NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 19 février 2024 par

Mélanie LANGIU

Conséquences de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes sur l'expression de glycoprotéines inflammatoires et métastatiques

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Oncologie

École doctorale
ED62 - Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition (C2VN)

Composition du jury

Sophie SUSEN INSERM UMR1011, CHU de Lille	Rapporteuse
Fabrice COGNASSE INSERM U1059, EFS, Saint-Etienne	Rapporteur
Sonia SEVERIN INSERM UMR1297, Toulouse	Examinatrice
Benoît HO-TIN-NOE INSERM U1144, Paris	Examinateur
Philippe PICCERELLE AMU, Marseille	Président du jury
Christophe DUBOIS AMU, C2VN, Marseille	Directeur de thèse
Laurence PANICOT-DUBOIS INSERM 1263, C2VN, Marseille	Co-directrice de thèse

Affidavit

Je soussigné, Mélanie Langiu, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Christophe Dubois et Laurence Panicot-Dubois, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 28 juillet 2023



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste des publications, participations aux conférences et bourses

A. Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse

1. **Neutrophils, Cancer And Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research** (revue). Mélanie Langiu*, Ana-Luisa Palacios-Acedo*, Lydie Crescence, Diane Mege, Christophe Dubois 1 and Laurence Panicot-Dubois. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. * co first author-ship.

2. **Platelet and Cancer-Cell Interactions Modulate Cancer-Associated Thrombosis Risk in Different Cancer Types** (revue). Ana-Luisa Palacios-Acedo*, Mélanie Langiu*, Lydie Crescence, Diane Mège, Christophe Dubois and Laurence Panicot-Dubois. *Cancers*, 2022. * co first author-ship.

3. **Plaquettes et neutrophiles : de l'immunité à la thrombose** (flash scientifique). Mélanie Langiu*, Ana-Luisa Palacios-Acedo*, Julie Tourn*, Lydie Crescence, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois. *Revue Francophone d'hémostase et thrombose*, 2022. * co first author-ship.

4. **Consequences of platelet-educated cancer cells on the expression of inflammatory and metastatic glycoproteins** (article original). Mélanie Langiu, Lydie Crescence, Diane Mège, Christophe Dubois and Laurence Panicot-Dubois. *Soumis dans Plos Biology*, 2024.

B. Participations aux conférences au cours de la période de thèse

1. Mélanie Langiu, Lydie Crescence, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois. **Platelet-educated Cancer cells overexpress Fibronectin as well as different glycosyltransferases.** Congrès Français d'Hémostase (CFH), 2023, Saint-Malo, France.

2. Mélanie Langiu, Lydie Crescence, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois. **Platelet-educated Cancer cells overexpress Fibronectin as well as different glycosyltransferases.** European Congress on Thrombosis and Haemostasis (ECTH), 2023, Valence, Espagne.

- Prix d'Honneur de la Jeunesse/"**Young Investigators Award from the ECTH**".

C. Bourses

1. Bourse GFHT dans le cadre d'une communication orale au Congrès Français d'Hémostase (CFH) à Saint-Malo (France) – 2023.

Résumé

La thrombose associée au cancer constitue la deuxième cause de décès chez les patients atteints de cancer, après la progression de la maladie elle-même. Le risque de thrombose veineuse est 4 à 7 fois plus élevé chez ces patients. Plusieurs facteurs contribuent à cette hypercoagulabilité, parmi lesquels la capacité des cellules cancéreuses à activer les plaquettes et à induire leur agrégation. Bien que ce phénomène de plaquettes éduquées par les cellules cancéreuses soit associé à un potentiel métastatique plus accru, diverses équipes, dont la nôtre, ont démontré le concept inverse, selon lequel les plaquettes éduquent les cellules cancéreuses en transférant des lipides, des ARN ou encore des protéines. Dans ces travaux de thèse, nous avons souhaité mieux comprendre le rôle de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes en caractérisant les gènes et les protéines impliqués dans ce phénomène, notamment dans les cancers colorectaux et pancréatiques.

Nous avons observé que les cellules cancéreuses interagissant avec les plaquettes présentaient une masse sèche totale supérieure à celle des cellules cancéreuses qui n'avaient pas interagi. Cette observation pourrait résulter soit d'un transfert direct de matériel des plaquettes vers les cellules cancéreuses, soit d'une augmentation du matériel présent dans la cellule cancéreuse résultant de l'interaction entre ces deux types cellulaires.

Étant donné qu'il a déjà été montré que les plaquettes amorcent et allongent les glycanes sur des molécules acceptrices extracellulaires, nous avons formulé l'hypothèse qu'elles pourraient altérer la glycosylation des protéines exprimées par les cellules cancéreuses au cours de leur interaction. Alors que les plaquettes elles-mêmes expriment peu de glycosyltransférases (GT) avec des activités fonctionnelles limitées, nous avons observé des variations dans l'expression de l'ARNm pour plusieurs familles de GT dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes. Par exemple, 3 familles de GT : MGAT2, MGAT3 et B3GNT sont significativement surexprimées dans les cellules cancéreuses éduquées et capable d'influencer de manière significative la glycosylation des protéines.

Nous avons ensuite étendu cette étude à 124 gènes supplémentaires codant pour des protéines inflammatoires et métastatiques et nous avons constaté que tous étaient surexprimés dans les cellules cancéreuses éduquées par rapport aux cellules non éduquées. Parmi les gènes les plus surexprimés figuraient ceux connus pour leur fonction pro-métastatique, tels que SERPINE1, MMP2 et 10, TIMP1 et FN1. Utilisée comme modèle pour mettre en lumière les possibles répercussions de sa surexpression dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes, la fibronectine (FN1) a été le point central de notre démonstration. Nos résultats ont révélé que, bien que cela n'ait pas d'impact sur la survie cellulaire, la surexpression de la FN1 diminue la migration des cellules cancéreuses. De plus, grâce à une lignée de cellules cancéreuses sous-exprimant la FN1, nous avons mis en évidence que les plaquettes peuvent partiellement restaurer le phénotype des cellules cancéreuses en induisant la transcription de la FN1 *via* des voies de signalisation impliquant l'EGF, le PDGF, l'IL-6, le TGF-β et l'IFN-γ. Outre l'augmentation de l'expression des gènes liés au processus métastatique dans les cellules cancéreuses

éduquées, notre étude a également révélé la surexpression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que CTBP1, APC et TP53.

Nous avons démontré pour la première fois que les plaquettes peuvent éduquer les cellules cancéreuses en modulant la transcription des gènes liés à la glycosylation, à l'inflammation et au processus métastatique. Bien que les mécanismes sous-jacents de ce processus nécessitent des recherches plus approfondies, cette approche est prometteuse pour des interventions thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer.

Mots-Clés : Cancer, plaquettes, glycosyltransférases, inflammation, métastase

Abstract

The cancer-associated thrombosis (CAT), is the second leading cause of death in cancer patients, following disease progression. The risk of venous thrombosis is 4 to 7 times higher in these patients. Various factors contribute to this hypercoagulable state, with one being the ability of tumor cells to activate platelets and induce their aggregation (TCIPA). This platelet education by cancer cells is associated with a higher metastatic potential. However, our team, among others, has demonstrated the reverse concept, wherein platelets educate cancer cells by transferring materials such as lipids, RNA, and proteins. In this study, we aimed to better understand the role of platelet education of cancer cells, characterizing genes and proteins involved, particularly in colorectal and pancreatic cancers.

Using holo-tomographic microscopy, we observed that cancer cells interacting with platelets had a higher total dry mass than those not interacting. This observation could result from direct material transfer or an increase in the cancer cell's own material due to the interaction. Furthermore, platelet-educated cancer cells proliferate significantly more than non-educated cells, suggesting a substantial selective advantage.

Given that platelets initiate and elongate glycans on extracellular acceptor molecules, we hypothesized they could modify the glycosylation of proteins expressed by cancer cells during interaction. While platelets themselves express few glycosyltransferases with limited functional activities, RT-qPCR revealed variations in mRNA expression for several GT families in platelet-educated cancer cells compared to non-educated cells. For instance, three GT families—MGAT2, MGAT3, and B3GNT—were significantly overexpressed in platelet-educated cancer cells and were able to influence protein glycosylation.

Expanding to 124 additional genes coding for inflammatory and metastatic proteins, we found all were overexpressed in platelet-educated cancer cells compared to solitary cancer cells. Among the most overexpressed genes were those known for metastatic involvement, including SERPINE1, MMP2 and 10, TIMP1, and FN1. Using FN1 as an example, we demonstrated that its overexpression in platelet-educated cancer cells increases cell migration. Additionally, using a cell line with 50% less FN1 expression, platelets could partially restore the cancer cell phenotype by inducing FN1 transcription through signaling pathways involving EGF, PDGF, IL-6, TGF-β, and IFN-γ. In addition to increased expression of metastasis-related genes in platelet-educated cancer cells, our study revealed overexpression of tumor suppressor genes such as CTBP1, APC, and TP53, and genes with less-studied roles in cancer, such as IL2RG, GNRH1, and CACNA1D.

In conclusion, we demonstrated for the first time that platelets can educate cancer cells by inducing changes in the transcription of genes related to glycosylation, inflammation, and metastasis. While the underlying mechanisms require further research, this approach holds promise for potential therapeutic interventions in cancer treatment.

Keywords : Cancer, platelets, glycosyltransferase, inflammation, metastasis

Remerciements

Je souhaite remercier le **Pr. Sophie Susen** et le **Dr. Fabrice Cognasse**, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs au sein de mon jury de thèse. Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, le **Dr. Sonia Severin** et le **Dr. Benoît Ho-Tin-Noé**, pour leur écoute et leurs conseils durant deux années consécutives. Je suis très heureuse que vous ayez accepté d'être les examinateurs de mon travail de thèse. Enfin, je remercie sincèrement le **Pr. Philippe Piccerelle** d'avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.

Je souhaite remercier le **Dr. Laurence Panicot-Dubois** et le **Pr. Christophe Dubois**, mes mentors depuis maintenant 6 ans. C'est en 2018, alors que vous sortiez d'un cours de Méthodologie de la Recherche que vous animiez, je me suis retrouvée à vous expliquer que je souhaitais me réorienter et intégrer votre Master en plein milieu de l'année. Malgré votre emploi du temps chargé, vous avez pris le temps de m'écouter et m'avez directement pris sous votre aile. Quelques semaines plus tard, j'assistais à mes premiers cours dans votre Master et je commençais un stage dans votre laboratoire. Jamais je n'aurais imaginé que cette simple discussion aboutirait à tout cela. Je vous suis infiniment reconnaissante de m'avoir accueilli, tous deux, au sein de votre équipe. Ces années ont été marquées par des hauts et des bas, des moments de rire et parfois des incompréhensions. Cependant, quel que soit le contexte, vous n'avez jamais manqué de compassion et vous avez toujours été présents pour moi. Vous m'avez laissé du temps quand j'en avais besoin et, surtout, vous m'avez rappelé à maintes reprises que je n'étais pas seule, que ce soit par un petit message ou une remarque en apparence anodine, mais qui ne l'est pas. Votre exigence légendaire permet de nous former d'une façon que l'on ne retrouve que très peu ailleurs : à mon arrivée au laboratoire, je n'avais aucune expérience préalable et je ne connaissais pas du tout ce qu'était la vie d'un scientifique. Aujourd'hui, je quitte cet environnement enrichie et armée de nombreuses compétences grâce à vous. Je pars, mais je n'oublierai jamais les repas conviviaux que nous avons partagés ensemble, les réunions dans lesquelles nous parlions de sciences, mais aussi de bien d'autres choses, ainsi que du match de foot au Vélodrome auquel j'ai eu la chance d'assister grâce à vous et, surtout, avec vous. Tous ces instants m'ont donné le sentiment d'avoir gagné comme une seconde famille, et ça m'a beaucoup aidé à surmonter les moments difficiles. Je vous remercie tous les deux de m'avoir encouragée, valorisée malgré mon naturel pessimisme et d'avoir rendu possible la présentation de mes travaux lors de congrès nationaux et européens. Je mesure la chance incroyable que j'ai eue de réaliser ma thèse à vos côtés. Bien que les années à venir seront différentes, j'espère vivre encore de nombreux moments enrichissants à vos côtés. Pour finir, j'aimerais vous remercier Madame, plus particulièrement, pour votre soutien et nos discussions qui m'ont permis d'évoluer un peu plus à chaque fois et, Monsieur, pour votre bienveillance et votre humour qui ont marqué mes années de thèse (et pour les Western Blots que nous avons fait ensemble bien évidemment !).

Je tiens à remercier chaleureusement **Lydie Crescence**, notre super ingénieure. Merci de m'avoir formé toutes ces années, tu m'as transmis une rigueur scientifique, une patience et une réflexion que je n'avais pas jusque-là ; le tout enrobé d'une passion débordante. Il est vrai qu'au tout début ça n'a pas été très facile, car ta franchise peut être déconcertante. Mais, avec le recul, tout ce que tu m'as dit m'a permis de me remettre en question et d'évoluer en tant que scientifique. Tu as su t'adresser à moi avec une grande bienveillance, ce qui m'a apporté réconfort et assurance. Je garde en mémoire certaines de tes remarques comme : « pour avoir des résultats propres, il faut travailler proprement ! » ou encore « il ne faut jamais lâcher » par exemple ; cela peut sembler anodin sur le coup, mais très souvent cela m'a permis de m'accrocher et de me surpasser. Outre le fait que tu sois une super ingénieure douée d'une efficacité et d'une anticipation remarquables, tu es bien plus que ça. Tu es une personne généreuse et humble. Tu es toujours là de près ou de loin pour nous soutenir et nous motiver quoi qu'il arrive. Sache qu'au cours de ces années, tu m'as donné une jolie leçon de vie et cela m'a beaucoup fait évoluer personnellement. J'admire réellement la belle personne que tu es et j'espère un jour pouvoir m'approcher ne serait-ce qu'un peu de cette barre que tu as placée si haut.

Un grand merci à **Laurie Bruzzese**, notre nouvelle ingénieure. Malgré le peu de temps que nous avons passé ensemble, j'ai apprécié nos échanges, ton humour débordant, ton honnêteté exceptionnelle et ton organisation militaire (tout le labo a été étiqueté !). Je tiens également à te remercier pour tous tes conseils et ton soutien qui m'ont aidé à garder ma motivation quand j'en avais le plus besoin. J'aurais aimé passer plus de temps avec toi mais dans tous les cas, je suis très heureuse que tu fasses partie de notre équipe parce que tu as su ramener la fraicheur et le piquant dont nous avions besoin. Je te souhaite pleins de jolies choses pour l'avenir et, comme tu le dis si bien, penser de manière positive attire le positif. Ne l'oublie pas.

Je souhaite adresser mes remerciements à **Julie Tourn** ou plutôt Juju. Nous avons commencé notre thèse en même temps et nous nous apprêtons à clôturer ce chapitre ensemble. Cette aventure à tes côtés a été tout sauf ordinaire. Même si tu es de nature un brin tête en l'air et que cela peut être agaçant parfois, les moments que nous avons partagés ensemble ont une place spéciale dans mon cœur. Je pense à nos escapades en kayak sur l'Ardèche, à nos moments détente au spa à Valencia, à nos repas en bord de mer et bien d'autres encore. Poursuivre un doctorat en même temps que quelqu'un, c'est vrai que ce n'est pas tous les jours facile, mais, à côté de ça, c'est avoir une partenaire qui comprend exactement ce que tu ressens, sans avoir besoin de prononcer un mot ; qui te fait rire aux éclats jusqu'à avoir les larmes aux yeux ; avec laquelle tu chantes *Love On the Brain* de Rihanna à tue-tête ; qui te montre fièrement ses ongles, juste pour que tu fasses la tête qu'elle adore ; qui semble plus stressée que toi quand tu fais une présentation orale, ... Toutes ces choses-là, qui finalement rendent ces années de thèse si exceptionnelles. Merci pour tout, je te souhaite le meilleur et même si tu perds ta photographe de thrombi préférée, j'espère que tu sais que tu as gagné une *Monkette*.

Je remercie **Jichen Dou**, même si la barrière de la langue fut bien présente au début, tu es un véritable petit soleil, avec un humour débordant qui est très attachant. Tu es également quelqu'un de très généreux, je pense notamment au jour où tu avais cuisiné pour nous tous mais aussi au fait que tu as veillé sur moi pendant que je rédigeais ma thèse ; cela m'a beaucoup touchée et a grandement contribué à ce que je travaille dans de bonnes conditions.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers le **Dr. Diane Mège**, chirurgienne digestive au sein de notre équipe. Merci de nous fournir de précieux échantillons et, surtout, d'être toujours présente pour nous en cas de besoin. Ton soutien et ta gentillesse ont été très importants pour moi durant ma thèse.

J'aimerais remercier tous les étudiants qui ont fait ou font encore parti de notre équipe. Je pense à…

- **Ana-Luisa Palacios Acedo** ou devrais-je dire Dr. Palacios Acedo x2 ! Nous avons toutes les deux débuté au sein du laboratoire la même année ; que de chemin parcouru depuis ! Merci d'avoir été pendant 2 ans l'épaule sur laquelle j'ai pu me reposer. Ton écoute et tes conseils m'ont été très précieux. Merci d'avoir été ma lumière jaune/orangée quand je n'étais que bleue ; pour les fous rires que nous avons eus en jouant au « ping-pong » dans ton bureau ; pour avoir cru que nous étions des chanteuses et/ou danseuses professionnelles en salle de culture ; pour m'avoir aidé à manger tous ces chocolats (sans toi, j'aurais pris 20 kg, c'est sûr !) ou encore pour cuisiner le fameux big cookie que nous aimons tant et qui nous fait du bien au cœur quand il le faut. Mes premières années de thèse n'auraient pas eu le même goût sans toi. Merci pour ton soutien indéfectible et pour ton honnêteté qui peut être fracassante parfois, mais qui est très souvent remplie de bon sens.
- **Elisa Doukbi**, sache que nos déjeuners au « *bagel corner* » et nos goûters/shopping vont beaucoup me manquer. J'admire profondément ta force de caractère et ta détermination, car malgré les obstacles tu ne renonces jamais. Professionnellement, ta passion pour la science, ainsi que ta réflexion scientifique, ont toujours été une source précieuse d'inspiration. À plusieurs reprises, nous avons passé des soirées à se corriger mutuellement nos travaux et à chaque fois, sans exception, j'en suis ressortie plus confiante. Personnellement, je n'oublierai pas toutes ces soirées passées ensemble à discuter de tout et de rien, tout comme de ces longues heures passées au téléphone, que ce soit pour se confier, rigoler ou même pour pleurer. Je suis contente que le destin (la science ?) t'ait mis sur ma route, car tu es devenue pour moi une véritable amie. Je te remercie d'avoir été durant ces dernières années, assez compliquées tant pour toi que pour moi, une épaule sûre et solide sur laquelle j'ai pu me reposer. Sache que je ne serai jamais loin, quoi qu'il arrive. En ce qui concerne ta thèse, n'oublie jamais que c'est un défi certes, mais aussi une belle expérience ! Bientôt, ce sera à ton tour de briller et d'inspirer tous ceux qui t'entourent, et je serai là pour te soutenir.
- **Jiawen Yi**, merci pour ton aide inestimable et ta joie contagieuse en toutes circonstances. Toujours très à l'écoute, j'ai particulièrement apprécié nos conversations (on peut dire que je me suis amélioré en anglais grâce à toi !). Je te

souhaite de réussir dans tout ce que tu entreprends et j'espère te revoir très vite. Travailler à tes côtés a été un réel plaisir, et c'est avec un grand bonheur que j'ai pu achever ma thèse.

- **Clothilde Oger**, j'ai adoré tous les moments passés ensemble (des restos au sport) et j'attends toujours que tu m'apprennes la danse bretonne typique.
- **Coline Vanhelle,** merci pour ta douceur infinie, ta compréhension et nos discussions toujours très instructives ; j'ai adoré passer du temps avec toi.
- **Estelle Carminita**, tu as été la première étudiante que j'ai rencontrée lors de mon arrivée au laboratoire. Je te remercie pour tous tes conseils avisés et tous les moments agréables que nous avons partagés.
- **Mathilde Aubert** dont j'admire l'efficacité, je n'oublierai pas le moment où nous avons nettoyé ensemble les fenêtres des bureaux ; c'était un moment mémorable qui me fait toujours sourire quand j'y repense.
- **David Zaragoza Huesca,** merci pour toutes nos conversations franco-espagnoles aussi drôles que bouleversantes et pour ton soutien indéfectible.
- **Andréa Brentot**, je n'oublierai pas nos pauses Coca-Cola/Cookies ainsi que tes fameux *Cinnamon rolls*.
- Et enfin, à tous les autres étudiants qui ont été de passage : **Elliott**, **Morgane**, **Ludivine**, **Abdou**, **Rivo**, **Soufiane**, …

Je souhaite également remercier tous les membres du C2VN qui ont été présents lors de ces 6 dernières années :

- L'équipe des Urémistes : **Nathalie McKay**, **Claire Cerini**, **Laetitia Dou**, **Stéphane Poitevin**, **Rania Chermiti** & **Blanca Piña**. Ce fut un réel plaisir de vous avoir en tant que « voisin de palier » pendant toutes ces années. Merci pour tous ces moments partagés ensemble, pour votre gentillesse, votre humour et la motivation que vous m'avez insufflée. Merci à **Rania** (Dr. Chermiti désormais) pour nos goûters, nos conversations et nos sessions rédaction qui me rappellent désormais que dans tous les cas « ça va le faire ! » et également à **Blanca**, pour ta capacité à relativiser et pour ton altruisme (et aussi pour les délicieux chocolats à l'orange que tu rapportes d'Espagne à chaque occasion !). Je termine ma thèse sur une bonne note grâce à toi puisque nous avons fini 3e au kayak et 4e sur le classement général de tout le C2VN, ce n'est pas beau ?
- **Pr. Pierre-Emmanuel Morange**, je vous remercie d'avoir accepté de présider mon comité de suivi de thèse durant deux années consécutives ; pour votre bienveillance et votre soutien lors de mes présentations aux Congrès et, pour la haka inoubliable que nous avons partagé !
- Notre informaticien, **Enzo Cuozzo** pour ta capacité à résoudre avec efficacité tous les problèmes informatiques auxquels j'ai été confrontée et, pour tous les fous rires que nous avons partagés. J'espère que même à distance, je resterai ton "assistante".
- Notre gestionnaire, **Célia Sarand**, merci beaucoup d'avoir été là pour moi et pour ta bienveillance. Discuter avec toi a été une vraie source d'apaisement.
- **Emtira**, je vous remercie pour votre sourire, qui pendant 5 ans, m'a donné du baume au cœur chaque matin.

- Toutes les autres doctorantes que j'ai pu rencontrer au sein du C2VN : **Yter Kara**, **Elisa Gabinaud**, **Mathilde Veneziano Broccia**, … Merci d'avoir contribué à rendre ma thèse unique, chacune à votre manière.
- Les membres de la plateforme Amuticyt, **Stéphane Robert** & **Léa Plantureux** pour votre aide, vos explications et votre disponibilité.
- **Annick Premilleux**, **Anne-Claire Duchez**, **Nacéra Zenatti** et **Christine Scagliarini**, anciennement au C2VN, qui ont marqué toutes quatre mes années de thèse avec leur gentillesse, leur dévouement et leur bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier l'équipe enseignante qui m'a accompagné tout au long de mes missions d'enseignement à la faculté des sciences de St-Charles. Mes remerciements vont à **Myriam Brugna** - ma tutrice, **Isabelle Crenon**, **Charlotte Jeanneau**, **Roxane Barthelemy**, **Eric Pilet**, **Valérie Deyris**, **Marie Maraninchi**, sans oublier **Jean-Michel Lorre** et **Sandrine Emery**. Votre accueil au sein de l'équipe pédagogique et votre accessibilité m'ont beaucoup touché. J'admire sincèrement votre engagement envers les étudiants et votre volonté constante d'améliorer leur expérience d'apprentissage. J'espère qu'ils sont conscients de la chance qu'ils ont d'être encadrés par une équipe enseignante aussi dévouée que la vôtre ! Grâce à vous, j'ai pu passer du rôle d'étudiante à celui d'enseignante. Je garde en mémoire d'excellents souvenirs partagés avec chacun d'entre vous, ainsi qu'avec mes collègues CME (**Vladimir**, **Hugo**, **Matthieu**, **Cynthia**, …) qui ont croisé mon chemin.

Je remercie également mes ami(e)s :

- **Sarah Cziesla** et **Manon Cossu**, votre soutien a été essentiel pour moi, et les moments que nous avons partagés étaient toujours empreints de simplicité et d'authenticité, que ce soit lors de nos soirées à déguster des pâtes carbo, de nos goûters « mises à jour » ou encore de nos vacances ensemble. Chaque fois, vous avez été une véritable bouffée d'air frais, et vous m'avez permis de relativiser pour continuer de donner le meilleur de moi-même. Merci pour tout.
- **Cécilia Luciani**, ou *Twin*, mon amie depuis bientôt 10 ans. En écrivant ces mots, je vois le chemin que nous avons parcouru depuis notre première année de licence, et je ressens une fierté immense pour tout ce que nous avons accompli. Cela me réjouit de constater que tu es déjà Dr. Luciani depuis quelques mois, et j'espère suivre ce chemin bientôt moi aussi. Tu es une amie qui ne craint pas de dire les choses telles qu'elles sont, et ta franchise a été une source de motivation. Partager nos expériences au laboratoire m'a fait prendre conscience que tous les doctorants rencontrent les mêmes obstacles et que l'on n'est jamais vraiment seuls.
- Enfin, j'aimerai remercier **Thibaud Sefiane**, qui a toujours été présent de près ou de loin pour moi durant ces années de thèse et depuis plus de 8 ans maintenant.

Pour finir, j'aimerais remercier tous les membres de ma famille qui ont été d'un soutien sans faille durant ces 10 années d'études, pour ne pas dire toute ma vie. Je pense à…

- **Mon père**, qui m'a toujours poussé à me surpasser et m'a inculqué de nombreuses valeurs tant sur le plan personnel que professionnel comme la rigueur et la persévérance. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, une part de toi sera toujours là où je suis et j'espère que de là où tu es, tu es fier de moi. Si je pouvais dédier ma thèse à quelqu'un, je te l'aurais dédié 1000 fois.
- **Ma mère**, merci d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir célébré avec moi les moments de réussite. Je pense notamment aux présentations que j'ai pu faire lors de Congrès, avec notre nom de famille en évidence, car je sais que cela t'a particulièrement ému. Durant mes études, tu as sacrifié de ton temps et de ton énergie en me faisant réviser mes cours des heures durant. Au final, tous ces efforts n'ont pas été vains et cette réussite est désormais la nôtre.
- Ma tante, **Evelyne**, merci de m'avoir accompagné et soutenu tout au long de ma thèse, dans les bons, comme dans les mauvais moments. Ta positivité inébranlable a été une grande source de réconfort pour moi. Tu es un rayon de soleil qui illumine tous ceux qui t'entourent, merci du fond du cœur pour tout.
- Mon frère **Lionel**, **Marie-Charlotte** et **Lucas** ; **MC** ton énergie, ta créativité et ton ambition sont une véritable source de motivation et d'exemples. Quant à **Lio**, tu es et seras toujours ce grand frère que j'admire profondément et que je regarde avec les yeux remplis de fierté, de la même manière que lorsque nous étions encore enfants.
- Ma belle-famille : **Laurence**, **Monique** & **Bernard**, je vous remercie pour votre soutien constant et pour me valoriser à chaque occasion (et pour tous les « sciences avenir » que vous conservez précieusement pour moi !).
- Mes oncles, mes tantes et mes cousin(e)s : **Philippe**, **Marie-Christine**, **Léa**, **Naémi**, **Emilie**, **Mélodie**, **Tess**, **Aaron**, **Jean-Michel**, **Nathalie**, **Marina,** …

Enfin et pour finir, j'aimerais remercier mon partenaire de vie, mon chéri, **Adrien**. Merci pour tous les petits plats que tu m'as faits alors que je révisais ou rédigeais ; de m'avoir écouté maintes fois réciter mes oraux ; de m'avoir apporté des sucreries quand j'étais en hypo tard au laboratoire et, pour toutes ces petites choses qui font ce que tu es. Tu as été un véritable pilier pour moi durant cette folle aventure de 3 ans.

