP/Luciférase. Afin de confirmer les résultats que nous avons obtenus dans le modèle murin *in vivo* et *in vitro* et de faire le parallèle avec la pathologie humaine, nous avons également étudié les interactions entre

les plaquettes humaines et une lignée de CCR humaine, les HT29 et réalisé des études immunohistochimiques sur des coupes de tumeurs colorectales humaines commerciales.

Résultats – article « Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer ».

Les résultats de cette étude nommée « Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer » ont été soumis dans le journal Blood et les auteurs sont Léa Plantureux, Diane Mège, Lydie Crescence, Stéphane Robert, Walid Ezzedine, Françoise Dignat-George, Laurence Panicot-Dubois, Christophe Dubois.

Brièvement, nous avons montré la présence de plaquettes extravasées au sein du microenvironnement des tumeurs colorectales et que celles-ci interagissent directement avec les cellules cancéreuses, de manière cadhérine-6 dépendante et TCIPA indépendante. Ces interactions induisent la génération de trois types de microparticules nommées iMPs qui expriment des marqueurs plaquettaires, des marqueurs tumoraux ou les deux. La présence de ces iMPs a été confirmée dans le plasma de patients atteints de cancer colorectaux. Dans le microenvironnement tumoral, les iMPs vectorisent des cytokines pro-inflammatoires ce qui induit le recrutement des macrophages et active leur fonction anti-tumorale, dont la conséquence est une diminution significative de la croissance tumorale via l'induction de P21. Au contraire, dans la circulation, ces iMPs sont capables d'activer les cellules endothéliales et via le transfert d'intégrine et l'induction de la TEM, de favoriser l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium, et donc les métastases.

Paradoxical roles of platelets in colorectal cancer

Léa Plantureux¹, Diane Mège¹⁻², Lydie Crescence¹, Stéphane Robert¹, Walid Ezzedine¹⁻²,

Françoise Dignat-George^{1,3}, Laurence Panicot-Dubois¹, Christophe Dubois^{1*}

¹ Aix Marseille Univ, INSERM UMR1263, INRA 1260, C2VN, Marseille, France.

² Department of digestive surgery, Timone University Hospital, Marseille, France.

³ Department of Hematology and Vascular Biology, CHU La Conception, APHM, Marseille, France.

* Aix Marseille Univ, C2VN, Faculty of Pharmacy, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France. christophe.dubois@univ-amu.fr

Abstract: 134 words

Main text: 4200 words

6 figures

3 supplemental figures

Abstract

Increasing evidence has demonstrated that platelets participate in the progression of metastasis. However, their roles in tumor growth are still subject to controversy. Here, we investigated the consequences of platelet interactions with colorectal tumors. Platelets extravasate into the tumor microenvironment and interact with tumor cells in a cadherin-6 dependent manner. This interaction induces the generation of three types of microparticles (named iMPs) that express markers of platelets, tumor or both. The presence of iMPs was confirmed in patients with colorectal cancer. In the microenvironment, iMP-dependent cytokine vectorization induces the recruitment of macrophages and activates their tumoricidal activity, leading to a significant diminution in tumor growth through a P21-dependent pathway. In contrast, in the bloodstream, iMPs activate endothelial cells and platelets through the transfer of integrins and the induction of epithelial-to-mesenchymal transition, favoring metastasis.

Platelets are small (2-4 μm), anucleate, hematopoietic cells released by bone marrow megakaryocytes into the bloodstream. Platelets were first described as the major effectors of hemostasis and thrombosis. However, platelets may also actively participate in the progression of malignancies¹. Since pioneer studies performed in the early 1970s, increasing evidence has shown that the release of platelet agonists and the expression of procoagulant proteins, such as tissue factor (TF)^{2,3,4}, by tumor cells induce platelet activation and aggregation in the bloodstream and actively participate in the process of metastasis. Subsequently, numerous studies, including ours, have demonstrated that the inhibition of platelet activation by clopidogrel or ticagrelor, two P2Y₁₂ inhibitors, impairs tumor metastasis in different animal models^{5,6}. This finding was confirmed in humans in different meta-analyses, indicating that the inhibition of platelet activation by daily aspirin treatment reduces the development of metastasis⁷. Beside their role in the development of metastasis, platelets have also been reported to participate in tumor growth, although their involvement is, in this case, still subject to controversy. On one hand, different studies have demonstrated that platelet-released factors promote tumor cell proliferation, prosurvival signaling, angiogenesis and invasiveness^{8,9}. On the other hand, other studies have shown that platelets and platelet-derived microparticles exert antiproliferative and cytotoxic effects on many tumor cells, including the induction of cell cycle arrest, the inhibition of DNA synthesis, and the induction of apoptosis^{10,11,12}.

Recently, the presence of extravasated intratumoral platelets was suggested in an orthotopic mouse model of ovarian cancer¹³. Subsequently, intratumoral platelets were observed in melanomas and breast carcinomas and were associated with tumor vessel structure and metastasis¹⁴. The mechanisms by which platelets extravasate have been

investigated and appear to be dependent on the platelet Focal Adhesion Kinase (FAK) protein in unstable and leaking tumor vessels¹⁵. The role of intratumoral platelets is, to date, unknown.

In this study, we investigated the presence of platelets in the colorectal tumor microenvironment and their roles in tumor growth and metastasis. Our findings demonstrated that platelets extravasate into the microenvironment of colorectal tumors and directly interact with tumor cells, without aggregation. Using a blocking-antibody and shRNA strategy, we showed that the interactions of platelets with colorectal tumor cells are cadherin-6 dependent and lead to decreased tumor growth *in vivo*. In the microenvironment, microparticles released following platelet-tumor cell interactions (iMPs) trigger the attraction of circulating monocytes, inducing cell cycle arrest of the colorectal tumor cells in a P21 (Waf1/Cip1)-dependent pathway. In contrast, in a circulatory and metastatic context, platelet-tumor cell interactions induce epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and increase the adhesive ability of colorectal tumor cells to interact with the endothelium. iMPs are able to prime the endothelium and increase the adhesion of tumor cells to the endothelial cells. Thus, platelet-tumor cell interactions play a paradoxical role in colorectal cancer progression, with antitumoral characteristics in the tumor microenvironment but prometastatic properties in the context of metastasis.

Results

Platelets were present in the tumor microenvironment and interacted with tumors through the expression of Cadherin 6.

To decipher the role played by platelets in the tumor microenvironment, we first determined if platelets were present apart from blood vessels, namely, within a colorectal tumor.

We developed an ectopic colorectal cancer model using CT26 cancer cells stably transfected with GFP and Luciferase, called CT26 GFP/Luci cells. Thirty days after the injection of the CT26 GFP/Luci cells, when the tumors reached a volume of approximately 1500 mm³, some platelets were detected apart from the tumor blood vessels (**Figure 1A**) and directly interacting with the cancer cells (**Figure 1B**). Intratumoral platelets were mostly detected at the periphery and not at the center of the tumors (**Figures 1C and 1D**) and represented approximately 20% of the total platelets present within the tumor (**Figure 1E**). The presence of intratumoral platelets was confirmed in human poorly differentiated colorectal tumors (**Figure 1F**). We next studied the interactions of platelets with colorectal cancer cells *in vitro*, in the absence of plasma, to reproduce the intratumoral conditions. Interestingly, the colorectal cancer cell line HT29 that was used did not induce aggregation (named TCIPA, for tumor cell-induced platelet aggregation) in the presence of washed platelets (**Supplemental Figure 1**), indicating that intratumoral interactions of platelets with cancer cells are independent of the classical α IIb β 3-fibrinogen platelet aggregation pathway. This finding was confirmed by studying the kinetics of the interactions between the two cellular partners; single platelets, and not aggregates, adhered to the cancer cells, and the number of adherent platelets increased over time to reach 200 platelets per field after 60

minutes (**Figures 2A and 2B**). This result was confirmed in a dynamic condition, at 6 dynes/cm². Single platelets were observed to interact with HT29 cancer cells. This interaction was specific for cancer cells since, under the same conditions, platelets did not adhere to human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (**Figures 2C and 2D**).

Dune and collaborators demonstrated that platelets express cadherin 6 (cdh-6)¹⁶, which is a type II cadherin that possesses an RGD motif allowing the protein to interact in a homophilic manner with other Cadherin 6 molecules and in an heterophilic manner with integrins through the RGD motif. To date, the functional roles of cadherins in platelet-cancer cell interactions have not yet been investigated. We hypothesize that cadherin 6 could be involved in the interactions of platelets with colorectal cancer cells. Flow cytometry analysis confirmed that platelets expressed cadherin-6. We also observed that HT29 cancer cells expressed cadherin (**Figure 2E**). The expression of cadherin-6 by HT29 was further confirmed by immunofluorescence (**supplemental Figure 2A**), RT-PCR (**Figure 2F**) and gene sequencing (**supplemental Figures 2B and 2C**). When using a Cadherin 6 blocking antibody or the RGDV peptide, the interactions between platelets and cancer cells in the static (**supplemental Figure 3**) and dynamic conditions were reduced by 46% and 21%, respectively. When both the homophilic and heterophilic cadherin 6 interactions were blocked, the interactions between platelets and cancer cells were reduced by 76% in comparison to the control (**Figure 2G**). Taken together, these data indicate that in the absence of plasma, the interactions of colorectal cancer cells with single platelets are mainly cadherin-6 dependent.

The interaction of platelets with cancer cells induced the generation of microparticles detected in patients with colorectal cancer.

During the first 30 minutes following the interactions of single platelets with colorectal cancer cells, we did not observe any changes in the platelet morphology. However, starting at 60 minutes postinteraction, nondiscoid platelets with an area greater than $10 \mu\text{m}^2$, corresponding to spread platelets, were detected on the surface of cancer cells (**Figure 3A**). The number of spread platelets detected increased over time to reach a maximum of 42% spread platelets at 120 minutes postinteraction (**Figure 3B**). Interactions of platelets with cancer cells also led to the generation of microparticles. The generation of platelet-derived microparticles (PMPs: Annexin V and CD41 positive; EPCAM negative) present in the supernatant following the interaction of platelets with cancer cells was observed 60 minutes postinteraction and was significantly increase at 360 minutes to reach 2000 MPs/ μL . This generation of PMPs was not due to the apoptosis of platelets since, in absence of cancer cells, control platelets generated fewer than 100 MPs/ μL at 360 minutes (**Figure 3C, left panel**). Tumor-derived microparticles (TMPs: Annexin V and EPCAM positive; CD41 negative) were also detected at a concentration of 420 MPs/ μL following 360 minutes of interaction between platelets and cancer cells. In this case, however, the number of microparticles was not significantly different from the number of microparticles detected in the absence of platelets (**Figure 3C, middle panel**), mainly because the tumor cells constantly generated microparticles, even in the absence of an agonist (data not shown). Interestingly, the interaction of platelets with tumor cells also led to the production of microparticles expressing both CD41 and Epcam at their surface (T+PMPs). We exclude that T+PMPs were MPs aggregates by performing serial dilutions of the sample (data not shown). The production of these MPs reached 200 MPs/ μL at 360 minutes (**Figure 3C, right panel**) but was undetectable when Cadherin-6 was blocked (data not shown). We concluded that the interactions of platelets with cancer cells induced the production of 3 different types of

MPs: 76% PMPs, 16% TMPs and 8% T+PMPs, the latter expressing markers of both platelets and cancer cells. We named these MPs (PMPs, TMPs and T+PMPs) iMPs, for platelet- and tumor cell-interacting microparticles.

We next determined if the T+PMPs could be detected at the surface of cancer cells interacting with platelets by confocal microscopy. As illustrated in **Figure 3D**, vesicles expressing Annexin V, CD41 and Epcam were identified on the surface of cancer cells interacting with platelets. Spread platelets, by secreting their granule contents into the cancer cells, might have induced a membrane redistribution that was involved in the production of T+PMPs. To test this hypothesis, we first injected fluorescent fibrinogen into a recipient mouse. After 1 day, platelets isolated from this mouse were isolated and found to express fluorescent fibrinogen in their granules (**Figure 3E**). Following interactions with tumor cells, a signal corresponding to fluorescent fibrinogen was detected in the cancer cells apart from the platelets (**Figure 3F**), which indicated that platelet granule contents were indeed released into the cancer cells and, consequently, that the platelet and cancer cell membranes were fused.

We next determined if iMPs—and more precisely, T+PMPs—are indeed generated in patients with colorectal cancer. The presence of microparticles expressing both Epcam and CD41 was detected in the plasma of all 13 patients studied, with concentrations ranging from 20 to 257 and a median of 70 microparticles/ μ L of plasma (**Figure 3G**). These Epcam and CD41 positive microparticles were also detected in the tumor microenvironment by immunofluorescence of human colorectal tumors (**Figure 3H**).

Altogether, these results indicated that following their interactions with cancer cells, the platelets spread, released their granules into the cancer cells and secreted microparticles. The fusion of platelet and cancer cell membranes led to the production of

iMPs, including microparticles expressing markers of platelets and cancer cells. These iMPs were present in the plasma of patients with colorectal cancer.

The generated iMPs recruited monocytes and contained two cytokines (IFN-gamma and IL-4) involved in activating the tumoricidal functions of macrophages.

To determine the role of iMPs, we primed mouse colorectal cancer cells (CT26GFP/Luci) with platelets before injecting them into the right flank of wild-type mice. When we compared the size of the tumors in the presence or absence of platelets, we observed, starting at day 18, that the tumor volumes were significantly lower in the group of mice that received CT26GFP/Luci cells primed by platelets than in the control group (**Figure 4A**). These results were confirmed by bioluminescence. The bioluminescent signal corresponding to the quantity of CT26GFP/Luci at day 28 was significantly lower in the group of mice that received CT26GFP/Luci cells interacting with platelets than in the control group (**Figure 4B**). When Cadherin 6 was blocked from cancer cells using shRNA (**Figures 4C and 4D**), the priming of the cancer cells with platelets no longer affected the growth of the tumor (**Figure 4E**), indicating that cadherin 6-dependent interactions of platelets with cancer cells were involved in the decreased tumor size observed. When comparing the cellular composition of the primary tumor in the presence or absence of platelets, no difference was observed in the presence of intratumoral neutrophils in the two groups of mice (data not shown). However, a F4/80 fluorescent signal corresponding to the presence of macrophages in the tumor was significantly higher in the tumor microenvironment of mice injected with CT26GFP/Luci cells primed by platelets than in the control mice (**Figure 4F**). Using a transwell assay, we observed that monocytes transmigrated from the upper to the lower chamber when the supernatants of platelets interacting with cancer cells or when purified iMPs were

present in the lower chamber. By contrast, the supernatants from platelets alone or cancer cells alone and containing PMPs and TMPs, respectively, were significantly less effective than iMPs in attracting monocytes (**Figure 4G**).

Taken together, these results indicate that iMPs produced following cadherin 6-dependent interactions of platelets with cancer cells were able to attract and activate monocytes, whereas PMPs or TMPs alone could not. These results strongly suggest that the subpopulation of T+PMPs were directly involved in this process.

To determine how iMPs attract macrophages at the site of a primary tumor, we next performed a cytokine array on the supernatant of platelets alone (Platelets SN), cancer cells alone (HT29 SN), on the supernatant of interacting platelets and cancer cells (iSN) and on purified iMPs (**Figure 4H**). The quantity of RANTES and MIF, two cytokines known to be involved in the recruitment of leucocytes, was approximately 6-fold greater in the supernatant of interacting platelets and cancer cells and in iMPs than that detected in the supernatant of platelets alone. Of note, only one cytokine, MIF, was detected in the supernatant of cancer cells, but again, at significantly lower levels than those detected in iMPs. Interestingly, various cytokines were only present in iMPs when the supernatant from platelet-cancer cell interactions was permeabilized. These cytokines included CXCL12 and CCL2 (involved in the attraction of leucocytes), IFN- γ and IL-4 (known to activate macrophages and to be involved in macrophage tumoricidal activity)¹⁷. These results indicated that cytokines contained in iMPs can attract macrophages (MIF, RANTES, CXCL12) and activate their tumoricidal capacity (IFN- γ and IL-4).

We next determined if platelets and macrophages could indeed affect cancer cell proliferation or the cell cycle. The interaction of platelets alone (**Figure 5A**) or monocytes alone (**Figures 5B**) with cancer cells did not induce the cleavage of the procaspase 3 in

cancer cells. Additionally, the percentage of apoptotic cancer cells, as attested by the percentage of Annexin V/7-AAD-positive cells, was not increased following interaction with platelets in comparison to camptothecin treatment (**Figure 5C**). Last, the expression of P21 (Waf1/Cip1) was unchanged in cancer cells after platelet interaction (**Figures 5D and 5E**). However, the interaction of monocytes alone or monocytes plus platelets with cancer cells induced, the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor P21 (Waf1/Cip1) in a time-dependent manner (**Figures 5F and 5G**). A few studies have demonstrated that under certain circumstances, P21 (Waf1/Cip1) may exhibit oncogenic activities¹⁸. When platelets and monocytes were sequentially added to cancer cells, the expression of Rb phosphorylated at positions 807 and 811 in HT29 cancer cells was significantly decreased (**Figure 5H**). Taken together, these results indicated that in the tumor microenvironment, tumoricidal macrophages were recruited and activated by iMPs.

Platelets and iMPs facilitated the interaction of cancer cells with the endothelium.

Our results indicated that in the tumor microenvironment, platelets through the generation of iMPs and the recruitment of macrophages play an important role in reducing tumor growth. However, different studies, including ours, have demonstrated that activated platelets may participate in the process of metastasis. To understand this apparent discrepancy, we next studied the role of platelets in cancer cell-endothelium interactions, a key step involved in metastasis. We first investigated the adhesive properties of HT29 colorectal cancer cells to the endothelium in the presence of absence of platelet priming in dynamic conditions (4 dynes/cm²). As illustrated **Figure 6A**, compared to control levels, a ten-fold increase in the adhesion of cancer cells to the endothelium was observed when cancer cells were primed by platelets. Interestingly, during the priming, platelets were

released and transferred the integrin-positive subunit $\beta 3$ (CD61) to the cancer cells (**Figure 6B**), which might have participated in the interactions with the endothelium. Alternatively to this mechanism, a few studies have demonstrated that platelet-cancer cell interactions increases the migratory properties of cancer cells by inducing EMT. To determine if platelet interaction with HT29 colorectal cancer cells induced EMT, we assessed the expression of E-cadherin and Snail1, two known proteins involved in EMT. The presence of platelets interacting with cancer cells decreased the expression of E-cadherin and increased the expression of snail1 in a time-dependent manner (**Figure 6C**). We next investigated the ability of iMPs to prime the endothelium and facilitate the adhesion of cancer cells at the site of metastasis. Purified iMPs activated HUVEC cells, as attested by the significant increase in the expression of ICAM-1 at the surface of the endothelial cells (**Figure 6D**). In a dynamic assay, at 4 dynes/cm², purified iMPs, as well as the interaction supernatant, significantly increased the percentage of HT29 in interaction with HUVECs in comparison to the control (**Figure 6E**). Altogether these results indicate that platelets as well as iMPs (PMPs, TMPs and T+PMPS) may contribute to metastasis by favoring the interactions between cancer cells and the endothelium.

Discussion

The goal of our study was to determine the effects of platelet-cancer cell interactions on colorectal tumor behavior. We demonstrated that platelets are present in the tumor microenvironment of tumors, apart from the tumor blood vessels, and directly interact with colorectal tumor cells in a cadherin-6 dependent manner, independently of platelet aggregation. The interaction of platelets with colorectal tumor cells leads to platelet spreading and the generation of microparticles, named iMPs, involved in the recruitment and activation of tumoricidal macrophages in the tumor microenvironment and the adhesion of circulating cancer cells to the endothelium in the bloodstream. Our results indicate a paradoxical role of platelets. When present in the tumor microenvironment, platelets may favor the destruction of the primary tumor. However, when present in the bloodstream, platelet-cancer cell interactions may participate in the metastatic process.

The role of platelets and platelet activation in tumor growth has been subject to controversy in the literature. Some studies have demonstrated that the use of drugs that inhibit platelet activation, such as ticagrelor and clopidogrel, reduces tumor growth and metastasis *in vivo* in pancreatic cancer. Other studies performed on breast, colorectal and prostate cancer did not observe any effect of clopidogrel or prasugrel alone on the tumor growth^{19,20}. The activation of platelets might play different roles in tumor behavior and metastasis in different cancers. We previously reported that in pancreatic cancer, inhibition of platelets decreases tumor growth and metastasis. In this case, cancer cells strongly activate platelets, leading to TCIPA, which is mainly dependent on $\alpha_{IIb}\beta_3$ interactions and not cadherin-6. Here, in a colorectal model, we observed a paradoxical role of platelets. Platelets mainly interacted with the cancer cells through cadherin-6, independent of TCIPA. A deep

characterization of the role played by platelets depending on the type of cancer and its stage is needed before using antiplatelet drugs in the management of cancer and cancer-associated thrombosis.

The kinetics of platelet activation and spread on colorectal cancer cells was different from what is usually described, with the activation of platelets starting as late as 60 minutes following their interaction with cancer cells. A few years ago, Steele et al. demonstrated that the canonical Wnt/ β -catenin signaling components are present in platelets and negatively regulate platelet functions (including platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, platelet adhesion and spread, and dense granule secretion) by regulating small GTPase activity^{21,22}. Later, Maguire et al. demonstrated that platelet β -catenin is strongly associated with cadherin adherens junctions including cadherin-6²³. In sum, it is possible that the cadherin-6 dependent interactions between platelets and tumor cells are responsible for the absence of TCIPA and the observed kinetics of platelet spread through activation of the Wnt/ β catenin signaling pathway. Further studies will have to confirm this hypothesis and identify the signaling pathway downstream to the engagement of Cadherin-6 in platelets.

For a few years, platelets have been considered effectors of inflammation and immunity, mainly based on the fact that platelet α -granules contain a plethora of chemokines, including RANTES (CCL5), MIF, CCL-3 (MIP-1a), CXCL5 and CXCL12, which are all known to attract leukocytes in different pathological conditions such as bacterial infections and atherosclerosis^{24,25}. One study also suggests that platelets alone can exert directly cytotoxic effects on tumor cells¹². This cytotoxicity is dependent on the type of cancer cells used and requires an interaction between platelets and cancer cells when the platelets are

not artificially preactivated²⁶. Our results indicate that the cytotoxic effect of platelets on cancer cells is mainly due to the production of microparticles involved in recruiting and activating macrophages that facilitate cell cycle arrest via the induction of P21 in cancer cells. Further studies will determine if this pathway is specific to colorectal cancer or is also activated following the interaction of platelets with other types of cancers.

Numerous studies underline the effects of platelet microparticles (PMPs) on the recruitment and activation of monocytes. PMPs are described as a transcellular delivery system for RANTES and, through their internalization by monocytes, promote monocyte recruitment and activation. This process classically induces oxidative burst activation of monocytes and the release of proinflammatory cytokines such as TNF- α ^{27,28}. In accordance with these studies, we showed that iMPs (containing RANTES, MIF, CXCL-12, and the proinflammatory cytokine IFN- γ) that were released following platelet-tumor cell interactions increased the attraction of monocytes and that monocyte – platelet – tumor cell interactions induced cell cycle arrest *in vitro* and decreased tumor growth *in vivo*. Proinflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , are known to induce M1 macrophage polarization with strong tumoricidal activity²⁹. The next step will consist of characterizing the polarization of the tumoricidal macrophages in our model.

Recently, the notion of tumor-educated platelets has been highlighted and provides an interesting tool for cancer diagnostics³⁰. Indeed, platelet RNA-profile changes have been reported in several cancer types, including lung, prostate, glioma and breast carcinoma³⁰⁻³². The main way a tumor influences platelet RNA profiles is through the uptake of tumor-derived microvesicles³². Here, we demonstrated that platelets can also educate tumor cells via (i) the release of their alpha-granule contents into the tumor cells and (ii) the

microvesicle-dependent transfer of adhesive proteins, such as the $\beta 3$ -integrin subunit. These mechanisms lead to the induction of EMT and are responsible for the enhanced ability to interact with the endothelium. Moreover, the iMPs generated during platelet-tumor cell interactions are able to prime the endothelium and enhance the adhesion of tumor cells to the endothelium. These results are in accordance with the findings of Pasquier J and collaborators, who demonstrated an MP-mediated cross-talk between endothelial cells and tumor cells involved in the activation of endothelial cells and the formation of a prometastatic vascular niche³³. In the same way, the team of Janowska demonstrated that PMPs can transfer platelet-derived CD41 (α_{IIb} integrin) in six lung cancer cell lines, a mechanism called “platelet mimicry”, which is known to enhance the metastatic potential of cancer cells with an increased ability to adhere to endothelial cells^{34,35}. Additionally, it has been recently shown that PMPs can infiltrate solid tumors and suppress tumor growth mainly via the delivery of miR-24¹⁰. Thus, platelets (as well as iMPs) that are released in the bloodstream during cancer progression may contribute to the metastatic process by facilitating the interactions between tumor cells and the endothelium. Further investigations are necessary to evaluate the transfer of RNA mediated by the iMPs during platelet-tumor cell interactions and its effect on tumor growth.