« Le doctorat est un voyage de découvertes, de revers et d'apprentissage constant.
C'est une expérience qui vous change profondément »

> Table des matières

Affidavit 1

Liste des publications, participations aux conférences et bourses 2

A. Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse 2

B. Participations aux conférences au cours de la période de thèse 2

C. Bourses 2

Résumé 3

Abstract 5

Remerciements 6

Table des matières 12

Liste des abréviations 15

Introduction 17

A. Généralités sur le cancer 18

1. Définition et épidémiologie 18
2. Les 10 caractéristiques du cancer - « The hallmarks of cancer » 18

B. Cancer et Glycosylation 23

1. Généralités 23

a) La N-glycosylation 24
b) La O-glycosylation 25

2. Causes possibles de la dérégulation de la glycosylation dans le cancer 27
3. Conséquences de la dérégulation de la glycosylation sur les cellules cancéreuses – Focus sur le processus métastatique 28

a) Altérations de la glycosylation et adhérence des cellules cancéreuses dans la tumeur primaire 28
b) Altérations de la glycosylation et échappement immunitaire des cellules cancéreuses 30
c) Interaction cellules-matrice extracellulaire (MEC) 31
d) Voies de signalisation intracellulaires 32

(1) Voie de signalisation Wingless-related iNTegration site (Wnt)/β-caténine 33
(2) Voie de signalization de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 34
(3) Voie de signalisation du Transforming Growth Factor β (TGF-β) 35
(4) Voie de signalisation NOTCH 36

4. Implications de l'altération de la glycosylation dans le cancer 37

a) Altération de la glycosylation comme biomarqueur du développement du cancer ... 37
b) Altération de la glycosylation : Nouvelle cible thérapeutique dans le cancer ? ... 38
(1) Cibler la N-glycosylation ... 38
(2) Cibler la O-glycosylation ... 39
C. Cancer et plaquettes ? ... **41**
1. Généralités ... 41
2. Composition moléculaire des plaquettes ... 41
3. Fonctions des plaquettes ... 43
a) Rôle des plaquettes dans l'hémostase ... 43
b) Rôle des plaquettes dans l'inflammation et l'immunité ... 46
c) Rôle surprenant des plaquettes dans la glycosylation extracellulaire : État des lieux ... 47
D. Effets de l'interaction entre les cellules cancéreuses et les plaquettes ... 48
1. Dans la circulation sanguine ... 48
a) Mécanismes impliqués dans la Thrombose Associée au Cancer (CAT) ... 48
b) Rôle des plaquettes éduquées par les cellules cancéreuses dans le processus métastatique ... 65
c) Introduction au concept de cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes ... 76
2. Dans le microenvironnement tumoral (MET) ... 76
Objectif de l'étude ... 78
Résultats ... 80
A. Introduction aux résultats ... 81
B. Résultats ... 82
C. Résultats complémentaires ... 114
1. L'expression des glycosyltransférases est modifiée dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes ... 114
2. Implication de la N-glycosylation dans la migration cellulaire ... 114
3. Signalisation intracellulaire des cellules cancéreuses éduquées ... 115
Discussion ... 119
A. Discussion des résultats ... 120
B. Limites et perspectives ... 131
C. Conclusion ... 134
Bibliographie ... 135
Annexes ... 154

A. Annexe n°1 : Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research. 155

Liste des abréviations

Abréviations générales

A
ACE : Antigène carcino-embryonnaire
ADAM9 : Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AFP : α-fœtoprotéine
Akt : Protein kinase B
APC : Adenomatous polyposis coli
ARN : Acides ribonucléiques
α-SMA : α smooth muscle actin
ATP : Adénosine triphosphate
AXIN : Axis inhibition protein

C
CAF : Cancer-associated fibroblasts
CAT : Cancer-associated thrombosis
CA19.9 : Carbohydrate antigen 19.9
CA125 : Carbohydrate antigen 125
CCL : C-C motif chemokine ligand
CSC : Cellules souches cancéreuses
CK1 : Casein kinase 1
CLEC-2 : C-type lectin-like receptor 2
CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
COX-1/2 : Cyclooxygenase-1/2
CSL : Cellulose synthase-like
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL : C-X-C motif chemokine ligand
CXCR : C-X-C motif chemokine receptor

D
Dsh : Disheveled

E
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : Epidermal growth factor receptor
ERK : Extracellular signal regulated kinase

F
FGF : Fibroblast growth factor
FN1 : Fibronectine 1
FZD : Frizzled receptors

G
GATA : Guanine-adenine-thymine-adenine binding protein
G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

H
HER : Human epidermal growth factor receptor
HGF : Hepatic growth factor
HIF-1α : Hypoxia-inducible factor-1α

I
IL : Interleukine
IFN-γ : Interféron γ
IGF : Insulin-like growth factor

L
LAK : Lymphokine activated killers
LEF : Lymphoid enhancer-binding factor
LRP6 : Low-density lipoprotein receptor-related protein 6

M
Mac-1 : Macrophage-1 antigen
MEC : Matrice extracellulaire
MEK (MAPKK) : Mitogen-activated protein kinase kinase
MET : Microenvironnement tumoral
MMP : Métalloprotéases matricielles
MP : Microparticules

N
NICD : NOTCH intracellular domain
NK : Natural killer
NM23 : Non-metastatic gene 23

O
OMS : Organisation mondiale de la santé

P
PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor 1
PAR1/4 : Protease-activated receptor 1/4
PD1 : Programmed cell death protein 1
PDGF : Platelet-derived growth factor
PD-L1/2 : Programmed death-ligand 1/2
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1
P2RY1 : Purinergic receptor P2Y1
P2RY12 : Purinergic receptor P2Y12

R
Raf : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Ras : Rat sarcoma virus
RE : Réticulum endoplasmique

S
siRNA : Small interfering RNA
SMAD : Suppressor of mothers against decapentaplegic

T
TAM : Tumor-associated macrophages
TAN : Tumor-associated neutrophils
TβRI/II : Type I/II TGF-β receptor
TCF : T-Cell Factor
TCIPA : Tumor cell-induced platelet aggregation
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TF : Tissue factor/Facteur tissulaire
TGFα/β : Transforming growth factor α/β
TIMP : Tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR : Toll-like receptor
TPI : Thrombocytopénie immunitaire
TPO : Thrombopoïétine
TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

V
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VISTA : V-domain Ig Suppressor of T cell Activation
VTE : Venous thromboembolism
5-Aza-Dc : 5-Aza-2'-désoxycytidine

Abréviations spécifiques de la glycosylation

A

Antigène Tn : Antigène Thomsen-nouveau
Asn : Asparagine

B

BG : Benzyl-O-GalNac
B3GNT : β1,3-N-acetylglucosaminyltransferase
B4GALT : β-1,4-galactosyltransferase
B4GALNT : β-1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase

C

C1GALT1 : Core 1 Synthase, Glycoprotein-N-Acetylgalactosamine 3-β-Galactosyltransferase 1
C1GALT1C1 (Cosmc) : C1GALT1 Specific Chaperone 1

D

DPAGT1 : dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminephosphotransferase 1

F

Fuc : Fucose
FUT : Fucosyltransferase

G

Gal : Galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GALNT : Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase
GCNT (C2GnT) : β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GPT : UDP-N-acetylglucosamine:dolichyl-phosphate N-acétylglucosaminephosphotransferase
GT : Glycosyltransférases

M

Man : Mannose
MGAT (GnT) : N-acetylglucosaminyltransferase
MUC : Mucine

O

OGT : O-linked N-acetylglucosaminyltransferase

P

POFUT1 : Protein O-fucosyltransferase 1
POGLUT1 : Protein O-glucosyltransferase 1
Poly-LacNAc : Poly-N-acetyllactosamine
PUGNAc : O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate

S

Ser : Sérine
SIGLEC : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
SLe : Sialyl lewis
ST3GAL : ST3 β-Galactoside α-2,3-Sialyltransferase
ST6GAL : ST6 β-Galactoside α-2,6-Sialyltransferase
SW : Swainsonine

T

Thr : Thréonine
2F-Fuc : 2-fluoro-L-fucose

INTRODUCTION

A. Généralités sur le cancer

1. Définition et épidémiologie

De nos jours, le cancer représente un véritable problème de santé publique affectant, en 2020, 19 millions de personnes à l'échelle mondiale et entraînant le décès de 10 millions d'entre elles[1]. En France, la projection pour 2023 est de 433 136 nouveaux cas[2,3]. Les décès sont de l'ordre de 157 400 pour 2018 (derniers chiffres publiés par l'INCA). Les cancers, qui constituent la principale cause de mortalité chez les hommes et, la seconde, chez les femmes, sont définis selon l'OMS comme « *un large groupe de maladies qui peuvent apparaître dans presque tous les organes ou tissus de l'organisme lorsque des cellules anormales se développent de manière incontrôlable, dépassent leurs limites habituelles pour envahir des parties adjacentes du corps et/ou se propager à d'autres organes* ». Leur apparition est étroitement liée à cinq facteurs de risque majeurs : le surpoids ou l'obésité, de mauvaises habitudes alimentaires, la sédentarité (inactivité physique), la consommation d'alcool et le tabagisme[2]. Parmi les types de cancer les plus fréquents, on retrouve le cancer de la prostate ou du sein, le cancer du poumon et le cancer colorectal[2,3].

2. Les 10 caractéristiques du cancer - « The hallmarks of cancer »

Dans les années 2000, Hanahan et Weinberg, ont identifié six caractéristiques fondamentales du cancer[4]. Ces caractéristiques définissent les capacités acquises par les cellules cancéreuses qui sont impliquées dans le développement et la progression de la maladie. Elles englobent le soutien de la signalisation pro-prolifération, l'échappement aux suppresseurs de croissance, l'activation de l'invasion et du processus métastatique, l'immortalité réplicative, l'induction de l'angiogenèse et, la résistance à la mort cellulaire[4]. Cependant, au fil des années, la recherche en cancérologie a clairement démontré que la compréhension de la biologique tumorale ne se limite pas à l'étude des caractéristiques intrinsèques des cellules cancéreuses. Il est impératif de prendre en considération l'ensemble des cellules constituant la tumeur. En effet, la tumeur est un organe complexe qui comprend non seulement de cellules cancéreuses, mais aussi une composante non tumorale appelée « stroma ». L'ensemble forme une entité connue sous le nom de microenvironnement tumoral (MET) (**Figure n°1**).

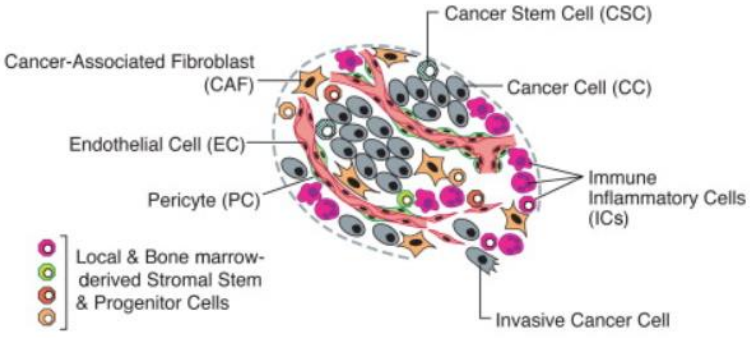


Figure n°1 : Composition du microenvironnement tumoral
"Hallmarks of Cancer: The next generation", Hanahan et Weinberg, Cell (2011)

Le stroma tumoral peut représenter jusqu'à 90% du volume d'une tumeur, il est constitué de différents types cellulaires dont les principaux sont les suivants :

- **Les fibroblastes associés au cancer (CAF) :** Ils constituent la population majoritaire du stromal et affichent une grande hétérogénéité puisqu'ils ont la plupart du temps des origines, des états cellulaires et des fonctions très diversifiées. En effet, les CAFs peuvent être issus de fibroblastes tissulaires résidents reprogrammés, de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, d'adipocytes péri-tumoraux ou encore de cellules endothéliales, épithéliales, péricytaires ou adipocytaires transdifférenciées et, ils acquièrent le phénotype de CAFs une fois recrutés au sein de la tumeur *via* des mécanismes moléculaires encore mal compris. Les CAFs se différencient également en deux groupes selon leur état d'activation. Ainsi, on retrouve d'une part, les CAFs quiescents, similaires aux fibroblastes normaux et les CAFs activés, appelé myofibroblastes. Ces derniers se distinguent par leur capacité proliférative, leur production élevée de facteurs de croissance, de cytokines, de chimiokines ou d'éléments de la matrice extracellulaire (MEC) et, possèdent une activité métabolique accrue. La vimentine est généralement utilisée pour détecter les CAFs quiescents alors que l'α-SMA, la protéine activée des fibroblastes (FAP), la protéine spécifique des fibroblastes 1 (FSP-1), le récepteur du PDGF ou encore la podoplanine permettent d'identifier les CAFs activés. En général, bien que la population des CAFs présente une grande diversité, ils sont reconnus pour jouer un rôle essentiel dans divers aspects du processus tumoral. En effet, ils participent au remodelage de la MEC en sécrétant par exemple du TGF-β, des métalloprotéinases (MMP) ou du collagène, ce qui favorise la résistance thérapeutique en créant une barrière physique aux traitements anticancéreux. Eun *et al.*, ont mis en évidence qu'ils sécrètent de la phosphoprotéine-1 dans le carcinome hépatocellulaire pour contribuer à la résistance au sorafenib et au lenvatinib, deux inhibiteurs de tyrosine kinase permettant de réduire la prolifération des cellules cancéreuses[5]. Une étude menée par Galbo Jr et collaborateurs, a identifié six sous-types de CAF communs à tous les types de cancer exprimant des facteurs immunosuppresseurs, tels que CXCL12, CXLC14, et le facteur de promotion des cellules souches IL-6[6]. Wen *et al.*, ont démontré leurs capacités à libérer des cytokines comme l'IL-32 pour soutenir l'invasion des cellules de cancer du sein et la formation de métastases *via* la signalisation de l'intégrine β3-p38 MAPK[7]. Enfin, ces cellules jouent un rôle crucial dans la progression et le développement de la maladie en sécrétant des facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques comme le VEGF, le FGF et l'IL-8[8–10].
- **Les cellules endothéliales :** Dans le stroma tumoral, les cellules endothéliales sont caractérisées par leur capacité à passer d'un état quiescent à un état actif spécifiquement associé à l'angiogenèse. Cette transition est couramment désignée sous le terme de « *switch* angiogénique ». Elles jouent alors un rôle déterminant dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en sécrétant des molécules pro-angiogéniques telles que le PDGF, l'HGF, les angiopoïétines, l'EGF, le facteur de croissance placentaire (PlGF) ou encore le VEGF permettant *in fine* de fournir les nutriments et l'oxygène nécessaires à la croissance et au développement de la tumeur[4,11–13]. Les cellules endothéliales interviennent également directement et indirectement dans la formation des métastases. En effet, certaines cellules

endothéliales sont impliquées dans la formation des vaisseaux lymphatiques[14]. Ces vaisseaux sont moins fréquents au centre des tumeurs solides, mais on les observe fréquemment dans les zones périphériques où ils agissent comme voies de dissémination des cellules cancéreuses *via* les ganglions lymphatiques[14]. Par ailleurs, les cellules endothéliales constituent l'une des principales origines des CAFs, lesquels, comme évoqué précédemment, jouent un rôle déterminant dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses.

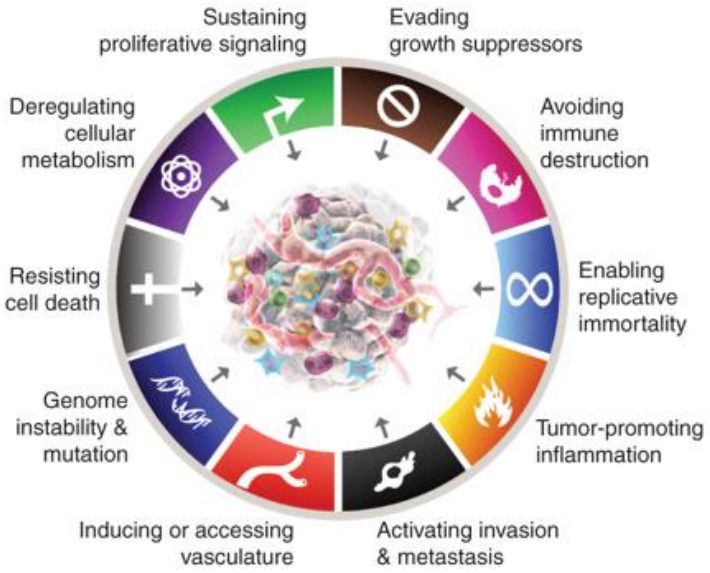
- **Les péricytes :** Ce sont des cellules murales localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des vaisseaux sanguins, qu'elles entourent par de longs prolongements circonférentiels et cytoplasmiques[14]. Ces cellules participent activement au soutien des vaisseaux sanguins en régulant leur développement, leur maturation et leur remodelage. Ils contribuent également à contrôler d'autres aspects tels que le flux sanguin, la coagulation et la perméabilité vasculaire[15]. Cependant, dans le MET, le dérèglement de plusieurs voies de signalisation perturbe le recrutement et le rôle physiologique des péricytes. Par conséquent, les nouveaux vaisseaux présentent une perméabilité accrue et une immaturité structurelle, favorisant ainsi la formation d'un microenvironnement hypoxique et acide dans la tumeur maligne[16]. Ces conditions ont un impact significatif sur les autres composants du MET en facilitant l'intravasation des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine ainsi que la dégradation enzymatique de la membrane basale capillaire locale et la prolifération des cellules endothéliales. L'ensemble contribue *in fine* à l'angiogenèse et à la formation de métastases[17]. De plus, les péricytes sont capables de sécréter du VEGF, jouant ainsi un rôle supplémentaire dans la promotion de l'angiogenèse tumorale[14]. Des études récentes ont mis en évidence qu'indépendamment de leur rôle de soutien des vaisseaux sanguins, les péricytes sécrètent CCL5 (RANTES) promouvant ainsi la réparation des dommages à l'ADN induite par les traitements anticancéreux et donc, la croissance des cellules cancéreuses ainsi que leur résistance aux thérapies conventionnelles[17,18]. En outre, les péricytes sont capables de polariser les macrophages associés à la tumeur (TAM) vers un phénotype de type M2 (immunosuppresseur) ce qui contribue à la progression tumorale[18].
- **Les cellules souches cancéreuses (CSC) :** Il s'agit d'un sous-ensemble de cellules présentes dans le MET qui possèdent des caractéristiques de pluripotence, ce qui signifie qu'elles peuvent se différencier en cellules cancéreuses dites « fonctionnelles ». Malgré leur faible proportion au sein de la masse tumorale, les CSC jouent un rôle crucial dans l'évolution de la maladie. Leur aptitude à l'auto-renouvellement (prolifération accrue) et à la quiescence favorise la résistance aux thérapies anticancéreuses conventionnelles, l'angiogenèse et l'échappement immunitaire[14,19]. Ainsi, plusieurs études ont démontré que les CSC quiescentes au sein de la tumeur primaire sont résistantes aux dommages causés à l'ADN par les traitements anticancéreux. Cette résistance découle, d'une part, du mode d'action des agents thérapeutiques qui ciblent généralement des cellules actives en phase de division, et d'autre part, de la capacité des CSC quiescentes à exprimer des transporteurs de médicaments tels que les pompes ABC. Ces transporteurs facilitent l'expulsion des agents chimiothérapeutiques hors de l'espace intracellulaire, réduisant ainsi l'efficacité des traitements[20]. Par la suite, ces cellules peuvent s'activer

et proliférer de manière accrue afin de régénérer une masse tumorale, souvent responsable des rechutes observées chez les patients. De plus, grâce à leur plasticité phénotypique, les CSC contribuent activement à l'hétérogénéité intratumorale. Cela confère une dimension plus complexe de la composition de la tumeur primaire et rend les approches thérapeutiques plus difficiles à concevoir et à mettre en œuvre. Enfin, les CSC sont capables d'interagir étroitement avec tous les constituants du MET, ce qui contribue à la progression de la maladie. En effet, elles peuvent sécréter des cytokines telles que l'HGF et le CCL2 afin de reprogrammer les fibroblastes normaux en CAF qui, à leur tour, entretiendront leur caractère souche[19]. Des études ont également démontré que dans le mélanome et le cancer colorectal, les CSC stimulent les cellules endothéliales pour favoriser l'angiogenèse tumorale[21,22]. Enfin, Nappo *et al.*, ont mis en évidence que les CSC prostatiques sont capables d'atténuer la réponse immunitaire anticancéreuse en libérant des cytokines immunosuppressives comme l'IL-4[23]. Dans le cas du glioblastome, elles sécrètent de la périostine, ce qui permet de recruter des macrophages de type M2 et d'accélérer la croissance tumorale[24]. De la même façon, Yamashina *et al.*, ont observé que les CSC pulmonaires soutiennent la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2 (immunosuppresseur) *via* le facteur de transcription IRF5[25]. De manière intéressante, il a été observé que l'IL-4 peut influencer l'expression ou l'activité de l'IFR5 et, des études ont suggéré des interactions possibles entre l'IL-4, la périostine et l'IFR5 dans plusieurs processus physiopathologiques.

- **Les cellules immunitaires :** Elles peuvent exercer des effets à la fois pro- et antitumoraux. Parmi ces cellules, on retrouve les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules NK, les macrophages, les cellules mastocytaires, les neutrophiles ainsi que les lymphocytes T et B. Cependant, dans le contexte tumoral, seule la fonction des macrophages associés à la tumeur (TAM) et des neutrophiles associés à la tumeur (TAN) a été largement étudiée. Les TAM ont la capacité de stimuler l'inflammation chronique en sécrétant des cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-23[26–28]. Ils peuvent aussi moduler la réponse anti-tumorale en exprimant des niveaux élevés des ligands des checkpoints inhibiteurs, PD-L1, PD-L2 et VISTA, limitant l'activation des lymphocytes T. De plus, ils peuvent recruter des lymphocytes T régulateurs qui inhibent également la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T[29–31]. Les TAM favorisent également le *switch* angiogénique des cellules endothéliales en libérant des molécules comme le VEGF, l'IL-8 et la MMP9, soutenant l'angiogenèse tumorale[32–35]. Enfin, dans le cancer du pancréas, les TAM jouent un rôle dans la résistance aux traitements comme les chimiothérapies, en libérant des métabolites (pyrimidines) qui inhibent certains médicaments utilisés en thérapie comme la Gemcitabine[36]. Enfin, ils peuvent empêcher l'accès des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques à la tumeur, menant à une absence de réponse thérapeutique[37]. De même, les TAN stimulent l'inflammation et favorisent le remodelage de la MEC, en libérant des protéases contenues dans leurs granules telles que la MMP9, la neutrophile élastase ou la cathépsine G[38–41]. Ils sécrètent également des facteurs immunosuppresseurs comme l'arginase-1 et le TGF-β et libèrent des facteurs de croissance comme l'HGF qui jouent un rôle dans la progression tumorale[42,43].

L'ensemble des composants cellulaires du MET ont donc de multiples fonctions et, interagissent ensemble de manière complexe. Cela potentialise leurs effets respectifs et contribue *in fine* à la croissance, à la progression et à la dissémination tumorale.

Suite à la prise de conscience que le microenvironnement jouait un rôle déterminant dans le développement du cancer, Hanahan et Weinberg, en ont ajouté quatre nouvelles caractéristiques : l'échappement immunitaire, la promotion de l'inflammation tumorale, l'instabilité génomique (mutations) ainsi que la dérégulation du métabolisme cellulaire[14]. Par conséquent, à ce jour, ces dix caractéristiques du cancer sont considérées comme des éléments fonctionnellement importants dans le développement et la progression de la maladie (**<u>Figure n°2</u>**)[14,44].



<u>Figure n°2 :</u> Les 10 caractéristiques du cancer
"Hallmarks of Cancer: New Dimensions", Hanahan, Cancer Discovery (2022)

B. Cancer et Glycosylation

Plusieurs études ont établi une corrélation entre la glycosylation et l'acquisition des dix caractéristiques du cancer (**Figure n°3**). Cela s'explique par le fait que la glycosylation, en tant que modification co- et post-traductionnelle majeure des protéines, agit comme un mécanisme régulateur clé, contrôlant plusieurs processus physiopathologiques dont le cancer[45].

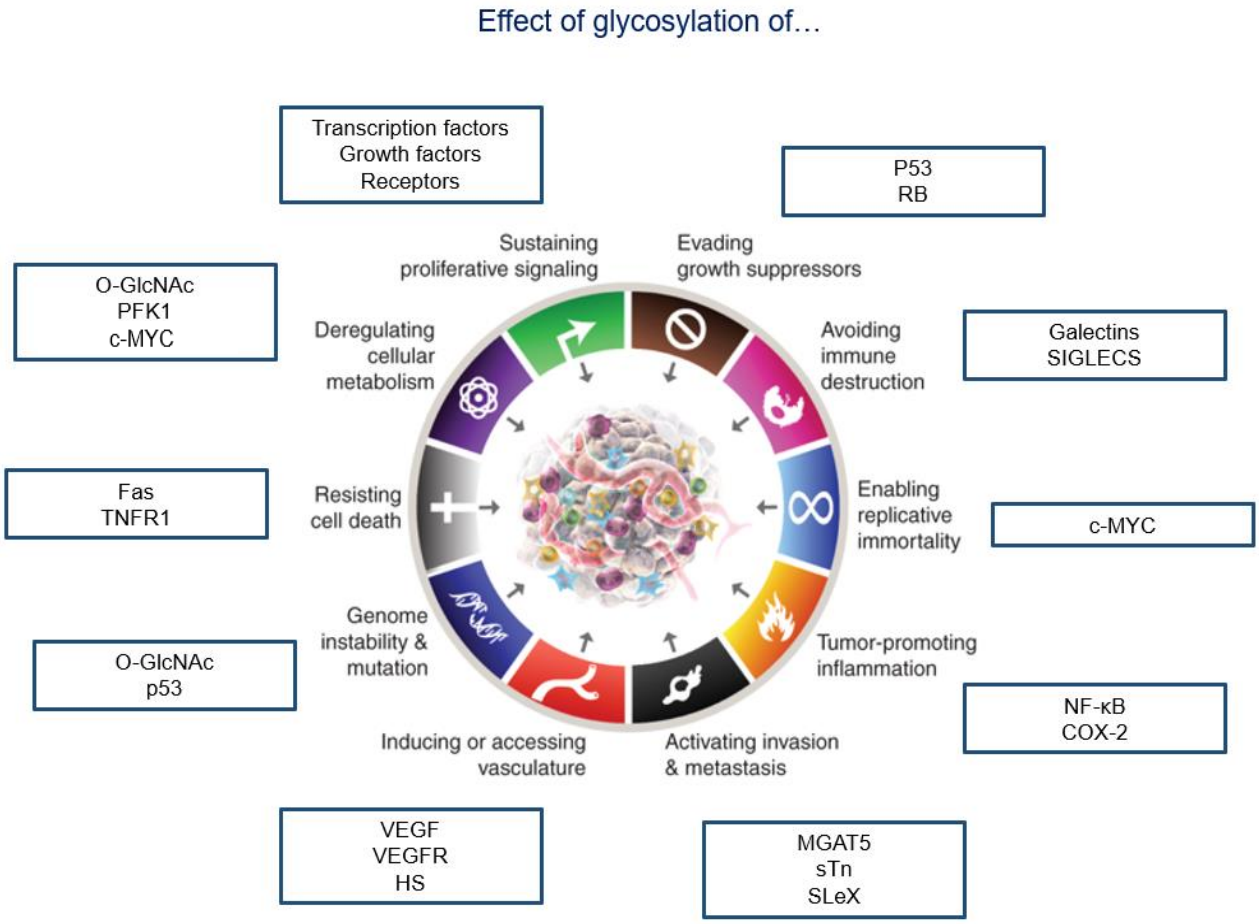


Figure n°3 : Implication de la glycosylation dans les 10 caractéristiques du cancer
Adaptation – "Hallmarks of glycosylation in cancer", Munkley et al, Oncotarget (2016) & "Hallmarks of Cancer: New Dimensions", Hanahan, Cancer Discovery (2022)

1. Généralités

Il existe deux types de glycosylation : La N-glycosylation et la O-glycosylation qui se distinguent principalement selon la nature de la liaison entre le polypeptide et le glycane.

Les enzymes responsables de ces liaisons glucidiques sont appelées glycosyltransférases (GT). Elles catalysent le transfert de résidus osidiques d'un donneur (généralement un nucléotide-ose comme l'UDP-Glc, CMP-Sialique, GDP-Man…) vers un accepteur, c'est-à-dire vers la molécule cible à glycosyler (protéine ou lipide) (**Figure n°4**).