Altogether, our results indicate that iMPs, by being present in the tumor microenvironment and by disseminating information (via cytokines and integrins) in the bloodstream, play an important role in the behavior of a tumor and may represent an interesting target to successfully treat colorectal cancer as well as a pertinent biomarker of cancer.

Methods

Mice: Wild-type Balb/cByJRj mice were obtained from Janvier Elevage and were housed under standard conditions. All the animal care and experimental procedures were performed as recommended by the European Community guidelines and were approved by local ethical committee number 14 (number 2018032713142114).

Antibody and reagents: Rabbit anti-cadherin6 IgG (GeneTex), rabbit anti-P21 IgG (Cell signaling), rabbit anti-caspase 3 IgG (Cell signaling), rabbit anti- β -actin IgG (cell signaling) and HRP-linked antibody anti-rabbit IgG (Cell Signaling) were used *in vitro* for Western blotting. PE-conjugated mouse anti-human CD29 (BD Bioscience), PE-conjugated mouse anti-human CD326 or Epcam (BD Bioscience), APC-conjugated mouse anti-human CD41 (Miltenyi Biotech), PE-conjugated mouse anti-human CD41, FITC-conjugated mouse anti-human CD14 (Beckman coulter) and appropriate isotype controls were used to perform flow cytometry experiments and immunofluorescence. Arg-Gly-Asp-Val (RGDV) and TRAP peptides were purchased from Polypeptide. Calcein green, Phalloidin 650 and isolectin IB4 AF 568 were purchased from Thermo Scientific. In some experiments, platelets were labeled with a DiD (1,10-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine) Vybrant™ Kit (Molecular Probes). MTT or (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and apyrase were purchased from Sigma-Aldrich. Prostacyclin I2 (PGI2) was obtained from Calbiochem Novabiochem. For *in vivo* experiments, a rat anti-mouse GPIb antibody Dylight X-649 (Emfret Analytics) was used as previously described³⁶.

Cell culture: A stable clone of murine colorectal cancer cells expressing GFP and luciferase named CT26GFP/Luci was obtained by infection of a CT26.WT cell line (ATCC® CRL-2638™) with

lentiviral particles (Amsbio LVP436-PBS) in the presence of polybrene (Life Technologies, 10 µg). A CT26GFP/Luci clone was selected and cultured in RPMI 1640 supplemented by 10% of decompemented FCS, 100 U/mL of penicillin, 100 mg/mL of streptomycin, 2 mM of glutamine, 0.1% fungizone and 0.02 mg/mL of blasticidin. Human pancreatic cancer cell line BxPC-3 (ATCC[®] CRL-1687[™]) was cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% decompemented FCS, 100 U/mL of penicillin, 100 mg/mL of streptomycin, 2 mM glutamine and 0.1% fungizone. Human colorectal cancer cell line HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) was cultured in McCoy's 5A medium supplemented by 10% decompemented FCS, 100 U/mL of penicillin, 100 mg/mL of streptomycin, 2 mM glutamine and 0.1% fungizone. The cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Knock down of cadherin-6 expression in the CT26.WT cell line

To knock down the expression of cadherin-6 in the CT26.WT cell line, a gene-specific silencing technique using short hairpin RNA was used. The 29-mer shRNA constructs in lentiviral GFP vector (four lentiviral clones targeting different sequences (A-, CATTTCCAAAGAGGACATCAGAGATAACA, B-CAGAGATAACATTGTTCAGTTACAACGACG, C-TGTTTGATGTCATCACCGACCAGGAAACC, D- GGCGACATACAGGCCACCAAGAGGCTGGA) in the coding regions of cadherin-6 gene) against Cdh6 and the control were purchased from Origene. Two stable clones, CT26 shRNAControl and CT26shRNAcdh6, were obtained by infection of the CT26.WT cell line by shRNA lentiviral particles in the presence of polybrene (Life Technologies, 10 µg) and were selected by puromycin 0.01 mg/mL. These two clones were selected based on the mRNA expression of cadherin-6 and their similar growth rate evaluated by an MTT assay.

Preparation of human washed platelets: Blood was collected from healthy volunteers. Blood samples were immediately treated by 200 *g* centrifugation at 37°C for 13 minutes to obtain PRPs (plasma-rich platelets). PRPs were then centrifuged at 900 *g* for 13 minutes at 37°C to obtain platelet pellets. The pellets were carefully resuspended in Tyrode/BSA buffer (138 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 10 mM Hepes, 2% BSA, pH 7.4) supplemented with apyrase (0.02 U/mL – Sigma-Aldrich) and prostacyclin (0.1 μM PGI₂). The platelets were washed twice in Tyrode/BSA buffer, and the washed platelets were resuspended in Tyrode/BSA buffer without apyrase nor prostacyclin. The washed platelets were kept at 37°C for 30 minutes at 37°C before use. The washed platelets were counted by flow cytometry using CytoCount beads (Dako).

Preparation of mouse washed platelets: Platelets were labeled *in vivo* by the intravenous injection of Dylight 647-conjugated rat anti-mouse GPIb antibody (1 μg/g) into anesthetized mice (100 mg/kg ketamine; 10 mg/kg xylazine; 0.25 mg/kg atropine). Blood was collected in a citrate solution (anticoagulant citrate dextrose solution: 85 mM trisodium citrate, 67 mM citric acid, and 111.5 mM glucose, pH 4.5) in the presence of 0.5 mM prostacyclin (PGI₂; Calbiochem- Novabiochem). Platelets were separated from freshly drawn blood by centrifugation at 450 *g* for 15 minutes at 37°C and washed twice in Tyrode buffer (138 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 1.8 mM CaCl₂, and 0.4 mM MgCl₂, pH 7.4) in the presence of 0.04 U/mL apyrase and 500 nM PGI₂. The washed platelets were counted by flow cytometry using CytoCount beads (Dako).

Purification of human monocytes: Blood was collected from healthy volunteers. Human FcR blocking reagents and human StraightFrom™ Whole Blood CD14 microbeads were added to

the whole blood according the manufacturer's instructions. Briefly, after incubation with the CD14 microbeads, blood cells were washed using separation buffer and centrifuged at 445 *g* for 10 minutes at room temperature. The magnetically labeled cells were resuspended in separation buffer and applied to the prepared whole blood column placed and equilibrated on the QuadroMACS (Miltenyi). After extensive washes, the whole blood column was removed from the separator, and the magnetically labeled cells were eluted using whole blood elution buffer. Finally, the eluted cells were centrifuged at 300 *g* for 10 minutes and resuspended in Hank's buffer with calcium and magnesium. The monocyte purity obtained by flow cytometry and based on CD45 and CD14 expression was always higher than 95%.

Interactions between colorectal tumor cells and platelets: To determine the consequences of platelet – cancer cell interactions, the kinetics of the interaction were measured at several end points (10, 30, 60, 120, 180 and 360 minutes). Briefly, 1.9×10^6 HT29 or 1.7×10^6 CT26GFP/Luci cells were seeded into 6-well plates (Thermo-Nunc) and allowed to adhere for 18 hours. Human or murine washed platelets were added to tumor cells (50:1 ratio of platelets to tumor cells) in an appropriate prewarmed FCS-free medium and kept at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. The interactions were stopped by extensive washes, and platelets in interaction with tumor cells were fixed in 2% paraformaldehyde or harvested to obtain total protein lysates for Western blotting. In the case of spreading experiments, nonadherent platelets were removed after 60 minutes of interaction by extensive washes, and then the appropriate prewarmed FCS-free medium was added at the next timepoints of the interactions.

Alternatively, interactions were performed in blocking conditions; platelets were incubated with either cadherin-6 blocking antibody (20 or 40 µg/mL), RGDV (100 µM) or both for 20

minutes before their contact with cancer cells. After 6 hours of interaction, supernatants (called iSN) were collected, cellular debris was removed by centrifugation, and finally, the samples were snap frozen and conserved at -80°C.

Purification of the iMPs contained in the iSN: iMPs were concentrated from iSN as previously described. Briefly, iSNs were centrifuged at 1000 *g* for 15 minutes. Then, the supernatants were centrifuged at 20 000 *g* for one hour, and the iMP pellet was resuspended in FCS-free McCoy's medium. iMPs were counted and analyzed by flow cytometry using a Gallios instrument and Kaluza software.

Characterization of circulating iMPs in the plasma of patients with colorectal cancer: A total of 13 patients who underwent surgery for colorectal cancer in the Digestive Surgical Department of Timone's Hospital (Marseille, France) were included in the study. Platelet-poor plasma containing MPs were obtained, as previously described³⁷. The circulating iMPs contained in the PPP samples were analyzed using a Cytoflex flow cytometry instrument. The iMPs were detected with a combination of FITC-conjugated Annexin V, a PC7-conjugated CD41 antibody and a PE-Dazzle-conjugated Epcam antibody. Data analyses were performed with Kaluza software for all the included patients.

Interactions between human colorectal tumor cells, platelets and monocytes: Interactions between HT29 and monocytes were performed in the presence or absence of platelets. Briefly, purified monocytes and platelets were added simultaneously to HT29 cells at a ratio of 1:100 (monocytes: platelets) in FCS-free prewarmed McCoy's 5A medium and kept at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 6 hours. Alternatively, in some experiments, the monocytes were added to the HT29 tumor cells after 6 hours of platelet-cancer cell

interactions for 6 hours. The interactions were stopped by extensive washes, and cancer cells were harvested for protein lysates and Western blotting.

Transwell assay: iSN, iMPs (15 million of total iMPs), and control supernatants were added to the lower chambers, and 50 000 calcein-green-labeled purified human monocytes were applied to the upper chamber. After 4 hours of incubation, the number of transmigrating monocytes was assessed by a tile scan of each well using a Leica DMI8 fluorescence microscope.

Interactions between HT29 cells and HUVECs under flow: HUVECs were seeded onto tissue-culture-treated microslides (Ibidi) and allowed to adhere for 18 hours under flow. HUVECs were treated or not treated with the iSN, iMPs, and control supernatant for 3 hours. Calcein-green-labeled HT29 cells were primed with or without platelets for 1 hour and then harvested and counted; 0.5×10^6 primed HT29 cells were then added to the perfusion set and allowed to interact with the endothelium monolayer at 4 dynes/cm^2 for 60 minutes. The noninteracting tumor cells were removed by extensive washes, and the endothelial cells were fixed using PFA 2%. HT29 cells interacting with HUVECs were analyzed and counted using a Leica DMI8 fluorescence microscope 20X objective in 20 fields per condition and per experiment.

Analysis of protein expression by flow cytometry: Cadherin-6 expression at the surface of HT29, CT26GFP/Luci, platelets (human and mice) was analyzed using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). The expression of Annexin V, CD41 and Epcam at the surface of the iMPs contained in the interaction supernatant was analyzed using a Gallios flow

cytometer (Beckman Coulter). The flow cytometry instrument settings and microparticles gating were performed with Megamix beads. Briefly, the interaction supernatants were incubated for 20 minutes with FITC-annexin V (Tau technology), PE anti-human Epcam and APC anti-human CD41. All the analyses were performed with Kaluza software.

Apoptosis analysis by flow cytometry: At the end points of the interactions (30, 60, 120 and 180 minutes), tumor cells were extensively washed, trypsinized and counted. Next, 2.5×10^5 cells were incubated with FITC-annexin V and PE anti-human CD41 (Biolegend) for 20 minutes. Five minutes before the end of the incubation time, 7-AAD was added to the cells. The 7-AAD/AnV positive cells were considered apoptotic cells. All the analyses were performed with Kaluza software.

Human cytokine array: Human cytokine arrays were performed according to the manufacturer's instructions with iSN and iMPs with or without permeabilized conditions (1% Triton X-100).

Ectopic syngenic colorectal cancer mouse model: Mice were anesthetized by 2% isoflurane gas. CT26GFP/Luci or CT26 shRNA cdh-6 clones and platelets, or Tyrode buffer were incubated for one hour. Colorectal cancer cells were washed extensively before their injection into the right flank of the mice (0.5×10^6 cells). Tumors were allowed to grow for 30 days and measured twice a week with an electronic caliper.

Immunohistochemistry of tumors: Mouse tumors were collected and stored in Optimal Cutting Temperature (OCT) glue at -80°C . Four micrometer OCT glue-embedded tumors sections were mounted on slides and submitted to labeling by different antibodies. Frozen

acetone-fixed tissue slides containing 5-10 μm sections from human poorly differentiated colorectal adenocarcinoma were purchased from BioChain and stained with different antibodies. Tumor sections were analyzed by confocal microscopy using a BX61 Olympus microscope coupled with CSU-X1 (Yokagawa).

Statistics: For *in vitro* experiments and tumor volume measurement, significance was determined using a two-tailed Mann-Whitney t-test. The differences were significant at $p < 0.05$.

Data availability : All the relevant data are available from the authors.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

TF and TFPI activity assay: A chromogenic assay (Actichrome TF and TFPI activity assay; American Diagnostica) was used to analyze TF and TFPI activity according the manufacturer's instructions. The absorbance was read at 405 nm with a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific). The TF and TFPI concentrations were determined by interpolation from a standard curve constructed using different amounts of lipidated TF and TFPI standards.

Platelet aggregation: The aggregatory potential of the human HT29 colorectal and BxPC-3 pancreatic-cancer cell lines (0.5×10^6 cells) were tested as previously described by Thomas and collaborators. Positive controls were performed in the presence of 25 μM TRAP. Negative controls were performed in the presence of 10 μM ADP (Helena Bioscience).

RT-PCR: The cadherin-6 mRNA was detected by RT-PCR (Promega) in the CT26GFP/Luci clone and in a kidney extract as a positive control. The custom primers (F-

ACAATGCCCCAGAGTTTGCT; R-TGACATCCGTGTTGTCACGAG) were purchased from Invitrogen.

PAGE and Western blotting: SDS-PAGE (on 7% or 15% polyacrylamide gels) and Western blotting were performed as previously described⁵.

Bibliography

1. Mezouar, S. *et al.* Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: Experimental and clinical evidences. *Thromb. Res.* **139**, 65–76 (2016).
2. Liu, Y. *et al.* Tissue factor-activated coagulation cascade in the tumor microenvironment is critical for tumor progression and an effective target for therapy. *Cancer Res.* **71**, 6492–6502 (2011).
3. Rickles, F. R. & Falanga, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res.* **102**, V215-224 (2001).
4. Ruf, W., Yokota, N. & Schaffner, F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb. Res.* **125**, S36–S38 (2010).
5. Mezouar, S., Darbousset, R., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L. & Dubois, C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis *in vivo*. *Int. J. Cancer* **136**, 462–475 (2015).
6. Gebremeskel, S., LeVatte, T., Liwski, R. S., Johnston, B. & Bezuhly, M. The reversible P2Y₁₂ inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. *Int. J. Cancer* **136**, 234–240 (2015).
7. Rothwell, P. M. *et al.* Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet Lond. Engl.* **379**, 1591–1601 (2012).
8. Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* **20**, 576–590 (2011).
9. Egan, K. *et al.* Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-

- angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PLoS One* **6**, e26125 (2011).
10. Michael, J. V. *et al.* Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood* **130**, 567–580 (2017).
 11. Wang, Y. & Zhang, H. Platelet-induced inhibition of tumor cell growth. *Thromb. Res.* **123**, 324–330 (2008).
 12. Ibele, G. M., Kay, N. E., Johnson, G. J. & Jacob, H. S. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* **65**, 1252–1255 (1985).
 13. Stone, R. L. *et al.* Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 610–618 (2012).
 14. Li, R. *et al.* Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. *BMC Cancer* **14**, 167 (2014).
 15. Haemmerle, M. *et al.* FAK regulates platelet extravasation and tumor growth after antiangiogenic therapy withdrawal. *J. Clin. Invest.* **126**, 1885 (2016).
 16. Dunne, E. *et al.* Cadherin 6 has a functional role in platelet aggregation and thrombus formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1724–1731 (2012).
 17. Suk, K., Somers, S. D. & Erickson, K. L. Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN-gamma differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology* **80**, 617–624 (1993).
 18. Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 400–414 (2009).
 19. Denslow, A. *et al.* Clopidogrel in a combined therapy with anticancer drugs—effect on tumor growth, metastasis, and treatment toxicity: Studies in animal models. *PLOS ONE* **12**, e0188740 (2017).
 20. Serebruany, V. L. Platelet Inhibition with Prasugrel and Increased Cancer Risks:

Potential Causes and Implications. *Am. J. Med.* **122**, 407–408 (2009).

21. Steele, B. M. *et al.* Canonical Wnt signaling negatively regulates platelet function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19836–19841 (2009).
22. Steele, B. M. *et al.* WNT-3a modulates platelet function by regulating small GTPase activity. *FEBS Lett.* **586**, 2267–2272 (2012).
23. Maguire, P. B. *et al.* Proteomic Analysis Reveals a Strong Association of β -Catenin with Cadherin Adherens Junctions in Resting Human Platelets. *PROTEOMICS* (2018).
doi:10.1002/pmic.201700419
24. Schrottmaier, W. C., Kral, J. B., Badrnya, S. & Assinger, A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb. Haemost.* **114**, 478–489 (2015).
25. Wirtz, T. H. *et al.* Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis* **239**, 1–10 (2015).
26. Sagawa, T., Tominaga, A., Kodama, T. & Okada, M. Cytotoxicity of unstimulated and thrombin-activated platelets to human tumour cells. *Immunology* **78**, 650–656 (1993).
27. Mause, S. F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R. R. & Weber, C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1512–1518 (2005).
28. Vasina, E. M. *et al.* Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release. *Am. J. Blood Res.* **3**, 107–123 (2013).
29. Bekisz, J. *et al.* Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **33**, 154–161 (2013).
30. Best, M. G. *et al.* RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-

Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* **28**, 666–676 (2015).

31. Calverley, D. C. *et al.* Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer. *Clin. Transl. Sci.* **3**, 227–232 (2010).
32. Nilsson, R. J. A. *et al.* Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* **118**, 3680–3683 (2011).
33. Pasquier, J. *et al.* Microparticles mediated cross-talk between tumoral and endothelial cells promote the constitution of a pro-metastatic vascular niche through Arf6 up regulation. *Cancer Microenviron.* **7**, 41–59 (2014).
34. Janowska-Wieczorek, A., Marquez-Curtis, L. A., Wysoczynski, M. & Ratajczak, M. Z. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion (Paris)* **46**, 1199–1209 (2006).
35. Janowska-Wieczorek, A. *et al.* Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer* **113**, 752–760 (2005).
36. Darbousset, R. *et al.* P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* **124**, 2575–2585 (2014).
37. Mege, D. *et al.* The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. *Int. J. Cancer* **138**, 939–948 (2016).

Acknowledgements: We would like to thank Dr Pierre-André Jarrot and Pascal Weber for their technical assistance.

Author Contributions: Christophe Dubois conceived the project and directed the study. Diane Mege, Françoise Dignat-George and Laurence Panicot-Dubois helped to conceive the project and directed the study respectively. Walid Ezzedine performed the flow cytometry experiments on the plasma from patients suffering of colorectal cancer. Lydie Crescence and Stephane Robert contribute to the technical assistance during the study. Léa Plantureux performed all the others experiments.

Competing Interests statement: The authors declare no competing interests.

Figure Legends

Figure 1. Platelets are present apart from blood vessels in the tumor microenvironment of mouse and human colorectal tumors. **A.** Representative images of the presence of extravasated platelets in the microenvironment of mouse colorectal tumors. Four-micrometer colorectal tumor sections were stained with the indicated antibodies. The tumor microenvironment is depicted in green (T26GFP/luci), with isolectin B4 in yellow and GPIb- α in red. Confocal microscopy, 60X. **B.** Representative images showing the colocalization of platelets and cancer cells (white). **C.** Representative images showing differential platelet extravasation into the tumor periphery in comparison to the tumor center (**upper panel**). The tumor localization was confirmed by HIF-1 α staining (red), representative of the degree of hypoxia (**lower panel**). Confocal microscopy, 60X. **D.** HIF-1 α positive staining area expressed in μm^2 in the tumor periphery and in the tumor center. The data are presented as the mean value \pm SD (p-value: 0.0072; n=3) **E.** Percentage of the fluorescent signal corresponding to platelet extravasation into the tumor center versus the tumor periphery. The data are presented as the mean value \pm SEM (p-value<0.0001; n=3) **F.** Representative images of extravasated platelets in the microenvironment of human colorectal tumors. Frozen tissue slides containing 5 μm sections from a poorly differentiated colorectal human adenocarcinoma were stained with the indicated antibodies. CD41 is depicted in red, and CD31 is shown in green. Confocal microscopy, 60X. All the experiments were performed at least three times. Quantifications were performed in 10 fields per experiment using SlideBook 6.0 software. Two-tailed Student's t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001.

Figure 2. Interactions of platelets with colorectal tumors are cadherin-6 dependent. A.

Representative images of platelet-HT29 cell interactions at 10, 30 and 60 minutes. DiD-stained human washed platelets (hWPs) were added to calcein-green-stained HT29 cells at a ratio of 50:1 (platelets: cancer cells) for 10, 30 and 60 minutes. Calcein green HT29 cells are depicted in green (left), and DiD-stained hWPs are shown in red (middle); merged image (right). Bars – 50 μ m. B. Graph representing the mean number (+/- SD) of DiD-positive platelets in interaction with HT29 cells / field, with 10 fields analyzed per experiment (p-value<0.05; n=3) C. Representative images showing the DiD-stained hWP and calcein-green-stained HT29 cell interaction after 60 minutes of interaction under dynamic conditions (6 dynes/cm²) (**upper panel**). Representative images showing the absence of an interaction between DiD-stained hWPs (red) and Hoechst 33342-stained endothelial cells (HUVEC-blue) after 60 minutes under dynamic conditions (6 dynes/cm²) (**Lower panel**). D. The graph depicts the mean number (+/-SD) of DiD-positive platelets/field in interaction with HT29 cells or HUVECs. (p-value<0.001; n=3) E. Expression of cadherin-6 on HT29 cells and hWP assessed by flow cytometry using indirect immunostaining with an unconjugated anti-human cadherin-6 IgG antibody (10 μ g/mL) and AF649-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (5 μ g/mL). Cadherin-6-specific staining (green); matched isotype control (red). F. RT-PCR using SSVI retrotranscriptase and cadherin-6 forward and reverse primers on total extracted RNA from HT29 cells and Mo59K human malignant glioblastoma cells (ATCC[®] CRL-2365[™], positive control). G. Cadherin-6 inhibition decreases the interaction of hWPs with HT29 cells. The hWPs were incubated with blocking antibody against cadherin-6 (40 μ g/mL) and/or RGDV (100 μ M) or control IgG (40 μ g/mL) for 20 minutes before their addition to the HT29 cells in dynamic conditions (6 dynes/cm²). The results are expressed as the mean

percentage of the interaction between the hWPs and HT29 cells in blocking conditions in comparison to the control after 60 minutes of interaction +/- SD. (p-value<0.05; n=4).

Quantifications were performed on 10 fields per experiment using ImageJ software. Two-tailed Student t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001. hWPs: human washed platelets; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells.

Figure 3. The interaction of platelets with tumor cells induces the generation of

microparticles. A. Representative images of hWP spreading on HT29 cells. CD41 (red), CD29 (green). Confocal microscopy, 100X. **B.** Quantification of platelet spreading. The results are presented as the mean percentage value of spread platelets relative to the total number of platelets +/- SD (n=4). Spread platelets were defined by their form (nondiscoid platelets) and their area (above 10 μm^2). **C.** Quantification of the generation of microparticles (MPs). The results are expressed as the mean concentration of the MPs released in the supernatant of the interaction (iSN) in MPs/ μL at different timepoints +/- SD (n=4); left panel: Annexin V+ CD41 + and Epcam- microparticles (Platelet microparticles, PMPs); medium panel: Annexin V+ CD41- and Epcam+ microparticles (Tumor cell derived MPs, TMPs) and right panel: Annexin V+ CD41+ and Epcam+ microparticles (T+PMPs). **D.** Representative images showing the formation of iMPs at 6 hours. CD41 is shown in red, Epcam in blue, AnV in green, and colocalization in white. Confocal microscopy, 100X. **E.** Flow cytometry characterization (left) and immunofluorescence (right) of fibrinogen (FGN)-positive washed platelets 24 hours after the intravenous injection of AF488-conjugated FGN in a recipient mouse. FGN is present in the platelet granules. CD41 is displayed in red. **F.** Representative images demonstrating the internalization of AF488 FGN in the tumor cells after 6 hours of interaction. CD29 is presented in blue and CD41 in red; the platelets were stained *in vivo* as previously described.

Leica microscope DMI8, 63X oil immersion; 0.2 μm stack conditions and Huygens deconvolution processing. **G.** Quantification of iMPs (AnV+, CD41+ and Epcam+ MPs) in blood from patients with colorectal cancer. **H.** Representative images demonstrating the presence of iMP in the microenvironment of human colorectal tumors. Frozen tissue slides containing 5 μm sections from a poorly differentiated, human colorectal adenocarcinoma. Right – crops corresponding to the white rectangular region. CD41, red; Epcam, green. Confocal microscopy, 60X. Two-tailed Student's t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001. hWP: human washed platelets.

Figure 4. Platelet-tumor cell interactions decrease tumor growth *in vivo* via the attraction of tumoricidal macrophages **A.** Tumor growth curve of platelet-primed colorectal tumors (CT26GFP/Luci + platelets) or control colorectal tumors (CT26GFP/Luci). Tumor volumes are expressed in mm^3 and are presented as the mean value +/- SD (p-value<0.05; n=6 per group). **B.** Bioluminescent signal of platelet-primed colorectal tumors (CT26GFP/Luci + platelets) or control colorectal tumors (CT26GFP/Luci) at day 28 expressed in photon/second/square centimetre/steradian (p-value<0.001; n=6 per group). **C.** RT-PCR using SSVI retrotranscriptase and cadherin-6 forward and reverse primers on total extracted RNA from the CT26 shRNA control and the CT26 shRNA cdh-6. **D.** Western blot analysis of the cadherin-6 protein expression on total protein lysates from the CT26 shRNA control and the CT26 shRNA cdh-6. **E.** Tumor growth curve of platelet-primed CT26 shRNA cdh6 and control CT26 shRNA. (ns; n=6 per group). **F.** Representative images showing macrophage infiltration (F4/80-positive cells) in the microenvironment of platelet-primed colorectal tumors (CT26GFP/Luci + platelets) and control colorectal tumors (CT26GFP/Luci). Four-micrometer tumor sections were stained by F4/80 antibody (red). Confocal microscopy, 60X

(left panel). The quantification of the fluorescent signal is represented on the right panel (p-value<0.01; n=3). **G.** Representative graph of the monocyte transwell assay in the presence of free FCS McCoy's v5A medium (medium control), 6-hour platelet supernatant control (Plts SN control), 6-hour HT29 supernatant control (HT29 SN control), TNF- α (100 U/mL), iSN and purified iMPs. The results are expressed as the mean percentage of transmigrating monocytes in comparison with that in the medium control (p-value<0.05; n=3) **H.** Quantification of cytokine and chemokine levels in the iSN and in the purified iMPs under permeabilized conditions (0.1% Triton X100) or nonpermeabilized conditions. The graph depicts the normalized level of cytokines relative to reference spots using ImageJ software. Two-tailed Student t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001. hWPs: human washed platelets; iSN: 6-hour hWP-HT29 interaction supernatant; iMPs: iSN-purified MPs.

Figure 5: Platelets and their MPs affect tumor cell proliferation in the presence of monocytes. **A.** Western blot analysis of the cleavage of caspase 3: noncleaved caspase 3 (35 kDa) and cleaved caspase 3 (17 and 12 kDa). The positive control was a treatment of HT29 cells with 200 μ M camptothecin (CPT) for 24 h. **B.** Western blot analysis of the cleavage of caspase 3 induced by monocytic interaction. **C.** Flow cytometry analysis of the apoptosis of HT29 cells. The graph depicts the mean percentage of AnV-positive and 7-AAD-positive HT29 cells at different times of interaction relative to the total number of analyzed HT29 cells +/- SD (p-value<0.05; n=3, Kaluza software). **D.** Western blot analysis of the P21 expression in total protein lysates from HT29 cells that interacted with hWPs. **E.** Relative protein expression level of P21 in HT29 cells at different times of interaction with hWPs +/- SD. (ns; n=3) **F.** Western blot analysis of the P21 expression in total protein lysates from HT29 cells that interacted with human purified monocytes, or human purified monocytes and hWPs.

Kinetic measurements of the interaction between human HT29 cells and human purified monocytes in the presence or absence of hWPs from the 60-minute timepoint to the 360-minute timepoint were performed. **G.** The relative protein expression level of P21 in HT29 cells at different times of interaction with human purified monocytes in the presence or absence of hWPs +/- SD. (p-value < 0.05; n=3) **H.** Western blot analysis of the PRb 807/811 expression in total protein lysates from HT29 cells that interacted with hWPs for 5 hours followed by 5 hours of interactions with purified human monocytes (top panel). The relative protein expression level is presented in the bottom panel (p-value<0.05; n=3, ImageJ software). Two-tailed Student's t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001.

Figure 6: Platelets and iMPs facilitate the interaction of tumor cells with the endothelium.

A. Left – Representative images of the HUVEC-HT29 tumor cell interaction in dynamic conditions (4 dynes/cm²). Calcein-green-stained HT29 cells (green), HUVEC monolayer (nuclei, blue). Right – The graph depicts the mean number of HT29 cells interacting with HUVECs/field +/- SD (n=3, 10 field/condition). **B.** Representative images of the β 3 integrin subunit (depicted in green), platelet vesicles (white arrow) and HT29 cells (F-actin in red). Confocal microscopy, 100X. **C.** Western blot analysis of E-cadherin and Snail-1 expression in total lysate proteins from HT29 cells that interacted with hWPs. **D.** ICAM-1 expression on HUVECs following 3 hours of control McCoy's 5A medium, iSN, iMPs, platelet control supernatant (cSN(Plts)) and HT29 control supernatant (cSN(HT29)) treatments. TNF- α (10 ng/mL) was used as a positive control for endothelial cell activation and degranulation. Endothelial cells were stained with Hoechst 33342 (nuclei, blue) and PE-conjugated ICAM-1 mouse IgG antibody (green). **E.** The graph depicts the mean percentage of HT29 cells interacting with the treated HUVEC monolayer in dynamic conditions (4 dynes/cm²) relative

to the control medium +/- SD. (p-value<0.01; n=3). Two-tailed Student t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001. hWPs: human washed platelets; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; iSN: 6-hour hWP-HT29 interaction supernatant; iMPs: iSN-purified MPs.

Figure 1

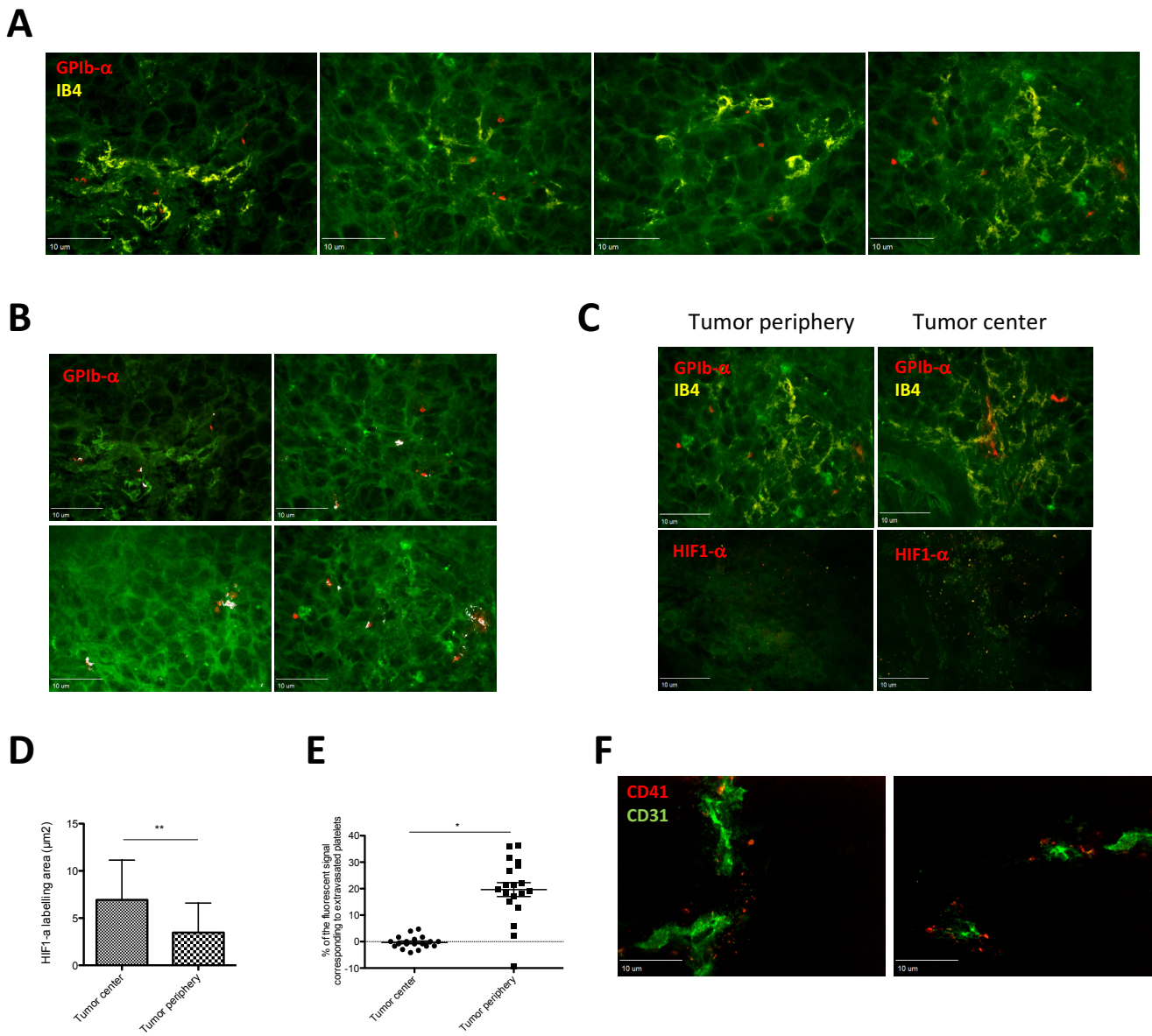


Figure 2

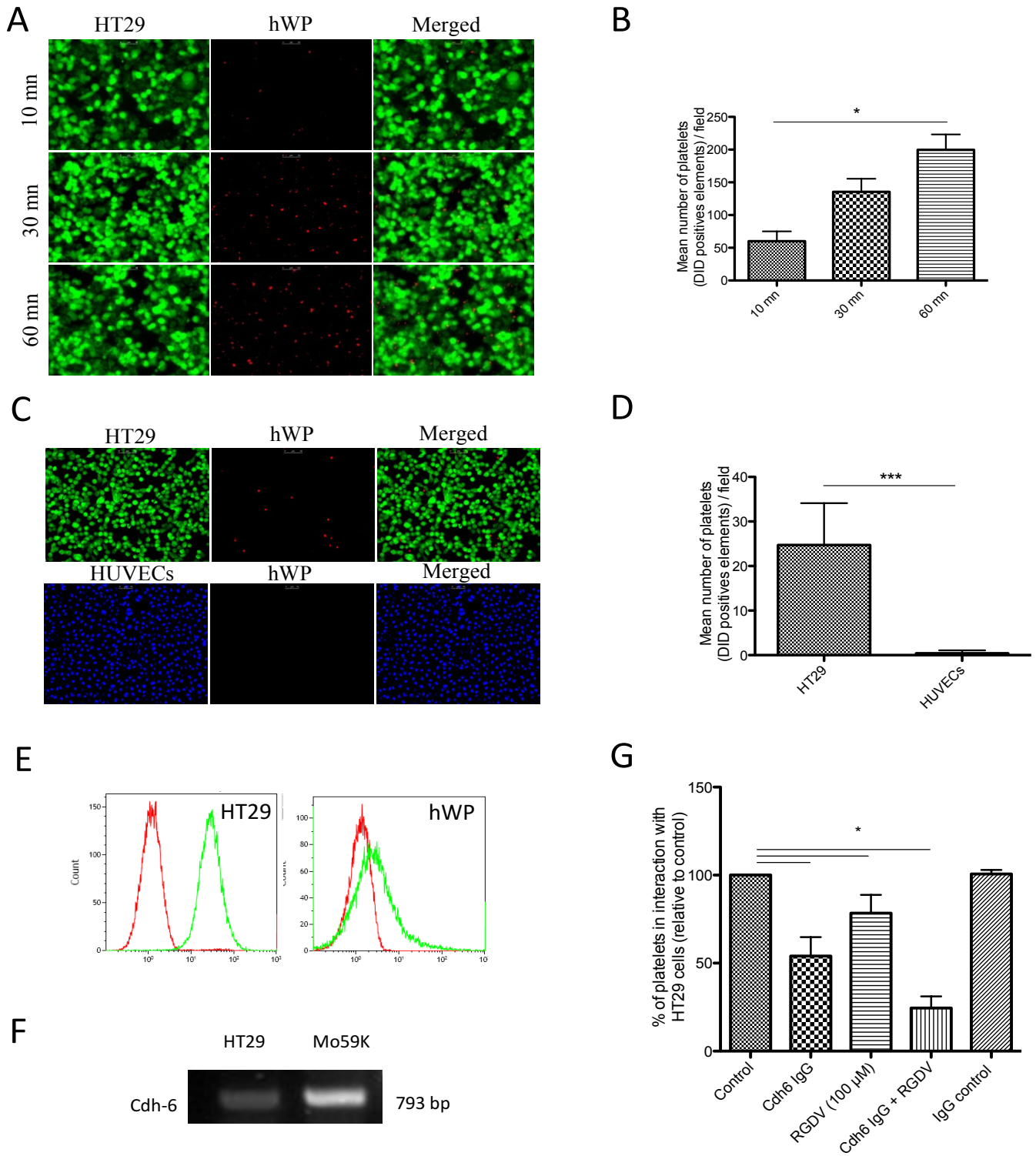
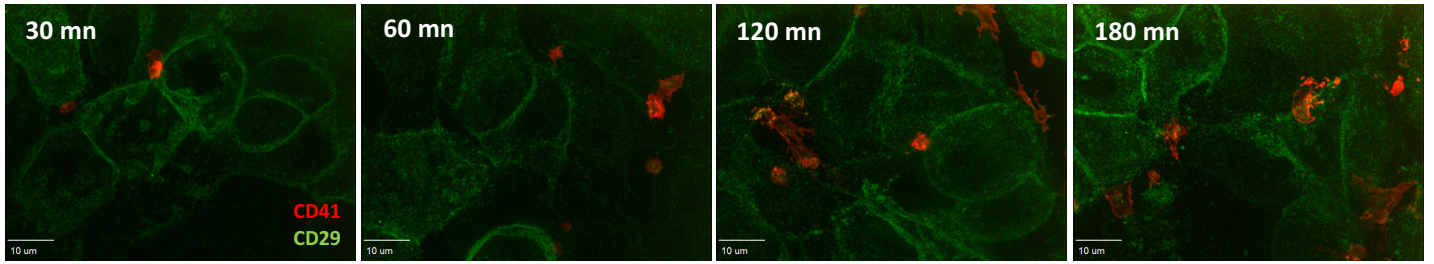
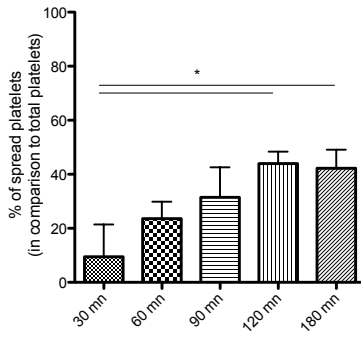