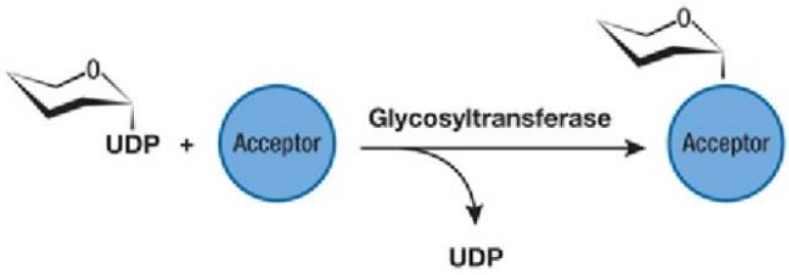
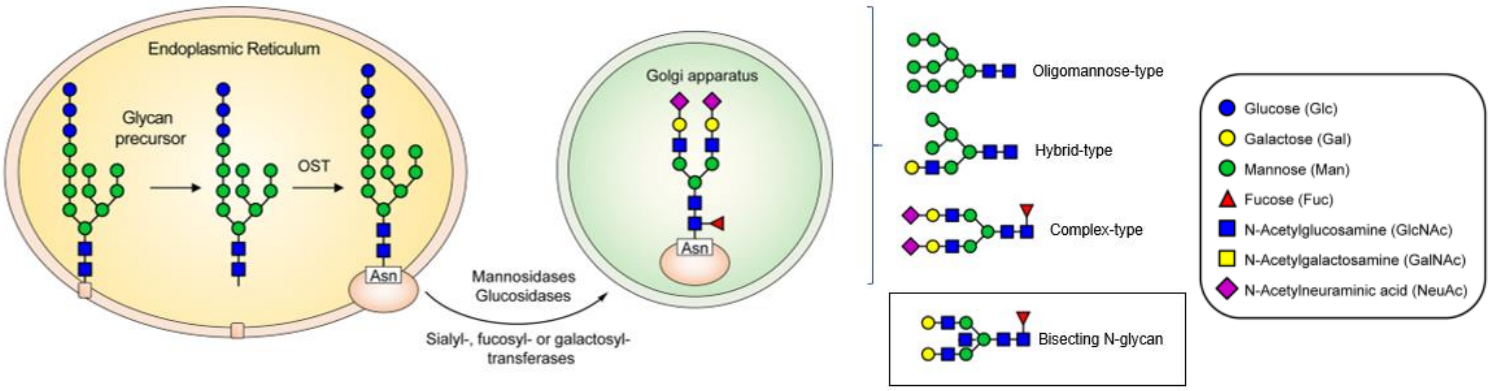


Figure n°4 : Représentation schématique de la réaction catalysée par les GT
Adaptation – "Rapid screening of sugar-nucleotide donor specificities of putative glycosyltransferases", Sheikh et al., Glycobiology (2017)

Il existe à ce jour plusieurs centaines de GT différentes identifiées qui se différencient les unes des autres, notamment par leur spécificité de substrat et leur structure. Celles-ci sont regroupées en 117 familles selon la base de données *Carbohydrate-Active enZYmes* (CAZy)[46].

a) La N-glycosylation

La N-glycosylation est caractérisée par une liaison amide entre une N-acétylglucosamine (GlcNAc) et un résidu Asparagine (Asn) situé dans la séquence consensus Asn-X-Sérine (Ser) ou Thréonine (Thr) du polypeptide. X pouvant être n'importe quel acide aminé sauf la proline[47]. Cette modification co-traductionnelle est divisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les GT catalysent l'ajout de deux N-acétylglucosamines (GlcNAc) et de cinq mannoses (Man) sur le dolichol-phosphate, un lipide exprimé à la membrane du réticulum endoplasmique (RE)[47]. Le dolichol-phosphate portant la structure glucidique « $GlcNAc_2Man_5$ » est ensuite basculé dans la lumière du RE par une flippase[47]. Une fois dans le RE, cette composition glucidique devient « $GcNAc_2Man_9Glc_3$ » grâce aux actions successives du dolichol-phosphomannose et du dolichol-phosphoglucose[47]. Elle est, par la suite, transférée en bloc sur la chaîne polypeptidique en cours de synthèse, lorsque la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr est reconnue par le complexe oligosaccharyltransférase dit « OST »[47]. Les trois glucoses présents au sein de la structure glucidique servent alors au bon repliement de la protéine[47]. En effet, l'α-glucosidase I et l'α-glucosidase II catalysent respectivement l'hydrolyse du premier et du deuxième glucose[47]. Le troisième et dernier glucose favorise l'interaction de la glycoprotéine avec les protéines chaperonnes calnexine et calréticuline afin de permettre le repliement optimal des protéines[47]. Une fois la protéine correctement repliée, le dernier glucose est dégradé par l'α-glucosidase II. Enfin, suite à l'intervention des α-mannosidases-I et II l'ensemble des N-glycanes partage une région *core* pentasaccharidique commune : « $GlcNAc_2Man_3$ » (**Figure n°5**)[47].



<u>Figure n°5 :</u> Étapes de la N-glycosylation

Adaptation - « The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2 », Gong et al., Nature (2021)

La protéine, quant à elle, continuera sa maturation vers l'appareil de Golgi où aura lieu la diversification[47]. Selon la composition de leur chaîne latérale dans l'appareil de Golgi, les N-glycanes peuvent être divisés en trois catégories :

- **High-Mannose ou oligomannose :** Ajout de mannoses uniquement en plus des trois du *core*.
- **Hybride :** Ajout de mannoses et d'autres types d'oses en plus des trois présents dans le *core* pentasaccharidique.
- **Complexe :** Ajout d'un autre type d'ose que le mannose en plus des trois de base[47].

Aux structures de type hybride ou complexe peuvent être ajoutés, par exemple, du galactose (Gal) par les galactosyltransférases (β4GalT…), du fucose (Fuc) par les fucosyltransférases (FUT) ou encore de la N-acétylglucosamine (GlcNAc) par les N-acétylglucosaminyltransférases (GnT ou MGAT)[47]. Il existe des N-glycanes particuliers appelés « N-glycanes bisectés » qui sont caractérisés par l'ajout d'une GlcNAc en β1,4 par MGAT3 sur le mannose central du core pentassacharidique commun[48]. Cela empêche l'ajout de sucres supplémentaires sur cette branche et, joue un rôle dans le cancer en modulant les voies de signalisation médiées par les galectines ainsi que la prolifération des cellules cancéreuses[49]. *In fine*, le terme générique désignant les N-glycanes matures sont « N-glycanes branchés » ou « N-glycanes ramifiés ».

b) La O-glycosylation

La O-glycosylation, dont la plus commune est celle de type mucine, est une modification post-traductionnelle caractérisée par l'addition initiale d'une N-acétylgalactosamine (GalNAc) sur le groupe hydroxyle d'un résidu Ser ou Thr pour former l'antigène Thomsen-nouveau (Antigène Tn) : « GalNAc-Ser/Thr »[50]. Cette réaction a lieu dans le compartiment *Cis* de l'appareil de Golgi et, elle est catalysée par des GT de la famille des N-acétylgalactosaminyltransférases (GALNTs)[50]. L'antigène Tn peut évoluer *via* des étapes d'élongations pour donner huit noyaux de structures différentes (*core* 1 à *core* 8)[50]. Par exemple, C1GALT1 catalyse l'ajout d'un Gal en β1,3 sur l'antigène Tn pour former l'antigène T qui correspond au *core* 1 alors que B3GNT6 (*core* 3 synthase) catalyse celui

d'une GlcNAc sur l'antigène Tn pour donner le *core* 3. Ces noyaux de bases peuvent eux-mêmes être élongés grâce à l'action de différentes GT comme les sialyltransférases (ST3GAL, ST6GAL…) ou les fucosyltransférases (FUT) pour constituer des motifs glucidiques plus complexes qui donneront aux protéines différentes fonctions (**Figure n°6**)[50].

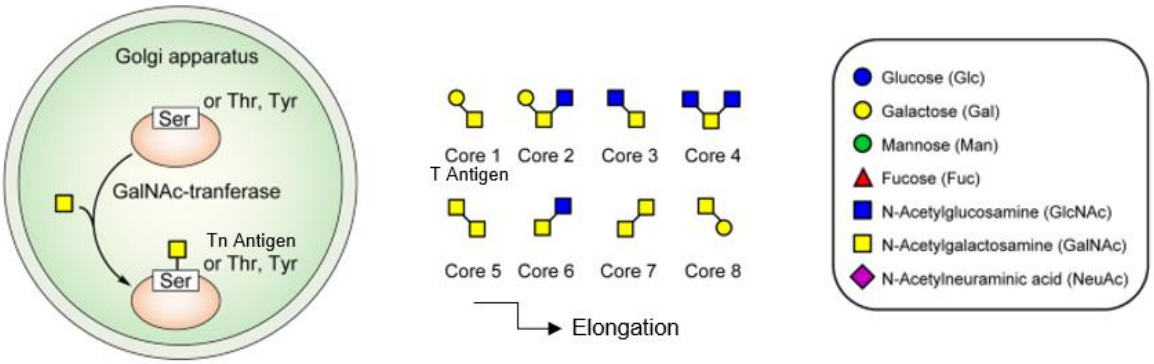


Figure n°6 : Étapes de la O-glycosylation

Adaptation - « The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2 », Gong et al., Nature (2021)

Les deux motifs O-glycosylés les plus connus sont les antigènes Sialyl Lewis X (SLe^X) et Sialyl Lewis A (SLe^a) (**Tableau n°1**)[51,52]. En effet, dans des conditions inflammatoires, ces motifs glucidiques se trouvent à la surface, notamment de la glycoprotéine PSGL-1, présente à la surface des cellules immunitaires et, ils contribuent à son interaction avec la P-sélectine exprimée par les cellules endothéliales. Ce processus participe au recrutement, au ralentissement puis l'extravasation des cellules immunitaires dans les tissus afin de combattre l'inflammation. Dans plusieurs types de cancers, il a été démontré qu'une expression accrue des antigènes SLe était corrélée avec une faible survie des patients[45,53,54]. En effet, cette interaction SLe-E/P-sélectine facilite l'arrêt des cellules cancéreuses circulantes au niveau de l'endothélium inflammé ce qui initie le processus métastatique[55,56].

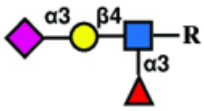
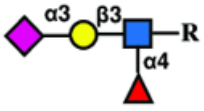
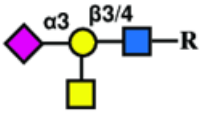
Nom	Structure du motif glucidique	GT impliquées
Sialyl Lewis X (SLe^X)		ST3GAL, FUT6
Sialyl Lewis A (SLe^a)		ST3GAL, FUT3
Sd^a		ST3GAL, B4GALNT2

Tableau n°1 : Nom, structure et glycosyltransférases impliquées dans la formation des motifs glucidiques les plus communs

2. Causes possibles de la dérégulation de la glycosylation dans le cancer

La glycosylation aberrante des protéines que l'on retrouve dans le cancer a été décrite pour la première fois il y a plus de 45 ans[57]. Depuis, il a été démontré que des changements dans les structures glucidiques présentes à la surface des cellules cancéreuses ou des glycoprotéines sécrétées surviennent pendant la transformation maligne et la progression du cancer. Cela est notamment dû à la dérégulation de l'expression des GT dans les cellules cancéreuses et, de nombreuses études suggèrent que l'hypoxie et le degré de méthylation des gènes en sont à l'origine.

L'hypoxie est connue comme étant l'une des principales caractéristiques des tumeurs solides[58]. En effet, les cellules cancéreuses prolifèrent généralement plus rapidement que la croissance des vaisseaux sanguins qui leur sont associés[58]. Par conséquent, elles ne reçoivent pas assez d'oxygène et sont donc en condition dite hypoxique[58]. Cela est à l'origine de l'activation d'un facteur de transcription clé, le facteur inductible par l'hypoxie (HIF1α)[58]. Il régule l'expression de nombreux gènes dont ceux codant pour les GT[58]. Une étude réalisée par, Belo *et al.*, a démontré que la régulation négative d'HIF1α dans des cellules humaines d'adénocarcinome pancréatique conduit à une augmentation des niveaux de l'ARNm codant pour FUT1 et FUT2, deux fucosyltransférases impliquées dans l'élongation des O-glycanes[59]. Il a été également montré, que le knockout transitoire de GATA2 et GATA3, deux facteurs de transcription stabilisant HIF1α, diminue l'expression de ST3GAL4 et MGAT5, qui induisent respectivement la sialylation et la ramification des N-glycanes[60,61]. Enfin, Koike *et al*, ont démontré que l'hypoxie augmentait directement la transcription de FUT7 et de ST3GAL1 dans des cellules humaines de cancer colorectal[62,63]. Ces deux GT jouant un rôle dans la synthèse des antigènes SLe[62].

En conclusion, la régulation de l'expression des GT par l'hypoxie influence le profil glucidique des cellules cancéreuses. En 2020, Greville *et al.* ont démontré que l'exposition des cellules humaines de cancer de l'ovaire et du sein à des conditions d'hypoxie (0,5 à 2% d'O_2) entraînait des modifications significatives dans la composition des N-glycanes sécrétés par les deux types de lignées cellulaires par rapport à la condition normoxie (21% d'O_2)[60]. Ces changements incluaient notamment des altérations au niveau des glycanes oligomannosylés, bissectés, ramifiés avec des structures de type poly-N-acétyllactosamine (Poly-LacNAc), galactosylées ou encore sialylées[60].

L'ensemble de ces données suggère que l'hypoxie contribue à la perturbation de la glycosylation dans les cellules cancéreuses. Cependant, cela ne peut pas expliquer entièrement ce phénomène.

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique caractérisée par l'ajout de groupements méthyles sur l'ADN, par les ADN méthyltransférases. Cela régule l'expression des gènes en les inhibant de manière stable et réversible[64]. Ce processus joue un rôle crucial au cours du développement embryonnaire et, il est souvent dérégulé dans le cancer. En effet, les cellules cancéreuses présentent généralement des profils de méthylation aberrants qui modulent de manière directe ou indirecte l'expression des gènes[65–68]. En 2011, Chachadi *et al.*, ont montré que le traitement des cellules de carcinome colorectal par un inhibiteur de l'ADN méthyltransférase, le 5-Aza-2'-

désoxycytidine (5-Aza-dC), induit une augmentation de l'expression de ST3GAL6 et FUT3, toutes deux participant à la formation de l'antigène SLe^{a}[67]. Ces résultats mettent ainsi en évidence que ces deux GT sont inhibées dans les cellules cancéreuses *via* l'hyperméthylation du promoteur de leurs gènes[67]. Cependant, Kawamura *et al.* ont démontré que le gène B4GALNT2, participant à la formation de l'antigène Sd^{a}, est hyperméthylé dans le carcinome gastrique (**Tableau n°1**)[68]. On constate ainsi une réduction de l'expression de l'antigène Sda au profit de celui des antigènes SLe qui partagent le même accepteur, entraînant une augmentation des capacités de migration des cellules cancéreuses[68].

D'autres équipes telle que celle d'Ide *et al.*, se sont intéressés aux N-glycanes et à l'enzyme MGAT4 qui initie la synthèse de la branche GlcNAcβ1-4 sur le bras Manα1-3 de la région *core* pentasaccharidique commune des N-glycanes[66,69]. Dans le cas du cancer pancréatique, les auteurs ont démontré que l'isoenzyme MGAT4a est sous-exprimée dans des lignées cancéreuses pancréatiques alors que l'isoenzyme MGAT4b est surexprimée par rapport aux tissus normaux[66] et mis en évidence que la régulation à la baisse de la MGAT4a dans les cellules cancéreuses du pancréas est due directement à l'hyperméthylation de son gène[66].

La méthylation de l'ADN peut aussi réguler l'expression des gènes codant pour les GT de manière indirecte. Chakraborty *et al.*, ont démontré que le traitement des cellules avec le 5-Aza-dC empêche la méthylation de NM23, un gène suppresseur de tumeur[65]. NM23 à nouveau actif peut alors inhiber l'expression de l'ARNm de MGAT5 et donc *in fine* la formation des N-glycanes ramifiés en β1,6 impliqués dans le chimiotactisme et la motilité des cellules cancéreuses[65]. Cela montre ainsi, que le gène codant pour MGAT5 est sur-exprimé dans le cancer *via* l'hyperméthylation de NM23, ce qui donne aux cellules cancéreuses des propriétés invasives[65].

L'ensemble de ces données met en évidence que l'hypoxie, tout comme la méthylation aberrante des gènes, contribuent à la dérégulation de la glycosylation dans les cellules cancéreuses. Il en résulte une surexpression, une délétion ou encore une perte de certaines structures glucidiques, ce qui peut modifier leur phénotype[70].

3. Conséquences de la dérégulation de la glycosylation sur les cellules cancéreuses – Focus sur le processus métastatique

L'altération de la glycosylation impacte le comportement des cellules cancéreuses à plusieurs niveaux. En ce qui concerne le processus métastatique, elle peut influencer l'adhérence cellulaire dans le MET, l'échappement immunitaire, l'interaction cellule-MEC ou les voies de signalisation intracellulaires.

a) Altérations de la glycosylation et adhérence des cellules cancéreuses dans la tumeur primaire

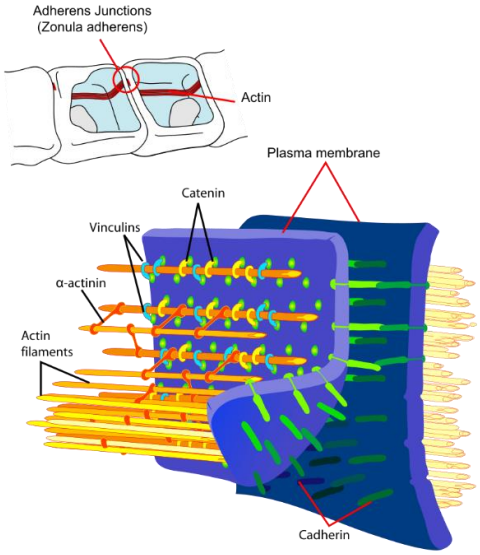


Figure n°7 : Représentation schématique d'une jonction d'adhérence

Au sein de la tumeur primaire, les cellules cancéreuses adhèrent les unes aux autres, notamment grâce aux jonctions d'adhérence (**Figure n°7**). Celles-ci sont médiées par les cadhérines, des protéines transmembranaires calcium-dépendantes qui participent à l'adhésion intercellulaire ainsi qu'à la motilité et la différenciation cellulaire en formant un complexe cadhérine-caténine entre les cellules voisines. Il existe différents types de cadhérines (E-cadhérine, P-cadhérine…), chacune exprimée de manière spécifique selon le type tissulaire ou la fonction cellulaire.

Au cours du processus métastatique, l'expression de ces molécules d'adhésion diminue au profit de celle des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) tels que la Vimentine ou la N-cadhérine, favorisant ainsi la dissémination tumorale. Plusieurs études tendent à démontrer que l'altération de la glycosylation dans les cellules cancéreuses est impliquée dans ce processus.

En effet, il a été montré dans le carcinome hépatocellulaire qu'il y a une sous-expression de la E-cadhérine suite à son hyperglycosylation. Il en résulte une réduction de l'adhérence entre les cellules cancéreuses, ce qui promeut leur dissémination et leur invasion. Dans le cancer du sein, l'expression de l'antigène SLe^x et celle de la E-cadhérine sont inversement corrélées, ce qui participe à la diminution de l'adhésion des cellules cancéreuses et de leur invasion[71].

Guo *et al.*, ont démontré que la surexpression de MGAT5, qui catalyse la formation de N-glycanes ramifiés en β1,6, altère la fonction de la N-cadhérine[72]. Cela conduit à une diminution de l'adhésion homotypique des cellules cancéreuses avec les cellules avoisinantes dans le fibrosarcome humain (HT1080)[72]. Ce phénomène se produit en parallèle avec la E-cadhérine, ce qui aboutit à une perte d'adhérence des cellules cancéreuses et, augmente leur potentiel invasif[72]. Carvalho *et al.*, ont également mis en évidence que la N-glycosylation aberrante crée par MGAT5 spécifiquement sur le résidu Asn-554 de la E-cadhérine affecte ses fonctions dans les cellules cancéreuses gastriques en perturbant sa localisation cellulaire, la formation de *cis*-dimères, l'assemblage moléculaire, la stabilité des jonctions d'adhérence et l'agrégation intercellulaire[73]. Ainsi, lorsque la N-glycosylation de l'Asn-554 est bloquée soit par mutation génétique, soit par l'inhibition de MGAT5, cela a un effet protecteur sur la E-cadhérine et contribue à réduire la progression tumorale[73]. De la même manière, l'inhibition de FUT8 dans les cellules de cancer du sein MCF-7 améliore la fonction de la E-cadhérine ce qui se traduit par une diminution de la migration et de l'invasion cellulaire[74].

Si l'hyperglycosylation de la N- et de la E-cadhérine, diminue l'adhésion entre les cellules voisines et contribue à l'invasion tumorale, l'hypoglycosylation de la E-cadhérine

favorise la stabilisation des jonctions adhérentes ainsi que l'assemblage des jonctions serrées dans les cellules cancéreuses, en augmentant l'interaction de la E-cadhérine hypoglycosylée et de la protéine phosphatase 2A[75,76].

b) Altérations de la glycosylation et échappement immunitaire des cellules cancéreuses

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules cancéreuses sont capables de développer des mécanismes pour éviter d'être détectées par le système immunitaire, ce qui leur permet de progresser vers la niche métastatique. L'altération de la glycosylation à la surface des cellules cancéreuses intervient également à ce stade, en favorisant l'échappement immunitaire de la tumeur. Par exemple, de nombreuses protéines présentes à la surface des cellules cancéreuses portent une structure appelée poly-N-acétyllactosamine (poly-LacNAc)[77]. Celle-ci se définit par un enchaînement de GlcNAc et de Gal et possède plusieurs fonctions dont celle de masquer les structures originelles des oses afin d'aider les cellules cancéreuses à échapper au système immunitaire[77]. Elle peut aussi agir en tant que ligand pour les anticorps et les lectines, comme la Galectine-3, qui est capable de se lier au Gal terminal de cette structure glucidique, la masquant ainsi du système immunitaire[78]. Par exemple, Okamoto *et al.*, ont démontré que les cellules cancéreuses de la prostate PC3 hautement métastatiques, exprimant GCNT, portent à leur surface la mucine 1 (MUC1) modifiée avec de la poly-LacNAc[79]. La présence de cette structure glucidique sur MUC1 atténue l'interaction des cellules cancéreuses avec les cellules NK, conduisant à une réduction de la sécrétion de granzyme B[79]. Cela entrave également la capacité du ligand TRAIL impliqué dans l'apoptose à accéder à la surface des cellules cancéreuses[79]. Ainsi, la structure poly-LacNAc bloque la cytotoxicité des cellules NK et favorise donc la survie des cellules PC3[79].

Les SIGLECS sont des récepteurs transmembranaires, que l'on retrouve à la surface des cellules immunitaires (NK, macrophages…), capables de reconnaître les résidus d'acide sialique portés par les protéines présentes à la surface des cellules cancéreuses[78,80]. Toutefois, Hudak *et al.* ont montré que l'augmentation des glycanes sialylés à la surface des cellules cancéreuses inhibe l'activation des cellules NK *via* leur interaction avec SIGLEC-7[81]. Ainsi, la modification des glycanes de la surface cellulaire peut moduler la cytotoxicité des cellules NK médiée par SIGLEC-7 et contribuer à l'évasion immunitaire[81]. Il est important de noter que cela peut avoir également un impact sur d'autres cellules immunitaires dont les macrophages. En effet, Stanczak *et al.*, ont mis en évidence que la désialylation des cellules cancéreuses ainsi que la perte du SIGLEC-E à la surface des TAM renforce la réponse anti-tumorale en repolarisant les macrophages M2 en macrophages M1 anti-tumoraux[82].

La dérégulation de la glycosylation impacte également les *checkpoints* inhibiteurs du système immunitaire. Ceux-ci sont des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes T (CTLA4, PD1) qui interagissent avec leurs ligands (CD80, PD-L1) exprimé par différents types cellulaires (macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques, cellules épithéliales…) pour moduler l'activation des cellules immunitaires et limiter la durée et l'intensité de la réponse immunitaire[83]. Dans de nombreux types de cancers, les cellules cancéreuses sont capables de surexprimer à leur surface les ligands des

récepteurs inhibiteurs pour échapper au système immunitaire[83]. Hsu *et al.*, ont mis en évidence que la glycosylation altérée de PD-L1 exprimé par les cellules cancéreuses, augmente sa liaison à PD1 présent à la surface des lymphocytes T[84,85]. Cela renforce l'action du *checkpoint* inhibiteur et donc, supprime l'activation des lymphocytes T[84,86]. De plus, Huang *et al.*, ont démontré que la combinaison d'anti-PD-L1 et d'inhibiteurs de la fucosylation, comme le 2F-Fuc, pourrait améliorer les réponses immunitaires anti-tumorales chez les patientes atteintes d'un cancer du sein[87]. En effet, l'augmentation de la fucosylation est caractéristique de la transformation des cellules malignes et participe à de nombreux processus associés au développement du cancer dont l'évasion immunitaire[88].

Enfin, la dérégulation de la glycosylation dans les cellules cancéreuses peut inhiber l'activation du système du complément ou induire l'expression de facteurs immunosuppresseurs comme CCL22 afin de créer un environnement immunosuppresseur. Ces facteurs ont la capacité de recruter et de promouvoir la fonction des cellules T régulatrices, ce qui inhibe les réponses immunitaires et favorise à l'échappement immunitaire.

La dérégulation de la glycosylation dans les cellules cancéreuses facilite leur évasion au système immunitaire, accroissant ainsi leur potentiel invasif.

c) Interaction cellules-matrice extracellulaire (MEC)

L'interaction des cellules cancéreuses avec la MEC est une étape clé dans le processus métastatique puisqu'elle permet à la fois l'intravasation (des tissus vers la circulation sanguine) et l'extravasation (de la circulation sanguine aux tissus) des cellules cancéreuses. La dérégulation de la glycosylation peut modifier les fonctions des protéines d'ancrage et des protéines de la membrane basale extracellulaire telles que les intégrines, la laminine, la fibronectine (FN1), la vitronectine ou encore le collagène (**Figure n°8**). Cela peut aussi impacter le remodelage de la MEC et la dégradation de ces composants. L'ensemble facilitant l'invasion et la dissémination tumorale.

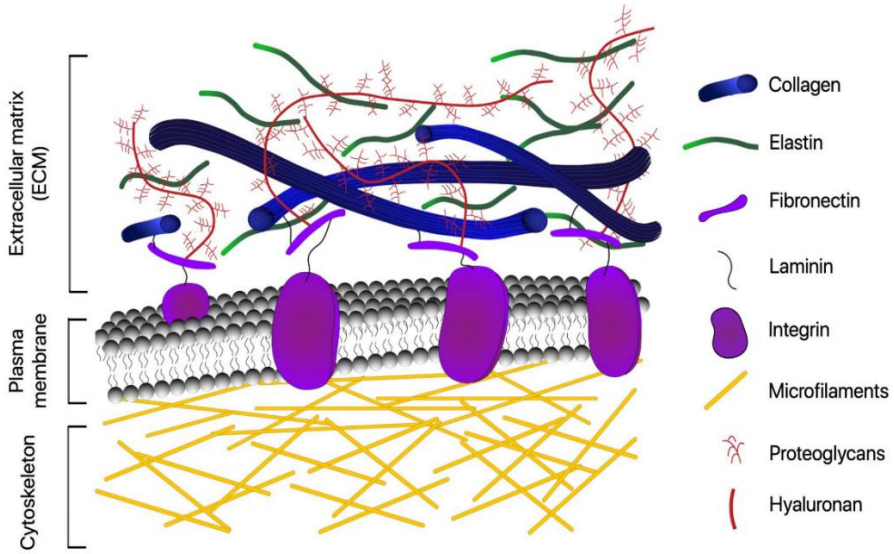


Figure n°8 : Composition de la MEC

"Optical microscopy and the extracellular matrix structure: A review", J.A.Poole et al., Cells (2021)

En effet, Janik *et al.*, ont traité des cellules de mélanome métastatique WM9 et WM239 avec de la swainsonine, un inhibiteur de la N-glycosylation[89]. Ils ont ainsi mis en évidence que l'altération chimique de la N-glycosylation des intégrines α3β1 et αvβ3 présentes à la surface des cellules cancéreuses, pouvaient affecter leur liaison aux protéines de la MEC telles que la vitronectine[89]. Pocheć *et al.*, ont confirmé ces données en comparant deux lignées cellulaires de mélanome : WM793 (primaire) et WM1205Lu (hautement métastatique). Ils ont montré que l'acquisition d'un profil métastatique par les cellules de mélanome s'accompagne d'une augmentation des structures β1-6-branchées sialylées sur les N-glycanes portés par l'intégrine αvβ3, ce qui favorise leur adhésion à la vitronectine[90]. L'augmentation du nombre de structures β1-6-branchées sur les N-glycanes est observée dans différents types de cancer et elle est due à la surexpression de MGAT5[91]. Ainsi, pour contrebalancer cette augmentation, Yoshimura *et al.*, ont induit une surexpression de MGAT3 puisque cette GT possède le même substrat que MGAT5[91]. Cela a permis d'inhiber l'attachement des cellules de mélanome murin hautement métastatiques B16-hm au collagène et à la laminine, empêchant ainsi leur extravasation[91]. L'ensemble de ces données démontre que la surexpression de MGAT5 dans le mélanome promeut l'extravasation des cellules cancéreuses en facilitant l'interaction des intégrines α3β1 et αvβ3 avec des protéines de la MEC telles que la vitronectine, le collagène et la laminine. Cependant, le mécanisme diffère selon l'intégrine considérée. En effet, Kariya *et al.*, ont démontré que la diminution de l'expression de MGAT3 dans les cellules de mélanome MDA-MB-435S diminue plutôt leur invasion et leur motilité en réduisant la réticulation de l'intégrine β4 avec la gélatine-3[92].