Figure 3

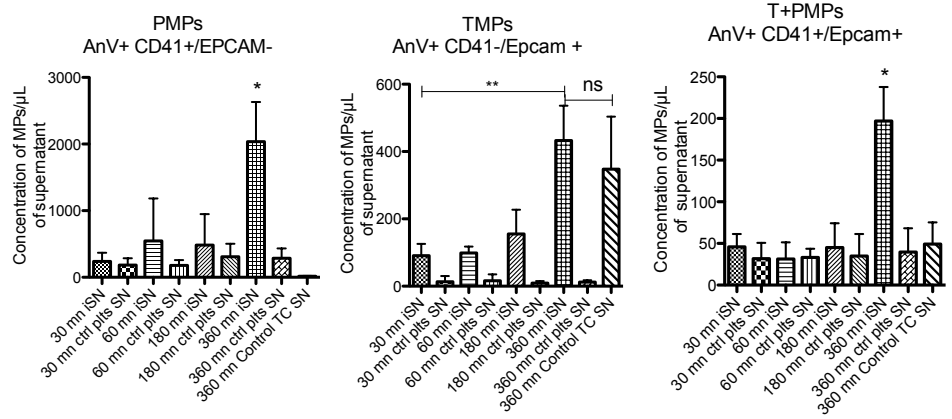
A



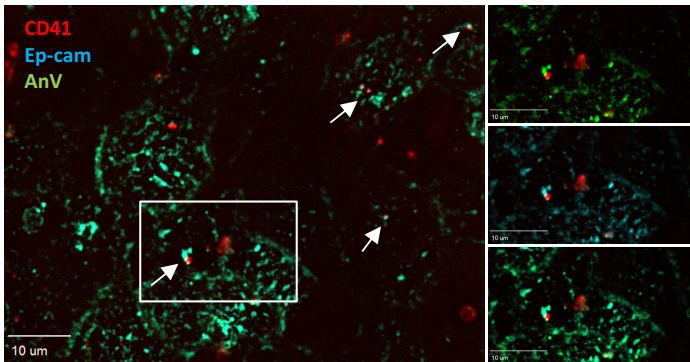
B



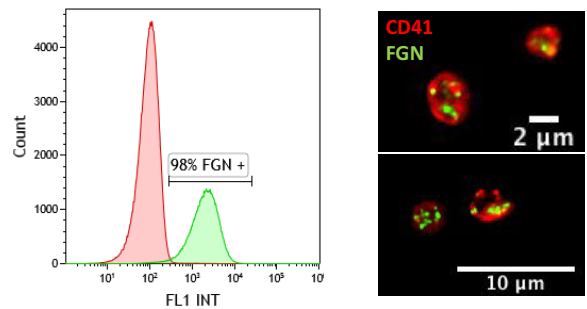
C



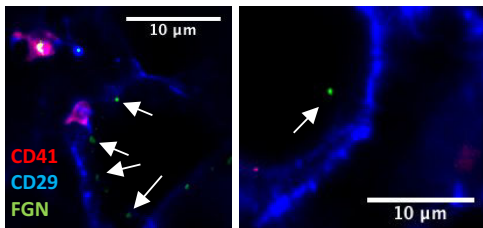
D



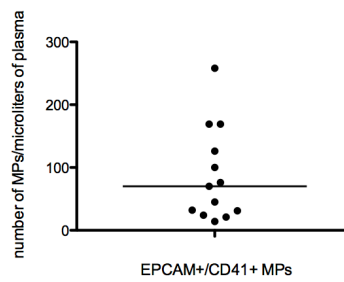
E



F



G



H

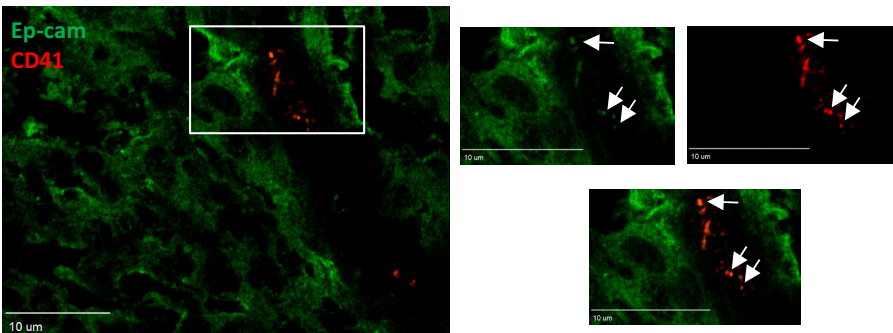


Figure 4

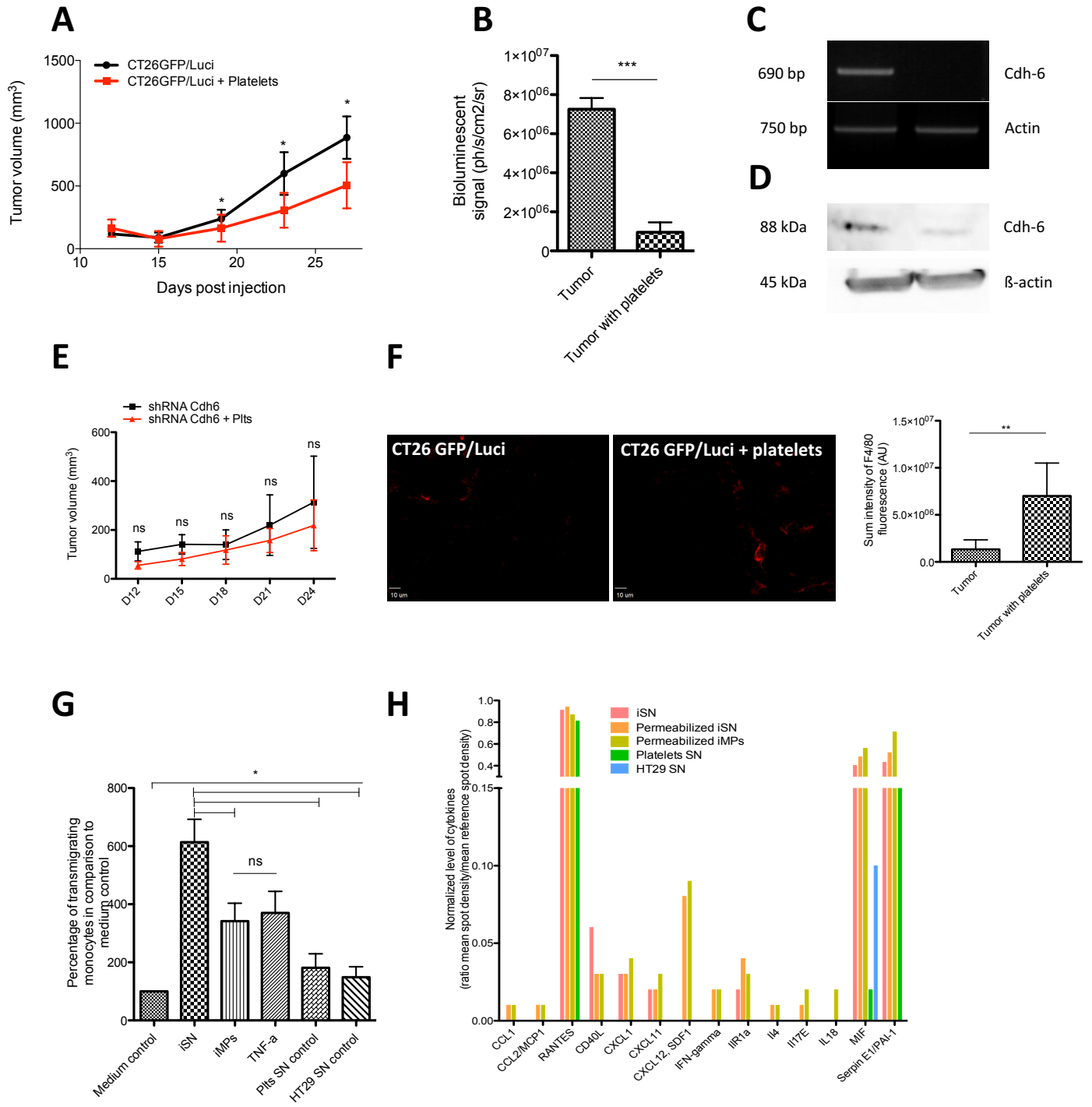


Figure 5

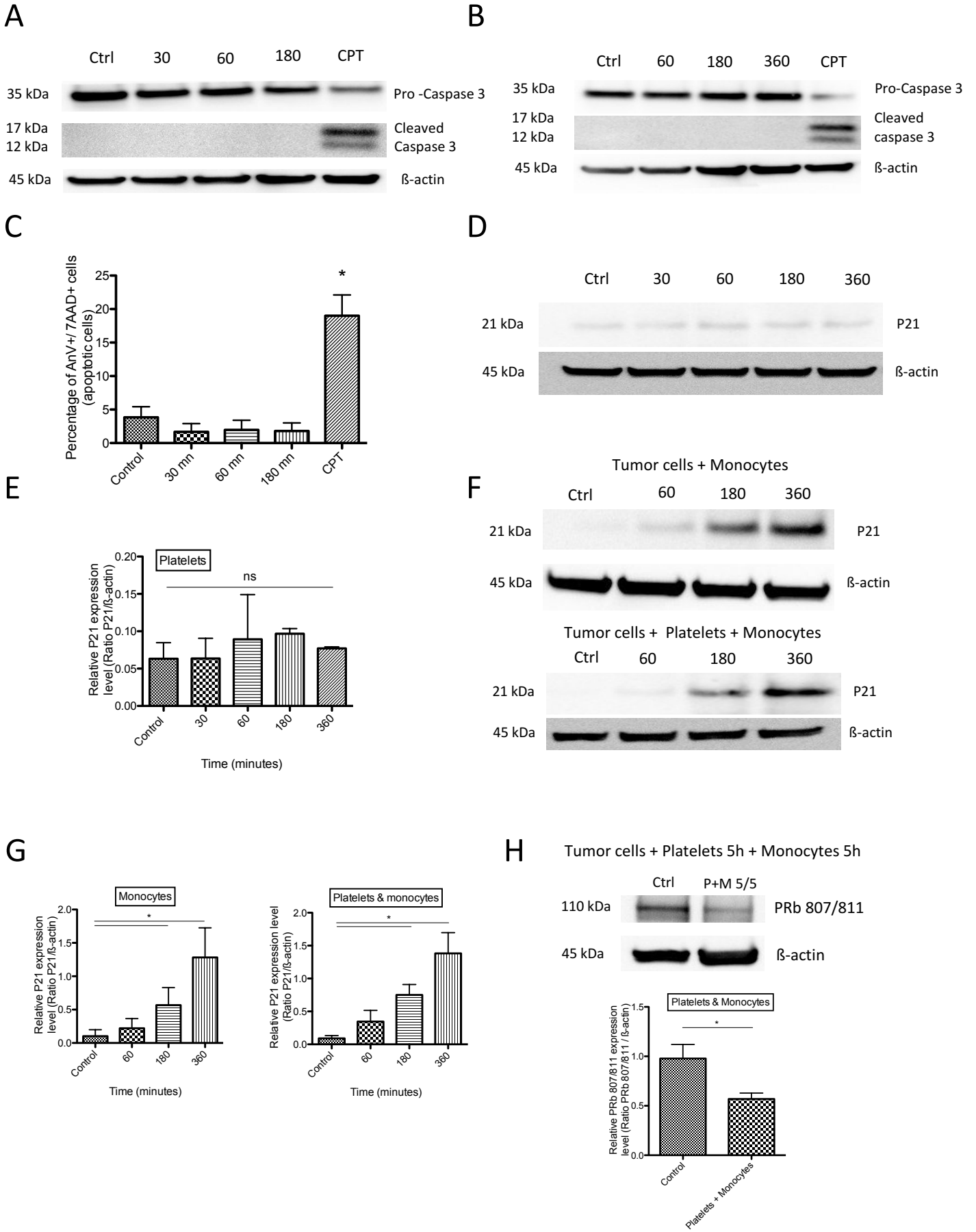
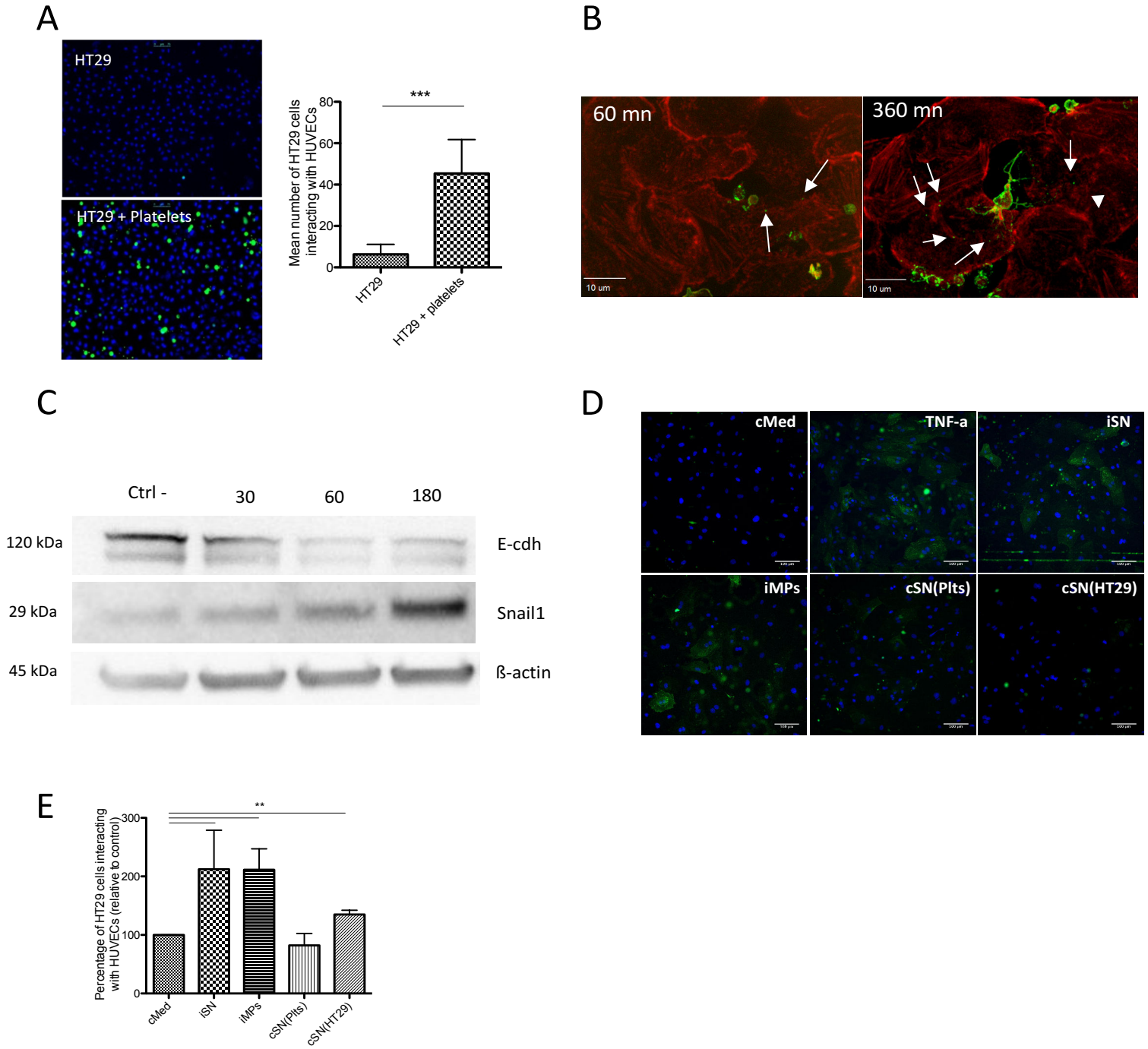
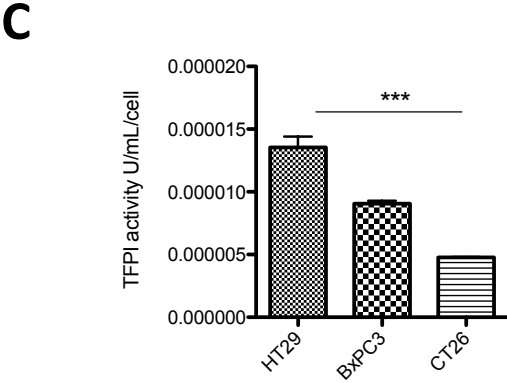
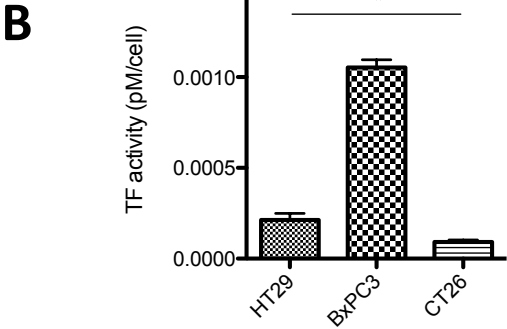
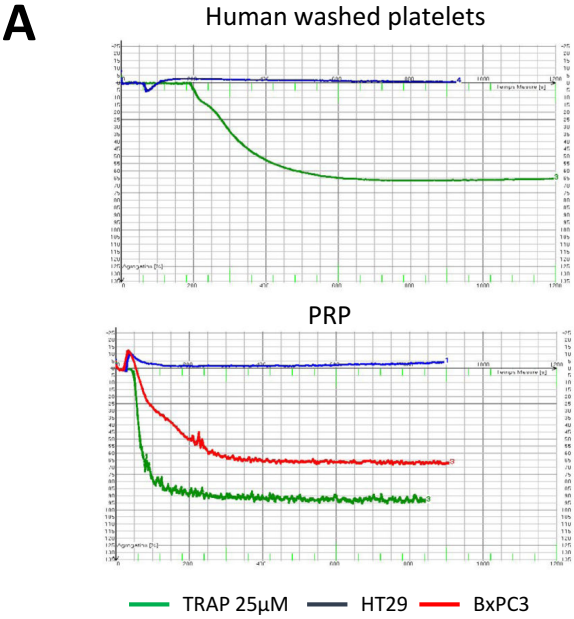


Figure 6

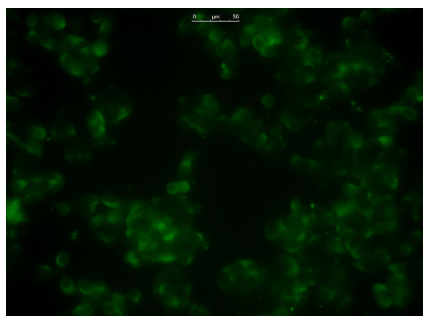


Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

A



B

↓

```

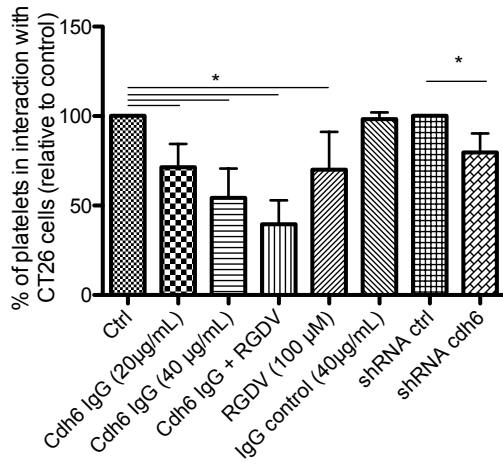
GGCCCTCATCCACCCACAGGGCTGAGCACAGGGGCTCTGGTGGCCATCCTTCTGTGCAT 60
  A L I H P T G L S T G A L V A I L L C
CGTGATCCTACTAGTGACAGTGGTGCTGTTTGCAGCTCTGAGGCGGCAGCGAAAGAAAGA 120
  I V I L L V T V V L F A A L R R Q R K K
GCCTTTGATCATTTCCAAAGAGGACATCAGAGATAACATTGTCAGTTACAACGACGAAGG 180
  E P L I I S K E D I R D N I V S Y N D E
TGCGGAGAGGAAGACACCCAGGCCTTTGATATCGGAACCCTGAGGAACCCTGAAGCCAT 240
  G G G E E D T Q A F D I G T L R N P E A
GGAGGACAGCAAATCGCGCAGGGACATTGTGCCTGAAGCTCTTTTCTACCCCGGCGGAC 300
  M E D S K S R R D I V P E A L F L P R R
TCCAACAGCTCGTGACAACACGGATGTGACAGATTTTCATTAACCAAAGGTTAAAGGAAA 360
  T P T A R D N T D V R D F I N Q R L K E
TGACACGGACCCAACAGCCCCCTCCTTACGACTCCTTGGCCACCTATGCCTACGAAGGCAC 420
  N D T D P T A P P Y D S L A T Y A Y E G
CGGCTCTGTGGCCGACTCCCTGAGCTCGCTGGAATCCGTGACCACGGATGGAGATCAAGA 480
  T G S V A D S L S S L E S V T T D G D Q
TTATGACTATTTGAGTGACTGGGGCCCTCGATTCAAAAAGCTGGCAGATATGTATGGAGG 540
  D Y D Y L S D W G P R F K K L A D M Y G
GATGGACAGTGACAAAGACTCC 561
  G M D S D K D S
    
```

C

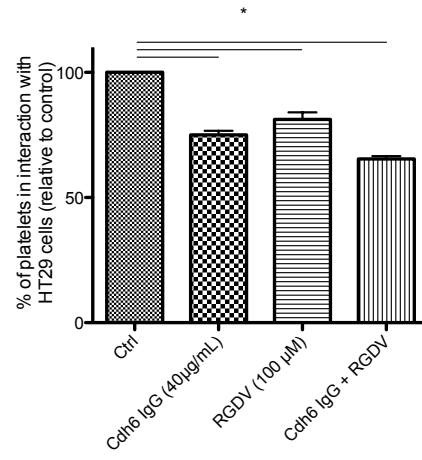
Cdh6	Number of sequenced Nt	Number of deduced AA	Identities	Range	NCBI sequence ID
cDNA	561		100%	1809 - 2369	BC107008.1
protein		187	100%	604-790	AAI07009.1

Supplemental Figure 3

A



B



Supplemental figure legends

Supplemental figure 1. The colorectal cancer cell lines HT29 and CT26GFP/Luci did not induce platelet aggregation.

A. Top. Representative graph of platelets aggregation on human washed platelets in presence of TRAP 25 μ M (green), or 0,5.10⁶ HT29 cells (blue). Bottom. Representative graph of platelets aggregation performed on plasma rich platelets (PRP) in presence of TRAP 25 μ M (green), or 0,5.10⁶ colorectal cancer HT29 cells (blue), or 0,5.10⁶ pancreatic cancer BxPC3 cells (red – positive control). **B.** TF activity of human colorectal cancer HT29 cell line, murine colorectal cancer cell CT26 GFP/Luci and human pancreatic cancer BxPC3 cell line. The datas are represented as mean value +/- SD in pM/cell (p-value < 0,05 ;n=3) . **C.** TFPI activity of human colorectal cancer HT29 cell line, murine colorectal cancer cell CT26GFP/Luci and human pancreatic cancer BxPC3 cell line. The datas are represented as mean value +/- SD in U/mL/cell (p-value < 0,001;n=3). All the experiments were performed at least three independent times. Two-tailed Mann-Whitney t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001.

Supplemental figure 2. Cadherin 6 expression by colorectal cancer cells HT29 and CT26.

A. Representative image of the expression of cadherin-6 on HT29 cells assessed by immunofluorescence using indirect immunostaining with an unconjugated anti-human cadherin 6 IgG antibody (10 μ g/mL) and AF488-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (5 μ g/mL). Cadherin-6 expression is depicted in green. Scale bar – 50 μ m **B.** Nucleotide and deduced amino acids sequence corresponding to mus musculus cadherin-6 in CT26 cell line. Total RNA was extracted from the CT26 cell line, followed by RT-PCR using

SSVI retrotranscriptase and cadherin-6 forward and reverse primers. The cDNA was then sequenced by sanger sequencing – myGATC biotec. **C.** Table containing the number of sequenced nucleotides and deduced amino acids, the percentage of identities with the cadherin-6 mRNA/protein, the position of the sequenced nucleotides and deduced amino acids in the NCBI sequence, and the NCBI sequence identity.

Supplemental figure 3. Involvement of the cadherin-6 in the interactions between murine (A) and human (B) platelets and colorectal tumor cells in static conditions.

A. Cadherin-6 inhibition significantly decreases the interaction of mice WPs (mWPs) with CT26GFP/Luci cells. The mWPs were incubated with blocking antibody against cadherin-6 (40 µg/mL) and/or RGDV (100 µM) or control IgG (40 µg/mL) for 20 minutes before their addition to the CT26GFP/Luci cells. The results are expressed as the mean percentage of the interaction between the mWPs and CT26GFP/Luci cells in blocking conditions in comparison to the control after 60 minutes of interaction +/- SD. (p-value<0.05; n=3). Quantifications were performed on 10 fields per experiment using ImageJ software. **B.** Cadherin-6 inhibition decreases the interaction of hWPs with HT29 cells. The hWPs were incubated with blocking antibody against cadherin-6 (40 µg/mL) and/or RGDV (100 µM) or control IgG (40 µg/mL) for 20 minutes before their addition to the HT29 cells. The results are expressed as the mean percentage of the interaction between the hWPs and HT29 cells in blocking conditions in comparison to the control after 60 minutes of interaction +/- SD. (p-value<0.05; n=3). Quantifications were performed on 10 fields per experiment using ImageJ software. Two-tailed Mann-Whitney t-test, * p-value<0.05; ** p-value<0.01*** p-value<0.001.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le but de cette étude était de déterminer la présence de plaquettes dans le microenvironnement des tumeurs colorectales ainsi que leurs rôles dans la croissance tumorale et la formation de métastases. A l'aide des deux lignées de CCR humaine HT29 et murine CT26GFP/Luci, et d'un modèle ectopique de cancer colorectal chez la souris Balb/c, nous avons pu mettre en évidence un rôle paradoxal des plaquettes dans la progression du cancer colorectal. En effet, dans le microenvironnement tumoral, l'interaction plaquettes-cellules cancéreuses induit la libération et la vectorisation de différents cytokines pro-inflammatoires capables d'attirer les macrophages et d'activer leur fonction anti-tumorale ce qui conduit à une diminution significative de la croissance tumorale *in vivo*. Au contraire, dans un contexte circulatoire, l'interaction plaquettes-cellules cancéreuses permet (i) d'augmenter les capacités d'invasions des cellules cancéreuses via l'induction de la TEM et (ii) d'augmenter leur adhésion à l'endothélium par le biais du transfert de la sous-unité d'intégrine $\beta 3$ et de l'activation des cellules endothéliales médiée par les iMPs.

Nous avons également montré l'implication des cadhérines dans les interactions plaquettes – cellules cancéreuses, et particulièrement celle de la cadhérine-6, ce qui n'avait jamais été décrit.

Dans cette discussion, nous allons reprendre point par point les résultats que nous avons obtenus dans l'ordre suivant :

- 1- Présence de plaquettes intra-tumorales et interactions plaquettes-cellules cancéreuses cadhérine-6 dépendantes
- 2- Rôles des plaquettes et des iMPs dans la croissance tumorale
- 3- Rôles des plaquettes et des iMPs dans la formation de métastases

1. Présence de plaquettes intra-tumorales et interactions plaquettes – cellules cancéreuses cadhérine-6 dépendantes

Dans cette étude, nous avons montré la présence de plaquettes extravasées au sein du microenvironnement de tumeurs colorectales humaines et murines. En effet, en réalisant des immuno-marquages sur des coupes de tumeurs humaines et murines, nous avons pu montrer la présence de plaquettes en dehors des vaisseaux marqués par de l'isolectine B4 dans le cas des tumeurs murines, et par un anticorps anti-CD31 (PECAM) dans le cas des tumeurs humaines. L'analyse de ces tumeurs par microscopie confocale montre que ces plaquettes sont en interaction directe avec les cellules cancéreuses au sein du microenvironnement. La présence de plaquettes extravasées au sein du microenvironnement tumoral a été décrite pour la première fois en 2012 dans un modèle murin orthotopique de cancer ovarien. Dans cette étude, les auteurs montrent la présence de plaquettes en dehors des vaisseaux au sein du microenvironnement tumoral, phénomène absent des tissus sains ou inflammés comme le péritoine, indiquant la spécificité de l'extravasation dans le microenvironnement tumoral ⁴⁸.

La quantification des plaquettes extravasées au sein des tumeurs murines, nous a permis de mettre en évidence que l'extravasation a lieu préférentiellement en périphérie de la tumeur, zone où la densité vasculaire et l'apport nutritif sont plus importants comme en témoigne le niveau d'hypoxie dans ces tumeurs. Cette observation est plutôt cohérente étant donné que les plaquettes s'extravasent des vaisseaux pour passer dans le tissu tumoral. De plus, l'étude de Li et collaborateurs réalisée en 2014 montre que les plaquettes intra-tumorales sont associées à la structure des vaisseaux et aux métastases ⁴⁷. En effet, dans des modèles murins de mélanome et de cancer du sein, la déplétion en plaquettes conduit à des fuites vasculaires via une altération de la densité et de la maturation des vaisseaux sanguins composants la tumeur et réduisant ainsi l'hypoxie de la tumeur. En l'absence de plaquettes, les taux intra-tumoraux des facteurs de croissance et pro-angiogéniques tels que le TGF- β et le VEGF respectivement, et des métalloprotéases impliquées dans la dégradation matricielle, telles que la MMP-2 et la MMP-9, sont significativement diminués comparativement aux tumeurs des souris contrôles. Dans leur modèle, la thrombocytopénie n'affecte pas la croissance tumorale mais réduit de manière significative le nombre de métastases pulmonaires. Les plaquettes sont riches en VEGF et en TGF- β . Le VEGF est un facteur pro-angiogénique très fort, dont l'action sur l'angiogénèse tumorale a été décrite dans de nombreux cancers, tels que le cancer colorectal, le cancer du sein, le cancer du poumon et le cancer ovarien, et a mené aux développements d'anticorps

thérapeutiques monoclonaux anti-VEGF et des inhibiteurs de tyrosine kinase^{260,261}. Dans ces modèles, les plaquettes intra-tumorales participent donc activement à l'angiogenèse locale au sein du microenvironnement.

Selon l'équipe du Dr Sood, l'extravasation des plaquettes est un processus actif et est dépendant de la protéine d'adhésion focale FAK, protéine régulatrice de la migration des plaquettes au sein du microenvironnement⁴⁹. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'arrêt des thérapies anti-angiogéniques dans un modèle de cancer ovarien est associé à une reprise accélérée de la croissance tumorale accompagnée d'une augmentation de l'hypoxie, de l'angiogenèse et de fuites vasculaires intra-tumorales. L'hypoxie induit la production d'ADP et augmente l'infiltration des plaquettes dans les tumeurs après la cessation de la thérapie. Au sein des souris dont les plaquettes sont déficientes en FAK comme des souris déplétées en plaquettes, la reprise de la croissance tumorale post cessation de thérapie anti-angiogénique est largement diminuée, indiquant un rôle essentiel des plaquettes extravasées dans ce rebond de croissance tumorale et l'implication de FAK dans l'extravasation des plaquettes. Par ailleurs, le Dr Cuiling Qi et ses collaborateurs ont montré que les plaquettes s'accumulent dans les tumeurs par un mécanisme dépendant de la P-sélectine. En effet, la déficience en P-sélectine ainsi que l'injection de P-sélectine soluble diminue significativement l'infiltration des plaquettes au sein de tumeurs issues de xénogreffes colorectales humaines et d'insulinome pancréatique spontané chez la souris Rip1-Tag2²⁶². Les tumeurs développées par les souris déficientes en P-sélectine dont l'infiltration plaquettaire est diminuée ont pour caractéristiques une diminution de la sécrétion de VEGF et de l'angiogenèse inhibant ainsi la croissance tumorale²⁶². Mécanistiquement la P-sélectine plaquettaire interagit via sa portion cytoplasmique avec la taline-1, interagissant à son tour avec la portion cytoplasmique de la sous unité d'intégrine β_3 ce qui active l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et recrute les plaquettes dans les tumeurs²⁶². Dans ces modèles, via la promotion de l'angiogenèse, les plaquettes intra-tumorales semblent donc supporter la croissance tumorale, contrairement à ce que nous observons *in vivo* dans notre modèle. Cependant nous n'avons pas comparé la densité vasculaire au sein de nos tumeurs contrôles et tumeurs ayant interagit avec les plaquettes. Il serait donc intéressant de déterminer le rôle de l'interaction plaquettes – cellules de CCR sur l'angiogenèse tumorale dans notre modèle. Pour ce faire, nous pourrions dans un premier temps, traiter des cellules endothéliales avec les surnageants d'interaction et les iMPs afin d'étudier *in vitro* leur prolifération, leur migration et leur capacité à former des tubes ; et dans un second temps, évaluer *in vivo*, la densité vasculaire et la maturation des vaisseaux grâce à un modèle de matrigel plug assay.

Au cours de notre étude nous avons démontré pour la première fois l'implication de la cadhérine-6 dans l'interaction plaquettes-cellules cancéreuses de CCR. En effet, l'inhibition de la cadhérine-6 par des anticorps bloquants ou l'extinction de son expression via des short-hairpin RNA, réduit significativement l'interaction des plaquettes avec les cellules cancéreuses de CCR humaines et murines *in vitro*, en condition statique et en condition dynamique. De plus, la diminution de la croissance tumorale induite par l'interaction plaquettes – CT26GFP/Luci est abolie lorsque l'expression de la cadhérine-6 est génétiquement supprimée. Cependant, l'interaction entre les plaquettes et les cellules de cancer colorectal n'est pas totalement inhibée lors du blocage de la cadhérine-6 indiquant que celle-ci n'est pas exclusive.

D'autres molécules d'adhésion ont été décrites pour participer à l'interaction plaquettes – cellules cancéreuses comme les intégrines, les sélectines et les mucines. Le Dr Karpatkin et ses collaborateurs furent les premiers auteurs à décrire l'implication des molécules d'adhésion dans l'interaction entre les plaquettes et les cellules cancéreuses *in vitro* et surtout dans la formation de métastases *in vivo*.

En effet, l'utilisation de RGDV et d'anticorps bloquants l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$, impliquée dans l'agrégation des plaquettes avec le fibrinogène et les cellules cancéreuses lors du TCIPA, induit une diminution de 60% de l'interaction entre plaquettes et cellules de cancers colorectaux humains et murins HCT8 et CT26 respectivement *in vitro* et réduit de 50% les métastases pulmonaires *in vivo*. Dans cette étude, l'utilisation d'aspirine à des doses inhibant l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP ou le collagène *ex-vivo*, n'a aucun effet sur les métastases pulmonaires. En revanche, la ticlopidine, un autre anti-plaquettaire, augmente significativement le nombre de métastases et la masse totale des tumeurs induites par les CT26²⁴⁷. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ exprimée à la surface des cellules tumorales, via sa liaison avec l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ a également été décrite pour participer à l'interaction plaquettes-cellules cancéreuses et est impliquée dans la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo*^{248,249,263,264}. Récemment, Mammadova-Bach et collaborateurs ont montré que l'intégrine plaquettaire $\alpha_6\beta_1$ interagit directement avec la molécule ADAM-9 exprimée par les cellules cancéreuses colorectales MC-38 et mammaires AT3. L'interaction dépendante de l' $\alpha_6\beta_1$ est responsable de l'activation des plaquettes, de la sécrétion de leurs granules et promeut l'extravasation des cellules cancéreuses dans les tissus pulmonaires²⁵⁰. Dans notre étude, l'inhibition des sous-unités d'intégrines β_3 et β_1 par du RGDV induit une diminution de

l'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR de 30% pour les CT26GFP/Luci et de 20% pour les HT29 suggérant que les intégrines possédant le motif de liaison au RGD sont impliquées dans l'interaction plaquettes – cellules de CCR.