L'implication de l'altération de l'expression d'autres GT telles que les sialyltransférases sur la fonction des intégrines a par la suite été mise en évidence. En effet, Seales *et al.*, ont montré que la surexpression de ST6GAL1, qui catalyse la formation de structures sialylées en α2,6 sur les N-glycanes, dans les cellules de cancer colorectal, induit une augmentation de la sialylation de l'intégrine β1 et de la taline, augmentant l'expression du collagène IV et favorisant l'invasion tumorale et la motilité cellulaire[93].

Outre son impact sur les intégrines, la dérégulation de la glycosylation peut également influencer l'activité enzymatique des MMP2 et MMP9. Cela affecte directement la capacité des cellules cancéreuses à dégrader les composants de la MEC et à envahir les tissus environnants. Par ailleurs, les TIMPs, qui régulent l'activité des MMP, sont également dérégulés, modifiant ainsi l'équilibre entre la dégradation et le remodelage de la MEC.

d) Voies de signalisation intracellulaires

Les modifications de la glycosylation des protéines dans les cellules cancéreuses peuvent activer différentes voies de signalisation telles que la voie Wnt/β-caténine, de l'EGFR, du TGF-β ou encore de NOTCH qui sont chacune impliquée de manière directe ou indirecte dans le processus métastatique.

(1) Voie de signalisation Wingless-related iNTegration site (Wnt)/β-caténine

La voie de signalisation Wnt joue un rôle crucial dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la morphogenèse pendant le développement embryonnaire et la croissance tissulaire chez les adultes (**Figure n°9**). En l'absence du ligand Wnt, l'Axin, l'APC, GSK3 et CK1 forment un complexe permettant la dégradation de la β-caténine. Par conséquent, le maintien de faibles niveaux de β-caténine engendre une inhibition de la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/β-caténine. En revanche, lorsque Wnt interagit avec ses récepteurs FZD et LRP6, Dsh inhibe le complexe formé par l'Axin, l'APC, GSK3 et CK1, ce qui conduit à la stabilisation de la β-caténine. Celle-ci s'accumule alors dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau cellulaire où elle interagit avec des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. Cette interaction co-activatrice modifie leur conformation, ce qui induit la transcription de gènes cibles spécifiques qui régulent divers processus.

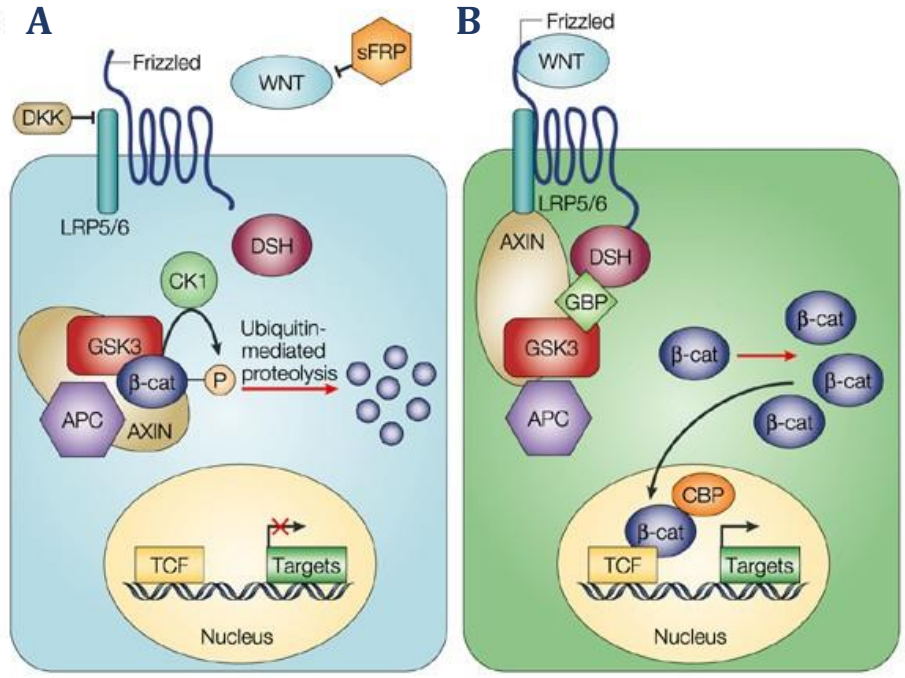


Figure n°9 : Voie de signalisation Wnt/β-caténine

"WNT and β-catenin signalling: diseases and therapies", Moon et al., Nature Reviews Genetics (2004)

Plusieurs équipes ont démontré le rôle prépondérant des mucines (MUC) dans la modulation de cette voie de signalisation. Les MUC constituent l'un des principaux composants du mucus et sont des protéines fortement glycosylées très souvent surexprimées dans le cancer. Dai *et al.*, ont démontré que la surexpression de MUC13 augmente la translocation nucléaire de la β-caténine ce qui accroît l'activation des facteurs de transcription TCF/LEF et donc, l'expression de c-myc, de l'Axin-2 et de l'E-cadhérine favorisant la croissance tumorale dans le carcinome hépatocellulaire[94]. De la même manière, dans le cancer gastrique, la surexpression de MUC5AC O-glycosylée augmente la prolifération cellulaire, l'invasion et les propriétés métastatiques en induisant l'expression de la β-caténine et de ses molécules en aval. Lahdaoui *et al.*, ont

ainsi inhibé l'expression de MUC5B dans les cellules de cancer gastrique KATO-III, ce qui a réduit l'expression de la β-caténine et la progression du cancer[95].

Enfin, hormis l'implication des mucines dans la voie Wnt, Sengupta *et al.*, ont montré que la délétion génétique de DPAGT1 diminue la N-glycosylation de Wnt ainsi que de ses récepteurs, ce qui décroît l'activation de la voie en aval et par conséquent, la progression tumorale et la formation de métastases[96,97]. De plus, il a été mis en évidence que la surexpression de GALNT1 induit une augmentation de la O-glycosylation de CD44, ce qui active la voie de signalisation Wnt/β-caténine et donc, la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses[98].

L'ensemble de ces études démontre que la modification de la glycosylation impacte la voie Wnt/β-caténine en favorisant notamment l'adhésion cellule-cellule et la formation de métastases[99].

(2) Voie de signalization de l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

La voie de signalisation de l'EGFR régit divers processus cellulaires dont la croissance, la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire. Elle est initiée par la liaison de ligands spécifiques, tels que l'EGF ou le TGF-α, au récepteur EGFR, une protéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Cela provoque alors la dimérisation de deux molécules d'EGFR puis l'activation *in fine* de Ras. Cette molécule initie par la suite plusieurs voies de signalisation telles que Ras/Raf/MEK/ERK ou PI3K/Akt ce qui conduit à la transcription des gènes cibles.

Che *et al.* ont mis en évidence que la surexpression de B4GALNT3, qui catalyse l'ajout d'un Gal sur la Ser/Thr des protéines O-glycosylées, augmente le caractère souche des cellules cancéreuses colorectales HCT116, SW480, HCT15 et HT29 ainsi que leurs propriétés invasives en altérant la glycosylation et la signalisation de l'EGFR[100]. Lin *et al.*, ont démontré que l'augmentation de la O-glycosylation de l'EGFR par C1GALT1 favorise l'invasion et la progression tumorale[101]. Par conséquent, son inhibition par l'Itraconazole diminue l'élongation et la liaison des O-glycanes à l'EGFR ce qui diminue la malignité des tumeurs[101]. Ainsi, l'altération de la glycosylation au niveau de la voie de l'EGFR favorise la progression et l'invasion tumorale.

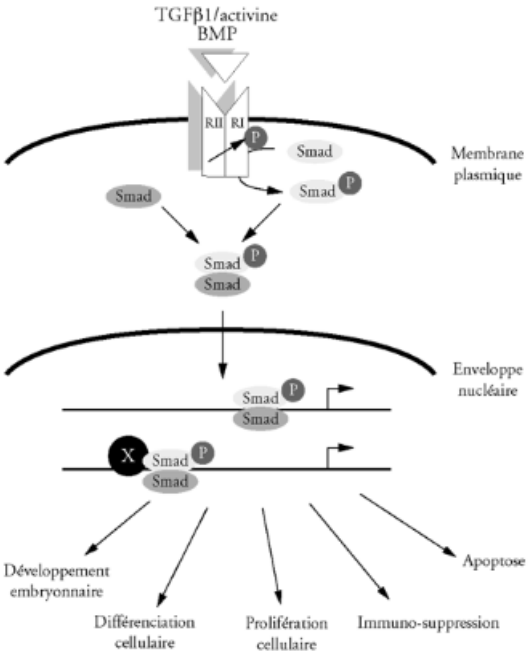


Figure n°10 : Voie de Signalisation du TGF-β[102]

La voie de signalisation du TGF-β régule des processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et la réponse immunitaire (**Figure n°10**). Lorsque le ligand TGF-β, se lie à son récepteur de type II (TβRII), cela modifie sa conformation, ce qui lui permet d'interagir avec le récepteur de type I (TβRI) ; tous deux étant des récepteurs à activité Ser/Thr kinase. Leur interaction conduit à leur phosphorylation réciproque puis à la phosphorylation des protéines Smad qui viennent alors se lier aux récepteurs. Les complexes Smad phosphorylés sont ensuite libérés et migrent vers le noyau dans lequel ils interagissent avec différents facteurs de transcription.

Il a été montré que l'inhibition de la N-glycosylation empêche l'interaction entre les deux récepteurs du TGF-β, ce qui rend les cellules cancéreuses résistantes à la signalisation du TGF-β[103]. Cette résistance découle de l'incapacité des récepteurs du TGF-β à être transportés à la surface cellulaire[103]. Ainsi, lorsque les cellules cancéreuses pulmonaires A549 ou gastrique MKN1 sont traitées avec des inhibiteurs de la glycosylation tels que la tunicamycine ou la kifunensine, la signalisation TGF-β diminue drastiquement[103].

De nombreuses études ont mis en évidence que l'altération de la glycosylation du TGF-β module l'interaction des cellules cancéreuses avec la MEC et favorise la TEM[99]. En effet, Park *et al.*, ont démontré que la fucosylation des récepteurs du TGF-β augmente la phosphorylation de Smad3, ce qui privilégie sa translocation nucléaire et promeut les métastases dans le cancer du poumon non à petites cellules[104]. L'ajout d'un résidu Fuc en α1,6 sur l'un des deux GlcNAc formant le *core* des N-glycanes semble être un régulateur important de la voie TGF-β dans le cancer. En effet, Tu *et al.*, ont démontré que les récepteurs du TGF-β fucosylés par FUT8 se lient plus facilement au TGF-β ce qui améliore la signalisation en aval[105]. Ainsi, l'inhibition de FUT8 a supprimé la capacité invasive des cellules du cancer du sein métastatiques[105]. Hirakawa *et al.* ont également souligné l'impact de FUT3 et FUT6, qui induisent la synthèse des antigènes SLe, sur la voie du TGF-β[106]. En effet, dans plusieurs lignées de cancer colorectal, ils ont mis en évidence que l'inhibition de l'expression de FUT3 et FUT6 par siRNA affecte la fucosylation du TβRI ainsi que la phosphorylation des molécules en aval, ce qui diminue l'invasion et la migration des cellules cancéreuses[106]. Par conséquent, FUT3 et FUT6 jouent un rôle dans l'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales en augmentant l'expression

des antigènes SLe et en améliorant la migration des cellules cancéreuses par la TEM médiée par le TGF-β[106].

La sialylation aussi semble avoir un rôle important puisque le phénotype mésenchymateux des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 a été partiellement inversé suite à l'inactivation de ST6GAL1[107]. Cela se traduit notamment par un gain du marqueur épithélial E-cadhérine et une perte des marqueurs mésenchymateux comme l'α-SMA, l'intégrine β1 et la FN1[107].

Enfin, Partridge *et al.*, ont montré que l'inhibition de MGAT5 bloque la génération des N-glycanes ramifiés et supprime la TEM induite par le TGF-β, et ce, en empêchant la rétention de TβRI et TβRII à la surface des cellules[108]. A contrario, Xu *et al.*, ont démontré que la surexpression de MGAT3 qui, pour rappel, est capable d'entrer en compétition avec MGAT5 pour le substrat, inhibe la motilité cellulaire induite par le TGF-β et, par conséquent, la TEM dans une lignée de cancer du sein humain MCF10A[109].

Le TGF-β et sa voie de signalisation sont connus comme étant un inducteur de la TEM dans différents types de cancer, ainsi, la dérégulation de leur glycosylation joue un rôle prépondérant sur le caractère invasif des cellules cancéreuses[106].

(4) Voie de signalisation NOTCH

Enfin, la voie de signalisation NOTCH est impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire, de la prolifération ou encore de l'apoptose. Cette voie est activée par l'interaction entre les récepteurs transmembranaires NOTCH et leurs ligands, les protéines Delta ou Jagged. Cette interaction provoque le clivage protéolytique du récepteur NOTCH permettant l'exposition d'un site de clivage pour la γ-sécrétase. Cette enzyme réalise ensuite un second clivage du récepteur NOTCH ce qui libère son domaine intracellulaire, NICD. Celui-ci est alors capable de transloquer dans le noyau cellulaire et d'interagir avec CSL afin d'activer la transcription des gènes cibles.

Plusieurs études ont démontré que l'altération de la glycosylation dans le cancer, modifie le ligand NOTCH ce qui favorise la survie des cellules cancéreuses et la prolifération des cellules souches[99]. En effet, à l'état physiologique, la protéine NOTCH1 présente une stœchiométrie élevée de O-fucosylation (POFUT1) et de O-glucosylation (POGLUT1) ; hors dans le cancer, elle peut être plus faible, c'est pourquoi la surexpression de POFUT1 et POFLUT1 peut affecter la quantité et la fonction de la molécule NOTCH[110]. Plusieurs études ont souligné le rôle de ces deux GT dans la signalisation NOTCH. Par exemple, Chabanais *et al.* ont mis en évidence que POFUT1 est surexprimée dans les stades précoces de cancer colorectal et que son expression est associée au processus métastatique probablement *via* la voie de signalisation NOTCH[111]. POFUT1 est également sur-exprimée dans les tumeurs cérébrale, hépatique et épidermoïde buccale ; tout comme POGLUT1 qui l'est dans les leucémies myélogène aigüe primaire et lymphoblastique aigüe à cellules T[110]. La surexpression de ces deux GT facilite celle de NOTCH à la surface des cellules et la transcription de ses gènes cibles. En revanche, l'inhibition de POGLUT1 par ARN interférants entraîne une diminution de l'activation de NOTCH dans les cellules U937 de leucémie myéloïde humaine[112].

D'autres GT peuvent agir sur la signalisation NOTCH telle que ST6GAL1. En 2018, Yuan *et al.*, ont mis en évidence que son inhibition dans les cellules de cancer pulmonaire non

à petites cellules, diminue l'expression de NOTCH1 et de ses molécules en aval ; il en résulte une diminution de la prolifération cellulaire, de l'invasion et de la formation de métastases[113].

4. Implications de l'altération de la glycosylation dans le cancer

a) Altération de la glycosylation comme biomarqueur du développement du cancer

Actuellement, de nombreux marqueurs diagnostic et pronostic sont utilisés en cancérologie. Parmi les plus fréquents, on retrouve l'antigène tumoral 125 (CA125) ou mucine 16 (MUC16) pour le cancer des ovaires ; l'antigène carbohydrate 19.9 (CA19.9) pour le cancer du pancréas ou encore l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) et l'antigène carbohydrate 72.4 (CA72.4) pour le cancer colorectal[54,114–116]. Tous sont des glycoprotéines sur-exprimées dans le sang des patients ayant un cancer. Cependant, ils sont souvent utilisés en combinaison, car ils sont peu sensibles et peu spécifiques. En effet, le CA125, par exemple, n'est pas détecté aux stades précoces de développement du cancer des ovaires et des niveaux élevés de CA125 peuvent également être observés dans d'autres types de cancers tels que le cancer du pancréas, du foie, du sein, de l'utérus et des trompes de Fallope[114]. Par ailleurs, ces niveaux peuvent aussi augmenter au cours du cycle menstruel, dans des conditions inflammatoires (péritonite, endométriose…) ou nonnéoplasiques[114].

Depuis plusieurs années, la glycosylation aberrante des protéines présentes à la surface des cellules cancéreuses devient peu à peu une nouvelle caractéristique du cancer[117–119]. Ainsi, plusieurs équipes ont souhaité identifier des changements dans la glycosylation des protéines entre les patients contrôles et les patients ayant un cancer pour trouver des marqueurs plus affins. L'α-foetoprotéine (AFP), par exemple, est une protéine dont l'expression augmente dans diverses situations (hépatite, grossesse, cancer…). Il a été montré que la forme fucosylée de l'AFP est spécifique du carcinome hépatocellulaire[55,114]. De la même manière, le CD43, une sialoglycoprotéine de type mucine, longtemps considérée comme un marqueur exclusif des leucocytes, est exprimée dans le cancer[120]. De Laurentiis *et al.*, ont démontré que le CD43 a une glycosylation altérée au niveau de l'antigène Tn uniquement dans les tissus cancéreux[120]. Ils ont également mis en évidence que l'anticorps monoclonal UN1 est capable de reconnaître spécifiquement cet épitope ce qui pourrait en faire un outil de choix pour le diagnostic précoce de la maladie[120]. Enfin, Saldova *et al.*, ont mis en évidence la présence dans le sérum des patientes atteintes de cancer des ovaires, de glycoformes riches en motifs SLe^X pour des protéines de la phase aigüe telles que l'haptoglobine, l'α1-glycoprotéine acide et l'α1-antichymotrypsine[121]. Ils ont par ailleurs établi que les chaînes lourdes IgG des patients contenaient deux fois plus de glycanes bi-antennaires agalactosylés et fucosylés[121].

Ces données montrent ainsi que certaines protéines ayant une glycoforme particulière dans le cancer pourraient être employées comme biomarqueur avec une meilleure sensibilité et spécificité que ceux actuellement utilisés en clinique.

Plusieurs équipes ont élargi ces observations au glycoprotéome des patients ayant un cancer en comparant leur profil glucidique plasmatique global à celui des sujets sains[122–124]. Ainsi, dans le cas du cancer de l'ovaire, on constate dans le sérum des patientes qu'il y a une augmentation des N-glycanes tri et tétras-branchés avec divers degrés de sialylation et de fucosylation et une diminution des glycanes bissectés[123,125]. En revanche, le profil glucidique des patients ayant un cancer du foie est inverse avec une diminution des N-glycanes complexes tri et tétras-branchés et une augmentation des glycanes bissectés[124]. Dans le sérum des patients atteints d'un cancer du pancréas, on retrouve une augmentation de sialylation mais aussi de la fucosylation et de la ramification des N-glycanes[122]. Cela pourrait être utilisé en tant que biomarqueur car les modifications de la glycosylation des protéines sériques reflètent l'état des tissus et des cellules de l'organisme, ce qui permettrait de classifier les cancers selon leur évolution et leurs sous-types[126].

Plus récemment, Abd-el-Halim *et al.*, se sont quant à eux concentrés sur les enzymes responsables de ces changements de glycosylation : les GT[127]. Ils ont alors défini une glyco-signature basée sur l'expression différentielle de 19 GT dans les xénogreffes dérivées de patients (PDX) atteint d'adénocarcinome pancréatique ductal[127]. Cela aiderait à stratifier les patients selon leur chance de survie et aurait une utilisation à visée pronostique[127].

b) Altération de la glycosylation : Nouvelle cible thérapeutique dans le cancer ?

La dérégulation de la glycosylation exerce un rôle fondamental dans le processus métastatique, conférant de manière générale un avantage aux cellules cancéreuses. Cela souligne l'importance de considérer les GT ou les motifs glucidiques comme des cibles thérapeutiques potentielles afin de réduire leurs capacités invasives. Plusieurs molécules permettent de cibler la N- comme la O-glycosylation *in vitro*, *ex vivo* et dans des modèles précliniques de cancer.

(1) Cibler la N-glycosylation

La swainsonine (SW) est un alcaloïde naturel qui a été largement utilisé dans les années 1980 pour démontrer le rôle de la N-glycosylation dans le cancer. Ce composé inhibe spécifiquement les α-mannosidases qui sont responsables du « contrôle de qualité » de la N-glycosylation. Il en résulte ainsi une accumulation d'oligosaccharides riches en mannose dans le RE et l'appareil de Golgi. Dans les années 1990, des études ont montré que le prétraitement des cellules de mélanome B16F10 avec la SW avant leur inoculation chez des souris immunodéficientes *Nude* réduisait leur potentiel invasif, sans entraîner de toxicité délétère[128,129]. Par la suite, Galustian *et al.*, ont montré que la SW était capable d'augmenter la cytotoxicité des cellules LAK et des cellules NK ainsi que la sensibilité des cellules de leucémie myéloïde K562 et des cellules de cancer colorectal Colo 320 à ces cellules immunitaires[130]. Il existe également le déoxymannojirimycine, un dérivé du

mannojorimycine, qui inhibe également les α-mannosidases et donc l'action est similaire à la SW.

Actuellement, la tunicamycine est plus fréquemment utilisée pour inhiber la N-glycosylation des cellules cancéreuses. Elle cible plus particulièrement, la GPT qui catalyse la première étape de la N-glycosylation en transférant le premier résidu de GlcNAc sur le dolichol phosphate. Son utilisation aboutit ainsi à l'accumulation de glycoprotéines incomplètes et au déclenchement des voies de réponses aux protéines non repliées, ce qui augmente le stress du RE et induit *in fine* la mort cellulaire. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que la tunicamycine permettait d'augmenter *in vitro* et *in vivo* la sensibilité aux traitements contre le cancer (chimiothérapies, trastuzumab, erlotinib…)[131–133]. Wu *et al.*, par exemple, ont traité les cellules de cancer gastrique multirésistantes SGC7901/ADR et SGC7901/VCR avec de la tunicamycine et ils ont observé une augmentation significative l'apoptose induite par la chimiothérapie[131]. Plus précisément, il a été montré dans les cancers colorectal, du sein HER^+, du poumon non à petites cellules et du cou et de la tête que la tunicamycine agissait notamment sur l'EGFR[132–135]. Ainsi, l'inhibition de la N-glycosylation de l'EGFR par la tunicamycine aboutit à sa dégradation et, par conséquent, inhibe les voies de signalisation en aval impliquées dans la survie cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse et la mobilité cellulaire[132–135]. Cela explique pourquoi le traitement des cellules cancéreuses à la tunicamycine conduit en partie à une augmentation de l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose des cellules cancéreuses et, à l'inhibition de leur prolifération[131–135].

Plusieurs équipes ont réalisé des études *in vivo* afin de confirmer le rôle de la tunicamycine dans des modèles précliniques de cancer. Wang *et al.*, ont montré que l'injection sous-cutanée de cellules de cancer du cou et de la tête HN4, préalablement traitées avec la tunicamycine chez des souris immunodéficientes *Nude*, entraîne une diminution de la tumorigenèse[135]. De la même manière, Han *et al.*, ont mis en évidence une diminution de la croissance tumorale de manière dose-dépendante dans un modèle murin de xénogreffe ectopique de cellules de cancer du sein HER^+[133].

(2) Cibler la O-glycosylation

Afin de bloquer la O-glycosylation, la molécule principalement employée est le Benzyl-O-GalNac (BG). Elle agit en entrant en compétition avec le donneur UDP-GalNAc pour bloquer la première réaction de la O-glycosylation.

Huang *et al.*, ont ainsi mis en évidence que le traitement des cellules de cancer colorectal HM7 pendant 48h avec 2 mM de BG induit une augmentation de la synthèse des antigènes T et Tn au détriment des antigènes sialylés de type SLe^x et SLe^a[136]. Il en résulte ainsi, une diminution de l'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales activées ou aux plaquettes médiée par les E et P-sélectines qui interagissent normalement avec les antigènes SLe[136,137]. Ces données ont été aussi démontrées avec des cellules de mélanome B16BL6, de leucémie HL60 et de cancer colorectal Colo205 et HT29[137–139].

Gouyer *et al.*, ont montré que le traitement des cellules avec le BG aurait un impact sur le traffic intracellulaire des protéines O-glycosylées[139]. En effet, les glycoprotéines défectueusement sialylées s'accumulent au sein des cellules au lieu d'être dirigées sur les membranes basolatérales ou apicales où elles sont fonctionnelles[139].

In fine, l'utilisation du BG inhiberait efficacement le potentiel métastatique[137]. À noter cependant que les altérations des antigènes glucidiques sont spécifiques de chaque lignée cellulaire : Par exemple, dans les cellules de cancer colorectal CaCo-2, il n'y a pas de différence de sialylation mais une diminution de la fucosylation[139,140].

Toutes ces molécules, bien qu'elles soient largement employées pour les expériences *in vitro*, *ex vivo* et très peu en pré-cliniques, présentent néanmoins une toxicité reconnue envers les cellules et les tissus sains. Ainsi, bien que de nombreuses études aient mis en évidence des altérations de la glycosylation dans les cellules cancéreuses, aucun inhibiteur ou modulateur de la glycosylation n'est à ce jour envisagé pour une application chez l'Homme.

C. Cancer et plaquettes ?

1. Généralités

La formation des plaquettes, appelée thrombopoïèse, se fait à partir des mégacaryocytes dans la moelle osseuse. Ces derniers sont de grandes cellules polyploïdes de 30 µm de diamètre, possédant plusieurs noyaux, leur permettant de générer une grande quantité de matériel génétique. Une fois mature, ils sont capables d'émettre des prolongements à travers les sinus vasculaires de la moelle osseuse, ce qui induit leur fragmentation et donne naissance aux pro-plaquettes. Une fois dans la circulation, ces proplaquettes sont scindées pour former des plaquettes fonctionnelles. Les plaquettes, également appelées thrombocytes, sont des cellules anucléées de petite taille, mesurant entre 1 et 3 µm de diamètre. Leur durée de vie comprise est entre 7 et 10 jours et, chaque jour, plus 10^{11} plaquettes sont produites pour garantir un renouvellement constant dans la circulation sanguine. Chez l'homme, le taux de plaquettes en circulation varie entre 150 et 350 000 plaquettes/µL.

2. Composition moléculaire des plaquettes

Les plaquettes constituent le réservoir de nombreuses protéines et, arborent divers récepteurs à leur surface, ce qui leur permet de jouer un rôle crucial dans divers processus physiopathologiques.

Lorsque les plaquettes sont activées, elles sont capables de libérer plus de 300 substances actives stockées dans leurs granules intracellulaires, ce qui leur permet de participer à de nombreux processus physiopathologiques (**Tableau n°2**). Il existe trois types de granules distincts dans les plaquettes : Les granules α, les granules denses et les lysosomes. Ceux-ci se distinguent par le type de molécules qu'ils contiennent, à savoir respectivement, des protéines impliquées dans l'agrégation plaquettaire, des agonistes plaquettaires et des enzymes de dégradation.