La P-sélectine, exprimée à la surface des plaquettes activées, est connue pour médier l'adhésion des plaquettes à une grande variété de cellules tumorales humaines et murines, dont des cellules issues de cancer colorectal, du cancer du poumon, du cancer gastrique et de mélanome. De nombreuses évidences montre que la P-sélectine joue un rôle très important dans la croissance tumorale et la formation de métastases. En effet, dans différents modèles murins, la déficience en P-sélectine affecte l'infiltration des plaquettes dans les tumeurs solides, diminue la sécrétion de facteurs angiogéniques tel que le VEGF et diminue le nombre d'agrégats plaquettes-cellules cancéreuses dans la circulation ce qui réduit significativement la croissance tumorale et le homing des cellules cancéreuses dans les poumons ^{251,262}.

La podoplanine est une protéine surexprimée dans différents types de cancers dont les cancers colorectaux, de la vessie, et des poumons. Les plaquettes expriment le récepteur à la podoplanine, CLEC-2, leur permettant d'interagir avec les cellules cancéreuses ce qui les active et participe à la croissance tumorale et à la formation de métastases ^{253,254,265-267}. Récemment, plusieurs anticorps monoclonaux ciblant ces interactions PDPN-CLEC2 ont été développés et inhibent la croissance tumorale induite par l'activation plaquettaire, les métastases, et la formation d'embolies plaquettes-cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* ²⁶⁸⁻²⁷⁰. Enfin, la galectine-3 a également été décrite pour participer à l'interaction entre les plaquettes humaines et la lignée de CCR humaine HT29 ²⁷¹.

D'après ces études, les interactions entre plaquettes et cellules cancéreuses agissent positivement sur la croissance tumorale et la formation de métastases. Cependant, dans notre étude, nous montrons que l'interaction entre les plaquettes et les cellules cancéreuses de CCR HT29 et CT26 induit une diminution de la croissance tumorale *in vivo*. Le point commun entre toutes ces études est que l'interaction plaquettes cellules-cancéreuses induit une agrégation des plaquettes. Or, nous décrivons dans cette étude, un nouveau type d'interaction entre les plaquettes et les cellules cancéreuses de CCR totalement indépendante du TCIPA. La cinétique d'activation des plaquettes en interaction avec les cellules cancéreuses HT29 est également différente de ce qui est classiquement connu. En effet, dans notre étude, les plaquettes interagissent avec les cellules cancéreuses et ne commencent à s'étaler qu'à partir de soixante

minutes, montrant une activation tardive des plaquettes. De plus, d'après les résultats obtenus en CMF sur la génération de MPs plaquettaires au cours du temps, on note que la concentration en PMPs dans le surnageant d'interaction augmente significativement à partir de six heures d'interaction en comparaison au contrôle. Ceci indique donc que l'interaction cadhérine-6 dépendante et TCIPA indépendante entre les plaquettes et les cellules de CCR HT29 et CT26 active les plaquettes d'une manière non conventionnelle et retardée.

En 2009, le Dr Steele et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence des composants de la voie de signalisation canonique Wnt/ β -catenin au sein des plaquettes dont l'activation régule négativement les fonctions plaquettaires. En effet, le traitement des plaquettes humaines avec des activateurs de cette voie tel que Wnt3a, inhibe l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, l'adhésion et l'étalement des plaquettes, leur agrégation et la sécrétion du contenu de leur granule dense via la régulation de l'activité des GTPases^{272,273}. De plus, il a récemment été démontré que la β -caténine est étroitement associée aux jonctions adhérentes cadhérines dépendantes au sein des plaquettes et notamment à la cadhérine-6²⁷⁴. Nous pouvons donc penser que l'interaction cadhérine-6 dépendante entre les plaquettes et les cellules cancéreuses induit un signaling régulant négativement l'activation des plaquettes. Il serait intéressant d'étudier les différentes voies de signalisation induites au cours de cette interaction afin de comprendre cette réponse plaquettaire non conventionnelle et retardée. Etant donné que l'interaction cadhérine-6 dépendante n'est pas exclusive, il est probable qu'il y ait une compétition entre plusieurs voies de signalisation au sein des plaquettes, ce qui expliquerait ce délai de réponse. De plus, lors des expériences d'étalement en conditions bloquantes, nous avons pu observer que les plaquettes qui interagissent avec les cellules cancéreuses indépendamment de la cadhérine-6 s'activent et s'étalent avec une cinétique identique à ce que nous avons décrit dans la voie de signalisation dépendante de la cadhérine-6 (**figure 18** – datas non publiées). En effet, les pourcentages de plaquettes étalées, normalisés par rapport au nombre total de plaquettes restantes suite à l'inhibition de la cadhérine-6, malgré une tendance à la diminution, ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus dans la condition contrôle. Ceci suggère donc que la cadhérine-6 serait responsable de l'interaction initiale et que l'étalement des plaquettes serait dépendant d'autres molécules d'interactions. D'autres études seraient donc nécessaires pour comprendre en détail les molécules d'adhésion impliquées et les voies de signalisations induites au sein des plaquettes au cours de l'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR.

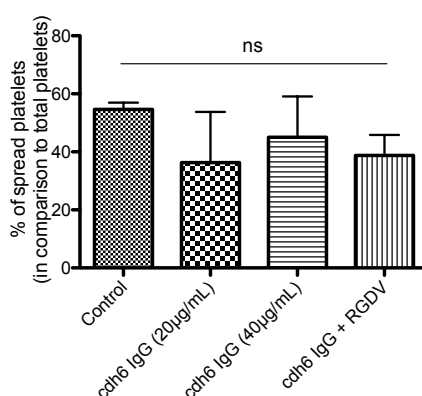


Figure 18 : La cadhérine-6 n'est pas impliquée dans l'étalement des plaquettes humaines à la surface des cellules de CCR HT29. Le graphique représente le pourcentage de plaquettes étalées à la surface des HT29 après 180 minutes d'interactions en conditions bloquantes ou non +/- SD (p-value : ns ; n=4). Les plaquettes humaines ont préalablement été incubées pendant 30 minutes avec un anticorps bloquant la cadhérine-6 (20 et 40µg/mL) et du RGDV (100 µM) avant l'interaction. Two-tailed Mann-Whitney t test.

Par ailleurs, au cours de notre étude, nous avons également mis en évidence la production significative de trois types de microparticules, les PMPs, les TMPs et les T+PMPs à partir de six heures d'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR HT29. Comme en atteste les résultats du cytokine array, ces MPs sont riches en cytokines telles que l'IL-4, l'IFN- γ , la CCL2 et la CXCL12 responsables du recrutement et de l'activation des monocytes circulants avec des propriétés anti-tumorales soulignant un rôle inflammatoire et immunitaire des plaquettes dans le microenvironnement.

Brown GT et collaborateurs ont montré en 2008 que les plaquettes peuvent initier la réponse de phase aiguë via leur production d'interleukine II-1 β ^{55,56}. Dans cette étude, la stimulation des plaquettes par du LPS induit une activation lente des plaquettes accompagnée de la libération de PMPs riches en II-1 β . La production de PMPs riches en II-1 β nécessite plusieurs heures, avec une augmentation significative de leur concentration de cinq fois par rapport au contrôle à partir de six heures de stimulation ⁵⁵. L'activation lente induite par le LPS a par ailleurs été confirmée dans des études réalisées par l'équipe du Dr Cognasse ^{275,276}. Cette équipe a également démontré que les plaquettes sont capables de moduler la production et la sécrétion de cytokines en fonction de la nature des agonistes, des récepteurs et des voies de signalisation mis en jeu ²⁷⁵⁻²⁷⁸. Ces observations suggèrent donc que les plaquettes peuvent réagir différemment en fonction de la réponse attendue, c'est-à-dire en fonction de leur implication dans l'hémostase et la thrombose (réponse rapide) ou dans l'inflammation et l'immunité

(réponse lente). Dans notre modèle, via leur production de MPs contenant des cytokines pro-inflammatoires attirant les monocytes, les plaquettes jouent un rôle inflammatoire et immunitaire certain dans le microenvironnement tumoral. Il est probable que la cinétique d'interaction retardée que nous observons soit liée à l'activation du rôle immunitaire des plaquettes au cours de leur interaction avec les cellules de CCR humaines et murines au sein du microenvironnement.

La cadhérine-6 est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des cadhérines de type II. Cette cadhérine est principalement exprimée dans le rein et le système nerveux central, organes dans lesquels elle joue un rôle essentiel durant l'embryogenèse en participant à la différenciation mésenchymale/épithéliale nécessaire à la morphogenèse²⁷⁹⁻²⁸¹. En plus de son rôle au cours de l'embryogenèse, la cadhérine-6 a été décrite pour être surexprimée dans des cancers ovariens, des carcinomes rénaux et des carcinomes papillaires de la thyroïde (CPT)^{256,282,283}. Son expression est positivement corrélée avec l'agressivité de la tumeur^{284,285}. La cadhérine-6 est un gène cible du TGF- β participant activement à la transition épithélio-mésenchymateuse et à la formation de métastases dans les CPT²⁵⁶. L'équipe de Gugnoni M, via l'extinction de son expression par des siRNAs, a montré que la cadhérine-6 est impliquée dans l'architecture et la morphologie cellulaire, dans la prolifération cellulaire et dans la TEM en restreignant la voie autophagique. En effet, la perte d'expression de la cadhérine-6 change profondément l'architecture cellulaire, altère les modalités d'interactions intercellulaires et atténue les caractéristiques mésenchymales des cellules de CPT. En utilisant une stratégie de screening doubles hybrides chez la levure basée sur une librairie de cancers thyroïdiens, les auteurs ont montré que la cadhérine-6 interagit directement avec GABARAP, BNIP3 et BNIP3L et à travers ces interactions, la cadhérine-6 restreint l'autophagie et promeut la réorganisation du réseau mitochondrial via un mécanisme médié par DRP1²⁵⁷. Comme la VE-cadhérine, et la cadhérine-17, appartenant au même type de cadhérine, la cadhérine-6 possède un motif RGD, lui permettant d'interagir de manière hétérophylique avec des intégrines^{286,287}. En 2012, le Dr Dunne et ses collaborateurs furent les premiers à montrer l'expression et le rôle de la cadhérine-6 des plaquettes dans l'agrégation $\alpha_{IIb}\beta_3$ dépendante et la formation des thrombi *in vitro*²⁵⁵. Cependant, avant notre étude, son rôle dans l'interaction plaquettes – cellules cancéreuses n'avait jamais été étudié. Comme nous avons pu le voir et le discuter précédemment, la cadhérine-6 est impliquée dans l'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR HT29 et CT26 *in vitro*, en condition statique et en condition dynamique, et *in vivo*, mais pas seulement. En utilisant des clones de CT26GFP/Luci infectés par des particules

lentivirales codant pour des shRNA dirigés contre la cadhérine-6 ou des shRNA contrôles ayant le même taux de prolifération, notre modèle murin de CCR nous a également permis de mettre en évidence un rôle certain de la cadhérine-6 dans la croissance tumorale. En effet, la perte d'expression de la cadhérine-6 est responsable d'une diminution de 70% de la croissance tumorale *in vivo*, en comparaison aux cellules CT26GFP/Luci shRNA contrôles (**Figure 19 – datas non publiées**). Son implication dans la progression tumorale et sa surexpression dans les tumeurs agressives de CPT, de carcinomes rénaux et ovariens ont mené au développement d'anticorps ciblant la cadhérine-6 dont les résultats sont très prometteurs avec une régression de 40% des tumeurs *in vivo*, dans des modèles de xéno greffes de tumeurs humaines de CPT issues de patients²⁸⁸. Cependant, peu d'études portent sur le rôle de la cadhérine-6 dans la croissance tumorale, et en fonction du modèle, son rôle semble être contradictoire. En effet, une étude a rapporté un rôle suppresseur des tumeurs de la cadhérine-6 dont l'expression est diminuée par le miR-429 lui-même dérégulé de manière épigénétique dans le cholangiocarcinome²⁸⁹.

En plus de son rôle dans l'interaction plaquettes-cellules de CCR, dans la TEM et la formation de métastases, la cadhérine-6 est donc également impliquée dans la croissance tumorale. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à déterminer dans de futures études.

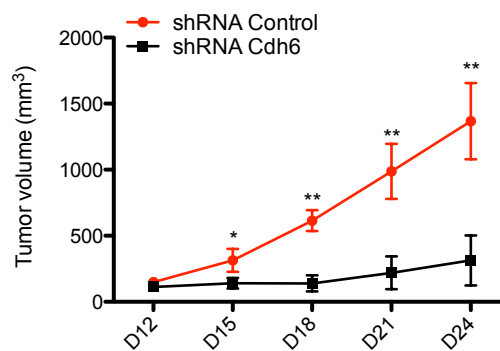


Figure 19 : La cadhérine-6 est impliquée dans la croissance tumorale du CCR. Le graphique représente le volume moyen des tumeurs de CCR en présence (CT26 GFP/Luci shRNA control) ou en l'absence d'expression de la cadhérine-6 (CT26 GFP/Luci shRNA cdh6) en fonction du temps +/- SD (* p-value<0,05 ** p-value<0,01 ; n=6 pour chaque groupe). L'inhibition de l'expression de la cadhérine-6 réduit de 70% le volume des tumeurs après 24 jours de croissance en comparaison aux tumeurs contrôles. Two tailed Mann Whitney t test.

2. Rôles des plaquettes et des iMPs dans la croissance tumorale

2.1 Attraction et activation des fonctions anti-tumorales des macrophages au sein du microenvironnement médiées par l'interaction plaquettes-cellules de CCR.

In vivo, l'interaction entre les cellules de CCR CT26GFP/Luci et les plaquettes induit une diminution significative de la croissance tumorale. En effet, les tumeurs générées à partir de CT26GFP/Luci ayant interagit préalablement avec les plaquettes *in vitro* sont significativement plus petites que les tumeurs contrôles. Cependant, comme en atteste l'expression de P21(Waf1/Cip1) et le pourcentage de cellules apoptotiques obtenus par CMF, les plaquettes seules n'ont aucun effet sur la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro*, suggérant que la diminution de la croissance tumorale n'est pas un effet cytotoxique direct des plaquettes sur les cellules cancéreuses. Pourtant, contrairement à ce que nous observons, l'équipe de Ibele a montré que les plaquettes, ajoutées à un ratio 4 :1 (plaquettes : cellules cancéreuses) via les produits qu'elles sécrètent, peuvent exercer un effet cytotoxique directement sur les cellules cancéreuses de mélanome et de carcinome rénal ²⁵⁹. L'interaction des plaquettes avec des cellules leucémiques L1210, ainsi que l'incubation de ces cellules avec les facteurs solubles libérés par les plaquettes, induit quant à elle une diminution de la prolifération cellulaire via l'inhibition de la synthèse d'ADN, sans faire intervenir de mécanismes cytotoxiques ou apoptotiques ²²³. L'étude du Dr Michael et collaborateurs montre par ailleurs un mécanisme de régression tumorale médié par les PMPs infiltrées dans le microenvironnement tumoral de tumeurs pulmonaires et colorectales. Au cours de cette étude, les auteurs démontrent que les PMPs infiltrées dans le microenvironnement délivrent le miRNA-24 au sein des cellules tumorales responsable de dysfonctions mitochondriales et de l'apoptose des cellules tumorales *in vivo* ²²⁴.

D'autre part, de nombreuses études montrent que les plaquettes, via les facteurs de croissance et les facteurs angiogéniques qu'elles sécrètent, augmentent la prolifération et la survie des cellules tumorales. En effet, par exemple, le PDGF libéré par les plaquettes suite à leur activation est impliqué dans l'accélération de la croissance de tumeurs métastatiques du cancer du sein ^{290,291}. De plus, le TGF- β 1 dérivé des plaquettes a été décrit pour induire la survie et augmenter la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes humaines et murines ²⁹². En plus des facteurs de croissance, les agonistes que les plaquettes sécrètent suite à leur activation comme la thrombine, l'ADP et le TXA₂, agissent positivement sur la prolifération des cellules

tumorales. En effet, Cho et collaborateurs ont montré que l'inhibition pharmacologique du récepteur P₂Y₁₂ par l'action du ticagrelor, réduit la croissance de tumeurs ovariennes de 60% en comparaison à l'aspirine, et de 75% en comparaison aux tumeurs des souris traitées par des placebos²⁹³. De la même manière, l'inhibition de l'activité de la thromboxane synthase comme de la thrombine permet de réduire la prolifération et la croissance tumorale²⁹⁴⁻²⁹⁶.

Les méthodes d'isolation des plaquettes ainsi que les rapports plaquettes – cellules cancéreuses utilisés diffèrent totalement entre les études, un point critique qui pourrait expliquer ces effets totalement contradictoires sur la croissance tumorale. Le ratio plaquettes-cellules cancéreuses est d'ailleurs un des points limites de notre étude car nous n'avons utilisé qu'un seul ratio de 50 : 1 plaquettes : cellules cancéreuses dans toutes nos expériences. Il serait donc intéressant de tester d'autres ratios et de déterminer si les effets observés sont similaires à ceux que nous avons obtenus avec le ratio 50 :1. De la même manière que pour la production de MPs, un protocole standardisé pour la production et la préparation de plaquettes humaines et murines devrait peut-être être proposé lors des sous-comités de l'ISTH, afin de lever les incertitudes liées au protocole lui-même.

La diminution de la croissance tumorale induite par l'interaction plaquettes-cellules de CCR apparaît à partir du dix-huitième jour seulement après l'induction de la tumeur, ce qui nous a poussé à étudier les populations immunitaires constituant les deux groupes de tumeurs par immunohistochimie. Après analyses des neutrophiles et des macrophages au sein du microenvironnement par des marquages Ly6G et F4/80 respectivement, nous avons montré la présence accrue de macrophages F4/80 positifs dans les tumeurs générées à partir de CT26GFP/Luci ayant interagit préalablement avec les plaquettes en comparaison aux tumeurs contrôles. Les pourcentages de neutrophiles intra-tumoraux ne diffèrent pas entre les deux groupes de tumeurs. En réalisant des expériences de migration cellulaire en transwell, nous avons pu montrer que les produits libérés au cours de l'interaction entre les plaquettes et les cellules cancéreuses sont capables d'attirer et de faire migrer les monocytes. En effet, le surnageant d'interaction entre plaquettes et cellules de CCR durant six heures et les MPs purifiées à partir de ces surnageants (iMPs) augmentent de six fois et de trois fois respectivement la transmigration des monocytes en comparaison au contrôle milieu seul, indiquant une participation active des interactions plaquettes-cellules cancéreuses et des iMPs dans l'attraction des monocytes au sein du microenvironnement. De plus, comme l'illustre la **figure 20** (datas non publiées), les macrophages retrouvés au sein des tumeurs générées à partir de CT26GFP/Luci ayant interagit avec les plaquettes, sont à proximité des plaquettes intra-

tumorales, ce qui confirme le rôle des plaquettes intra-tumorales dans l'attraction des monocytes circulants. Afin de comprendre l'implication des plaquettes et des iMPs dans l'attraction des monocytes, nous avons réalisé un cytokine array sur les surnageants d'interaction et les iMPs, perméabilisés ou non. Les chémokines CXCL12 (ou SDF-1) et CCL2 (ou MCP-1), connues pour leur rôle dans l'attraction des monocytes sont retrouvées dans le iSN et dans les iMPs lorsque ceux-ci sont perméabilisés, et absentes en condition non perméabilisées, indiquant qu'elles sont exclusivement véhiculées au sein des iMPs. On retrouve la chémokine RANTES dans les iSN et iMPs, mais également dans le surnageant des plaquettes seules, indiquant que la source de RANTES est exclusivement plaquettaire et que sa libération n'est pas due à l'interaction plaquettes-cellules de CCR. Ces trois chémokines sont connues pour attirer les leucocytes dans différentes conditions pathologiques comme les infections bactériennes et l'athérosclérose. Dans le microenvironnement tumoral, la chémokine CCL2, également produite par les cellules tumorales, les macrophages et les fibroblastes a été décrite comme essentielle pour le recrutement des macrophages^{146,147}. D'autres chémokines, telles que CCL3, CCL4, CCL5 (RANTES), CCL7, CCL8, CXCL12 (SDF-1) et cytokines incluant le VEGF, le PDGF et l'Il-10 ont aussi été décrites pour induire le recrutement des macrophages au sein du microenvironnement tumoral^{130,149-151}.

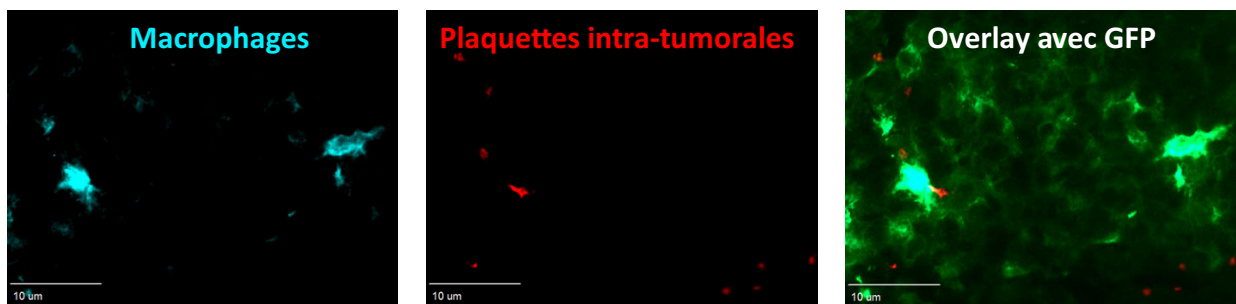


Figure 20 : Présence de macrophages à proximité des plaquettes intra-tumorales. Images représentatives de la présence de macrophages et de plaquettes intra-tumorales à proximité dans le microenvironnement tumoral. Ces images ont été obtenues par microscopie confocale après marquage des coupes de tumeurs de CCR issues de CT26GFP/Luci à l'aide d'un anticorps dirigé contre le F4/80 murin spécifique des macrophages (bleu – gauche) et d'un anticorps anti-GP1b murin spécifiquement dirigé contre les plaquettes murines (rouge – milieu). L'image de droite correspond à l'overlay des signaux obtenus pour les macrophages, les plaquettes et le microenvironnement GFP (vert).

En fonction des signaux qu'ils reçoivent, les monocytes circulants qui s'infiltrent dans la tumeur primaire pour devenir *in fine* des TAMs vont se polariser soit en type M1 soit en type M2 et ainsi avoir des effets totalement opposés. En effet, comme cela a été abordé en introduction, il existe deux phénotypes de TAMs, (i) les TAMs classiques aussi appelés type M1, activés par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α , les ligands des TLRs et les agonistes de NOD ayant des fonctions anti-tumorales et (ii) les TAMs alternatifs ou type M2, activés par les interleukines Il-4 et Il-13 ayant des fonctions immunosuppressives et pro-tumorales. Dans notre étude, nous avons montré que les iMPs, au-delà de leur fonction dans l'attraction des monocytes par le biais de chémokines, véhiculent des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IFN- γ et l'interleukine Il-4 capables d'activer les fonctions anti-tumorales des monocytes. Bien que l'Il-4 soit décrite pour induire un phénotype M2, une étude a montré que comme l'IFN- γ , l'Il-4 est capable d'activer les fonctions anti-tumorales des macrophages murins en induisant la production de TNF- α et de NO ²⁹⁷. De plus, dans notre étude, l'interaction des monocytes humains avec les cellules de CCR humaines HT29 en présence ou non de plaquettes induit l'expression de P21 (Waf1/Cip1) et réduit la phosphorylation de la PRb au niveau des résidus 807 et 811, témoignant d'un arrêt du cycle cellulaire. En accord avec nos résultats, une étude a montré que l'addition d'IFN- γ et de lignées cellulaires tumorales, les A375 (mélanome) et les HT29 (CCR), à des monocytes induit la libération de TNF- α et augmente la cytotoxicité et la lyse des cellules tumorales ¹⁸². L'activité cytotoxique des monocytes activés à l'IFN- γ a également été observée dans d'autres lignées tumorales humaines. En effet, la co-culture de monocytes activés à l'IFN- γ avec les cellules d'ostéosarcome HOS, de mélanome LOX, et du cancer du poumon A549 inhibent jusqu'à 95% la croissance tumorale ¹⁸³. Les résultats du cytokine array indiquent que l'INF- γ et l'Il-4 sont présentes exclusivement dans les MPs, indiquant que l'activation des fonctions anti-tumorales des monocytes sont très certainement médiées exclusivement par les iMPs. En 2011, Vasina et collaborateurs ont montré que les PMPs issues de plaquettes apoptotiques induisent la différenciation des monocytes en macrophages de type M2 ²⁹⁸. Il serait donc intéressant dans une future étude, à l'aide de différents marqueurs, de déterminer et de différencier le phénotype des macrophages au sein de nos tumeurs de CCR primés ou non avec les plaquettes. Dans notre cas, comme l'indiquent les résultats obtenus en CMF, la concentration en PMPs dans le contrôle plaquette seule est significativement plus basse que celle obtenue dans le iSN à six heures indiquant que les PMPs relarguées dans le iSN ne sont pas issues de plaquettes apoptotiques. Par ailleurs, il a récemment été montré que les PMPs sont internalisées par les macrophages

humains, dans lesquels elles délivrent le miR-126-3p ayant pour conséquence une altération de l'expression de certains gènes et mènent à un phénotype phagocytaire du macrophage²⁹⁹. Dans notre modèle, il serait intéressant de déterminer les différents miRNA présents dans les iMPs et leurs effets sur les monocytes ainsi que sur les cellules tumorales afin d'améliorer notre compréhension de tous les mécanismes mis en jeu dans le microenvironnement tumoral.

2.2 Activation des fonctions anti-tumorales des TAMs et immunothérapie

Les rôles des TAMs dans la croissance tumorale sont controversés. En effet, dans la plupart des cancers et surtout dans le cancer du sein, du col de l'utérus et du rein, les TAMs sont polarisés en phénotype M2 et leur infiltration est positivement corrélée avec la prolifération des cellules tumorales^{171,172}. Cependant, dans le CCR, les TAMs sont décrits comme pro-inflammatoires et jouent des rôles anti-tumoraux ce qui en fait un facteur de bon pronostic^{142,143}. De manière intéressante, nous avons retrouvé la présence des iMPs dans le plasma de treize patients atteints de CCR ainsi que dans le microenvironnement de tumeurs primaires humaines de CCR. Il serait donc intéressant dans de futures études de caractériser par cytokine array la composition des iMPs issues de patients atteints de CCR et de leurs tumeurs afin de confirmer leurs rôles dans l'activation des fonctions anti-tumorales des TAMs *in vivo* dans l'histoire naturelle de la pathologie humaine.

L'activation des fonctions anti-tumorales des TAMs représente une stratégie thérapeutique intéressante. De plus, comme nous avons pu le voir en introduction, les TAMs constituent un obstacle majeur à l'immunothérapie actuelle basée sur la réponse anti-tumorale lymphocytaire T. Des études pré-cliniques et cliniques se sont donc intéressées au potentiel thérapeutique du reprogramming des TAMs. Reprogrammer les TAMs aurait un rôle double avec d'une part l'activation des propriétés anti-tumorales des TAMs de type M1 et d'autre part la levée de l'immunosuppression imposée par les TAMs sur la réponse anti-tumorale des lymphocytes T. Dans ce but, différentes stratégies thérapeutiques ont été testées.

D'une part, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'INF- γ et le TNF- α , sont connues pour induire les propriétés anti-tumorales des macrophages. Basées sur cette observation, des études se sont intéressées à la capacité des liposomes encapsulés à délivrer spécifiquement des signaux activant les macrophages *in vivo*. Par exemple, l'administration systémique de liposome contenant des agonistes de NOD2, tel que les muramyldipeptides,

permet aux macrophages alvéolaires d'acquérir des propriétés tumoricides, devenant alors capables d'éradiquer des métastases spontanées pulmonaires et nodales établies³⁰⁰. Dans un essai clinique de phase I, l'administration intraveineuse de liposomes encapsulés contenant des phosphatidylethanolamine muramyltripeptides induit la production de monocytes circulants possédants une activité tumoricide³⁰¹. Dans une autre étude randomisée de phase III, cette approche en combinaison avec de la chimiothérapie a montré une amélioration de la survie totale des patients atteints d'ostéosarcomes³⁰². Toujours dans le but de délivrer des signaux activateurs des propriétés tumoricides des TAMs, une étude a montré que l'administration intravésicale du bacille de Calmette et Guérin atténué pour le traitement du cancer de la vessie active les macrophages via le TLR2 qui deviennent alors pro-inflammatoires et tumoricides^{303,304}. Au vu de nos résultats, nous pourrions imaginer que l'injection de MPs riches en INF- γ , seule ou en combinaison de chimiothérapie pourrait être efficace pour faire régresser les tumeurs de CCR.

De plus, l'administration systémique d'anticorps monoclonaux spécifiques et agonistes du CD40, récepteur exprimé à la surface des macrophages et d'autres cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques, potentialise l'activité anti-tumorales des macrophages dans un modèle cliniquement relevant d'adénocarcinome ductal pancréatique (PDAC) et chez des patients atteints de PDA à des stades avancés. Dans ces études, l'administration de ces anticorps permet d'induire une réponse inflammatoire systémique rapide marquée par des taux élevés d'IFN- γ et de TNF- α , pouvant ainsi reprogrammer les TAMs. Les TAMs ayant répondu à l'administration de l'anticorps agoniste spécifique du CD40, s'infiltrèrent rapidement dans le microenvironnement et facilitent la déplétion de collagène, soit diminuent la fibrose, caractéristique courante du microenvironnement du PDAC, menant à la réduction de la tumeur^{305,306}. Dans notre étude, l'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR induit la libération de CD40L soluble directement dans le surnageant et sous forme de microparticules. Comme pour le PDA, il est probable que le CD40L soluble interagisse avec son récepteur à la surface des monocytes et potentialise leur activité anti-tumorale.

Enfin, l'une des stratégies thérapeutiques des plus intéressantes est de reprogrammer les TAMs de manière à inverser le contexte immunosuppresseur présent dans les tumeurs. En effet, comme nous avons pu le voir, les TAMs jouent un rôle immunosuppresseur important dans le microenvironnement tumoral. Par exemple, les TAMs peuvent exprimer différentes enzymes métabolisant des acides aminés telles que l'indeolamine 2,3 dioxygénase 1 (IDO-1), la nitric

oxyde synthase 2 (NOS2) et l'arginase, qui génèrent des métabolites inhibant la réponse immunitaire des LT³⁰⁷. Les TAMs produisent également des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène, perturbant la liaison du TCR des LT aux CMH présentant les antigènes et aux cellules tumorales. De plus, à travers la production de facteurs solubles immunosuppresseurs comme le PGE2, le TGF-β1 et l'Il-10 et l'expression de molécules contrôlant la réponse immunitaire, telles que la PD-L1 (CD174) et la galectine-9, les macrophages peuvent supprimer l'activation de la réponse immunitaire dépendante des LT^{126,308}. Les stratégies ayant pour but d'inverser le comportement immunosuppresseur des macrophages peuvent donc représenter une nouvelle approche thérapeutique pour restaurer l'immunité anti-tumorale des LT dans le cancer.

Par exemple, l'inhibition du colony stimulating factor I receptor (CSFR1) induit une modification de la signature génétique et phénotypique des TAMs pro-tumoraux en TAMs anti-tumoraux, prolongeant ainsi la survie des souris portant des tumeurs³⁰⁹. Dans un modèle de cancer du sein, ce blocage, lorsque combiné avec des agents chimio-thérapeutiques, permet de promouvoir l'immuno-surveillance médiée par les LT CD8+ cytotoxiques³¹⁰. De surcroît, l'utilisation d'anticorps bloquant la voie de signalisation de PD-1/PD-L1 a montré une amélioration de l'activation des lymphocytes T médiée par les macrophages dans un modèle d'adénocarcinome hépatique³¹¹.

En conclusion, lorsque les macrophages sont correctement éduqués, ceux-ci peuvent médier une activité anti-tumorale en ciblant des composants essentiels du microenvironnement : les cellules tumorales, les vaisseaux associés à la tumeur, la fibrose associée à la tumeur et la réponse immunitaire. Reprogrammer les TAMs de manière à activer leur réponse anti-tumorale représente donc une stratégie thérapeutique intéressante. Toutes ces observations ont mené au développement de différents outils thérapeutiques ayant pour but de restaurer et/ou de générer *de novo* la réponse immunitaire anti-tumorale chez les patients, stratégie appelée immunothérapie.

A ce jour, les immunothérapies les plus avancées au niveau clinique sont les anticorps monoclonaux modulant l'activité des LT via le blocage de voies de signalisation inhibitrices qui agissent comme des points de contrôles immunologiques. Les activités anti-tumorales prometteuses des anticorps monoclonaux ciblant les protéines impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire, tel que la cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4), la programmed cell death protein 1 (PD-1) et le ligand de PD-1 (PD-L1), ont mené à une approbation réglementaire de ces agents pour le traitement de différents types de cancer. Le premier

traitement à avoir été approuvé était l'anticorps anti-CTLA-4 appelé Ipilimumab dans le traitement du mélanome métastatique ou non résecable.

Cependant, certains patients ne répondent pas ou sont réfractaires à ce genre de thérapies. Le contexte immunologique de chaque tumeur, appelé « immunoscore » semble être un facteur pronostic de la réponse à la thérapie dans différents types de cancers, incluant le mélanome et le CCR³¹²⁻³¹⁴. Les études histologiques ont permis de faire avancer notre compréhension de l'impact des cellules immunitaires au sein du microenvironnement sur les réponses aux immunothérapies des différents patients. Brièvement, trois types de microenvironnement sont décrits en fonction du profil des cellules immunitaires dans la tumeur : le microenvironnement chaud (hot) ayant des LT CD8⁺ et des cellules NK pré-existantes, le microenvironnement froid (cold) dont l'infiltration en LT est faible, et le microenvironnement immunosuppresseur riche en cellules immunosuppressives telles que les MSDCs³¹⁵.

Récemment Tumeh et collaborateurs ont montré qu'une meilleure infiltration des LT cytotoxiques CD8⁺ corrèle avec une réponse clinique aux traitements utilisant les anticorps monoclonaux précédemment décrits³¹⁶. Les observations cliniques concernant l'impact du profil des cellules immunitaires du microenvironnement sur la réponse à l'immunothérapie ont été validées dans des modèles précliniques. En effet, les modèles de cancer à microenvironnement chaud (incluant les cellules de CCR CT26 et les cellules du cancer rénal RENCA) sont plus répondeurs aux anticorps monoclonaux anti-CTLA-4 et anti PD-1 en comparaison aux modèles de cancer à microenvironnement immunosuppresseur (incluant les cellules 4T1, B16F10 AP-3, LL/2 et MC38)³¹⁷. Cette étude montre que les CT26 ont un microenvironnement riche en cellules cytotoxiques et en cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL2, INF- γ , le TNF- α et l'IL-1 β comparativement aux microenvironnements immunosuppresseurs riches en cytokines immunosuppressives IL-4 et IL-10. Il est donc probable que le rôle des TAMs et leur fonction anti-tumorale directe ou médiée par les LT soit liés au type de microenvironnement généré par les caractéristiques propres de chaque lignée cellulaire. Dans notre modèle, il serait intéressant de quantifier et de comparer les LT CD8⁺ cytotoxiques infiltrés dans les tumeurs issues de CT26GFP/Luci ayant interagis avec les plaquettes et les tumeurs contrôles. De cette manière, nous pourrions déterminer si la diminution de la croissance tumorale *in vivo* est médiée exclusivement par l'activité antitumorale directe des TAMs ou si ceux-ci, via leur capacité à moduler la réponse adaptative, recrutent et activent également les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques dans le but de faire régresser la tumeur.

En plus des anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôles immunologiques, de nouvelles approches thérapeutiques se développent pour traiter le cancer, et notamment les cancers résistants aux immunothérapies actuellement disponibles. C'est le cas du MEDI9197, agoniste potentiel des TLR7 et TLR8, induisant la production de cytokines pro-inflammatoires à travers l'activation des cellules myéloïdes et lymphoïdes ³¹⁵. Dans des modèles précliniques murins, l'administration intra-tumorale du MEDI9197 induit une réponse inflammatoire locale caractérisée par la surexpression de gènes associés à l'activation de la réponse immunitaire innée et adaptative dans la tumeur. De manière intéressante, dans les modèles murins syngéniques répondant faiblement aux anticorps monoclonaux ciblant CTLA-4 et PD-L1, l'utilisation de ces anticorps en combinaison avec MEDI9197 améliore significativement l'activité anti-tumorale en comparaison à chaque monothérapie seule. Le MEDI9197 est en train d'être évalué dans des essais cliniques comme monothérapie de sujets avec des tumeurs solides, et en combinaison avec les anticorps monoclonaux ciblant PD-L1 et/ou des radiations palliatives ³¹⁵.

Au vu de nos résultats sur l'interaction plaquettes – cellules de CCR dans l'activation des fonctions anti-tumorales des macrophages, les plaquettes intra-tumorales pourraient être exploitées pour reprogrammer les TAMs au sein du microenvironnement, ce qui constituerait une nouvelle approche thérapeutique. De plus, physiologiquement comme expérimentalement, les plaquettes sont capables d'endocyter de nombreuses protéines et de les stocker dans leurs granules alpha ³¹⁸. Cette propriété pourrait être exploitée pour délivrer les signaux spécifiques induisant un programme anti-tumoral au sein des TAMs. Certaines études ont commencé à exploiter la capacité d'endocytose plaquettaire dans le but de réduire la progression tumorale. En effet, l'équipe de Yu-Tung Li a montré que l'infusion intraveineuse de plaquettes contenant la cytokine anti-cancéreuse IFN- γ induced protein 10 (IP-10) atteint le microenvironnement tumoral et réduit la croissance tumorale en supprimant l'accumulation des cellules immunosuppressives T FoxP3 positives dans un modèle de mélanome ³¹⁹. De plus, la modification génétique des plaquettes dans le but de traiter les désordres de saignement, a donné lieu à des études portant sur les interactions entre des plaquettes génétiquement modifiées pour exprimer TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand) et les cellules cancéreuses circulantes. Cette modification génétique induit l'apoptose des cellules tumorales *in vitro* et réduit significativement les métastases *in vivo* dans un modèle murin de cancer de la prostate ³²⁰.

3. Rôles des plaquettes et des iMPs dans la formation de métastases

Dans notre étude, nous avons montré que l'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR dans le microenvironnement tumoral induit une diminution de la croissance tumorale *in vivo*. Cependant, certaines études, incluant les nôtres montrent que l'inhibition pharmacologique de l'activation plaquettaire par du clopidogrel ou du ticagrelor, réduit significativement les métastases *in vivo* dans des modèles murins de cancer du pancréas, de mélanome et de cancer du sein^{246,321}. De plus, dès les années 1960, grâce à l'utilisation du modèle de métastases expérimentales, des études montrent que l'induction d'une thrombocytopénie et l'inhibition des molécules d'adhésion plaquettaires réduisent de manière significative la formation de métastases au niveau pulmonaire^{220,247}. Aujourd'hui le rôle des plaquettes dans la formation de métastases est bien établi et fortement documenté. Nous avons donc souhaité vérifier, si dans notre modèle de CCR, et dans un contexte circulatoire, les plaquettes jouent un rôle en faveur de la dissémination métastatique.

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR HT29 augmente de manière significative les capacités d'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium en condition dynamique. En effet, le priming des cellules HT29 avec des plaquettes durant soixante minutes augmente de dix fois le nombre de cellules HT29 en interaction avec les cellules endothéliales HUVECs en comparaison aux cellules non primées. En accord avec nos résultats, l'équipe de Lonsdorf a montré que l'interaction plaquettes-cellules de mélanome B16 augmente significativement le nombre de cellules B16 adhérentes à une monocouche de cellules endothéliales murines en condition dynamique³²². Cette étude montre par ailleurs que l'interaction entre les plaquettes et les cellules de mélanome est dépendante de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ plaquettaire et $\alpha_v\beta_3$ des cellules tumorales. De plus, l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par des anticorps bloquants réduit significativement l'adhésion des cellules de mélanomes primées avec des plaquettes à l'endothélium, indiquant l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ d'une part dans l'interaction plaquettes-cellules tumorales et d'autre part, dans l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium³²². L'extinction de l'expression de l'intégrine β_3 par le biais de siRNA au sein de cellules de mélanome B16 réduit de 86% la formation de métastases *in vivo*, indiquant un rôle direct de la sous unité d'intégrine β_3 dans l'adhésion, la migration et la formation de métastases *in vivo*³²³. L'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et notamment de la sous-unité β_3 dans la formation de métastases a été démontrée dans de nombreux autres cancers, incluant le cancer du sein, des ovaires, de la prostate, du pancréas, du col de l'utérus et du

glioblastome³²⁴. Au cours de l'interaction plaquettes –cellules CCR, nous avons démontré que, via les microvésicules qu'elles libèrent, les plaquettes transfèrent la sous-unité d'intégrine β_3 aux cellules de CCR HT29, initialement négatives pour l'expression de cette intégrine. En effet, après une heure d'interaction, on retrouve des éléments de taille similaire à des microvésicules, exprimant la sous-unité d'intégrine β_3 à la surface des cellules de CCR HT29. Etant donné l'implication de la sous-unité d'intégrine β_3 dans la formation de métastases, et de son transfert de la plaquette à la cellule cancéreuse au cours de l'interaction, il est très probable que celle-ci soit à l'origine de l'augmentation de l'adhésion des cellules tumorales HT29 à l'endothélium. Par ailleurs, le transfert de molécules d'adhésion plaquettaire médié par les PMPs aux cellules cancéreuses, mécanisme appelé « platelet mimicry », est directement lié au potentiel métastatique des cellules tumorales. En effet, Janowska et collaborateurs ont démontré le transfert de la sous-unité d'intégrine plaquettaire α_{IIb} (CD41) médié par les PMPs au sein de six lignées de cancer du poumon et de trois lignées de cancer du sein régule positivement le potentiel métastatique des cellules tumorales avec une augmentation des capacités d'adhésion aux cellules endothéliales^{325,326}.

Dans notre modèle, nous avons montré que les iMPs activent les cellules endothéliales et augmentent l'adhésion des cellules tumorales HT29 à l'endothélium. En effet, le traitement des cellules endothéliales avec des iMPs induit l'expression de ICAM-1, présent dans les corps de Weibel Palade des cellules endothéliales, indiquant que les iMPs sont capables d'induire une activation et une dégranulation des cellules endothéliales. Par ailleurs, ce traitement augmente significativement le nombre de cellules HT29 adhérentes aux cellules endothéliales en comparaison aux conditions contrôles en condition dynamique. Ces résultats suggèrent donc que dans un contexte circulatoire, les plaquettes comme les iMPs favorisent le processus de métastases en augmentant les capacités d'adhésions des cellules tumorales à l'endothélium. En accord avec nos résultats, l'équipe de Pasquier et collaborateurs a mis en évidence un dialogue entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales, médié par les TMPs, dont la fusion avec les cellules endothéliales induit l'activation des cellules endothéliales et favorise la formation de niches pro-métastatiques³²⁷.

Les MPs, du fait de leur nature lipidique, de leur capacité de fusion avec d'autres cellules et de leur composition, constituent de véritables vecteurs biologiques permettant une communication intercellulaire dans un milieu proche comme à distance. Depuis plusieurs années, le nombre de publications concernant le rôle des MPs dans la progression tumorale ne

cesse d'augmenter. Les MPs, en fonction du type cellulaire dont elles proviennent, participent activement à différents processus pro-tumoraux tels que : l'acquisition par la cellule cancéreuse d'un phénotype invasif, la formation de métastases, l'angiogenèse, la formation de niches vasculaires pro-métastatiques, et la chimiorésistance. En effet, au-delà de leur capacité à activer les cellules endothéliales et induire l'angiogenèse, les PMPs peuvent stimuler la production de métalloprotéinases telles que la MMP-9 et la MMP-2, via l'activation de la voie de signalisation MAPK p42/44 et Akt, au sein de cellules cancéreuses du poumon, du sein et de la prostate et moduler ainsi positivement leurs capacités d'invasion^{325,326,328}. De plus, via le transfert de l'onco-miR miR-223 ciblant le gène suppresseur de tumeur EPB41L3 (Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3), les PMPs augmentent les capacités d'invasion des cellules du cancer du poumon A549³²⁹. Les TMPs, via le transfert de MMP-2 et de MMP-9 et leur capacité à activer la voie NF- κ B, augmentent elles aussi les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses³³⁰⁻³³². L'activation de la voie NF- κ B a pour conséquence une régulation négative du miR-503, responsable de l'inhibition de la migration et de l'invasion dans le cancer du sein^{332,333}. Les microRNA et protéines actives contenus dans les PMPs et les TMPs sont donc capables de moduler positivement les capacités invasives des cellules tumorales et de favoriser la formation de métastases par des mécanismes indépendants de l'activation endothéliale. Il serait donc intéressant dans de futures études, d'identifier et de caractériser le contenu des iMPs et d'évaluer leur rôle dans la formation de niches pro-métastatiques et dans l'invasion des cellules tumorales.

De manière intéressante, l'étude de Pasquier et collaborateurs montre que seules les TMPs issues de cellules cancéreuses mésenchymateuses sont capables d'activer les cellules endothéliales³²⁷. Or, nous avons montré comme de nombreuses autres études, que l'interaction entre les plaquettes et les cellules tumorales induit une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). En effet, l'interaction entre les plaquettes et les cellules de CCR induit une modification de l'expression de certains gènes avec une augmentation de l'expression du marqueur mésenchymal, Snail-1, et une diminution de l'expression du marqueur épithélial, la E-cadhérine. La TEM est un mécanisme cellulaire très important au cours de l'embryogenèse dont la réactivation à l'âge adulte est souvent synonyme de pathologie. Dans le cas du cancer, l'induction de l'EMT au sein des cellules tumorales augmente drastiquement leurs capacités de migration et d'invasion, favorisant ainsi la dissémination métastatique et l'apparition de foyers secondaires. Durant la TEM, les cellules tumorales perdent leurs caractéristiques épithéliales permettant une cohésion intercellulaire forte, pour acquérir des caractéristiques migratoires

mésenchymales leur permettant de migrer à travers le parenchyme et d'entrer dans la circulation sanguine. Cette reprogrammation transcriptionnelle est induite principalement par le TGF- β , la BMP (Bone morphogenetic protein), Wnt- β catenin, Notch, Hedgehog et les récepteurs à tyrosine kinase³³⁴. En accord avec nos résultats, Labelle et collaborateurs ont montré que l'interaction directe entre des cellules tumorales colorectales (MC38GFP) et mammaires (Ep5) et les plaquettes est suffisante pour induire une sorte de TEM dans la circulation. L'interaction elle-même ainsi que la libération de TGF- β d'origine plaquettaire active de manière synergique les voies de signalisation TGF- β /Smad et NF- κ B au sein des cellules cancéreuses ce qui résulte en l'acquisition d'un phénotype mésenchymal invasif *in vitro* et augmente le nombre de métastases *in vivo* ²²². D'autre part, cette équipe a également montré que les plaquettes participent activement à la formation de niches métastatiques précoces au niveau pulmonaire, via leur sécrétion de CXCL5/7 induite par l'interaction plaquettes-cellules cancéreuses menant au recrutement de granulocytes CD11b⁺ MMP9⁺ Ly6G⁺. Le recrutement de ces cellules et l'établissement des métastases pulmonaires sont très largement diminués lorsque le CXCR2 (récepteur à la CXCL5/7 sur les granulocytes) est inhibé, indiquant que le recrutement des granulocytes médié par les plaquettes est essentiel pour la formation de niches métastatiques⁴⁴. Dans notre modèle, l'interaction plaquettes – cellules de CCR induit la libération de nombreuses cytokines, sous forme libre ou associée aux iMPs. Il est donc probable que les cytokines libérées au cours de l'interaction participent également à ce phénomène en contexte circulatoire.

La thrombine dérivée des plaquettes activées est également impliquée dans l'acquisition d'un phénotype invasif via (i) l'activation de la voie PI3K induisant l'expression et l'association de la MMP-9 et de l'intégrine β 1 à la surface des cellules cancéreuses ³³⁵, (ii) l'induction de la TEM au sein de lignées tumorales ovariennes ³³⁶, et (iii) l'induction de l'activité du FT et de la sécrétion de VEGF au sein de lignées tumorales mammaires ³³⁷. Par ailleurs, via le transfert du miR-939, les PMPs participent activement à la TEM dans des cellules cancéreuses ovariennes épithéliales ³³⁸. Dans notre cas, comme dans la plupart des études portant sur le rôle des plaquettes dans le cancer, l'interaction des plaquettes et des cellules de CCR induit la TEM. Cependant il serait intéressant d'étudier le rôle des iMPs dans ce reprogramming cellulaire et dans l'invasion des cellules tumorales.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons montré que les plaquettes jouent des rôles paradoxaux dans la progression du CCR. D'une part, dans le microenvironnement tumoral, l'interaction plaquettes – cellules de CCR dépendante de la cadhérine-6 induit la libération de cytokines pro-inflammatoires sous forme soluble et associées à des MPs capables de recruter et d'activer les fonctions anti-tumorales des macrophages ce qui résulte en un arrêt du cycle cellulaire *in vitro* et une diminution de la croissance tumorale *in vivo*. Dans notre modèle, les plaquettes intra-tumorales sont donc associées à une diminution de la croissance tumorale via l'activation de la réponse immunitaire innée anti-tumorale. La réponse immunitaire adaptative n'a cependant pas été étudiée et devant l'importance des LT CD8⁺ cytotoxiques dans la régression tumorale et de leur régulation dépendante des TAMs, il apparaît important pour ma part, de s'y intéresser dans de futures études.