Granules denses	Granules α	Lysosomes
• **Nucléotides :** ATP, ADP, GTP, GDP • **Amines :** Sérotonine, histamine • **Cations bivalents :** Calcium, magnésium, pyrophosphate • **Polyphosphates** • **Protéines membranaires :** P-sélectine, glycoprotéines (GPIb, αIIbβ3), CD63, LAMP2, …	• **Protéoglycanes** • **Lipides :** Phospholipides, sphingomyélines, glycosphingolipides, … • **Glycoprotéines adhésives :** Fibronectine, vitronectine, vWF, thrombospondine • **Facteurs hémostatiques :** Fibrinogène, facteurs I/IV/V/VII/XI/XIII, kininogènes, protéine S, plasminogène, … • **Mitogènes cellulaires** • **Protéases et inhibiteurs :** Thrombospondine, MMPs • **Immunoglobulines** • **Albumine** • **Facteurs de croissance :** PDGF, VEGF, TGF-β, IGF, EGF, FGF, … • **Cytokines/chimiokines :** PF4, RANTES, CXCL5, CXCL7, IL-1β, IL-8, IL-6, … • **Molécules d'adhésion :** Sélectines E et P, intégrines (GPIIb/IIIa), CD40L, … • **ARNs**	• **Hydrolases :** Phosphatases acides, β-glucuronidase, arylsulfatase, N-acetyl-β-D-glucosaminidase, lipase acide, carboxypeptidase, collagénase, … • **Cathépsines (D, E)** • **Myélopéroxydase** • **Protéines membranes :** CD63, LAMP1, LAMP2, …

Tableau n°2 : Composition non exhaustive des différents granules plaquettaires

De plus, bien que dépourvues de noyau, les plaquettes héritent également d'un vaste répertoire de protéines et d'ARNm provenant des mégacaryocytes. De manière surprenante, elles possèdent un spliceosome ainsi que tous les facteurs essentiels à son fonctionnement comme des petits ARN nucléaires, des protéines d'épissage et des pré-ARNm endogènes[141]. Cela leur permet de s'adapter rapidement à des signaux environnementaux et à un changement de phénotype *via* la maturation des pré-ARN en ARNm matures[141]. Les plaquettes sont aussi capables d'interagir avec de nombreuses cellules différentes, ce qui peut influencer leur contenu en ARN.

Enfin, les plaquettes expriment à leur surface plusieurs récepteurs essentiels pour leur fonction dans l'hémostase et la thrombose (**Figure n°11**). Parmi eux, ceux dédiés à l'adhésion jouent un rôle essentiel dans les interactions entre les plaquettes et les éléments de la MEC. On retrouve notamment la glycoprotéine VI (GPVI) spécifique au collagène vasculaire, le récepteur GPIb-IX-V crucial pour l'attachement initial des plaquettes au facteur von Willebrand présent dans la matrice sous-endothéliale endommagée, ainsi que l'intégrine αIIbβ3 qui se lie à des ligands tels que le fibrinogène et la fibronectine, favorisant ainsi l'adhésion et l'agrégation des plaquettes.

Une fois adhérées, les plaquettes, s'activent et libèrent, entre autres, des agonistes plaquettaires stockés dans leurs granules. Ces agonistes agissent *via* leurs récepteurs respectifs, à savoir le P2Y1 et P2Y12 pour l'ADP, le récepteur TP pour le thromboxane A2,

ainsi que les récepteurs PAR1 et PAR4 pour la thrombine, formant ainsi une boucle d'activation positive des plaquettes.

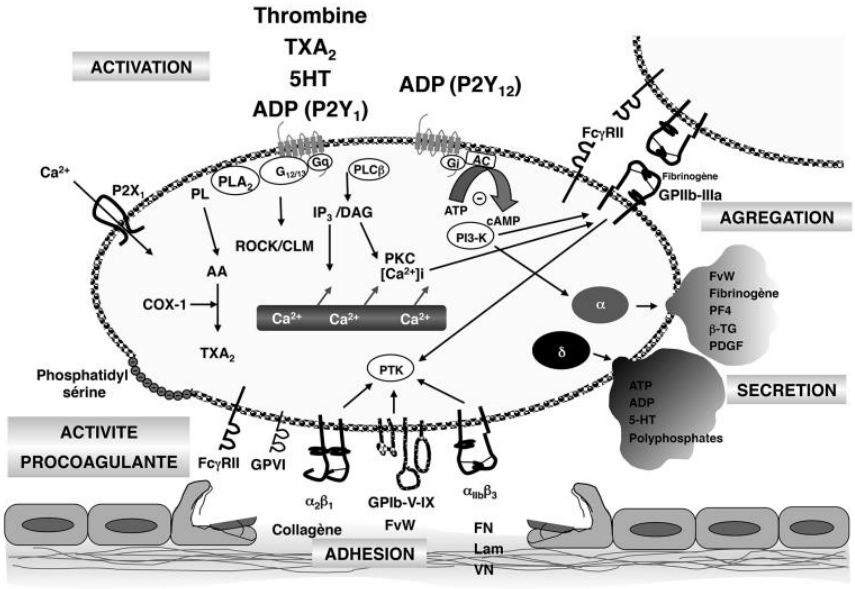


Figure n°11 : Schéma illustrant les principaux récepteurs plaquettaires
« Molecular mechanisms of platelet activation", Gachet, Bulletin de l'académie nationale de médecine (2013)

3. Fonctions des plaquettes

a) Rôle des plaquettes dans l'hémostase

Les plaquettes sont connues, de prime abord, par leur rôle dans l'hémostase. L'hémostase est un processus physiologique visant à arrêter le saignement au niveau d'une brèche vasculaire par la formation d'un caillot. Elle se déroule en trois phases concomitantes :

- L'**hémostase primaire**, qui aboutit à la formation d'un agrégat plaquettaire appelé également clou plaquettaire ;
- La **coagulation**, qui permet la consolidation du clou plaquettaire *via* la génération d'un réseau de fibrine ;
- La **fibrinolyse**, qui une fois la cicatrisation du vaisseau achevée, induit la lyse du thrombus tout en maintenant la perméabilité vasculaire.

À l'état physiologique, l'endothélium n'est pas thrombogène. Autrement dit, les plaquettes circulent dans la circulation sanguine sans interagir avec l'endothélium, évitant ainsi la formation de thrombi. Cependant, à l'état pathologique, lors d'une coupure par exemple, le collagène de la matrice sous-endothéliale est exposé à la circulation sanguine. Par conséquent, les plaquettes circulantes peuvent interagir au niveau de la zone de blessure grâce à des récepteurs spécifiques tels que le récepteur GPIb-IX-V qui se lie au facteur von Willebrand (vWF), lui-même lié au collagène. Cela permet le ralentissement et l'adhésion faible des plaquettes à la matrice sous-endothéliale[142]. La formation du complexe GPVI-FcRγ-collagène induit ensuite l'activation plaquettaire ainsi que leur adhésion ferme au site de blessure[142]. Une fois qu'elles sont activées, les plaquettes

libèrent le contenu de leurs granules, lequel comprend des agonistes plaquettaires tels que l'ADP, la sérotonine, la P-sélectine et le fibrinogène. Ceci favorise le recrutement de plaquettes supplémentaires aux sites de blessure ainsi que leur activation[143,144]. De plus, l'interaction entre plaquettes et ces agonistes entraîne l'activation de l'intégrine αIIbβ3, favorisant leur agrégation *via* la formation de ponts de fibrinogène pour former le clou plaquettaire.

Dans le même temps, les plaquettes activées et les cellules endothéliales activées expriment des phospholipides négatifs à leur surface, les phosphatidylsérines, qui fournissent une surface favorable à l'activation des facteurs de la coagulation sanguine (**Figure n°11**). Des études ont montré que les plaquettes libèrent également un grand nombre de microparticules (MPs) dans la circulation sanguine. Ces dernières sont définies comme de petites vésicules membranaires pro-coagulantes et pro-inflammatoires, mesurant entre 0,1 et 1 µm de diamètre. Bien que plus de 95% des MPs circulantes proviennent des plaquettes, elles peuvent aussi dériver d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales ou les cellules cancéreuses[144,145]. Ces MPs se caractérisent par l'expression de phosphatidylsérine à leur surface membranaire, ainsi, elles forment, elles aussi, une plateforme adéquate pour initier la cascade de coagulation[145,146].

Les facteurs de la coagulation, qui sont synthétisés par le foie et libéré sous forme inactive (zymogènes) dans la circulation sanguine, sont alors activés. Ils ont la capacité d'initier deux voies plus ou moins dépendantes (**Figure n°12**) :

- **La voie extrinsèque :** Initiée par le facteur tissulaire (TF) qui est en contact avec les éléments du sang lorsque la matrice sous-endothéliale est exposée. Il peut également être exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules cancéreuses et les leucocytes[147–150]. Une faible quantité de TF activé est suffisante pour convertir le facteur VII en facteur VII activé (VIIa). Ce complexe active alors le facteur X, essentiel à la transformation de la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa).
- **La voie intrinsèque :** Déclenchée par le contact du sang avec une surface étrangère ou lésée. Cela induit l'activation en cascade de plusieurs facteurs de coagulation, notamment le facteur XII (Hageman), le facteur XI, le facteur IX et enfin, le facteur X. Cette cascade d'activation aboutit à la conversion de la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa).

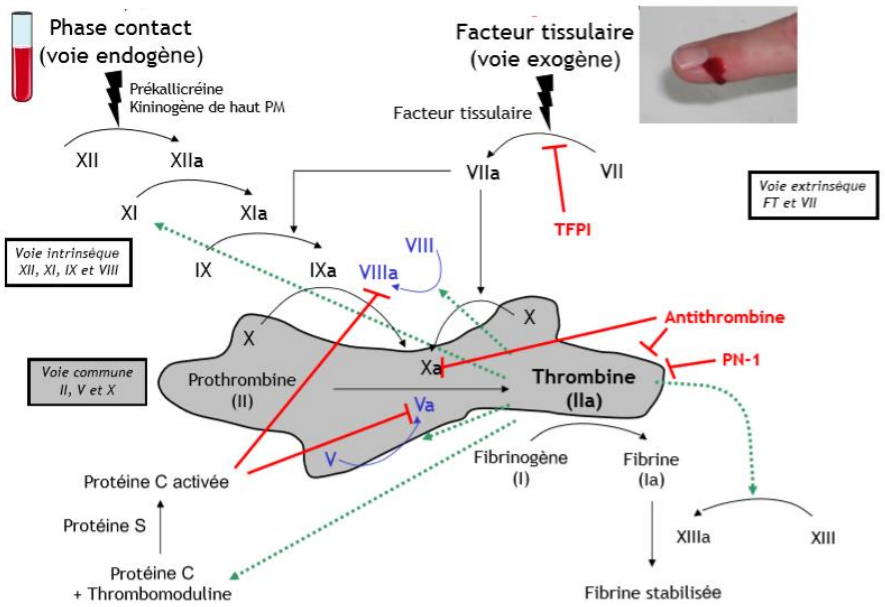


Figure n°12 : Représentation schématique des deux voies de la cascade de coagulation

Ces deux voies génèrent donc localement de petites quantités de thrombine, contribuant à plusieurs processus cruciaux dans l'hémostase. En effet, la thrombine induit le recrutement, l'activation et l'agrégation des plaquettes en se liant à leurs récepteurs PAR1 et PAR4[151]. De plus, elle déclenche une boucle de rétroaction positive en activant notamment les facteurs VIII et XI, favorisant ainsi la production de quantités plus conséquentes de thrombine. Enfin, elle est capable de cliver le fibrinogène en fibrine, consolidant ainsi le clou plaquettaire formé, ce qui contribue à sa stabilité[152].

La cascade de coagulation est un processus hautement contrôlé *via* plusieurs inhibiteurs physiologiques tels que les protéines C et S, l'antithrombine, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et la thrombomoduline, présents dans la circulation sanguine et à la surface des cellules endothéliales[153,154]. Cela permet de réguler négativement la cascade de la coagulation pour, à la fois, maintenir l'endothélium dans un état non thrombogène et, prévenir la formation de thrombi occlusifs potentiellement délétères pour l'organisme.

Une fois la régénération de l'endothélium endommagé accomplie, la fibrinolyse, troisième et dernière étape de l'hémostase, commence[155]. Elle a lieu grâce à l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et à l'activateur de type urokinase du plasminogène (u-PA) qui convertissent tous deux le plasminogène en plasmine. Cette enzyme dégrade la fibrine en produits solubles (D-dimères) que l'on retrouve dans la circulation sanguine. La fibrinolyse est étroitement régulée par des inhibiteurs appartenant à la famille des serpines. Par exemple, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1) régule ce processus en bloquant le complexe t-PA/u-PA, tandis que l'α2 anti-plasmine agit directement en inhibant la plasmine. Outre son rôle principal dans la dissolution des caillots, la fibrinolyse contribue également à l'activation de certaines MMPs, participant ainsi au remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et favorisant la cicatrisation de la paroi lésée.

b) Rôle des plaquettes dans l'inflammation et l'immunité

Depuis plusieurs années, les plaquettes ont été reconnues non seulement pour leur rôle dans l'hémostase, mais également pour leur implication dans les processus inflammatoires et immunitaires. Des études ont démontré que la thrombine, l'ADP et le thromboxane A2 libérés par les plaquettes agissent comme des régulateurs clés de l'inflammation[156,157]. Par exemple, des études ont mis en évidence que l'inhibition thérapeutique de la thrombine permettait de réduire l'inflammation associée à la stéatose hépatique, le sepsis ou l'ischémie reperfusion rénale[158–160]. Le blocage des récepteurs à l'ADP a, quant à lui, entraîné une aggravation de l'arthrite, mais une diminution du sepsis[161,162]. Enfin, l'inhibition du thromboxane A2 a permis de limiter l'inflammation endothéliale induite par le TNF-α[163].

Cela s'explique par le fait que les plaquettes sont impliquées dans diverses étapes des processus inflammatoires et immunitaires. D'une part, elles expriment des récepteurs, tels que les *Toll-Like Receptor* (TLR), qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (bactéries, virus, champignons) et jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse immunitaire innée[164]. Parmi ces récepteurs, les TLR2 et TLR4 sont les plus étudiés dans les plaquettes, et ils induisent la production d'oxyde nitrique, l'augmentation du taux de GMPc et l'activation de la protéine kinase G, ce qui favorise l'agrégation plaquettaire[165]. Scott *et al.*, ont démontré que le TLR4 active NF-κβ ainsi que les voies des MAPK, entraînant une augmentation de l'expression de l'IL-6, de la COX-2 et de la prostaglandine E2[166]. Ces molécules contribuent globalement à l'initiation et à l'amplification de la réponse inflammatoire en promouvant le recrutement des neutrophiles et des monocytes vers les sites infectieux. De plus, les plaquettes expriment des récepteurs Fcγ, qui leur permettent de phagocyter les agents pathogènes, de les marquer pour l'élimination par d'autres cellules immunitaires, ou encore de les neutraliser en sécrétant des peptides antimicrobiens tels que la β-défensine ou la thrombocidine.

De plus, une fois activées, les plaquettes expriment des molécules d'adhésion qui leur permettent d'interagir avec d'autres cellules et, notamment, les leucocytes. Les molécules telles que la P-sélectine et le CD40 présentes à la surface des plaquettes sont reconnues respectivement par le PSGL1 et le CD154 présents sur les leucocytes, ce qui permet la formation d'agrégats plaquettes-leucocytes et contribue à la réponse immunitaire innée[167]. Ces agrégats jouent un rôle clé en facilitant le recrutement des cellules immunitaires vers le site d'infection, en activant les leucocytes pour renforcer la réponse immunitaire locale ou en opsonisant ou capturant les agents pathogènes pour favoriser leur élimination par les cellules immunitaires. Ils peuvent également participer à la régulation de la coagulation pendant la réparation tissulaire par le biais de la libération de molécules pro- et anti-coagulantes et, en contrôlant l'adhérence des leucocytes et des plaquettes à l'endothélium.

De manière complémentaire, les plaquettes contribuent aussi à l'immunité adaptative en interagissant avec les cellules dendritiques et en les activant par l'intermédiaire de l'axe CD40-CD154[168,169]. L'activation des cellules dendritiques par les plaquettes permet la présentation d'antigènes aux lymphocytes T[164]. En outre, l'activation des plaquettes

peut conduire à la sécrétion de sérotonine et de RANTES (CCL5), connus pour leur rôle dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T[164].

Enfin, les MPs plaquettaires qui contiennent du matériel génétique (miRNA, mRNA, etc.), des enzymes, des protéines et de petites molécules, peuvent altérer ou moduler la fonction d'autres cellules dans le vaisseau[144].

Ainsi, bien que principalement impliquées dans l'hémostase, les plaquettes occupent une place essentielle dans l'immunité et l'inflammation en contribuant activement à la protection contre les agents pathogènes et en régulation le système immunitaire.

c) Rôle surprenant des plaquettes dans la glycosylation extracellulaire : État des lieux

Chez les vertébrés, la glycosylation des protéines a toujours été décrite comme ayant lieu dans les cellules nucléées au niveau de l'appareil de Golgi et du RE[170]. C'est pourquoi, les plaquettes ont longtemps été considérées comme incapables d'effectuer des modifications post-traductionnelles, notamment à cause de leur absence de noyau, d'appareil de golgi et de RE.

Les xylosyltransférases sont l'une des premières familles de GT décrites. Celles-ci catalysent le transfert de résidus xyloses (Xyl) sur les résidus Ser portés par la protéine *core*, ce qui initie l'assemblage de chaînes de glycosaminoglycanes qui formeront *in fine* des protéoglycanes. Ceux-ci participent à de nombreux processus biologiques clés tels que la formation de la MEC ainsi qu'à ses propriétés mécaniques, de signalisation et de rétention d'eau ou encore au développement embryonnaire, à la cicatrisation des tissus, à la régulation de la prolifération cellulaire, à l'adhésion cellulaire et à la migration cellulaire. Condac *et al.*, ont démontré en 2009 que les niveaux de xylosyltransférases sont très élevés dans le sérum des patients ayant une maladie qui présente une fibrose importante et/ou un renouvellement de la MEC comme le diabète ou la sclérose systémique[171]. Ils ont également montré que cette élévation du taux sérique de xylosyltransférases est dû à l'activation des plaquettes, qui sont leur source principale[171].

Cependant, les plaquettes ne renfermeraient pas seulement des xylosyltransférases. En effet, en 2012, Wandall *et al.*, ont mis en évidence que trois familles distinctes de GT (sialyltransférases, galactosyltransférases, acétylgalactosaminyltransférases) fonctionnelles seraient exposées à la surface des plaquettes inactivées ou sécrétées dans l'espace extracellulaire avec les nucléotides-ose associés lors de leur activation, ce qui permettrait aux plaquettes d'initier et d'allonger les glycanes sur des molécules acceptrices extracellulaires[172]. Ces GT sont emballées dans des vésicules lors de la maturation des mégacaryocytes et, elles transitent *via* les pro-plaquettes pour s'accumuler dans les plaquettes naissantes[172]. La présence de GT dans les plaquettes humaines et murines a aussi été mise en évidence par Lee-Sundlov *et al.,* qui les décrit comme des transporteurs importants, en particulier de ST3GAL1 et β4GalT[173].

Ainsi, les GT solubles circulantes sont en partie contrôlées et libérées suite à l'activation des plaquettes, ce qui leur permet de remodeler les glycanes à la surface des cellules et de potentiellement modifier le comportement cellulaire[173].

D. Effets de l'interaction entre les cellules cancéreuses et les plaquettes

1. Dans la circulation sanguine

La perturbation de la glycosylation, comme évoqué précédemment, revêt une importance cruciale dans le cancer. Toutefois, d'autres aspects jouent un rôle tout aussi déterminant dans l'apparition de la maladie et de ses complications. Il en est ainsi de l'interaction entre les cellules cancéreuses et les plaquettes, un phénomène qui accroît notamment le risque de thrombose associée au cancer (CAT) et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses.

a) Mécanismes impliqués dans la Thrombose Associée au Cancer (CAT)

« Thrombose et Cancer » sont liés depuis près d'un siècle, notamment par le Dr. Armand Trousseau qui avait constaté que la phlébite profonde était fréquemment associée au cancer. Ainsi, ce qui est appelé désormais « Syndrome de Trousseau » est caractérisé par le fait que les patients ayant un cancer ont quatre fois plus de risque de développer une thrombose veineuse profonde et, ont donc une espérance de vie diminuée de moitié[174,175].

Cet état pro-thrombotique observé chez les patients ayant un cancer peut s'expliquer, d'une part, par le fait que 20 à 50% d'entre eux ont une thrombocytose, c'est-à-dire un taux de plaquettes supérieur à 400.10^9 plaquettes/L[145,176,177]. En effet, les cellules cancéreuses présentes au sein de la tumeur primaire sont capables de produire et de sécréter dans la circulation sanguine du G-CSF, du GM-CSF, de la TPO et de l'IL-6 qui stimulent la mégacaryopoïèse et donc, la thrombopoïèse (= production de plaquettes)[145]. Ce phénomène est associé à de faibles taux de survie[173,176,177].

D'autre part, les cellules cancéreuses sont capables d'activer les plaquettes et surtout d'induire leur agrégation, on parle alors de « tumor cell-induced platelets aggregation » (TCIPA). Cela augmente considérablement le risque de Thrombose Associée au Cancer (CAT). Les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène peuvent être directs ou indirects.

Les « mécanismes directs », font référence à toutes les interactions physiques entre les récepteurs plaquettaires et les molécules présentes à la surface des cellules cancéreuses qui aboutissent à l'activation des plaquettes et à leur agrégation. Typiquement, les récepteurs plaquettaires αIIbβ3 et αVIβ1 sont capables d'interagir respectivement avec les molécules αVβ3 et ADAM9 exprimées par les cellules cancéreuses[178]. De la même manière, la P-sélectine et CLEC-2 des plaquettes peuvent interagir avec PSGL-1 et la podoplanine des cellules cancéreuses[178].

Par « mécanismes indirects », on sous-entend que les cellules cancéreuses sont capables d'exprimer ou de sécréter différentes classes de molécules agissant sur les plaquettes, ce qui augmente *in fine* le risque de CAT. Parmi elles se trouve :

(1) **Agonistes plaquettaires :** Il a été montré que les cellules de mélanome, de neuroblastome, de carcinome ovarien ou mammaire sont capables de sécréter des agonistes plaquettaires tels que l'ADP, le thromboxane A2 ou la thrombine[179,180].

Ces agonistes interagissent ensuite avec leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des plaquettes pour les activer et induire leur agrégation[145,180–187].

(2) **Molécules pro-coagulantes :** Les cellules cancéreuses expriment également des molécules pro-coagulantes telles que le TF qui initie la voie extrinsèque de la coagulation ou PAI-1 qui empêche la dégradation des thrombi et contribue ainsi au maintien de la thrombose. Plusieurs études ont aussi démontré que le TF est exprimé à la surface des MP d'origine cancéreuse (MP TF^+). En 2012, Thaler *et al.* ont mis en évidence une augmentation du taux de MP TF^+ circulantes dans les cancers pancréatique, colorectal, gastrique et pulmonaire[188]. De plus, lors d'une étude menée sur des patients ayant un cancer, mais n'ayant pas encore développé de thrombo-embolie veineuse (VTE), une analyse rétrospective sur une période d'un an a révélé que les patients ayant des MP TF^+ avaient une incidence de 34,8% de VTE contrairement à ceux dépourvus de MP TF^+ détectables[189]. En 2009, Thomas *et al.* ont démontré *in vivo* dans des modèles murins de cancers pancréatique et pulmonaire que les MP TF^+ s'accumulent au site de la lésion et que leur présence est directement corrélée à la taille du thrombus. Ainsi, ces MP favorisent l'activation excessive des plaquettes et de la coagulation sanguine, ce qui aboutit à la formation de thrombi, et ce, de manière dépendante du TF[190]. Mezouar *et al.*, ont mis en évidence que le traitement des souris portant des tumeurs avec des antiplaquettaires, comme le Clopidogrel, permettait de réduire la croissance tumorale et la formation de métastases en empêchant l'accumulation de ces MP dérivées de cellules cancéreuses sur le site de la thrombose[191].

(3) **Molécules pro-inflammatoires :** Enfin, les cellules cancéreuses peuvent sécréter directement des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF-α ainsi que des chimiokines telles que le VEGF. Elles peuvent également induire leur libération de manière indirecte, notamment par le biais des MP. Ces molécules soutiennent ainsi une réponse inflammatoire locale et, perturbent l'équilibre de la coagulation sanguine. Il en résulte une activation excessive des plaquettes, des altérations de la paroi vasculaire et l'activation des facteurs de coagulation, contribuant ainsi au risque accru de thrombose chez les patients ayant un cancer.

In fine, les plaquettes éduquées par les cellules cancéreuses sont activées et s'agrègent, ce qui augmente le risque de CAT. Cependant, le risque de thrombose diffère selon le type de cancer. Dans la revue présentée dans les pages suivantes, nous avons recensé les interactions entre les cellules cancéreuses et les plaquettes dans les microenvironnements tumoraux, ainsi que leur impact sur le risque thrombotique global. Nous avons choisi d'explorer trois types de cancer distincts, chacun présentant des niveaux de risque thrombotique différents : le cancer lingual (risque faible), le cancer colorectal (risque moyen) et le cancer du pancréas (risque élevé). La compréhension de ces interactions et de leurs conséquences revêt une importance cruciale pour approfondir les connaissances sur la thrombose associée au cancer, et pour identifier des biomarqueurs ainsi que des cibles thérapeutiques novateurs (*Cf.Publication*).

PUBLICATION

Platelet and Cancer-Cell Interactions Modulate Cancer-Associated Thrombosis Risk in Different Cancer Types

Ana-Luisa Palacios-Acedo*, **Mélanie Langiu***, Lydie Crescence, Diane Mège, Christophe Dubois and Laurence Panicot-Dubois. *Cancers* 2022, 14, 730. * co first author-ship.

cancers

MDPI

Review

Platelet and Cancer-Cell Interactions Modulate Cancer-Associated Thrombosis Risk in Different Cancer Types

Ana-Luisa Palacios-Acedo [1,†], Mélanie Langiu [1,†], Lydie Crescence [1,2], Diane Mège [1,3], Christophe Dubois [1,2,*] and Laurence Panicot-Dubois [1,2]

[1] Aix Marseille University, INSERM 1263 (Institut National de la Santé et de la Recherche), INRAE 1260 (Institut National de la Recherche Agronomique et de l'Environnement), C2VN (Center for CardioVascular and Nutrition Research), 13885 Marseille, France; ana-luisa.palacios-acedo@univ-amu.fr (A.-L.P.-A.); melanie.langiu@univ-amu.fr (M.L.); lydie.crescence@univ-amu.fr (L.C.); diane.mege@univ-amu.fr (D.M.); laurence.panicot-dubois@univ-amu.fr (L.P.-D.)

[2] Marseille University, PIVMI (Plateforme d'Imagerie Vasculaire et de Microscopie Intravitale), C2VN (Center for CardioVascular and Nutrition Research), 13385 Marseille, France

[3] Department of Digestive Surgery, La Timone University Hospital, 13005 Marseille, France

* Correspondence: christophe.dubois@univ-amu.fr

† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: Cancer-associated thrombosis is the first cause of death in cancer after cancer-progression itself; however, thrombotic risk is not the same in all cancer types. Here, we exemplified cancer-cell interactions with platelets in tumor microenvironments and their effect on overall thrombotic risk. We chose three distinct cancer types with varying thrombotic risks: oral cancer (low risk), colorectal cancer (medium risk) and pancreatic cancer (high risk). Understanding these interactions and their consequences is crucial for deepening researcher's and clinician's knowledge of cancer-associated thrombosis and finding innovative biomarkers and therapeutic targets.

Abstract: The first cause of death in cancer patients, after tumoral progression itself, is thromboembolic disease. This cancer-associated hypercoagulability state is known as Trousseau's syndrome, and the risk for developing thrombotic events differs according to cancer type and stage, as well as within patients. Massive platelet activation by tumor cells is the key mediator of thrombus formation in Trousseau's syndrome. In this literature review, we aimed to compare the interactions between cancer cells and platelets in three different cancer types, with low, medium and high thrombotic risk. We chose oral squamous cell carcinoma for the low-thrombotic-risk, colorectal adenocarcinoma for the medium-thrombotic-risk, and pancreatic carcinoma for the high-thrombotic-risk cancer type. We showcase that understanding these interactions is of the highest importance to find new biomarkers and therapeutic targets for cancer-associated thrombosis.