Dans un contexte circulatoire, l'interaction des plaquettes avec les cellules cancéreuses HT29 augmente leurs caractéristiques invasives via (i) le transfert de la sous-unité d'intégrine β_3 , (ii) l'induction de la TEM, (iii) l'activation des cellules endothéliales dépendante des iMPs. Le concept de plaquettes « éduquées » par le cancer a émergé ces dernières années et apporte de nouveaux outils diagnostiques intéressants. Au vu de nos résultats sur le rôle des plaquettes et des iMPs dans la formation de métastases, nous pouvons également dire que les plaquettes elles-mêmes sont capables d'éduquer les cellules cancéreuses. Il s'agit plus particulièrement d'un dialogue perpétuel entre les plaquettes et les cellules tumorales au cours de la progression de la maladie.

Notre étude montre que l'effet des plaquettes sur les cellules tumorales est réellement dépendant de leur localisation intravasculaire ou intratumorale et donc par conséquent du stade du cancer, localisé ou métastatique. Cependant, il apparaît dans la littérature que l'effet des plaquettes sur le comportement des cellules tumorales dépend également du type de cancer et particulièrement des mécanismes et molécules d'adhésion impliqués dans l'interaction entre ces deux partenaires. L'utilisation d'antiplaquettaires (aspirine) ou d'inhibiteurs de l'activation plaquettaire (clopidogrel) dans le but de traiter le cancer ou de manager la thrombose associée au cancer devrait donc être mûrement réfléchi en fonction du type et du stade des tumeurs. Il est cependant évident que d'autres études sont nécessaires pour (i) définir si l'action anti-tumorale des plaquettes intra-tumorales peut être généralisée à l'ensemble des cancers et (ii) déterminer si les caractéristiques immunitaires de l'interaction plaquettes – cellules cancéreuses au sein du microenvironnement pourraient être utilisées en clinique dans le but de développer de nouvelles stratégies immunothérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bluteau, D. *et al.* Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 227–234
2. Lefrançois, E. *et al.* The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* **544**, 105–109 (2017).
3. Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Platelets in lung biology. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 569–591 (2013).
4. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* **23**, 177 (2009).
5. Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. C. & Schallmoser, K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* **76**, 371–387 (2016).
6. Mangin, P. H. *et al.* Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica* **103**, 898–907 (2018).
7. Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A. & Du, X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2341–2349 (2010).
8. Ruggeri, Z. M. Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* **82**, 576–584 (1999).
9. Bergmeier, W. *et al.* The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16900–16905 (2006).
10. Ni, H. *et al.* Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J. Clin. Invest.* **106**, 385–392 (2000).
11. Rivera, J., Lozano, M. L., Navarro-Núñez, L. & Vicente, V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* **94**, 700–711 (2009).
12. Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Gainor, J. F., Furie, B. C. & Furie, B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J. Clin. Invest.* **117**, 953 (2007).
13. Davie, E. W. & Ratnoff, O. D. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science* **145**, 1310–1312 (1964).
14. Macfarlane, R. G. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. *Nature* **202**, 498–499 (1964).
15. Palta, S., Saroa, R. & Palta, A. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* **58**, 515–523 (2014).
16. Drake, T. A., Ruf, W., Morrissey, J. H. & Edgington, T. S. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J. Cell Biol.* **109**, 389–395 (1989).
17. Mackman, N., Sawdey, M. S., Keeton, M. R. & Loskutoff, D. J. Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am. J. Pathol.* **143**, 76–84 (1993).
18. Bode, M. & Mackman, N. Regulation of tissue factor gene expression in monocytes and endothelial cells: Thromboxane A2 as a new player. *Vascul. Pharmacol.* **62**, 57–62 (2014).
19. Celi, A. *et al.* P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8767–8771 (1994).
20. Newell, J. L. & Fay, P. J. Acidic residues C-terminal to the A2 domain facilitate thrombin-catalyzed activation of factor VIII. *Biochemistry* **47**, 8786–8795 (2008).
21. Renné, T. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. *Semin. Immunopathol.* **34**, 31–41 (2012).
22. Leeb-Lundberg, L. M. F., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D. J. & Zuraw,

- B. L. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.* **57**, 27–77 (2005).
23. Long, A. T., Kenne, E., Jung, R., Fuchs, T. A. & Renné, T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J. Thromb. Haemost. JTH* **14**, 427–437 (2016).
 24. Björkqvist, J., Nickel, K. F., Stavrou, E. & Renné, T. In vivo activation and functions of the protease factor XII. *Thromb. Haemost.* **112**, 868–875 (2014).
 25. Monroe, D. M., Mackman, N. & Hoffman, M. Wound healing in hemophilia B mice and low tissue factor mice. *Thromb. Res.* **125 Suppl 1**, S74–77 (2010).
 26. Mackman, N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1015–1022 (2004).
 27. Falati, S. *et al.* Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J. Exp. Med.* **197**, 1585–1598 (2003).
 28. Dubois, C., Panicot-Dubois, L., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. & Furie, B. C. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood* **107**, 3902 (2006).
 29. Parry, G. C., Erlich, J. H., Carmeliet, P., Luther, T. & Mackman, N. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J. Clin. Invest.* **101**, 560–569 (1998).
 30. Darbousset, R. *et al.* Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* **120**, 2133–2143 (2012).
 31. Schoen, P. & Lindhout, T. Flow and the inhibition of prothrombinase by antithrombin III and heparin. *Blood* **78**, 118–124 (1991).
 32. Lijnen, H. R. Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**, 226–236 (2001).
 33. Sidelmann, J. J., Gram, J., Jespersen, J. & Kluft, C. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin. Thromb. Hemost.* **26**, 605–618 (2000).
 34. Zwaal, R. F. A. & Schroit, A. J. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* **89**, 1121–1132 (1997).
 35. Giesen, P. L. A. *et al.* Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 2311–2315 (1999).
 36. Geddings, J. E. & Mackman, N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood* **122**, 1873–1880 (2013).
 37. Falanga, A., Panova-Noeva, M. & Russo, L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **22**, 49–60 (2009).
 38. Thomas, G. M. *et al.* Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J. Exp. Med.* **206**, 1913–1927 (2009).
 39. Thomas, G. M. *et al.* 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 (2015).
 40. Hisada, Y., Ay, C., Auriemma, A. C., Cooley, B. C. & Mackman, N. Human pancreatic tumors grown in mice release tissue factor-positive microvesicles that increase venous clot size. *J. Thromb. Haemost. JTH* (2017). doi:10.1111/jth.13809
 41. Smyth, S. S. *et al.* Platelet functions beyond hemostasis. *J. Thromb. Haemost. JTH* **7**, 1759–1766 (2009).
 42. Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M. & Modjeski, K. L. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* **123**, 2759–2767 (2014).

43. Kopp, H.-G., Placke, T. & Salih, H. R. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* **69**, 7775–7783 (2009).
44. Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E3053-3061 (2014).
45. Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 497–512 (2014).
46. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
47. Li, R. *et al.* Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. *BMC Cancer* **14**, 167 (2014).
48. Stone, R. L. *et al.* Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 610–618 (2012).
49. Haemmerle, M. *et al.* FAK regulates platelet extravasation and tumor growth after antiangiogenic therapy withdrawal. *J. Clin. Invest.* **126**, 1885 (2016).
50. Wirtz, T. H. *et al.* Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis* **239**, 1–10 (2015).
51. Mause, S. F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R. R. & Weber, C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1512–1518 (2005).
52. Aggrey, A. A., Srivastava, K., Ture, S., Field, D. J. & Morrell, C. N. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 4685–4691 (2013).
53. Lindemann, S. *et al.* Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol.* **154**, 485–490 (2001).
54. Scott, T. & Owens, M. D. Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF-kappaB pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2. *Mol. Immunol.* **45**, 1001–1008 (2008).
55. Shashkin, P. N., Brown, G. T., Ghosh, A., Marathe, G. K. & McIntyre, T. M. Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 3495–3502 (2008).
56. Brown, G. T. & McIntyre, T. M. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 5489–5496 (2011).
57. Denis, M. M. *et al.* Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. *Cell* **122**, 379–391 (2005).
58. Jin Richard C., Voetsch Barbara & Loscalzo Joseph. Endogenous Mechanisms of Inhibition of Platelet Function. *Microcirculation* **12**, 247–258 (2010).
59. Kaplan, Z. S. & Jackson, S. P. The Role of Platelets in Atherothrombosis. *ASH Educ. Program Book* **2011**, 51–61 (2011).
60. Gleissner, C. A., Hundelshausen, P. von & Ley, K. Platelet Chemokines in Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1920–1927 (2008).
61. Brandt Ernst *et al.* The β -thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 471–478 (2000).
62. Kasper, B., Brandt, E., Bulfone-Paus, S. & Petersen, F. Platelet factor 4 (PF-4)–induced neutrophil adhesion is controlled by src-kinases, whereas PF-4–mediated exocytosis requires the additional activation of p38 MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* **103**, 1602–1610 (2004).

63. Kasper, B., Brandt, E., Brandau, S. & Petersen, F. Platelet Factor 4 (CXC Chemokine Ligand 4) Differentially Regulates Respiratory Burst, Survival, and Cytokine Expression of Human Monocytes by Using Distinct Signaling Pathways. *J. Immunol.* **179**, 2584–2591 (2007).
64. Scheuerer, B. *et al.* The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* **95**, 1158–1166 (2000).
65. Hundelshausen, P. von *et al.* Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* **105**, 924–930 (2005).
66. Gawaz, M., Langer, H. & May, A. E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **115**, 3378–3384 (2005).
67. Kaplanski, G. *et al.* Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* **84**, 4242–4248 (1994).
68. Gawaz, M. *et al.* Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* **148**, 75–85 (2000).
69. Gawaz, M. *et al.* Activated Platelets Induce Monocyte Chemotactic Protein-1 Secretion and Surface Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Endothelial Cells. *Circulation* **98**, 1164–1171 (1998).
70. Semple, J. W., Italiano, J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 264–274 (2011).
71. The CD40/CD40 Ligand System: Linking Inflammation With Atherothrombosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 669–677 (2009).
72. Schönbeck, U. & Libby, P. CD40 Signaling and Plaque Instability. *Circ. Res.* **89**, 1092–1103 (2001).
73. Addi, A. B., Cammarata, D., Conley, P. B., Boeynaems, J.-M. & Robaye, B. Role of the P2Y₁₂ Receptor in the Modulation of Murine Dendritic Cell Function by ADP. *J. Immunol.* **185**, 5900–5906 (2010).
74. Totani, L. *et al.* Prasugrel inhibits platelet-leukocyte interaction and reduces inflammatory markers in a model of endotoxic shock in the mouse. *Thromb. Haemost.* **107**, 1130–1140 (2012).
75. Hagiwara, S. *et al.* Adenosine diphosphate receptor antagonist clopidogrel sulfate attenuates LPS-induced systemic inflammation in a rat model. *Shock Augusta Ga* **35**, 289–292 (2011).
76. Katoh N. *et al.* Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **146**, 354–361 (2006).
77. Matilde León-Ponte, Ahern, G. P. & O’Connell, P. J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood* **109**, 3139–3146 (2007).
78. Assinger, A. *et al.* Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 799–809 (2011).
79. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int. Immunopharmacol.* **17**, 1176–1184 (2013).
80. Hrachovinová, I. *et al.* Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat. Med.* **9**, 1020–1025 (2003).
81. Gawaz M., Fateh-Moghadam S., Pilz G., Gurland H.-J. & Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur. J. Clin. Invest.* **25**, 843–851 (1995).
82. Grommes, J. *et al.* Disruption of Platelet-derived Chemokine Heteromers Prevents Neutrophil Extravasation in Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 628–636 (2012).

83. Engelmann, B. & Massberg, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 34–45 (2013).
84. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463–469 (2007).
85. Fuchs, T. A., Brill, A. & Wagner, D. D. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1777–1783 (2012).
86. Jenne, C. N. & Kubes, P. NETs Tangle with HIV. *Cell Host Microbe* **12**, 5–7 (2012).
87. Jenne, C. N. *et al.* Neutrophils Recruited to Sites of Infection Protect from Virus Challenge by Releasing Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Host Microbe* **13**, 169–180 (2013).
88. Cadrillier, A. *et al.* Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **122**, 2661–2671 (2012).
89. McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B. G., Jenne, C. N. & Kubes, P. Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis. *Cell Host Microbe* **12**, 324–333 (2012).
90. Pfeiler, S., Massberg, S. & Engelmann, B. Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb. Res.* **133**, S35–S37 (2014).
91. Duguid, J. B. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J. Pathol. Bacteriol.* **58**, 207–212 (1946).
92. Duguid, J. B. & Anderson, G. S. The pathogenesis of hyaline arteriosclerosis. *J. Pathol. Bacteriol.* **64**, 519–522 (1952).
93. Mustard, J. F., Packham, M. A., Rowsell, H. C. & Jorgensen, L. The role of platelets in thrombosis and atherosclerosis. *Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl.* **26**, 261–274 (1967).
94. Renaud, S., Kinlough, R. L. & Mustard, J. F. Relationship between platelet aggregation and the thrombotic tendency in rats fed hyperlipemic diets. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **22**, 339–343 (1970).
95. Gils Janine M., Zwaginga Jaap Jan & Hordijk Peter L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 195–204 (2008).
96. Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R. A., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin. Immunopathol.* **34**, 5–30 (2012).
97. Huo, Y. *et al.* Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* **9**, 61–67 (2003).
98. Nassar, T. *et al.* Platelet Factor 4 Enhances the Binding of Oxidized Low-density Lipoprotein to Vascular Wall Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 6187–6193 (2003).
99. Sachais, B. S. *et al.* Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE^{-/-} mice. *Thromb. Haemost.* **98**, 1108–1113 (2007).
100. Shoji, T. *et al.* Platelet-monocyte aggregates are independently associated with occurrence of carotid plaques in type 2 diabetic patients. *J. Atheroscler. Thromb.* **12**, 344–352 (2005).
101. Dotsenko, O. *et al.* Platelet and leukocyte activation, atherosclerosis and inflammation in European and South Asian men. *J. Thromb. Haemost. JTH* **5**, 2036–2042 (2007).
102. Scull, C. M., Hays, W. D. & Fischer, T. H. Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets. *J. Inflamm.* **7**, 53 (2010).
103. Halvorsen, B. *et al.* Activated platelets promote increased monocyte expression of CXCR5 through prostaglandin E2-related mechanisms and enhance the anti-inflammatory effects of CXCL13. *Atherosclerosis* **234**, 352–359 (2014).
104. Xiang, B. *et al.* Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-

- dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat. Commun.* **4**, 2657 (2013).
105. Langer, H. F. *et al.* Platelets Recruit Human Dendritic Cells Via Mac-1/JAM-C Interaction and Modulate Dendritic Cell Function In Vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1463–1470 (2007).
 106. Maître B. *et al.* Immature myeloid dendritic cells capture and remove activated platelets from preformed aggregates. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2262–2272 (2010).
 107. Martinson, J., Bae, J., Klingemann, H.-G. & Tam, Y. Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC. *Cytotherapy* **6**, 487–497 (2004).
 108. Hamzeh-Cognasse, H. *et al.* Direct contact of platelets and their released products exert different effects on human dendritic cell maturation. *BMC Immunol.* **9**, 54 (2008).
 109. Kaneider, N. C., Kaser, A., Tilg, H., Ricevuti, G. & Wiedermann, C. J. CD40 Ligand-Dependent Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by Activated Platelets
,
CD40 Ligand-Dependent Maturation of Human
Monocyte-Derived Dendritic Cells by Activated Platelets. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **16**, 225–231 (2003).
 110. Hagihara, M. *et al.* Platelets, after Exposure to a High Shear Stress, Induce IL-10-Producing, Mature Dendritic Cells In Vitro. *J. Immunol.* **172**, 5297–5303 (2004).
 111. Kissel Karin *et al.* Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines. *Transfusion (Paris)* **46**, 818–827 (2006).
 112. Mueller Anja *et al.* CXCL4-induced migration of activated T lymphocytes is mediated by the chemokine receptor CXCR3. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 875–882 (2008).
 113. Lasagni, L. *et al.* An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. *J. Exp. Med.* **197**, 1537–1549 (2003).
 114. Srivastava, K. *et al.* Platelet Factor 4 Mediates Inflammation in Experimental Cerebral Malaria. *Cell Host Microbe* **4**, 179–187 (2008).
 115. Shi, G. *et al.* Platelet factor 4 limits Th17 differentiation and cardiac allograft rejection. *J. Clin. Invest.* **124**, 543–552 (2014).
 116. Danese, S. *et al.* Cutting Edge: T Cells Trigger CD40-Dependent Platelet Activation and Granular RANTES Release: A Novel Pathway for Immune Response Amplification. *J. Immunol.* **172**, 2011–2015 (2004).
 117. Chapman, L. M. *et al.* Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. *J. Immunol.* **189**, 916–923 (2012).
 118. Swaim, A. F., Field, D. J., Fox-Talbot, K., Baldwin, W. M. & Morrell, C. N. Platelets Contribute to Allograft Rejection through Glutamate Receptor Signaling. *J. Immunol.* **185**, 6999–7006 (2010).
 119. Xu, H., Zhang, X., Mannon, R. B. & Kirk, A. D. Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154. *J. Clin. Invest.* **116**, 769–774 (2006).
 120. Sprague, D. L. *et al.* Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* **111**, 5028–5036 (2008).
 121. Elzey, B. D. *et al.* Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity: A Communication Link between Innate and Adaptive Immune Compartments. *Immunity* **19**, 9–19 (2003).
 122. Elzey, B. D. *et al.* Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against *Listeria monocytogenes* challenge. *Blood* **111**, 3684–3691 (2008).
 123. Younas, M. *et al.* IL-7 Modulates In Vitro and In Vivo Human Memory T Regulatory

- Cell Functions through the CD39/ATP Axis. *J. Immunol.* **191**, 3161–3168 (2013).
124. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
 125. Mantovani, A. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* **13**, 265–270 (1992).
 126. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549–555 (2002).
 127. Long, K. B. & Beatty, G. L. Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy. *OncoImmunology* **2**, e26860 (2013).
 128. Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.-L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J. Immunol.* **181**, 3733–3739 (2008).
 129. Alberto Mantovani, Antonio Sica & Locati, M. Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity* **23**, 344–346 (2005).
 130. Solinas G., Germano G., Mantovani A. & Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1065–1073 (2009).
 131. Condeelis, J. & Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263–266 (2006).
 132. Cassol Edana, Cassetta Luca, Alfano Massimo & Poli Guido. Macrophage polarization and HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 599–608 (2009).
 133. Verreck, F. A. W. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4560–4565 (2004).
 134. Kolls, J. K. & Lindén, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**, 467–476 (2004).
 135. Mantovani, A. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum. Immunol.* **70**, 325–330 (2009).
 136. Hao, N.-B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 948098 (2012).
 137. Odegaard, J. I. & Chawla, A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **4**, 619–626 (2008).
 138. Bekisz, J. *et al.* Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **33**, 154–161 (2013).
 139. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
 140. Hu, X., Li, W.-P., Meng, C. & Ivashkiv, L. B. Inhibition of IFN- γ Signaling by Glucocorticoids. *J. Immunol.* **170**, 4833–4839 (2003).
 141. Li, Q. & Verma, I. M. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725–734 (2002).
 142. Ong, S.-M. *et al.* Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *Eur. J. Immunol.* **42**, 89–100 (2011).
 143. Dumont, P. *et al.* Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. *Lab. Invest.* **88**, 896–906 (2008).
 144. Kozłowska, K., Cichorek, M., Wachulska, M. & Bautembach, I. Role of Interleukins and Nitric Oxide Secretion by Peritoneal Macrophages in Differential Tumoricidal Effect to Transplantable Melanomas as Regarding their Biological Properties. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **28**, 305–317 (2006).

145. Nardin, A. & Abastado, J.-P. Macrophages and cancer. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 3494–3505 (2008).
146. Graves, D. T., Jiang, Y. L., Williamson, M. J. & Valente, A. J. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science* **245**, 1490–1493 (1989).
147. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
148. Siveen, K. S. & Kuttan, G. Role of macrophages in tumour progression. *Immunol. Lett.* **123**, 97–102 (2009).
149. Murdoch, C., Giannoudis, A. & Lewis, C. E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* **104**, 2224–2234 (2004).
150. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 540–550 (2004).
151. Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C. & Mantovani, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **66**, 1–9 (2008).
152. Coffelt, S. B. & Scandurro, A. B. Tumors Sound the Alarmin(s). *Cancer Res.* **68**, 6482–6485 (2008).
153. Coffelt, S. B., Hughes, R. & Lewis, C. E. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* **1796**, 11–18 (2009).
154. Bingle L., Brown N. J. & Lewis C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* **196**, 254–265 (2002).
155. Zeisberger, S. M. *et al.* Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer* **95**, 272–281 (2006).
156. Tanaka, Y. *et al.* Thymidine phosphorylase expression in tumor-infiltrating macrophages may be correlated with poor prognosis in uterine endometrial cancer. *Hum. Pathol.* **33**, 1105–1113 (2002).
157. Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G. & Pollard, J. W. Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *J. Exp. Med.* **193**, 727–740 (2001).
158. Aharinejad, S., Sioud, M., Lucas, T. & Abraham, D. Target Validation Using RNA Interference in Solid Tumors. *Target Discov. Valid. Rev. Protoc.* 227–238 (2007). doi:10.1385/1-59745-208-4:227
159. Vérollet Christel *et al.* Extracellular proteolysis in macrophage migration: Losing grip for a breakthrough. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2805–2813 (2011).
160. Giraud, E., Inoue, M. & Hanahan, D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* **114**, 623–633 (2004).
161. Du, R. *et al.* HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* **13**, 206–220 (2008).
162. Krecicki T., Zalesska-Krecicka M., Jelen M., Szkudlarek T. & Horobiowska M. Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **26**, 469–472 (2002).
163. Guruvayoorappan, C. Tumor Versus Tumor-Associated Macrophages: How Hot is the Link? Tumor Versus Tumor-Associated Macrophages: How Hot is the Link? *Integr. Cancer Ther.* **7**, 90–95 (2008).
164. Schioppa, T. *et al.* Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *J. Exp. Med.* **198**, 1391–1402 (2003).
165. Carmi, Y. *et al.* The role of macrophage-derived IL-1 in induction and maintenance of

- angiogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 4705–4714 (2009).
166. Palma, M. D. & Naldini, L. Angiopoietin-2 TIEs Up Macrophages in Tumor Angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5226–5232 (2011).
167. Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S. & Lewis, C. E. Expression of Tie-2 by Human Monocytes and Their Responses to Angiopoietin-2. *J. Immunol.* **178**, 7405–7411 (2007).
168. Roda, J. M. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor-2 α Regulates GM-CSF–Derived Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Production from Macrophages and Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Immunol.* **187**, 1970–1976 (2011).
169. Roda, J. M. *et al.* Stabilization of HIF-2 α Induces sVEGFR-1 Production from Tumor-Associated Macrophages and Decreases Tumor Growth in a Murine Melanoma Model. *J. Immunol.* **189**, 3168–3177 (2012).
170. Schoppmann, S. F. *et al.* Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* **161**, 947–956 (2002).
171. Tsutsui, S. *et al.* Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: The relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol. Rep.* **14**, 425–431 (2005).
172. Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* **66**, 605–612 (2006).
173. Huang, S. *et al.* Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1134–1142 (2002).
174. Erreni, M., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* **4**, 141–154 (2011).
175. Brekhman, V. *et al.* Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. *FASEB J.* **25**, 55–65 (2010).
176. Kaafarani, I. *et al.* Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB J.* **23**, 3424–3435 (2009).
177. Nathan, C. F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**, 319–326 (1987).
178. MacMicking, J., Xie, Q. & Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323–350 (1997).
179. Blankenstein, T. *et al.* Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor alpha gene transfer. *J. Exp. Med.* **173**, 1047–1052 (1991).
180. McBride, W. H. Phenotype and functions of intratumoral macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **865**, 27–41 (1986).
181. Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L., Sugarman, B. J. & Schreiber, H. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 5233–5237 (1986).
182. Webb, D. S. & Gerrard, T. L. IFN-alpha and IFN-gamma can affect both monocytes and tumor cells to modulate monocyte-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **144**, 3643–3648 (1990).
183. Baron, S. *et al.* Clinical Model: Interferons Activate Human Monocytes to An Eradicative Tumor Cell Level In Vitro. *J. Interferon Cytokine Res.* **27**, 157–164 (2007).
184. Miyanishi, M. *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435–439 (2007).
185. Segawa, K., Suzuki, J. & Nagata, S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 19246–19251 (2011).
186. Gardai, S. J. *et al.* Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic

- Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell* **123**, 321–334 (2005).
187. Chao, M. P. *et al.* Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *Sci. Transl. Med.* **2**, 63ra94-63ra94 (2010).
188. Weiskopf, K. *et al.* Engineered SIRP α Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. *Science* **341**, 88–91 (2013).
189. Grugan, K. D. *et al.* Tumor-Associated Macrophages Promote Invasion while Retaining Fc-Dependent Anti-Tumor Function. *J. Immunol.* **189**, 5457–5466 (2012).
190. Oldenborg, P.-A., Gresham, H. D. & Lindberg, F. P. Cd47-Signal Regulatory Protein α (Sirp α) Regulates Fc γ and Complement Receptor-Mediated Phagocytosis. *J. Exp. Med.* **193**, 855–862 (2001).
191. Oldenborg, P.-A. *et al.* Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells. *Science* **288**, 2051–2054 (2000).
192. Jaiswal, S. *et al.* CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell* **138**, 271–285 (2009).
193. Majeti, R. *et al.* CD47 Is an Adverse Prognostic Factor and Therapeutic Antibody Target on Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell* **138**, 286–299 (2009).
194. Kurte, M. *et al.* A Synthetic Peptide Homologous to Functional Domain of Human IL-10 Down-Regulates Expression of MHC Class I and Transporter Associated with Antigen Processing 1/2 in Human Melanoma Cells. *J. Immunol.* **173**, 1731–1737 (2004).
195. Ben-Baruch, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 38–52 (2006).
196. Bak, S. P., Alonso, A., Turk, M. J. & Berwin, B. Murine ovarian cancer vascular leukocytes require arginase-1 activity for T cell suppression. *Mol. Immunol.* **46**, 258–268 (2008).
197. Mantovani, A. & Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 231–237 (2010).
198. Flavell, R. A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S. H. & Licona-Limón, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 554–567 (2010).
199. Castriconi, R. *et al.* Transforming growth factor β 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4120–4125 (2003).
200. Ito, M. *et al.* Tumor-Derived TGF β -1 Induces Dendritic Cell Apoptosis in the Sentinel Lymph Node. *J. Immunol.* **176**, 5637–5643 (2006).
201. Weber, F. *et al.* Transforming growth factor- β 1 immobilises dendritic cells within skin tumours and facilitates tumour escape from the immune system. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 898–906 (2005).
202. Maeda, H. & Shiraishi, A. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* **156**, 73–78 (1996).
203. Maeda, H., Tsuru, S. & Shiraishi, A. Improvement of Macrophage Dysfunction by Administration of Anti-transforming Growth Factor- β Antibody in EL4-bearing Hosts. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* **85**, 1137 (1994).
204. Maeda, H. *et al.* TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J. Immunol.* **155**, 4926–4932 (1995).
205. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380 (2005).
206. Matsuda, M. *et al.* Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J. Exp. Med.* **180**, 2371–2376 (1994).