Keywords: cancer; thrombosis; platelets; risk; cancer-associated thrombosis; Trousseau's syndrome; pancreatic; oral; colorectal

check for updates

Citation: Palacios-Acedo, A.-L.; Langiu, M.; Crescence, L.; Mège, D.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Platelet and Cancer-Cell Interactions Modulate Cancer-Associated Thrombosis Risk in Different Cancer Types. *Cancers* **2022**, *14*, 730. https://doi.org/10.3390/cancers14030730

Academic Editor: Yacine Boulaftali

Received: 30 December 2021
Accepted: 28 January 2022
Published: 30 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 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 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The connection between thrombosis and cancer has been known for nearly 150 years since Dr. Armand Trousseau described migratory thrombophlebitis as a diagnostic element for visceral cancer [1]. Today, we know that 20 to 30% of first-time diagnoses of venous thrombotic events are cancer-related, and they portend poor prognosis with low survival odds for those that develop them [2,3]. Indeed, thrombotic events are the second cause of death in oncologic patients, only after disease progression itself. Cancer patients have an increased incidence of both venous (4–20%) and arterial (2–5%) thrombotic events [4,5]. However, the incidence of cancer-associated thrombosis (CAT) can vary depending on

tumor type, stage, and administered treatment, and often increases over time [3]. This increase in thrombotic events is most likely multifactorial, due to disease progression as well as treatments (many commonly used therapeutic agents are known to increase venous thromboembolism risk) and the fact that cancer treatments are associated with longer survival rates [6,7].

The most important modulator of thrombotic risk in cancer patients seems to be the tumor site and burden. The primary sites most linked to increased CAT include pancreas, lung, lymphoma, stomach, and testicular cancer [8]. Primary brain tumor and hematologic malignancies are also at high risk of venous thromboembolism (VTE) development [9]. The stage of the cancer also positively correlates with thrombotic risk in almost all cancer types [7].

Incidentally, the genetic and mutational status of tumors can also have an impact on CAT development. Indeed, *ALK* and *ROS-1* rearrangements in non-small-cell-lung cancer as well as *KRAS* mutations in colorectal and lung cancer are known to confer a higher thrombotic risk [8,10,11]. In another study, Dunbar and collaborators did a large-scale analysis to determine if tumor-specific genomic events could be related to CAT risk and found that somatic mutations of genes were associated with heightened malignant aggressiveness: *STK11*, *KRAS*, *CTNNB1*, *KEAP1*, *CDKN2B*, and *MET* were all associated with increased risk in patients with solid tumors [12]. These genes all have different functions and effects: KRAS is a tumor-specific mutation that promotes the initiation and progression of cancers, and *STK11* is a tumor suppressor that loses function after mutations [13,14]. *CTNNB* mutations cause the aberrant activation of the β-catenin gene, while KEAP1 mutations, which are common in lung cancer, produce an improved oxidative stress response in cancer cells and are associated with aggressive disease and shorter overall survivals [15,16]. *CDKN2B* encodes for cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), which regulates the cell cycle; its mutation in the cancer setting is associated with uncontrolled tumor growth [17]. On the other hand, MET mutations have been associated with a hypercoagulable state in animal models of cancer [18]. In another study, it was shown that BRCA2 mutations are related to increased plasma levels of P-selectin, PF4, and fibrinogen, which seems to suggest that coagulation may be heightened in this case [19]. On the other hand, IDH1/2 mutations are correlated with lower thromboembolic risk in patients with glioblastomas [20,21].

The intrinsic characteristics of the tumor itself are mostly responsible for the increase in coagulation risk in oncological patients. However, this risk can be modified and even exacerbated by the specific characteristics of patients [7,8]. For example, being female, of more than 65 years of age, of black ethnicity, and with elevated body-mass index can significantly increase the risk of developing blood clots [8,9]. The presence of comorbidities such as renal, cardiovascular, and lung disease, as well as a precedent VTE event, also increases the risk of developing blood clots [8,9].

Traditionally, the main reason for the cancer-associated hypercoagulable state known as Trousseau's syndrome is that tumor cells can interact with and activate platelets [22]. However recent publications show that there are many cell types and molecules involved, creating a web of pro-thrombotic interactions around the tumor [5]. Different cancer-type specific pathways of thrombosis have been proposed to explain the risk difference between cancer types and risk-assessment scores [5]. These extensive interactions are why scores such as the Khorana and PROTECT scores use parameters such as cancer site as well as circulating blood cell counts (thrombocytosis, leukocytosis) before the start of treatment, as well as treatment type, to stratify risk [5,23].

The interaction between cancer cells with platelets and neutrophils—and their releasates—can also impact and promote different paths for increased thrombotic risk [22,24–28]. Indeed, when platelets degranulate they release pro-inflammatory molecules that act as chemo-attractants for neutrophils in the tumoral microenvironment [27]. Neutrophils increase the local inflammation and can undergo a switch to a protumoral "N2" phenotype [29]. Neutrophils enhance cancer-associated thrombosis by expressing procoagulant

molecules such as P-selectin and tissue factor on their surface or by secreting neutrophil extracellular traps that enhance the thrombotic risk by trapping platelets and coagulation factors [30–35]. In this article, we will focus specifically on the interactions between cancer cells and platelets in the context of CAT.

2. Platelet and Cancer-Cell Interactions

Platelets are anucleate cells produced by megakaryocytes in the bone marrow; they have a discoid shape and measure 2–5 µm in diameter [22,36]. When activated by different agonists, most notably thrombin, ADP, von Willebrand factor (vWF), and collagen, platelets change shape and produce multiple filopodia [22,36,37]. Platelets have specific receptors for their agonist molecules, for example, thrombin can bind to GPIb-IX-V and the PAR receptors (with PAR_1 being more sensitive than PAR_4 in human), and ADP can bind to P2RY1 and P2RY12, who, respectively, initiate and amplify platelet degranulation and aggregation [22]. Von Willebrand factor exposed on activated endothelial cells or on the subendothelium matrix will interact with platelet GPIbα and αIIbβIII integrin to cross-link activated platelets during thrombus formation [22,38]. Exposed collagen can also bind to platelets through the integrin αIIβI and GPVI receptor and contribute to platelet activation and aggregation [22,37].

Activated platelets will both degranulate and express activation and adhesion molecules on their surface [2,22,36]. Platelets have three distinct types of granules: alpha, dense, and lysosomal. α-granules are the most present and contain both membrane-associated and soluble proteins such as ADP, P-selectin, fibrinogen, epidermal growth factor, vWF, vascular endothelial growth factor (VEGF), and complement C3 and C4 precursors (Figure 1A) [22]. When granule contents are released, the contents of the granules are either released into the microenvironment or upcycled to the platelet membrane [22,39,40]. The granule components promote cell adhesion, activation, and aggregation; they can also promote cell growth and inflammation through interactions with other cell types [22,39,40].

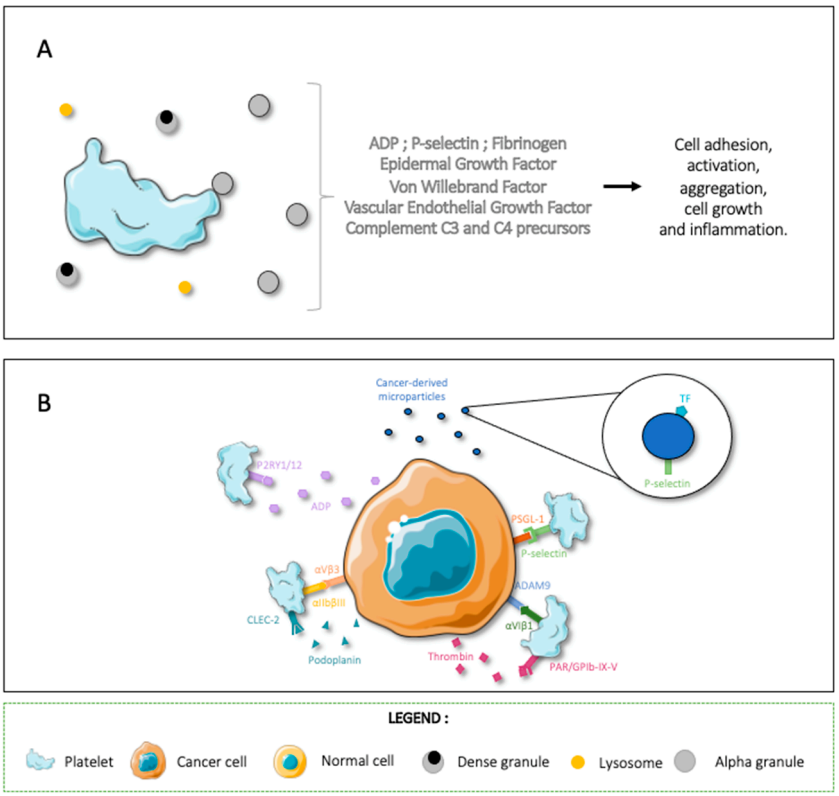


Figure 1. Schematic representation showing how the interaction of platelets with cancer cells can induce cancer-associated thrombosis. (**A**) Platelets have three distinct types of granules: alpha, dense,

and lysosomal. α-granules are the most present and contain both membrane-associated and soluble proteins that promote cell adhesion, activation, aggregation, cell growth, and inflammation through interactions with other cell types. (**B**) Cancer cells can express platelet agonists, intermediary molecules, and microvesicles to activate platelets and induce TCIPA. Figure created using Servier Medical Art available at http://smart.servier.com/, accessed on 15 December 2021.

Tumor and platelet cell interactions can happen directly or indirectly through the release of platelet agonists or intermediary molecules and microvesicles (MVs) [22]. The most common effect of these interaction is tumor-cell-induced platelet aggregation (TCIPA) [22]. TCIPA is correlated with higher aggressiveness and metastatic potential due to increased survival of tumor cells in circulation [22,41]. In order to activate platelets in the tumoral microenvironment and induce TCIPA, cancer cells can express platelet agonists on their membrane. This platelet activation in the tumoral microenvironment contributes to cancer progression [22]. Activated platelets "hide" metastatic cells from the immune system and protect them from shear forces in circulation [22,36,42]. Activated platelets can also degranulate in the tumoral microenvironment and provide pro-growth and pro-angiogenetic signals to the surrounding stroma [22,43,44]. As an example, platelet receptors αIIbβIII and αVIβ1 bind, respectively, to cancer-cell αVβ3 and ADAM9, and tumoral cells can interact with platelet P-selectin through PSGL-1 [22,45]. Cancer-cells can also express molecules such as podoplanin and thrombin, which interact with platelet CLEC-2 and $PAR_{1/2}$ receptors to activate and aggregate platelets [22,44,46–48]. Evidently, these activated platelets degranulate in the tumoral microenvironment and amplify the TCIPA loop.

Interestingly tumor-cells themselves can also secrete platelet agonists into their microenvironment. These secreted molecules contribute to the local TCIPA as well as recruit immune cells such as tumor-associated neutrophils and macrophages into the tumoral stroma [49,50]. Among these pro-platelet molecules, we have tumor-cell ADP secretion, which enhances platelet activation through P2RY1 and 12; in turn, platelet releasates attract immune cells and perpetuate local inflammation [22,51].

Cancer-cells are also known for releasing large numbers of MVs into the tumoral microenvironment [22]. MVs are plasma membrane vesicles produced by activated or apoptotic cells as well as resting cancer cells. These vesicles contain the parent cell's membrane markers and may have mRNA, proteins, and some organelles in their cytoplasm [52–54]. MVs are vectors of information between different cell types and tissues. Interestingly, cancer-derived MVs have exposed negative phospholipids that support platelet function, thus supporting the development of CAT [22,47]. In some cancers, such as pancreatic adenocarcinoma, the tumor-derived MVs express procoagulant molecules such as tissue factor (TF) and podoplanin and adhesion molecules such as P-selectin, allowing them to interact with platelets and other cell types to promote tumor growth and metastasis [22,55,56]. As information vectors, they also have mRNA, which can alter the transcriptome of targeted cells [54].

The interactions between tumor cells and platelets can also induce changes in the protein profile of circulating platelets, emphasizing the bi-directional communication between these cell types [40,57,58]. Ercan and colleagues have shown that the proteome in platelets from patients with lung cancer was significantly different to that of matched healthy samples [58]. They found specifically an over-expression of endoplasmic reticulum proteins: careticulin, endoplasmic reticulum chaperone BiP, and protein disulfide-isomerase [58]. These altered protein levels were associated with increased platelet degranulation and up-regulation of protein processing in the endoplasmic reticulum. Authors also found elevated levels of a coagulation factor XIII fragment named F13A1, which suggest higher activation rate of fXII and thus coagulation cascade activation in lung cancer patients [58,59]. When they compared platelet proteome of brain cancer patients with healthy samples, they found that brain cancer patients did not have altered proteomes such as in lung cancer, showing that each cancer type has unique interactions and effects on platelets and vice versa [58].

As the evidence shows, platelets and cancer cells are in constant interaction, both in the tumoral microenvironment and in circulation (Figure 1B). However, the final effect these interactions have depends on the cancer type. In this review article, we will expose three cancer types with different thrombotic risks and showcase the cancer–platelet interactions within each.

3. Oral Cancer

Head-and-neck cancer (HNC) represents approximately 2% of all cancers worldwide and has a 5-year survival rate of 60% [60]. The most common localizations in the oral cavity are oral cavity (lips, tongue, and mucosa), pharyngeal, and laryngeal, and 90% are squamous cell carcinoma [61].

Despite the fact that HNC is between the 8th and 10th most common cancer in the world, there is surprisingly little information available about the risk of developing thrombotic events in this disease [60–62]. In a worrisome manner, the incidence of oral cavity and pharyngeal cancer is on the rise at a rate of 0.6% per year in the last decade alone [63]. Interestingly, the known risk factors for developing this disease are similar to those associated with heightened thrombotic risk; certainly, risk factors such as tobacco use and an age over 50 years are common to both diseases [61,64]. In developed countries, the incidence of HNC associated with Human Papilloma Virus is on the rise, particularly in younger patients, underlining the need to better understand this cancer and its possible complications [61,65].

It is generally accepted that head and neck cancers have low thrombotic risk, and a clinical study review performed by P. Haen and collaborators in 2019 confirms this [61]. However, HNC and, more specifically, oral squamous cell carcinoma (OSCC) has multiple characteristics of cancers associated with high thrombotic risk, for example, modified thrombosis and fibrinolysis mechanisms, strong expression of procoagulant factors, and production of procoagulant cytokines and of procoagulant microparticles [62,66–71]. Indeed, OSCC cells can express TF, podoplanin, and thromboxane A2 (TXA2) and secrete TNFα, interleukins IL1 and IL6, VEGF, and procoagulant microparticles into the tumoral microenvironment (Figure 2) [61].

Recently, evidence of this thrombotic paradox has been demonstrated: a study published in 2021 has shown for the first time, in an original mouse model of OSCC, that there is no elevated systemic thrombosis risk [62]. Authors found that, in vitro, OSCC cells induce platelet aggregation due to high TF activity; they confirmed this in vivo by detecting platelet aggregates and fibrin deposits in histological sections of primary mouse tongue tumors [62]. In orthotopic animal models, there was no significant difference in terms of blood cell counts or tail bleeding times between healthy and cancer-inoculated mice [62]. Using the same OSCC orthotopic mouse model, researchers studied platelet accumulation and fibrin generation in the cremasteric arteries after a laser induced injury. Surprisingly, platelet accumulation and fibrin generation were highly inhibited in tumor-bearing mice versus healthy controls, suggesting decreased thrombotic power in OSCC [62].

Neutrophils are now known to be key players in both thrombosis and CAT [72]. More specifically, in this laser model of injury neutrophil they play a key role in thrombus initiation as they are the first cells detected at the endothelial injury site [72,73]. However, no difference in neutrophil accumulation at the site of injury was demonstrated, showing that the difference is due to a platelet defect and not a decrease in neutrophil activity [73].

Researchers determined that this discrepancy between in vivo and in vitro observations in OSCC was due to a decrease in αIIbβ3 activated form at the platelets' surface, and a significant decrease in the number of alpha and dense granules present in the platelets of the cancer-bearing mice [62]. The authors show that locally, OSCC can cause multiple microthrombi and fibrin accumulation by aggregating platelets. Platelets are activated and aggregated in situ due to cancer-cell procoagulant protein expressions such as TF and thrombin. At the same time, OSCC has a low systemic risk of thrombus development because circulating platelets present a storage pool deficiency [61,62].

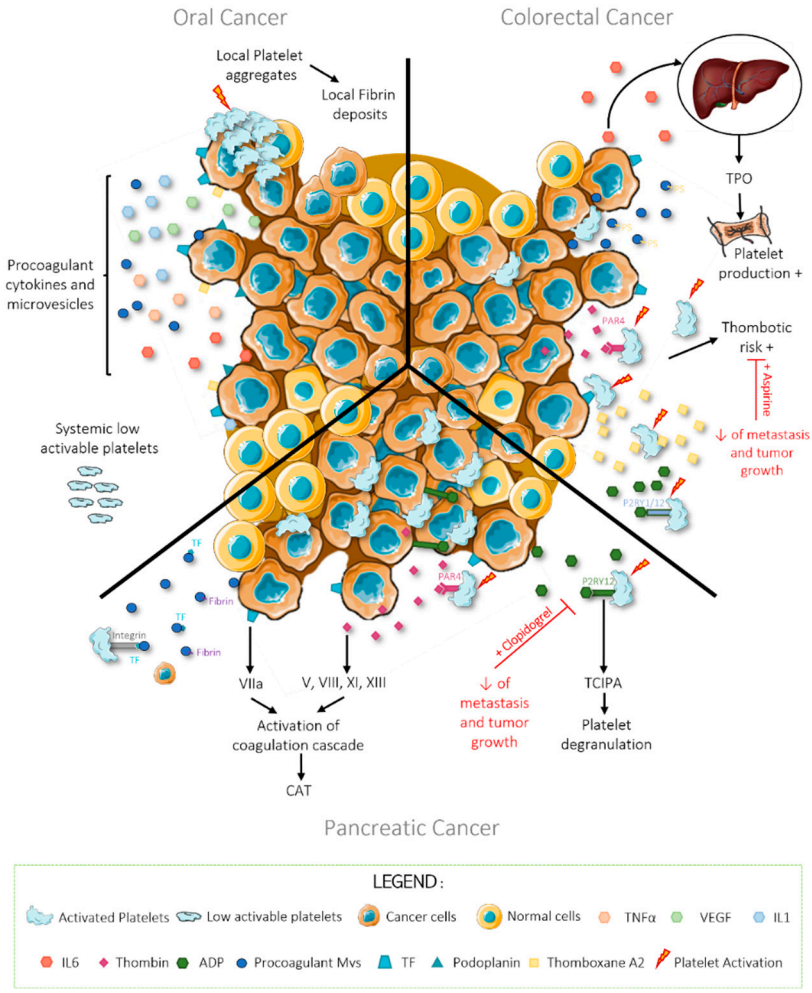


Figure 2. Comparison of cancer-cell–platelet interactions in three different cancer types with low (oral cancer), medium (colorectal cancer), and high (pancreatic cancer) thrombotic risk. Figure created using Servier Medical Art available at http://smart.servier.com, accessed on 15 December 2021.

4. Colorectal Cancer

Colorectal cancer (CRC) affected 1.8 million people worldwide in 2017, of which 896,000 died [74]. This makes it the third most common cancer after lung cancer and breast cancer in women or prostate cancer in men [75]. Studies have also estimated that by 2035, the mortality of colorectal cancer will increase from 60 to 71.5% [76]. These data are partly explained by the fact that patients with CRC have abnormal activation of the coagulation cascade, which significantly increases the risk of VTE [5,77]. Therefore, there is a need to find treatments to reduce CAT, which results from the interaction of platelets with colorectal cancer cells.

Wu and colleagues demonstrated that the mean platelet volume (MPV) is elevated in several types of cancers, particularly in CRC [78]. This change in morphology reflects an increase in the production of platelets and consequently in the number of circulating platelets [78]. This may be because colorectal cancer cells are able to secrete IL-6 and stimulate platelet production by increasing thrombopoietin (TPO) secretion from hepatocytes (Figure 2) [79]. This phenomenon is generally a sign of advanced disease and of poor prognosis [77]. Indeed, colorectal cancer cells stimulate the production of platelets to maintain a normal number of platelets in the bloodstream because these are consumed during the formation of micro-thrombi [77,80,81]. This disruption of haemostasis facilitates tumor progression, angiogenesis, and metastasis by facilitating exchanges between cancer cells and platelets, and their arrest in the endothelial wall for extravasation [77,80,81].

Interestingly, the increase in MPV also highlights that massive platelet activation is taking place [78]. Mitrugno et al. demonstrated that colon cancer cells are able to activate platelets by expressing TF and generating thrombin, thus activating platelet receptor PAR4 and releasing both ADP and TXA2 into the tumoral microenvironment [82]. This platelet activation leads to fibrin generation and to increased thrombotic risk.

Moreover, several studies have shown that the daily use of low-dose anti-platelet drugs such as aspirin could prevent the development of metastasis and have a long-term chemo-preventive effect on colorectal cancer development [83–85]. These effects can be explained by the fact that aspirin targets platelet cyclooxygenase 1 (COX-1) [86]. Indeed, it is able to donate its acetyl group to acetylate a hydroxyl group present at the active site of COX-1, and as result there is an irreversible inhibition of the enzyme by steric blockage, preventing further platelet COX-1 and, eventually, TXA2 production, which reduces platelet aggregation [86]. Aspirin also inhibits cancer-induced inflammation by targeting the cyclooxygenase COX-1 and COX-2 because these enzymes lead to the production of prostaglandins, and it is known that cytokines plays an essential role in inflammation and thus in colorectal tumor development [87].

The interaction between platelets and colorectal cancer cells also induces the secretion of platelet-derived, pro-coagulant extracellular vesicles that play a role in CAT [82]. Colorectal cancer cells and platelets are in constant interaction in the tumoral microenvironment. Cancers cells interacting with platelets initiate tumoral EMT, and they also potentiate metastatic cells' interplay with endothelial cells in a TCIPA-independent manner [40]. Some studies have described the presence of chimeric microparticles that contain both platelet and cancer protein-markers in their membrane, for example, PECAM-1 and CD41 [40]. In the microenvironment, these chimeric MVs are responsible for the monocyte's recruitment at the primary tumor site. Moreover, they contain two pro cytokines (IFNγ and IL4) known to be implicated in the activation of tumoricidal function of macrophages. In the blood compartment, the same chimeric MVs prime the endothelium to enhance the adhesion of tumor cells by increasing their ICAM-1 expression [40].

The study of D. Mege and collaborators show that the microparticulosome signature is specific to colorectal cancer and is different from benign inflammatory colorectal disease [88]. Additionally, when patients entered remission the microparticulosome signature changed towards the signature seen in healthy control patients [88]. The researchers conclude that the microparticulosome and, more specifically, fibrin-bearing MVs can be used as a complex biomarker for both cancer progression and thrombotic risk [54,88,89]. In 2016, Zhao and colleagues highlighted that a high level of phosphatidylserine on the surface of platelets and their microparticles is associated with increased pro-coagulant activity in vitro that, moreover, corresponds to the different stages of CRC [90]. Taken together, these data demonstrate how platelet and cancer-cell interactions; platelet activation; and MV generation contribute to the pro-thrombotic phenotype of patients with CRC [82].

Colorectal cancer is a complex disease that moderately increases systemic thrombotic risk compared to the healthy population. This increase in risk is due to different types of interactions between cancer cells and platelets. Indeed, both TCIPA and TCIPA-independent mechanisms come into play, and, depending, on the receptors expressed by cancer cells, these interactions result in specific changes in properties of both tumor-cells and platelets that affect the overall organism [40,82].

5. Pancreatic Cancer

Pancreatic cancer is the fourth most deadly cancer in the world, with a median survival after diagnosis of 17–23 months. It is a cancer type that is more prevalent in developed countries, and its incidence increases steadily every year [91]. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) compromises the majority of the histological types and is particularly aggressive, with a 5-year overall survival rate of 10% [92]. PDAC is considered one the most prothrombotic cancer types and interacts in direct and indirect manners with platelets

to induce their activation, degranulation, and aggregation, which support tumor growth and spread [3,22,51].

PDAC cells are known to express thrombin on their surface, which directly engage with the PAR receptors on platelets leading to their activation [22,41,93]. In an indirect manner, thrombin can also engage with coagulation factors V, VIII, XI, and XIII, leading to activation of the coagulation cascade and the development of CAT [22]. Pancreatic adenocarcinoma cells can also express TF, the main activator of the coagulation cascade once it interacts with factor VIIa, and can thus further stimulate the development of thrombotic events [22,55]. Indeed, PDAC cells secrete platelet agonist into their microenvironment in a bid to increase TCIPA and local inflammation. It has been recently confirmed that both mouse and human PDAC cells secrete higher amounts of ADP into the tumoral microenvironment than washed platelets [51]. This ADP activates P2RY1 and P2RY12 in platelets to induce TCIPA and platelet degranulation in the tumoral microenvironment [51]. Recently, Palacios and collaborators demonstrated an increase of P2Y12 expression in tumoral pancreatic cancer tissue; moreover, the inhibition of P2RY12 using clopidogrel in pancreatic cancer not only reduces TCIPA but also tumor growth, metastasis, and the spontaneous thrombosis associated with Trousseaus syndrome [51]. These results showcase the powerful effect of platelets in malignant disease progression (Figure 2) [51,56].

In an indirect manner of interaction, PDAC cells are known for producing large amounts of MVs, which contain the same procoagulant proteins as the original cancer-cells on their membrane [22,24,54,88,94–96]. MVs with membrane-bound TF accumulate at thrombotic sites in an orthotopic pancreatic cancer mouse model, and their presence drastically increases the thrombotic risk [24,56]. TF bearing MVs also have integrins on their surface, allowing them to interact and bind to platelets in both the tumoral microenvironment and circulation [24,96]. This allows metastatic cancer cells to bind to circulating platelets to use as a shield against shear forces and the immune system [22].

In another study, PDAC-derived MVs were found to express fibrin, the final molecule in the coagulation cascade and that is issued after platelet–cancer-cell interactions [54]. Remarkably, these fibrin-bearing MVs could have potential as a biomarker for CAT development risk [54]. Authors isolated and studied mRNAs present in the fibrin bearing MVs and detected transcripts of five genes: ITGB1, ANXA1, ANXA5, HPGD, and NFKB1 [54]. ITGB1, also called integrin β1, is implicated in metastatic diffusion [54]. It has been shown that overexpression of ITGB1 may be a marker of poor prognosis in patients with PDAC who have undergone resection [97]. ANXA1 and ANXA5 encode annexin 1 and 5, respectively, which are calcium-dependent phospholipid-binding proteins involved in particular in drug resistance and coagulation [54,97]. Finally, HPGD and NFKB1 are involved in inflammation [54]. In fact, HPGD catalyzes the first step of the catabolic pathway of prostaglandins, cytokines involved in inflammation, and NFKB1 is a key transcription factor that stimulates the expression of genes involved in various biological functions. Inappropriate inactivation of NFKB1 is associated with various inflammatory diseases, including cancer [98]. All these proteins are therefore important for different stages of tumor progression, and their presence in the fibrin-bearing MVs attests to the power these entities have in cell–cell communication and in cancer growth and spread.

PDAC-secreted MVs are intricately related to cancer cells and their interactions with the microenvironment, so much so that their use as biomarkers for disease progression has been proposed. Indeed, D. Mege et al. have shown that the "microparticulosome" signature is different in cancer vs. benign disease and reverts to "healthy" parameters when disease is resolved in both colorectal and pancreatic afflictions [88].

As can be evidenced, pancreatic cancer in general and PDAC specifically can directly and indirectly interact with platelets to generate "tumor-educated" platelets and "platelet-educated" tumor cells that increase cancer aggressiveness and augment the risk of developing thromboembolic events [2,22,36,98]. Pancreatic cancer is renowned for its high thrombotic risk, and while we have focused on the interactions that involve platelets, there are other pathways that increase cell adhesion and encourage metastasis by hijacking other

elements of the coagulation cascade; however, they surpass the scope of this review and have already been summarized elsewhere [2,22,36,98].

6. Conclusions

Trousseau's syndrome is an important contributor to morbidity and mortality in the cancer setting. Traditionally, cancer-cell–platelet interactions have taken the spotlight to explain the increase in thrombotic risk in cancer patients. Here, we have strived to highlight the differences in platelet–cancer interactions and their consequences in the thrombotic risk across three different cancer types. As the evidence shows, all three types interacted directly and indirectly with the platelets, but the systemic risk in CAT is very different. This shows that each cancer type, and its interactions within the cancer microenvironment, are unique and therefore have unique effects on tumor growth, TCIPA, and thrombotic risk. It is important to understand the different mechanisms involved in cancer-associated thrombosis so that patients can be treated with the appropriate anti-coagulant or antiplatelet agents.

Author Contributions: Conceptualization, A.-L.P.-A. and L.P.-D.; investigation, A.-L.P.-A. and M.L.; data curation, A.-L.P.-A. and M.L.; writing—original draft preparation, M.L. and A.-L.P.-A.; writing—review and editing, M.L., A.-L.P.-A., L.C., D.M., C.D. and L.P.-D.; supervision, L.C., C.D. and L.P.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Ana Luisa Palacios-Acedo was supported by the PAUSE program (College de France—PARIS).

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

Abbreviations

ADAM9	ADAM Metallopeptidase Domain 9
ADP	Adenosine Diphosphate
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
ANXA1/5	Annexin A1/5
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein
CAT	Cancer-associated thrombosis
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B
CLEC-2	C-type lectin-like type II transmembrane receptor
COX-1/2	Cyclooxygenase 1/2
CRC	Colorectal cancer
CTNNB1	Catenin beta-1
GPIbα	Glycoprotein Ib alpha
GPIV	Glycoprotein IV
HNC	Head-and-neck cancer
HPGD	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (NAD(+))
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IDH1/2	Isocitrate dehydrogenase (NADP) cytoplasmic or mitochondrial
IL1/6	Interleukin 1/6
ITGB1	Integrin beta-1
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KRAS	Proto-Ongene GTPase
MET	Hepatocyte growth factor receptor
MPV	Mean platelet volume
MVs	Microvesicles
NFKB1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
P2RY1/P2RY12	Purinergic Receptor P2Y1/P2Y12
PAR	Protease-Activated Receptors
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PLF4	Platelet factor 4

PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
ROS	Proto-Ongene 1, Receptor Tyrosine Kinase
STK11	Serine/threonine-protein kinase STK11
TCIPA	Tumor-cell-induced-platelet-aggregation
TF	Tissue Factor
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TPO	Thrombopoietin
TXA2	Thromboxan A2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VTE	Venous thromboembolism
vWF	Von Willebrand Factor

References

1. Metharom, P.; Falasca, M.; Berndt, M.C. The history of armand trousseau and cancer-associated thrombosis. *Cancers* **2019**, *11*, 158. [CrossRef] [PubMed]
2. Plantureux, L.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Effects of platelets on cancer progression. *Thromb. Res.* **2018**, *164*, S40–S47. [CrossRef] [PubMed]
3. Timp, J.F.; Braekkan, S.K.; Versteeg, H.H.; Cannegieter, S.C. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood* **2013**, *122*, 1712–1723. [CrossRef] [PubMed]
4. Falanga, A.; Marchetti, M.; Vignoli, A. Coagulation and cancer: Biological and clinical aspects. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, *11*, 223–233. [CrossRef]
5. Hisada, Y.; Mackman, N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood* **2017**, *130*, 1499. [CrossRef]
6. Khorana, A.A.; Francis, C.W.; Culakova, E.; Kuderer, N.M.; Lyman, G.H. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 632–634. [CrossRef]
7. Sevestre, M.A.; Soudet, S. Epidemiology and risk factors for cancer-associated thrombosis. *J. Med. Vasc.* **2020**, *45*, 6S3–6S7. [CrossRef]
8. Leiva, O.; Newcomb, R.; Connors, J.M.; Al-Samkari, H. Cancer and thrombosis: New insights to an old problem. *J. Med. Vasc.* **2020**, *45*, 6S8–6S16. [CrossRef]
9. Khorana, A.A.; Francis, C.W.; Culakova, E.; Kuderer, N.M.; Lyman, G.H. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer* **2007**, *110*, 2339–2346. [CrossRef]
10. Chiari, R.; Ricciuti, B.; Landi, L.; Morelli, A.M.; Delmonte, A.; Spitaleri, G.; Cortinovis, D.L.; Lamberti, G.; Facchinetti, F.; Pilotto, S.; et al. ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer is associated with a high rate of venous thromboembolism: Analysis from a phase II, prospective, multicenter, two-Arms trial (METROS). *Clin. Lung Cancer* **2020**, *21*, 15–20. [CrossRef]
11. Ades, S.; Kumar, S.; Alam, M.; Goodwin, A.; Weckstein, D.; Dugan, M.; Ashikaga, T.; Evans, M.; Verschraegen, C.; Holmes, C.E. Tumor oncogene (KRAS) status and risk of venous thrombosis in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2015**, *13*, 998–1003. [CrossRef] [PubMed]
12. Dunbar, A.; Bolton, K.L.; Devlin, S.M.; Sanchez-Vega, F.; Gao, J.; Mones, J.V.; Wills, J.; Kelly, D.; Farina, M.; Cordner, K.B.; et al. Genomic profiling identifies somatic mutations predicting thromboembolic risk in patients with solid tumors. *Blood* **2021**, *137*, 2103–2113. [CrossRef] [PubMed]
13. Cook, J.H.; Melloni, G.E.M.; Gulhan, D.C.; Park, P.J.; Haigis, K.M. The origins and genetic interactions of KRAS mutations are allele- and tissue-specific. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1808. [CrossRef] [PubMed]
14. Granado-Martínez, P.; Garcia-Ortega, S.; González-Sánchez, E.; McGrail, K.; Selgas, R.; Grueso, J.; Gil, R.; Naldaiz-Gastesi, N.; Rhodes, A.C.; Hernandez-Losa, J.; et al. STK11 (LKB1) missense somatic mutant isoforms promote tumor growth, motility and inflammation. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 366. [CrossRef]
15. Kim, S.; Jeong, S. Mutation Hotspots in the β-catenin gene: Lessons from the human cancer genome databases. *Mol. Cells* **2019**, *42*, 8–16. [CrossRef]
16. Saleh, M.M.; Scheffler, M.; Merkelbach-Bruse, S.; Scheel, A.H.; Ulmer, B.; Wolf, J.; Buettner, R. Comprehensive analysis of TP53 and KEAP1 mutations and their impact on survival in localized- and advanced-stage NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **2022**, *17*, 76–88. [CrossRef]
17. Suzuki, H.; Zhou, X.; Yin, J.; Lei, J.; Jiang, H.Y.; Suzuki, Y.; Chan, T.; Hannon, G.J.; Mergner, W.J.; Abraham, J.M. Intragenic mutations of CDKN2B and CDKN2A in primary human esophageal cancers. *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *4*, 1883–1887. [CrossRef]
18. Boccaccio, C.; Sabatino, G.; Medico, E.; Girolami, F.; Follenzi, A.; Reato, G.; Sottile, A.; Naldini, L.; Comoglio, P.M. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* **2005**, *434*, 396–400. [CrossRef]
19. Perez-Segura, P.; Zamorano-León, J.J.; Acosta, D.; Santos-Sancho, J.M.; Modrego, J.; Caldés, T.; de la Hoya, M.; Díaz-Rubio, E.; Díaz-Millán, I.; de Las Heras, N.; et al. BRCA2 gene mutations and coagulation-associated biomarkers. *Thromb. Haemost.* **2016**, *115*, 415–423. [CrossRef]
20. Tawil, N.; Bassawon, R.; Meehan, B.; Nehme, A.; Montermini, L.; Gayden, T.; De Jay, N.; Spinelli, C.; Chennakrishnaiah, S.; Choi, D.; et al. Glioblastoma cell populations with distinct oncogenic programs release podoplanin as procoagulant extracellular vesicles. *Blood Adv.* **2021**, *5*, 1682–1694. [CrossRef]

21. Ünlü, B.; Versteeg, H.H. Cancer-associated thrombosis: The search for the holy grail continues. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* **2018**, *2*, 622–629. [CrossRef] [PubMed]
22. Palacios-Acedo, A.L.; Mège, D.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Platelets, thrombo-inflammation, and cancer: Collaborating with the enemy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1805. [CrossRef] [PubMed]
23. Kim, A.S.; Khorana, A.A.; McCrae, K.R. Mechanisms and biomarkers of cancer-associated thrombosis. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **2020**, *225*, 33. [CrossRef] [PubMed]
24. 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]
25. Erpenbeck, L.; Schön, M.P. Neutrophil extracellular traps: Protagonists of cancer progression? *Oncogene* **2017**, *36*, 2483–2490. [CrossRef]
26. Cools-Lartigue, J.; Spicer, J.; McDonald, B.; Gowing, S.; Chow, S.; Giannias, B.; Bourdeau, F.; Kubes, P.; Ferri, L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 3446–3458. [CrossRef]
27. Chen, M.B.; Hajal, C.; Benjamin, D.C.; Yu, C.; Azizgolshani, H.; Hynes, R.O.; Kamm, R.D. Inflamed neutrophils sequestered at entrapped tumor cells via chemotactic confinement promote tumor cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7022–7027. [CrossRef]
28. Yang, L.; Liu, Q.; Zhang, X.; Liu, X.; Zhou, B.; Chen, J.; Huang, D.; Li, J.; Li, H.; Chen, F.; et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature* **2020**, *583*, 133–138. [CrossRef]
29. Fridlender, Z.G.; Sun, J.; Kim, S.; Kapoor, V.; Cheng, G.; Ling, L.; Worthen, G.S.; Albelda, S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil (TAN) phenotype by TGF-β: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 183–194. [CrossRef]
30. Darbousset, R.; Thomas, G.M.; Mezouar, S.; Frère, C.; Bonier, R.; Mackman, N.; Renné, T.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* **2012**, *120*, 2133–2143. [CrossRef]
31. Egorina, E.M.; Sovershaev, M.A.; Olsen, J.O.; Østerud, B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: Evidence for a direct transfer. *Blood* **2008**, *111*, 1208–1216. [CrossRef] [PubMed]
32. Maugeri, N.; Brambilla, M.; Camera, M.; Carbone, A.; Tremoli, E.; Donati, M.B.; De Gaetano, G.; Cerletti, C. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 1323–1330. [CrossRef] [PubMed]
33. Ritis, K.; Doumas, M.; Mastellos, D.; Micheli, A.; Giaglis, S.; Magotti, P.; Rafail, S.; Kartalis, G.; Sideras, P.; Lambris, J.D. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 4794–4802. [CrossRef] [PubMed]
34. Fuchs, T.A.; Brill, A.; Duerschmied, D.; Schatzberg, D.; Monestier, M.; Myers, D.D.; Wrobleski, S.K.; Wakefield, T.W.; Hartwig, J.H.; Wagner, D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15880–15885. [CrossRef] [PubMed]
35. Longstaff, C.; Varjú, I.; Sótonyi, P.; Szabó, L.; Krumrey, M.; Hoell, A.; Bóta, A.; Varga, Z.; Komorowicz, E.; Kolev, K. Mechanical stability and fibrinolytic resistance of clots containing fibrin, DNA, and histones. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6946–6956. [CrossRef] [PubMed]
36. Plantureux, L.; Mège, D.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Impacts of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer-associated thrombosis. *Cancers* **2018**, *10*, 441. [CrossRef] [PubMed]
37. Nuyttens, B.P.; Thijs, T.; Deckmyn, H.; Broos, K. Platelet adhesion to collagen. *Thromb. Res.* **2011**, *127*, S26–S29. [CrossRef]
38. Thon, J.N.; Italiano, J.E. Platelets: Production, morphology and ultrastructure. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2012**, 3–22. [CrossRef]
39. Iba, T.; Levy, J.H. Inflammation and thrombosis: Roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J. Thromb. Haemost.* **2018**, *16*, 231–241. [CrossRef]
40. Plantureux, L.; Mege, D.; Crescence, L.; Carminita, E.; Robert, S.; Cointe, S.; Brouilly, N.; Ezzedine, W.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; et al. The interaction of platelets with colorectal cancer cells inhibits tumor growth but promotes metastasis. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 291–303. [CrossRef]
41. Xu, X.R.; Zhang, D.; Oswald, B.E.; Carrim, N.; Wang, X.; Hou, Y.; Zhang, Q.; Lavalle, C.; McKeown, T.; Marshall, A.H.; et al. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2016**, *53*, 409–430. [CrossRef] [PubMed]
42. Karpatkin, S.; Ambrogio, C.; Pearlstein, E. The Role of Tumor-Induced Platelet Aggregation, Platelet Adhesion and Adhesive Proteins in Tumor Metastasis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, *283*, 585–606. [PubMed]
43. Wojtukiewicz, M.Z.; Sierko, E.; Hempel, D.; Tucker, S.C.; Honn, K.V. Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 249–262. [CrossRef] [PubMed]
44. Tsopanoglou, N.E.; Maragoudakis, M.E. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin. Thromb. Hemost.* **2004**, *30*, 63–69. [CrossRef]
45. 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 A6β1 controls lung metastasis through direct binding to cancer cell–derived ADAM9. *JCI Insight* **2016**, *1*, e88245. [CrossRef]

46. Shaker, H.; Bundred, N.J.; Landberg, G.; Pritchard, S.A.; Albadry, H.; Nicholson, S.L.; Harries, L.J.; Heah, J.Y.E.; Castle, J.; Kirwan, C.C. Breast cancer stromal clotting activation (tissue factor and thrombin): A pre-invasive phenomena that is prognostic in invasion. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 1768–1778. [CrossRef]
47. Omarova, F.; Rosing, J.; Bertina, R.M.; Castoldi, E. Negatively charged phospholipids stimulate factor XI activation by thrombin. *Thromb. Update* **2021**, *2*, 100022. [CrossRef]
48. Turpin, B.; Miller, W.; Rosenfeldt, L.; Kombrinck, K.; Flick, M.J.; Steinbrecher, K.A.; Harmel-Laws, E.; Mullins, E.S.; Shaw, M.; Witte, D.P.; et al. Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3020–3030. [CrossRef]
49. Kim, J.; Bae, J.-S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 6058147. [CrossRef]
50. Lin, Y.; Xu, J.; Lan, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 76. [CrossRef]
51. Palacios-Acedo, A.L.; Mezouar, S.; Mège, D.; Crescence, L.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. P2RY12-Inhibitors reduce cancer-associated thrombosis and tumor growth in pancreatic cancers. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 3536. [CrossRef] [PubMed]
52. Janowska-Wieczorek, A.; Wysoczynski, M.; Kijowski, J.; Marquez-Curtis, L.; Machalinski, B.; Ratajczak, J.; Ratajczak, M.Z. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer* **2005**, *113*, 752–760. [CrossRef] [PubMed]
53. 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* **2006**, *46*, 1199–1209. [CrossRef] [PubMed]
54. Mege, D.; Crescence, L.; Ouaissi, M.; Sielezneff, I.; Guieu, R.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Fibrin-bearing microparticles: Marker of thrombo-embolic events in pancreatic and colorectal cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 97394–97406. [CrossRef] [PubMed]
55. 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]
56. 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]
57. Palacios-Acedo, A.L.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Platelet-educated cancer cells and tumor-educated platelets: An egg-and-chicken debate. *ICTHIC Magazine*, 17 May 2021.
58. Ercan, H.; Mauracher, L.-M.; Grilz, E.; Hell, L.; Hellinger, R.; Schmid, J.A.; Moik, F.; Ay, C.; Pabinger, I.; Zellner, M. Alterations of the platelet proteome in lung cancer: Accelerated F13A1 and ER processing as new actors in hypercoagulability. *Cancers* **2021**, *13*, 2260. [CrossRef]
59. F13A1 Coagulation Factor XIII A Chain [Homo Sapiens (Human)]—Gene—NCBI. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2162 (accessed on 24 January 2022).
60. Sundermann, B.V.; Uhlmann, L.; Hoffmann, J.; Freier, K.; Thiele, O.C. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2018**, *46*, 177–182. [CrossRef]
61. Haen, P.; Mege, D.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Thrombosis risk associated with head and neck cancer: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2838. [CrossRef]
62. Haen, P.; Crescence, L.; Mege, D.; Altié, A.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Oral squamous cell carcinoma is associated with a low thrombosis risk due to storage pool deficiency in platelets. *Biomedicines* **2021**, *9*, 228. [CrossRef] [PubMed]
63. Cohen, N.; Fedewa, S.; Chen, A.Y. Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am.* **2018**, *30*, 381–395. [CrossRef] [PubMed]
64. Kumar, M.; Nanavati, R.; Modi, T.; Dobariya, C. Oral cancer: Etiology and risk Factors: A review. *J. Cancer Res. Ther.* **2016**, *12*, 458. [CrossRef]
65. Jiang, S.; Dong, Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. *Curr. Probl. Cancer* **2017**, *41*, 323–327. [CrossRef] [PubMed]
66. Parks, R.R.; Yan, S.-D.; Huang, C.-C. Tumor necrosis factor-alpha production in human head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* **1994**, *104*, 860–864. [CrossRef]
67. Ren, J.G.; Man, Q.W.; Zhang, W.; Li, C.; Xiong, X.P.; Zhu, J.Y.; Wang, W.M.; Sun, Z.J.; Jia, J.; Zhang, W.F.; et al. Elevated level of circulating platelet-derived microparticles in oral cancer. *J. Dent. Res.* **2016**, *95*, 87–93. [CrossRef]
68. Chang, M.-C.; Chan, C.-P.; Ho, Y.-S.; Lee, J.-J.; Lin, P.-S.; Lin, B.-R.; Huang, Y.-L.; Hahn, L.-J.; Yeh, H.-W.; Wang, Y.-J.; et al. Signaling pathways for induction of platelet aggregation by SAS tongue cancer cells—A mechanism of hematogenous metastasis. *J. Oral Pathol. Med.* **2008**, *38*, 434–440. [CrossRef]
69. Christensen, A.; Kiss, K.; Lelkaitis, G.; Juhl, K.; Persson, M.; Charabi, B.W.; Mortensen, J.; Forman, J.L.; Sørensen, A.L.; Jensen, D.H.; et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (UPAR), tissue factor (TF) and epidermal growth factor receptor (EGFR): Tumor expression patterns and prognostic value in oral cancer. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 572. [CrossRef]
70. Jagielska, B.; Symonides, M.; Stachurska, E.; Kawecky, A.; Kraszewska, E. Coagulation disorders in patients with locally advanced head and neck cancer—Should they really be disregarded? *Neoplasma* **2011**, *58*, 129–134. [CrossRef]
71. Kosugi, T.; Takagi, I.; Ariga, Y.; Okada, S.; Morimitsu, T.; Mihara, H. Fibrinolysis-coagulation system in patients with cancer of the head and neck. *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* **1982**, *236*, 211–215. [CrossRef]

72. Langiu, M.; Palacios-Acedo, A.-L.; Crescence, L.; Mege, D.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Neutrophils, cancer and thrombosis: The new bermuda triangle in cancer research. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1257. [CrossRef]
73. Darbousset, R.; Delierneux, C.; Mezouar, S.; Hego, A.; Lecut, C.; Guillaumat, I.; Riederer, M.A.; Evans, R.J.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; et al. P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* **2014**, *124*, 2575. [CrossRef] [PubMed]
74. Fitzmaurice, C.; Abate, D.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdel-Rahman, O.; Abdelalim, A.; Abdoli, A.; Abdollahpour, I.; Abdulle, A.S.M.; et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* **2019**, *5*, 1749. [CrossRef] [PubMed]
75. Sawicki, T.; Ruszkowska, M.; Danielewicz, A.; Niedźwiedzka, E.; Arłlukowicz, T.; Przybyłlowicz, K.E. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers* **2021**, *13*, 2025. [CrossRef]
76. Douaiher, J.; Ravipati, A.; Grams, B.; Chowdhury, S.; Alatise, O.; Are, C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *J. Surg. Oncol.* **2017**, *115*, 619–630. [CrossRef]
77. Zhang, L.; Ye, J.; Luo, Q.; Kuang, M.; Mao, M.; Dai, S.; Wang, X. Prediction of poor outcomes in patients with colorectal cancer: Elevated preoperative prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT). *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 5373. [CrossRef]
78. Wu, Y.Y.; Zhang, X.; Qin, Y.Y.; Qin, J.Q.; Lin, F.Q. Mean platelet volume/platelet count ratio in colorectal cancer: A retrospective clinical study. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 314. [CrossRef]
79. Braun, A.; Anders, H.J.; Gudermann, T.; Mammadova-Bach, E. Platelet-cancer interplay: Molecular mechanisms and new therapeutic avenues. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 665534. [CrossRef]
80. Seretis, C.; Youssef, H.; Chapman, M. Hypercoagulation in colorectal cancer: What can platelet indices tell us? *Platelets* **2015**, *26*, 114–118. [CrossRef]
81. Li, J.Y.; Li, Y.; Jiang, Z.; Wang, R.T.; Wang, X.S. Elevated mean platelet volume is associated with presence of colon cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2014**, *15*, 10501–10504. [CrossRef]
82. Mitrugno, A.; Yunga, S.T.; Sylman, J.L.; Zilberman-Rudenko, J.; Shirai, T.; Hebert, J.F.; Kayton, R.; Zhang, Y.; Nan, X.; Shatzel, J.J.; et al. The role of coagulation and platelets in colon cancer-associated thrombosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2019**, *316*, C264. [CrossRef] [PubMed]
83. 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. [CrossRef] [PubMed]
84. Baron, J.A.; Cole, B.F.; Sandler, R.S.; Haile, R.W.; Ahnen, D.; Bresalier, R.; McKeown-Eyssen, G.; Summers, R.W.; Rothstein, R.; Burke, C.A.; et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 891–899. [CrossRef] [PubMed]
85. Sandler, R.S.; Halabi, S.; Baron, J.A.; Budinger, S.; Paskett, E.; Keresztes, R.; Petrelli, N.; Pipas, J.M.; Karp, D.D.; Loprinzi, C.L.; et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 883–890. [CrossRef] [PubMed]
86. Ornelas, A.; Zacharias-Millward, N.; Menter, D.G.; Davis, J.S.; Lichtenberger, L.; Hawke, D.; Hawk, E.; Vilar, E.; Bhattacharya, P.; Millward, S. Beyond COX-1: The effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* **2017**, *36*, 289–303. [CrossRef] [PubMed]
87. Greten, F.R.; Grivennikov, S.I. Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms and consequences. *Immunity* **2019**, *51*, 27–41. [CrossRef] [PubMed]
88. Mege, D.; Panicot-Dubois, L.; Ouaissi, 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]
89. Mege, D.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Tumor-derived microparticles to monitor colorectal cancer evolution. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1765*, 271–277. [CrossRef]
90. Zhao, L.; Bi, Y.; Kou, J.; Shi, J.; Piao, D. Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2016**, *35*, 54. [CrossRef]
91. Aier, I.; Semwal, R.; Sharma, A.; Varadwaj, P.K. A systematic assessment of statistics, risk factors, and underlying features involved in pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol.* **2019**, *58*, 104–110. [CrossRef]
92. Mizrahi, J.D.; Surana, R.; Valle, J.W.; Shroff, R.T. Pancreatic cancer. *Lancet* **2020**, *395*, 2008–2020. [CrossRef]
93. De Candia, E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thromb. Res.* **2012**, *129*, 250–256. [CrossRef] [PubMed]
94. Mege, D.; Mezouar, S.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Microparticles and cancer thrombosis in animal models. *Thromb. Res.* **2016**, *140*, S21–S26. [CrossRef]
95. Thomas, G.M.; Panicot-Dubois, L.; Lacroix, R.; Dignat-George, F.; Lombardo, D.; Dubois, C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 1913–1927. [CrossRef] [PubMed]

96. 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]
97. Taniuchi, K.; Furihata, M.; Naganuma, S.; Sakaguchi, M.; Saibara, T. Overexpression of PODXL/ITGB1 and BCL7B/ITGB1 accurately predicts unfavorable prognosis compared to the TNM staging system in postoperative pancreatic cancer patients. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217920. [CrossRef]
98. In 'T Veld, S.G.J.G.; Wurdinger, T. Tumor-educated platelets. *Blood* **2019**, *133*, 2359–2364. [CrossRef]

b) Rôle des plaquettes éduquées par les cellules cancéreuses dans le processus métastatique

L'éducation des plaquettes par les cellules cancéreuses contribue à la CAT, mais également à la progression tumorale et à la formation des métastases. En effet, de nombreuses études démontrent que la thrombocytose observée chez les patients ayant un cancer est aussi corrélée à une augmentation du potentiel métastatique[167,192]. Ainsi, dès 1968, il a été montré qu'il était possible de réduire de moitié la formation de métastases dans des modèles murins après l'injection de cellules cancéreuses d'ascite TA3[193]. En effet, la sialidase contenue dans ces cellules dégrade les résidus d'acides sialiques portés par les plaquettes, ce qui accélère leur clairance[193].

Plusieurs équipes ont alors cherché à réduire la formation de métastases en inhibant les plaquettes *via* l'utilisation d'antiplaquettaires tels que l'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom d'Aspirine. Ce médicament agit comme agent acétylant, c'est-à-dire qu'il induit une liaison covalente entre un groupe acétyle et un résidu Ser qui se trouve dans le site actif de l'enzyme COX-1. Cette liaison empêche la production de prostaglandines et de thromboxane A2 et donc, l'activation et l'agrégation plaquettaire[194,195]. Ces effets sont irréversibles et durent pendant toute la durée de vie d'une plaquette. Des études rétrospectives ont démontré que l'utilisation régulière de l'Aspirine réduit le risque de développer un cancer colorectal et limite la formation de métastases[194–196]. Cependant, Palacios-Acedo *et al.* ont mis en évidence dans un modèle murin syngénique ectopique de cancer pancréatique que l'Aspirine administrée en tant que traitement curatif ne diminue pas de manière significative la taille de la tumeur[197]. En revanche, lorsqu'elle est utilisée dans un cadre préventif, cela réduit la taille de la tumeur de 60% par rapport aux souris contrôles[197]. Ainsi, si le cancer est établi, l'Aspirine n'a aucun impact[197]. Par contre, le Clopidogrel, un antiplaquettaire ciblant le récepteur à l'ADP P2RY12, diminue la croissance du cancer lorsqu'il est administré en traitement curatif ainsi que le développement de métastases spontanées par rapport aux souris non traitées[197].

Les plaquettes jouent donc un rôle central dans la formation de métastases, et ce, *via* différents mécanismes (**Figure n°13**). D'une part, elles protègent les cellules cancéreuses contre leur destruction mécanique dues aux forces de cisaillement exercées par le flux sanguin ainsi que contre leur lyse par les cellules NK[198]. Elles sont également capables de libérer des facteurs de croissance tels que le TGF-β ou le VEGF et des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et l'IL-6 pour moduler la réponse immunitaire anti-tumorale en agissant notamment sur les cellules dendritiques qui sont les principales cellules présentatrices d'antigènes[198,199]. L'ensemble accroît la survie des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine.

D'autre part, les plaquettes facilitent l'extravasation des cellules cancéreuses dans les tissus. Par exemple, en libérant des polyphosphates afin d'amplifier leur activation et leur agrégation autour des cellules cancéreuses. Cela favorise ainsi l'arrêt des cellules cancéreuses dans la microcirculation en renforçant leur adhésion à l'endothélium, ce qui augmente leur potentiel invasif[198]. Elles sont aussi capables de sécréter de nombreuses molécules (MMP, sérotonine, TGF-β, ATP, ADP…) qui influencent l'intégrité vasculaire

pour faciliter la formation de métastases. Ward *et al.*, ont ainsi mis en évidence, en 2018, que les plaquettes sécrètent de l'ATP suite à l'interaction entre le CD97 présent à la surface des cellules de cancer prostatique et l'acide lysophosphatidique présent à leur surface[200]. L'ATP agit en tant un médiateur de la rupture de la jonction endothéliale en interagissant avec les récepteurs P2RY présents à la surface des cellules endothéliales. Ce processus participe à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et facilite l'extravasation des cellules cancéreuses[200,201]. Le TGF-β issu des plaquettes, en synergie avec d'autres facteurs plaquettaires, a récemment été identifié comme un élément essentiel pour favoriser le processus métastatique, en particulier dans le cadre de la TEM[202]. Des études plus récentes chez la souris ont montré que, suite à leur interaction avec les cellules cancéreuses, les plaquettes libèrent les chimiokines CXCL5 et CXCL7 qui, *via* le récepteur CXCR2, recrutent les neutrophiles au sein de la tumeur[203]. Ces derniers sont connus comme jouant un rôle important dans la formation de métastases, notamment en augmentant leur potentiel de migration trans-endothéliale et l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium[38,204,205]. Dans le flash scientifique présenté dans les pages qui suivent, nous présentons plus en détail les différents mécanismes par lesquels les plaquettes et les neutrophiles interagissent ensemble afin de participer à la thrombose, notamment dans le contexte du cancer (*Cf.Publication*).