207. Qin, Z., Noffz, G., Mohaupt, M. & Blankenstein, T. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J. Immunol.* **159**, 770–776 (1997).
208. Beissert, S., Hosoi, J., Grabbe, S., Asahina, A. & Granstein, R. D. IL-10 inhibits tumor antigen presentation by epidermal antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **154**, 1280–1286 (1995).
209. Miotto, D. *et al.* CD8+ T cells expressing IL-10 are associated with a favourable prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* **69**, 355–360 (2010).
210. Lopez, M. V., Adris, S. K., Bravo, A. I., Chernajovsky, Y. & Podhajcer, O. L. IL-12 and IL-10 Expression Synergize to Induce the Immune-Mediated Eradication of Established Colon and Mammary Tumors and Lung Metastasis. *J. Immunol.* **175**, 5885–5894 (2005).
211. Mocellin, S., Marincola, F. M. & Young, H. A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1043–1051
212. Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P. & Bronte, V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol. Rev.* **222**, 162–179
213. Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D. & Gabrilovich, D. I. Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *J. Immunol.* **172**, 989–999 (2004).
214. Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol. Rev.* **222**, 155–161 (2008).
215. Gorelik E., Wiltrout R. H., Brunda M. J., Holden H. T. & Herberman R. B. Augmentation of metastasis formation by thioglycollate-elicited macrophages. *Int. J. Cancer* **29**, 575–581 (1982).
216. Wyckoff, J. *et al.* A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Res.* **64**, 7022–7029 (2004).
217. Wyckoff, J. B. *et al.* Direct Visualization of Macrophage-Assisted Tumor Cell Intravasation in Mammary Tumors. *Cancer Res.* **67**, 2649–2656 (2007).
218. Hagemann, T. *et al.* Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* **25**, 1543–1549 (2004).
219. Yang, M. *et al.* Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol. Cancer* **10**, 117 (2011).
220. Gasic, G. J., Gasic, T. B. & Stewart, C. C. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **61**, 46–52 (1968).
221. Egan, K. *et al.* Platelet adhesion and degranulation induce pro-survival and pro-angiogenic signalling in ovarian cancer cells. *PloS One* **6**, e26125 (2011).
222. Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* **20**, 576–590 (2011).
223. Wang, Y. & Zhang, H. Platelet-induced inhibition of tumor cell growth. *Thromb. Res.* **123**, 324–330 (2008).
224. Michael, J. V. *et al.* Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood* **130**, 567–580 (2017).
225. Rothwell, P. M. *et al.* Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *The Lancet* **379**, 1591–1601 (2012).
226. Cook, N. R. *et al.* Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women’s Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA* **294**, 47–55 (2005).

227. Markowitz, S. D., Dawson, D. M., Willis, J. & Willson, J. K. V. Focus on colon cancer. *Cancer Cell* **1**, 233–236 (2002).
228. Varki, A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* **110**, 1723–1729 (2007).
229. Alcalay, A. *et al.* Venous thromboembolism in patients with colorectal cancer: incidence and effect on survival. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 1112–1118 (2006).
230. White, R. H. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* **107**, I4-8 (2003).
231. Blom, J. W. *et al.* Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J. Thromb. Haemost. JTH* **4**, 529–535 (2006).
232. Camez, A. *et al.* Human platelet-tumor cell interactions vary with the tumor cell lines. *Invasion Metastasis* **6**, 321–334 (1986).
233. Boukerche, H. *et al.* Human melanoma cell lines differ in their capacity to release ADP and aggregate platelets. *Br. J. Haematol.* **87**, 763–772 (1994).
234. Alonso-Escolano, D., Strongin, A. Y., Chung, A. W., Deryugina, E. I. & Radomski, M. W. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 241–252 (2004).
235. Heinmöller, E. *et al.* Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**, 735–744 (1996).
236. Rickles, F. R. & Falanga, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res.* **102**, V215-224 (2001).
237. Jóna, V. *et al.* Thrombocytosis of Liver Metastasis from Colorectal Cancer as Predictive Factor. *Pathol. Oncol. Res. POR* **21**, 991–997 (2015).
238. Khorana, A. A., Francis, C. W., Culakova, E. & Lyman, G. H. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* **104**, 2822–2829 (2005).
239. Baranyai, Z. *et al.* Paraneoplastic thrombocytosis in gastrointestinal cancer. *Platelets* **27**, 269–275 (2016).
240. Chadha, A. S. *et al.* Paraneoplastic thrombocytosis independently predicts poor prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **54**, 971–978 (2015).
241. Gücer, F. *et al.* Thrombocytosis as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **70**, 210–214 (1998).
242. Jefferson, K. & Persad, R. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with renal cell carcinoma. *BJU Int.* **87**, 715–716 (2001).
243. Sierko, E. & Wojtukiewicz, M. Z. Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin. Thromb. Hemost.* **30**, 95–108 (2004).
244. Karpatkin, S. & Pearlstein, E. Role of platelets in tumor cell metastases. *Ann. Intern. Med.* **95**, 636–641 (1981).
245. Mezouar, S. *et al.* Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: Experimental and clinical evidences. *Thromb. Res.* **139**, 65–76 (2016).
246. Mezouar, S., Darbousset, R., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L. & Dubois, C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. *Int. J. Cancer* **136**, 462–475 (2015).
247. Karpatkin, S., Pearlstein, E., Ambrogio, C. & Collier, B. S. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J. Clin. Invest.* **81**, 1012–1019 (1988).
248. Engebraaten, O., Trikha, M., Juell, S., Garman-Vik, S. & Fodstad, Ø. Inhibition of in

- vivo tumour growth by the blocking of host alpha(v)beta3 and alphaII(b)beta3 integrins. *Anticancer Res.* **29**, 131–137 (2009).
249. Weber, M. R. *et al.* Activated tumor cell integrin $\alpha v \beta 3$ cooperates with platelets to promote extravasation and metastasis from the blood stream. *Thromb. Res.* **140 Suppl 1**, S27–36 (2016).
250. Mammadova-Bach, E. *et al.* Platelet integrin $\alpha 6 \beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* **1**, e88245 (2016).
251. Kim, Y. J., Borsig, L., Varki, N. M. & Varki, A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9325–9330 (1998).
252. Jain, S. *et al.* Platelet glycoprotein Iba supports experimental lung metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9024–9028 (2007).
253. Takagi, S. *et al.* Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. *Int. J. Cancer* **134**, 2605–2614 (2014).
254. Fujita, N. & Takagi, S. The impact of Aggrus/podoplanin on platelet aggregation and tumour metastasis. *J. Biochem. (Tokyo)* **152**, 407–413 (2012).
255. Dunne, E. *et al.* Cadherin 6 Has a Functional Role in Platelet Aggregation and Thrombus Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1724–1731 (2012).
256. Sancisi, V. *et al.* Cadherin 6 is a new RUNX2 target in TGF- β signalling pathway. *PLoS One* **8**, e75489 (2013).
257. Gugnoni, M. *et al.* Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy. *Oncogene* **36**, 667–677 (2017).
258. Bambace, N. M. & Holmes, C. E. The platelet contribution to cancer progression. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 237–249 (2011).
259. Ibele, G. M., Kay, N. E., Johnson, G. J. & Jacob, H. S. Human platelets exert cytotoxic effects on tumor cells. *Blood* **65**, 1252–1255 (1985).
260. George, D. Targeting PDGF receptors in cancer--rationales and proof of concept clinical trials. *Adv. Exp. Med. Biol.* **532**, 141–151 (2003).
261. Zhang, J., Yang, P. L. & Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 28–39 (2009).
262. Qi, C. *et al.* P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth. *Oncotarget* **6**, 6584–6596 (2015).
263. Felding-Habermann, B. *et al.* Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1853–1858 (2001).
264. Felding-Habermann, B., Habermann, R., Saldívar, E. & Ruggeri, Z. M. Role of 3 Integrins in Melanoma Cell Adhesion to Activated Platelets under Flow. *J. Biol. Chem.* **271**, 5892–5900 (1996).
265. Kato, Y. *et al.* Enhanced Expression of Aggrus (T1alpha/Podoplanin), a Platelet-Aggregation-Inducing Factor in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Tumor Biol.* **26**, 195–200 (2005).
266. Kato, Y. *et al.* Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J. Biol. Chem.* **278**, 51599–51605 (2003).
267. Takagi, S. *et al.* Platelets Promote Tumor Growth and Metastasis via Direct Interaction between Aggrus/Podoplanin and CLEC-2. *PLoS ONE* **8**, e73609 (2013).
268. Miyata, K. *et al.* Suppression of Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and pulmonary metastasis by a single-chain antibody variable region fragment. *Cancer Med.* **3**, 1595–1604 (2014).
269. Nakazawa, Y. *et al.* Prevention of hematogenous metastasis by neutralizing mice and its chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. *Cancer Sci.* **102**, 2051–2057 (2011).
270. Sekiguchi, T. *et al.* Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis. *Oncotarget* **7**, 3934–3946 (2016).

271. Dovizio, M. *et al.* Pharmacological inhibition of platelet-tumor cell cross-talk prevents platelet-induced overexpression of cyclooxygenase-2 in HT29 human colon carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **84**, 25–40 (2013).
272. Steele, B. M. *et al.* WNT-3a modulates platelet function by regulating small GTPase activity. *FEBS Lett.* **586**, 2267–2272 (2012).
273. Steele, B. M. *et al.* Canonical Wnt signaling negatively regulates platelet function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19836–19841 (2009).
274. Maguire, P. B. *et al.* Proteomic Analysis Reveals a Strong Association of β -Catenin with Cadherin Adherens Junctions in Resting Human Platelets. *PROTEOMICS* (2018). doi:10.1002/pmic.201700419
275. Berthet, J. *et al.* Human platelets can discriminate between various bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **145**, 189–200 (2012).
276. Cognasse, F. *et al.* Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br. J. Haematol.* **141**, 84–91 (2008).
277. Damien, P. *et al.* NF- κ B Links TLR2 and PAR1 to Soluble Immunomodulator Factor Secretion in Human Platelets. *Front. Immunol.* **8**, 85 (2017).
278. Nguyen, K. A. *et al.* Specific activation, signalling and secretion profiles of human platelets following PAR-1 and PAR-4 stimulation. *Platelets* **26**, 795–798 (2015).
279. Cho, E. A. *et al.* Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Dev. Camb. Engl.* **125**, 803–812 (1998).
280. Inoue, T., Chisaka, O., Matsunami, H. & Takeichi, M. Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions, and neural crest subpopulations in mouse embryos. *Dev. Biol.* **183**, 183–194 (1997).
281. Inoue, Y. U., Asami, J. & Inoue, T. Cadherin-6 gene regulatory patterns in the postnatal mouse brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 95–104 (2008).
282. Köbel, M. *et al.* Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med.* **5**, e232 (2008).
283. Paul, R. *et al.* Cadherin-6, a cell adhesion molecule specifically expressed in the proximal renal tubule and renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **57**, 2741–2748 (1997).
284. Shimazui, T. *et al.* Expression of cadherin-6 as a novel diagnostic tool to predict prognosis of patients with E-cadherin-absent renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **4**, 2419–2424 (1998).
285. Paul, R. *et al.* Cadherin-6: a new prognostic marker for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **171**, 97–101 (2004).
286. Shimoyama, Y., Gotoh, M., Terasaki, T., Kitajima, M. & Hirohashi, S. Isolation and sequence analysis of human cadherin-6 complementary DNA for the full coding sequence and its expression in human carcinoma cells. *Cancer Res.* **55**, 2206–2211 (1995).
287. Shimoyama, Y., Takeda, H., Yoshihara, S., Kitajima, M. & Hirohashi, S. Biochemical Characterization and Functional Analysis of Two Type II Classic Cadherins, Cadherin-6 and -14, and Comparison with E-cadherin. *J. Biol. Chem.* **274**, 11987–11994 (1999).
288. Bialucha, C. U. *et al.* Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6–Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers. *Cancer Discov.* **7**, 1030–1045 (2017).
289. Goepfert, B. *et al.* Cadherin-6 is a putative tumor suppressor and target of epigenetically dysregulated miR-429 in cholangiocarcinoma. *Epigenetics* **11**, 780–790 (2016).
290. Ariad, S., Seymour, L. & Bezwoda, W. R. Platelet-derived growth factor (PDGF) in plasma of breast cancer patients: correlation with stage and rate of progression. *Breast Cancer Res. Treat.* **20**, 11–17 (1991).
291. Di Stefano, J. F., Kirchner, M., Dagenhardt, K. & Hagag, N. Activation of cancer cell

- proteases and cytotoxicity by EGF and PDGF growth factors. *Am. J. Med. Sci.* **300**, 9–15 (1990).
292. Cho, M. S. *et al.* Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. *Blood* **120**, 4869–4872 (2012).
293. Cho, M. S. *et al.* Role of ADP receptors on platelets in the growth of ovarian cancer. *Blood* **130**, 1235–1242 (2017).
294. Cathcart, M.-C. *et al.* Examination of thromboxane synthase as a prognostic factor and therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **10**, 25 (2011).
295. Hu, L., Roth, J. M., Brooks, P., Luty, J. & Karpatkin, S. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. *Cancer Res.* **68**, 4666–4673 (2008).
296. Alexander, E. T. *et al.* Thrombin inhibition and cyclophosphamide synergistically block tumor progression and metastasis. *Cancer Biol. Ther.* **16**, 1802–1811 (2015).
297. Suk, K., Somers, S. D. & Erickson, K. L. Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN-gamma differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology* **80**, 617 (1993).
298. Vasina, E. M. *et al.* Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation. *Cell Death Dis.* **2**, e210 (2011).
299. Laffont, B. *et al.* Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function. *Thromb. Haemost.* **115**, 311–323 (2016).
300. Fidler, I. J., Sone, S., Fogler, W. E. & Barnes, Z. L. Eradication of spontaneous metastases and activation of alveolar macrophages by intravenous injection of liposomes containing muramyl dipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 1680–1684 (1981).
301. Kleinerman, E. S., Murray, J. L., Snyder, J. S., Cunningham, J. E. & Fidler, I. J. Activation of Tumoricidal Properties in Monocytes from Cancer Patients following Intravenous Administration of Liposomes Containing Muramyl Tripeptide Phosphatidylethanolamine. *Cancer Res.* **49**, 4665–4670 (1989).
302. Chou, A. J. *et al.* Addition of Muramyl Tripeptide to Chemotherapy for Patients with Newly Diagnosed Metastatic Osteosarcoma: a Report from the Children’s Oncology Group. *Cancer* **115**, 5339 (2009).
303. Luo, Y. & Knudson, M. J. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin-Induced Macrophage Cytotoxicity against Bladder Cancer Cells. *Clin. Dev. Immunol.* **2010**, (2010).
304. Heldwein, K. A. *et al.* TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 277–286 (2003).
305. Beatty, G. L. *et al.* CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans. *Science* **331**, 1612 (2011).
306. Beatty, G. L. *et al.* A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, (2013).
307. Frey, A. B. Myeloid suppressor cells regulate the adaptive immune response to cancer. *J. Clin. Invest.* **116**, 2587 (2006).
308. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252 (2012).
309. Pyonteck, S. M. *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **19**, 1264 (2013).
310. DeNardo, D. G. *et al.* Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. *Cancer Discov.* **1**, 54 (2011).
311. Kuang, D.-M. *et al.* Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J. Exp. Med.* **206**, 1327–1337 (2009).

312. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
313. Galon, J. *et al.* Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *J. Transl. Med.* **14**, 273 (2016).
314. Galon, J. *et al.* Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
315. Wilkinson, R. W. & Leishman, A. J. Further Advances in Cancer Immunotherapy: Going Beyond Checkpoint Blockade. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
316. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
317. Mosely, S. I. S. *et al.* Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 29–41 (2017).
318. Handagama, P. J., Shuman, M. A. & Bainton, D. F. Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G, and fibrinogen in guinea pig megakaryocyte granules. *J. Clin. Invest.* **84**, 73 (1989).
319. Li, Y.-T., Nishikawa, T. & Kaneda, Y. Platelet-cytokine Complex Suppresses Tumour Growth by Exploiting Intratumoural Thrombin-dependent Platelet Aggregation. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
320. Li, J., Sharkey, C. C., Wun, B., Liesveld, J. & King, M. R. Genetic engineering of platelets to neutralize circulating tumor cells. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **228**, 38 (2016).
321. Gebremeskel, S., LeVatte, T., Liwski, R. S., Johnston, B. & Bezuhly, M. The reversible P2Y₁₂ inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. *Int. J. Cancer* **136**, 234–240 (2015).
322. Lonsdorf, A. S. *et al.* Engagement of α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) with α v β 3 Integrin Mediates Interaction of Melanoma Cells with Platelets: A CONNECTION TO HEMATOGENOUS METASTASIS*. *J. Biol. Chem.* **287**, 2168 (2012).
323. Nasulewicz-Goldeman, A., Uszczyńska, B., Szczauńska-Nowak, K. & Wietrzyk, J. siRNA-mediated silencing of integrin β 3 expression inhibits the metastatic potential of B16 melanoma cells. *Oncol. Rep.* **28**, 1567 (2012).
324. Desgrosellier, J. S. & Cheresh, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 9–22 (2010).
325. Janowska-Wieczorek, A. *et al.* Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer* **113**, 752–760 (2005).
326. Janowska-Wieczorek, A., Marquez-Curtis, L. A., Wysoczynski, M. & Ratajczak, M. Z. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion (Paris)* **46**, 1199–1209 (2006).
327. Pasquier, J. *et al.* Microparticles mediated cross-talk between tumoral and endothelial cells promote the constitution of a pro-metastatic vascular niche through Arf6 up regulation. *Cancer Microenviron.* **7**, 41–59 (2014).
328. Dashevsky, O., Varon, D. & Brill, A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int. J. Cancer* **124**, 1773–1777 (2009).
329. Liang, H. *et al.* MicroRNA-223 delivered by platelet-derived microvesicles promotes lung cancer cell invasion via targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol. Cancer* **14**, 58 (2015).
330. Ginestra, A. *et al.* The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res.* **18**, 3433–3437 (1998).
331. Graves, L. E. *et al.* Proinvasive Properties of Ovarian Cancer Ascites-Derived

Membrane Vesicles. *Cancer Res.* **64**, 7045–7049 (2004).

332. Zhou, R. *et al.* Histone Deacetylases and NF- κ B Signaling Coordinate Expression of CX3CL1 in Epithelial Cells in Response to Microbial Challenge by Suppressing miR-424 and miR-503. *PLOS ONE* **8**, e65153 (2013).

333. Gong, J., Luk, F., Jaiswal, R. & Bebawy, M. Microparticles Mediate the Intercellular Regulation of microRNA-503 and Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 to Alter the Migration and Invasion Capacity of Breast Cancer Cells. *Front. Oncol.* **4**, (2014).

334. Gonzalez, D. M. & Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* **7**, re8–re8 (2014).

335. Radjabi, A. R. *et al.* Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface. *J. Biol. Chem.* **283**, 2822–2834 (2008).

336. Zhong, Y.-C., Zhang, T., Di, W. & Li, W.-P. Thrombin promotes epithelial ovarian cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition. *J. Gynecol. Oncol.* **24**, 265–272 (2013).

337. Asanuma, K. *et al.* The thrombin inhibitor, argatroban, inhibits breast cancer metastasis to bone. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* **20**, 241–246 (2013).

338. Tang, M. *et al.* Platelet microparticle-mediated transfer of miR-939 to epithelial ovarian cancer cells promotes epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget* **8**, 97464 (2017).

Abstract: Increasing evidence has demonstrated that platelets actively participate to the progression of metastasis. However, their roles in tumor growth are still subject to controversy. Here, we investigated the interaction of platelets with colorectal tumors. We showed that platelets extravasate in the tumor microenvironment and interact with the tumor cells in a cadherin-6 dependent manner. This interaction induces the spreading of platelets, the release of their granules content and the generation of three types of microparticles named iMPs expressing makers of platelets, tumor and both. The presence of iMPs was confirmed in patients suffering from a colorectal cancer. In the microenvironment, platelets induce a significant diminution of the tumor growth and a significant increase in the number of intratumoral macrophages. iMPs participate in the recruitment of macrophages by vectorizing the cytokines RANTES, CCL2 and CXCL12 and activate their tumor cell killing capacity through IFN-gamma and IL-4. This lead to the cell cycle arrest of the tumor in a P21 (Waf1/Cip1) dependent pathway. In contrast, in the bloodstream, platelets and production of iMPs induce the adhesion of tumor cells to the endothelium mainly via the transfer of β_3 integrin from platelets to tumor and the activation of endothelial cells. Altogether, our results indicate that, in the tumor microenvironment, Cadherin- 6 dependent platelet-tumor cells interactions induce the generation of iMPs leading to the recruitment and the activation of tumoricidal macrophages whereas, in bloodstream, platelets and circulating iMPs favor the interaction of tumor cells with the endothelium, promoting the formation of metastasis.

Résumé : De plus en plus d'évidences démontrent que les plaquettes participent activement à la formation de métastases. Cependant, leurs rôles dans la croissance tumorale est toujours sujet à controverse. Dans cette étude, nous avons décidé d'étudier les interactions des plaquettes avec des tumeurs colorectales. Nous avons démontré que les plaquettes s'extravasent dans le microenvironnement et interagissent avec les cellules tumorales de manière dépendante de la cadhérine-6. Cette interaction induit l'étalement des plaquettes, la libération du contenu de leur granules et la génération de trois types de microparticules, nommée iMPs, exprimant des marqueurs plaquettaires, tumoraux ou les deux. Ces iMPs ont par ailleurs été retrouvées dans le plasma et dans les tumeurs primaires de patients souffrant d'un cancer colorectal. Dans le microenvironnement tumoral, les plaquettes induisent une diminution significative de la croissance tumorale et une augmentation significative du nombre de macrophages intratumoraux. De par la vectorisation des chémokines RANTES, CCL2 et CXCL12, les iMPs participent au recrutement des macrophages dans le microenvironnement et activent leur capacités anti-tumorales à travers les cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et Il-4. Ce mécanisme mène à l'arrêt du cycle cellulaire dans les tumeurs via l'induction de la protéine inhibitrice des kinases dépendantes des cyclines p21 (Waf1/Cip1). En revanche, dans la circulation, les plaquettes et la production des iMPs augmentent l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium principalement par le transfert de la sous-unité d'intégrine β_3 des plaquettes aux cellules tumorales et via l'activation des cellules endothéliales. Nos résultats indiquent donc que dans le microenvironnement tumoral, les interactions cadhérine-6 dépendantes entre les plaquettes et les cellules tumorales induisent la génération de iMPs menant au recrutement et à l'activation des macrophages tumoricides, alors que dans la circulation, les plaquettes et les iMPs circulantes favorisent l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium, promouvant alors la formation de métastases.