Enfin, les plaquettes aident à la colonisation de sites distants et à la croissance des métastases en libérant des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération des cellules endothéliales, la formation et la stabilisation des nouveaux vaisseaux tels que le TGF-β, le VEGF, l'EGF et le PDGF[180,206,207]. Le VEGF circulant, principalement dérivé des plaquettes, joue un rôle non seulement dans la promotion de l'angiogenèse, mais aussi dans les fonctions des CSC et dans l'initiation tumorale[208,209].

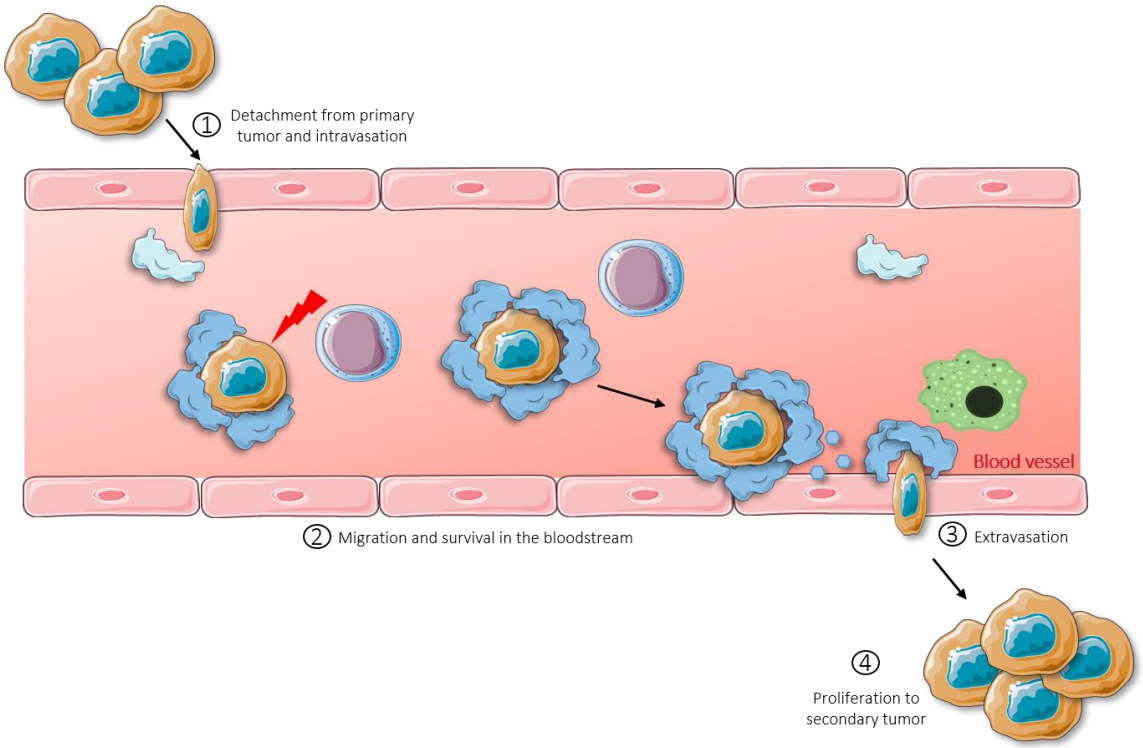


Figure n°13 : Schéma illustrant l'implication des plaquettes à chaque étape du processus métastatique

Adaptation – "Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis", Stegner et al., Thrombosis Research (2014)

PUBLICATION

Plaquettes et neutrophiles : de l'immunité à la thrombose

Mélanie Langiu*, Ana-Luisa Palacios-Acedo*, Julie Tourn*, Lydie Crescence, Christophe Dubois, Laurence Panicot-Dubois. Revue Francophone d'hémostase et de thrombose. 2022, Vol 4, N°3. * co first author-ship

Plaquettes et neutrophiles : de l'immunité à la thrombose

Platelets and neutrophils: from immunity to thrombosis

Mélanie LANGIU*, Ana-Luisa PALACIOS-ACEDO*, Julie TOURN*, Lydie CRESCENCE, Christophe DUBOIS, Laurence PANICOT-DUBOIS

C2VN (AMU – INSERM 1263 – INRAE 1260), *Equipe III Endothelium, circulating cells and vascular disease*, Aix-Marseille Université, Campus Santé Timone, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France.
* *Les auteurs ont contribué de manière égale.*
Auteur correspondant : Laurence PANICOT-DUBOIS
Courriel : laurence.panicot-dubois@univ-amu.fr
Article reçu le 22/08/2022 et accepté le 12/09/2022

RÉSUMÉ

La thrombose est l'une des principales causes de décès dans le monde et se traduit par des pathologies telles que la thrombose veineuse profonde, l'embolie pulmonaire, l'accident vasculaire cérébral ischémique ou encore l'infarctus du myocarde. Il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la formation de thrombi pour réduire son incidence et sa mortalité.
Les plaquettes ont longtemps été considérées comme les principales cellules jouant un rôle dans la thrombose, principalement à travers leurs interactions avec la thrombine et le collagène qui permettent la production de fibrine et la formation du clou plaquettaire en les activant.
Aujourd'hui, les neutrophiles sont également largement décrits comme jouant un rôle majeur dans le développement du thrombus. Ils peuvent transporter des molécules procoagulantes comme le facteur tissulaire et sécréter leur ADN condensé avec leur contenu granulaire pour former des « NETs » (*neutrophil extracellular traps*).
Les neutrophiles et les plaquettes interagissent ensemble et créent une boucle d'amplification positive. Par exemple, les plaquettes expriment la P-sélectine ou le TLR-4 qui induisent la production de NETs qui à leur tour, les activent *via* l'exposition des histones 3 et 4 citrullinées.
Les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles sont si importantes dans la formation des thrombi que leur dérèglement dans des maladies comme le cancer, l'infection par le SARS-Cov-2 et le lupus, augmente considérablement le risque thrombotique. Dans cet article, nous allons présenter les différents mécanismes par lesquels les plaquettes et les neutrophiles interagissent ensemble pour participer à la thrombose en les illustrant à travers différents contextes cliniques.
Mots clés : formation de thrombi, interaction plaquettes neutrophiles, dérèglement et risque thrombotique, contextes cliniques.

ABSTRACT

Thrombosis is one of the major causes of death in the world and results in pathologies like deep vein thrombosis, pulmonary embolism, ischemic stroke, and myocardial infarction. Understanding the underlying mechanisms of thrombus formation is essential to reduce its incidence and mortality.
Platelets were long considered the main cellular contributors to thrombosis. They are activated through their interactions with thrombin and collagen to support the formation of fibrin and form the platelet clot.

Nowadays neutrophils are also widely described as playing a major role in thrombus development. They can carry procoagulant molecules like tissue factor and secrete their condensed DNA with their granule content to form neutrophil extracellular traps (NETs).
Neutrophils and platelets interact and create a positive amplification loop with each other. For example, platelets can express P-selectin or TLR-4 which induce NET production which in turn activates platelets *via* the exposition of citrullinated histones 3 and 4.
The interactions between platelets and neutrophils are so important in thrombus formation that their dysregulation in diseases like cancer, SARS-Cov-2 infection, and lupus, significantly increase the thrombotic risk. In this article we will review different mechanisms by which platelets and neutrophils interact together and how they may be altered in different diseases known for increased thrombotic risk.
Keywords: thrombi formation, platelet neutrophil interaction, dysregulation and thrombotic risk, clinical situations.

Rev Francoph Hémost Thromb 2022 ; 4 (3) : ???-??.

INTRODUCTION

La maladie thrombo-embolique, veineuse ou artérielle, est une maladie complexe qui comprend entre autres la thrombose veineuse profonde, l'embolie pulmonaire, l'accident vasculaire cérébral ischémique et l'infarctus du myocarde **1**. En Europe, on compte 500 000 décès chaque année ; et il s'agit de la première cause de décès dans le monde **2**. Nous verrons ici qu'elle résulte de l'interaction entre plusieurs partenaires et notamment de celle entre les plaquettes et les neutrophiles.

IMPLICATION DES PLAQUETTES ET DES NEUTROPHILES DANS LA FORMATION DE THROMBI

Les plaquettes sont les principales cellules impliquées dans la formation d'un thrombus. Ce sont de petites cellules anucléées discoïdes issues des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Les plaquettes contiennent différents types de granules qui sont sécrétés au cours de leur activation : granules alpha, denses et lysosomes. Les granules alpha sont les plus nombreuses et contiennent des molécules solubles qui sont exprimées à la surface des plaquettes lors de leur activation comme la P-selectine, le fibrinogène ou encore le facteur de von Willebrand (FvW) **3,4**. Les granules denses quant à elles renferment des nucléotides d'adénosine (ADP et ATP), de la sérotonine et du calcium **3,4**. Enfin, les granules lysosomaux sont plutôt rares (un-deux par plaquettes) et sont composées de protéases telles que des élastases, des collagénases et des glucosidases **3,4**.

L'adhésion et l'agrégation des plaquettes à la paroi vasculaire lésée sont des étapes critiques dans la formation d'un thrombus. La façon dont cette activation et cette adhésion se déroulent peut varier selon le stimulus qui initie la pathologie thrombo-embolique.

Dans le cas d'une blessure de l'endothélium avec rupture de la barrière endothéliale, le collagène de la matrice sous-endothéliale est exposé à la circulation sanguine. Par conséquent, les plaquettes circulantes peuvent interagir avec le FvW, lui-même lié au collagène, *via* le complexe glycoprotéinique (GP) Ib-V-IX. Cette interaction permet aux plaquettes de ralentir et d'adhérer faiblement à la matrice sous-endothéliale **5**. Ensuite, la formation du complexe GPVI-FcRγ-collagène induit l'activation plaquettaire ainsi que leur adhésion ferme au site de blessure **5**.

Dans des conditions physiologiques, le facteur tissulaire (FT) exprimé par les cellules de l'adventice n'est pas en contact avec les éléments du sang **6**. Cependant, lorsque la matrice sous-endothéliale est exposée, il le devient. Un candidat possible responsable de l'activation du FT est la protéine disulfure isomérase (PDI) présente à la surface de différents types cellulaires dont les plaquettes **7**. Néanmoins, la diminution de la formation du thrombus observée après l'inhibition de PDI peut aussi être due au fait que cette protéine jouerait un rôle dans l'activation des plaquettes **8**. En effet, PDI, en assurant l'échange de liaisons disulfures, maintient le récepteur αIIbβ3 dans une conformation stable permettant le *signaling inside-out* **8,9**. Le FT activé présentant un pont disulfure forme un complexe avec le facteur VIIa, ce qui induit l'activation de la cascade de coagulation, entraînant la génération de thrombine **6,7**. La thrombine interagit ensuite directement avec ses récepteurs plaquettaires PAR1 et PAR4 et les clive, ce qui active les plaquettes **10,11**.

In fine, dans le cas d'une exposition de la matrice sous-endothéliale (Figure 1.1), les plaquettes sont activées à la fois par le collagène et la thrombine. L'activation des plaquettes *in vitro* à de fortes concentrations de collagène et de thrombine forme une sous-population de plaquettes pro-coagulantes

appelées les « Coated platelets » (*Collagen and thrombin activated platelets*) **12**. Ces plaquettes très fortement activées sont associées à l'expression de phospholipides négatifs qui servent de plateforme d'ancrage pour l'assemblage des facteurs de coagulation **13,14**.

Une fois activées par ces deux agonistes, les plaquettes sécrètent leurs granules alpha et denses qui contiennent des agonistes plaquettaires (ADP, sérotonine, P-sélectine, fibrinogène…), ce qui permet de recruter davantage de plaquettes aux sites de lésions vasculaires et de les activer **8,15**. L'interaction des plaquettes avec ces agonistes induit également l'activation de l'intégrine αIIbβ3 et donc leur agrégation *via* des ponts de fibrinogène pour former le clou plaquettaire **8,15,16**.

Cependant, l'adhésion et l'activation des plaquettes peut également se produire lors de l'activation de l'endothélium, sans dénudation (Figure 1.2) **16**. La matrice sous-endothéliale n'étant pas exposée, les mécanismes de formation du thrombus sont donc indépendants du collagène mais dépendants de la thrombine **10,11**. Dans ce cas, les neutrophiles, initialement connus pour leur propriété de phagocytose dans l'immunité innée, jouent un rôle important dans les mécanismes de formation du thrombus **17,18**. Cette interaction étroite entre les neutrophiles et la coagulation est appelée « immuno-thrombose » **18,19**.

En 1905, Bizzozero décrit pour la première fois la présence de globules blancs au sein de thrombi de veines mésentériques de cochon d'Inde. Mais ce n'est qu'à partir des années 2000 que le développement de la microscopie intravitale digitale en temps réel permet d'observer que des leucocytes roulent à la surface de l'endothélium activé et s'incorporent au thrombus deux à trois minutes après la blessure de la paroi vasculaire **10,18**. Plusieurs équipes ont montré que ces leucocytes sont des neutrophiles et que ces cellules sont les premières à s'accumuler au site de blessure, avant même les plaquettes **17,20**. De plus, ces neutrophiles expriment le FT à leur surface, ce qui permet l'activation de la cascade de coagulation et par conséquent, la génération de fibrine **17**. Massberg et son équipe ont montré que les neutrophiles activés sont aussi capables d'inactiver l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), permettant ainsi le maintien de la fonction activatrice de la coagulation du FT **20**.

Lors de la formation d'un thrombus, les neutrophiles adhèrent à l'endothélium activé grâce à la liaison de leur in-

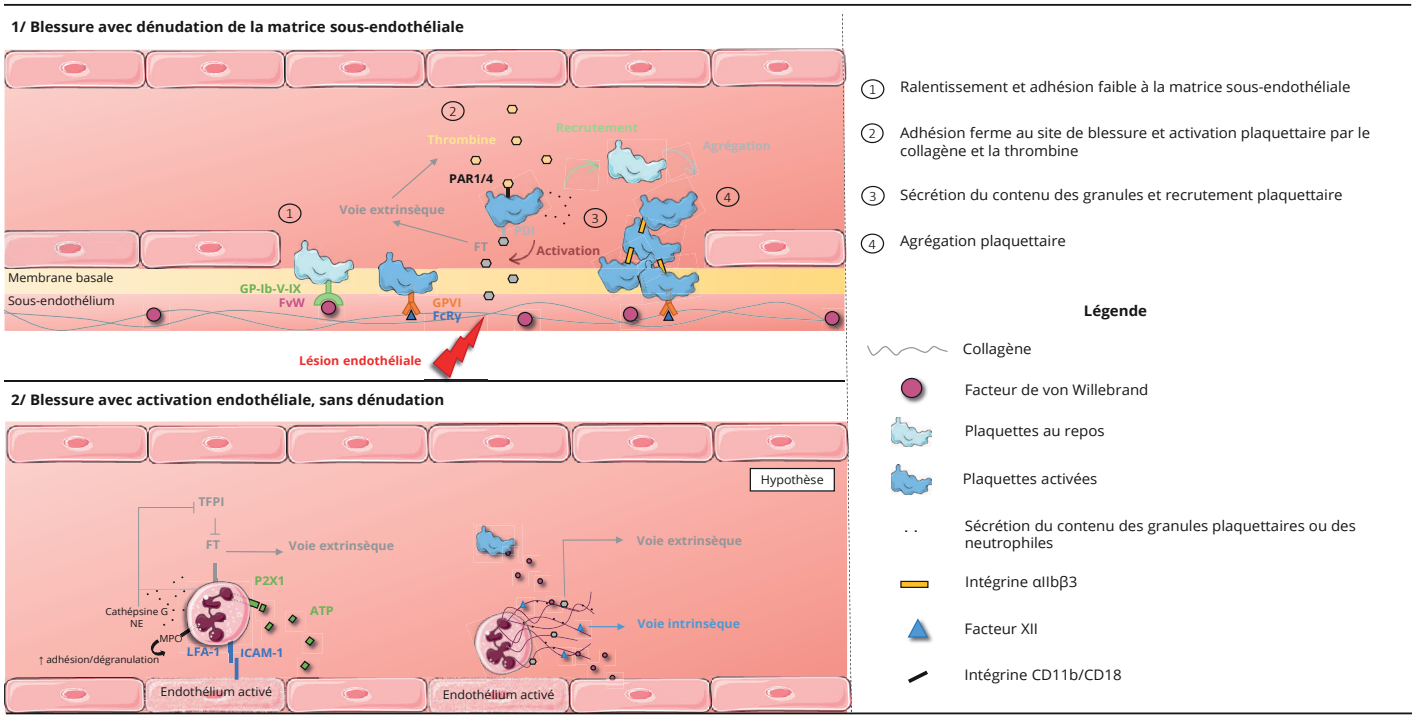


Figure réalisée avec Servier Medical Art disponible : http://smart.servier.com/

Figure 1 : Représentation schématique de l'implication des plaquettes et des neutrophiles dans la formation d'un thrombus.
Figure 1: Schematic representation of the involvement of platelets and neutrophils in thrombus formation.

tégrine CD11a/CD18 (aussi appelée LFA-1) à ICAM-1 **17,18**. Par la suite, l'ATP sécrété par l'endothélium activé interagit avec le récepteur P2X1 des neutrophiles pour les activer **21,22**. Les neutrophiles activés sécrètent alors le contenu de leurs granules avec la libération de molécules telles que la cathepsine G, la neutrophile élastase (NE) et la myéloperoxydase (MPO) **20**. La cathepsine G et la NE inhibent le TFPI et permettent ainsi le maintien de l'activation de la cascade de coagulation **20**. La MPO, en se liant à l'intégrine CD11b/CD18 des neutrophiles, stimule leur adhésion et leur dégranulation **20**.

Les neutrophiles pourraient également participer à la thrombose en produisant des NETs (*neutrophil extracellular traps*) lorsqu'ils sont activés. Les NETs sont des filaments d'ADN chromosomique décompactés sécrétés dans l'espace extracellulaire **20**. Il a été montré dans un modèle murin de thrombose veineuse que ces structures filamenteuses portent à leur surface des protéines telles que la NE, la cathepsine G et la MPO que l'on retrouve à l'origine dans les granules des neutrophiles **20**.

Le FT exprimé à la surface des neutrophiles est également retrouvé à la surface des NETs. Celui-ci est activé par ces filaments tout comme le facteur XII, et les NETs permettent ainsi l'initiation des deux voies de la cascade de coagulation **16**. Des expériences de thrombose veineuse profonde *in vivo* montrent que les NETs seraient également capables de piéger le FvW sécrété par des plaquettes activées ou par les cellules endothéliales **20**. Le FvW participe ensuite à l'activation de la cascade de coagulation en activant le facteur VIII pour stabiliser le thrombus *via* la formation de fibrine **23,24**.

Le rôle des NETs dans la thrombose est donc largement décrit, cependant il reste controversé. En effet, notre équipe a mis en évidence dans la thrombose artérielle induite par une blessure au laser qu'il n'y a pas de formation de NETs au site de blessure **25**. De plus, l'étude de l'implication des NETs dans la thrombose veineuse et artérielle provient essentiellement d'expériences réalisées sur des modèles murins infusés avec la DNAse-I **18,20**. Notre équipe a montré en 2021 que la DNAse-I hydrolyse l'ADP et l'ATP (deux agonistes des plaquettes et des neutrophiles) en adénosine, qui inhibe l'activation des plaquettes et des neutrophiles **25,26**. Les marqueurs utilisés pour identifier les NETs dans les différents modèles précliniques, notamment PAD-4 et l'histone-3 citrullinée, sont aussi présents à la surface des neutrophiles activés, montrant alors qu'ils ne sont pas spécifiques des NETs **25**.

Ainsi, les neutrophiles et les plaquettes sont étroitement liés dans le processus de formation d'un thrombus **17,18,20**. L'altération de leur production, de leur recrutement ou encore de leur état d'activation impacte l'équilibre pro- et anticoagulant et peut alors être à l'origine de phénomènes prothrombotiques dans différentes maladies **27**.

IMPLICATION DE L'INTERACTION ENTRE LES PLAQUETTES ET LES NEUTROPHILES DANS DIFFÉRENTES PATHOLOGIES

C'est le cas, dans la thrombose veineuse profonde (TVP), pathologie dans laquelle des thrombi se forment au niveau des veines profondes, notamment celles des membres inférieurs **11**. En effet, la TVP est caractérisée par une restriction du flux sanguin, ce qui crée des conditions d'hypoxie qui potentialisent la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'activation du complexe NADPH oxydase **23**. Les ROS permettent alors l'activation des neutrophiles et la production de NETs **23**. Par la suite, le maillage formé par les NETs est capable de piéger les globules rouges et les plaquettes activées dont le rôle dans la thrombose est central, comme nous l'avons vu précédemment **23**. Les neutrophiles et les plaquettes interagissent donc pour augmenter le recrutement et l'activation de davantage de plaquettes et de neutrophiles pour aboutir à la formation d'un thrombus (Figure 2).

Un autre exemple de maladie dont la dérégulation des interactions entre les plaquettes et les neutrophiles modifie le risque thrombotique est le cancer. En effet, les patients diagnostiqués cancéreux ont quatre fois plus de risque de développer une thrombose veineuse profonde ou superficielle que des patients sains **28,29**. Cette association cancer-thrombose est connue depuis 1865 sous le nom de syndrome de Trousseau **30,31**. L'augmentation du risque thrombotique chez ces patients induit une réduction de leur espérance de vie et cela peut s'expliquer, entre autres, par le fait que les cellules cancéreuses sont capables d'agir à la fois sur les plaquettes et sur les neutrophiles **27,29,31,32**.

Les cellules tumorales peuvent recruter les plaquettes et les neutrophiles et les activer *via* la sécrétion ou l'exposition membranaire d'agonistes tels que l'ADP, la thrombine, le FT, l'IL-8 ou encore le TGF-β **32-34**. Par la suite, les plaquettes et les neutrophiles activés se recrutent et s'activent mutuellement de façon massive **3**. Le TLR4 des plaquettes peut déclencher la NETose des neutrophiles, et les histones 3 et 4 libérées pendant ce processus peuvent à leur tour activer les plaquettes **3,35**. À cela s'ajoute le fait que la P-sélectine exprimée par les plaquettes activées peut également activer les neutrophiles *via* PSGL-1 et ainsi déclencher la formation de NETs **3,36**. L'ADN extracellulaire des NETs étant capable de piéger et d'activer les plaquettes, une boucle d'activation et d'amplification continue se crée entre ces deux partenaires (Figure 2) **3**.

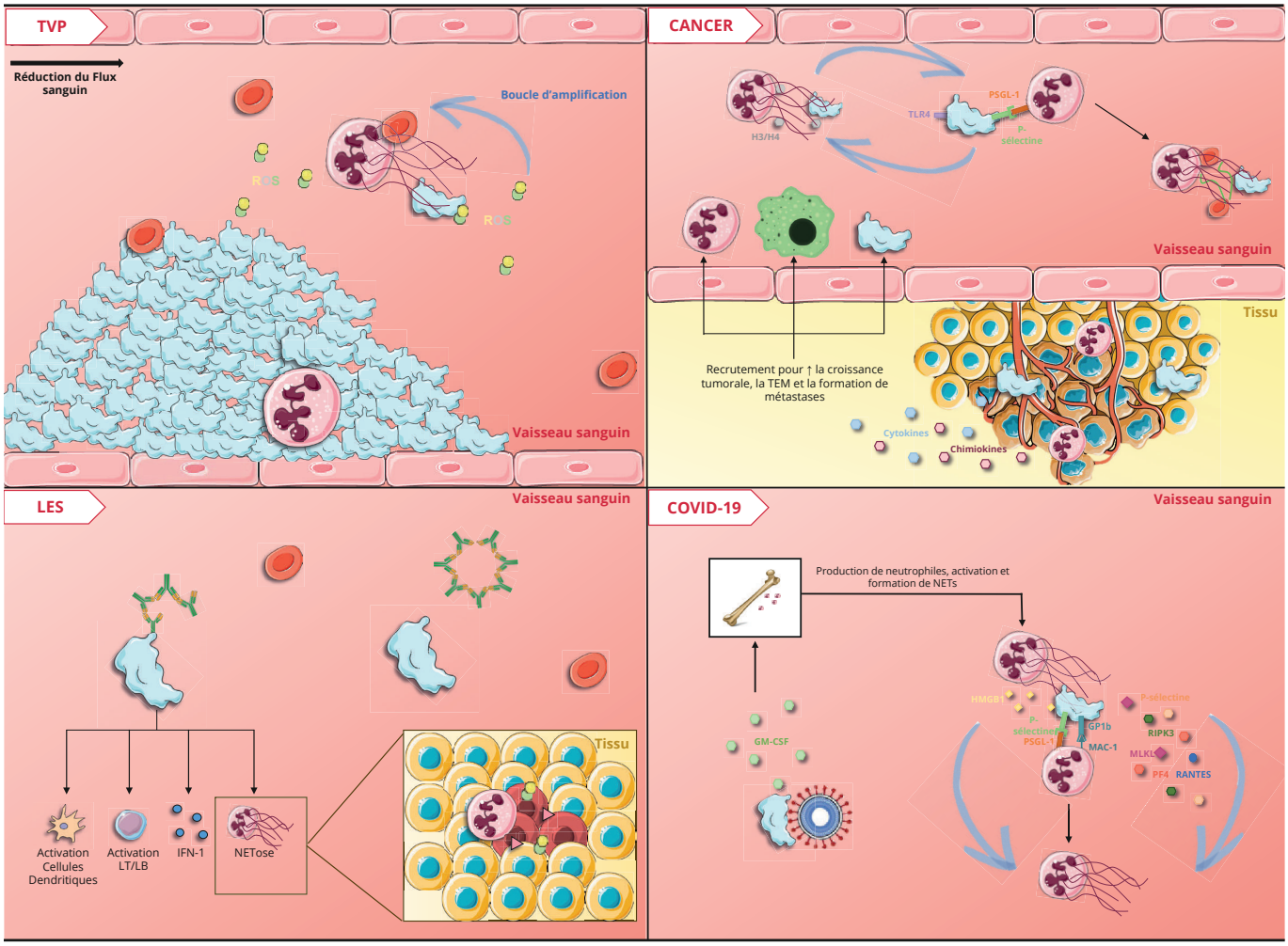


Figure réalisée avec Servier Medical Art disponible : http://smart.servier.com/

Figure 2 : Représentation schématique montrant l'implication de l'interaction entre les plaquettes et les neutrophiles dans l'initiation et la progression de différentes pathologies.

Figure 2: Schematic representation showing the involvement of the interaction between platelets and neutrophils in the initiation and progression of different pathologies.

De plus, la dégranulation massive des neutrophiles et des plaquettes dans le microenvironnement tumoral potentialise l'inflammation locale **3,32**. En effet, les cytokines et les chimio-attractants sécrétés par ces deux types cellulaires facilitent le recrutement d'encore plus de neutrophiles, de plaquettes et d'autres cellules comme les macrophages qui sont capables de soutenir la croissance tumorale, la transition épithélio-mésenchymateuse et la formation de métastases (Figure 2) **3,37-40**.

Le rôle des interactions entre les plaquettes et les neutrophiles a également été mis en évidence dans des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique (LES) **41-43**. Comme toute maladie auto-immune, il s'agit d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque aux constituants du soi de l'organisme **41**. Dans le cas du LES, les organes du tissu conjonctif sont la cible principale **41**.

Dans le LES, Boilard et coll. montrent que les plaquettes circulantes sont activées *via* l'interaction entre les complexes immunitaires circulants et les récepteurs Fc plaquettaires **42**. L'activation des plaquettes promeut la production d'interféron de type I, la NETose, l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T et B. Ces phénomènes sont connus pour contribuer à la progression du LES **42**. Par exemple, la NETose joue un rôle dans une complication majeure du LES, à savoir l'hémorragie alvéolaire diffuse **43**.

En effet, les NETs exposent des néoépitopes nucléaires (ADN double brin et protéines nucléaires) au système immunitaire, ce qui déclenche la production d'auto-anticorps (anti-ADN double brin et anti-histones acétylées/méthylées) et augmente l'autoréactivité immune contre les composants du soi **41,43**. De plus, les neutrophiles eux-mêmes sont impliqués dans la détérioration et la destruction des tissus hôtes *via* la production de ROS et de protéases granulaires (Figure 2) **41,44**. Ainsi, dans certaines maladies auto-immunes comme le LES, plaquettes et neutrophiles agissent en étroite relation pour faire progresser la pathologie. Leur interaction constitue donc un axe important afin d'améliorer la compréhension et le traitement de ces maladies.

Plaquettes et neutrophiles interagissent aussi ensemble dans le cadre d'infections, comme celle due au coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2). Les symptômes de la COVID-19 sont multiples et peuvent aller de l'infection asymptomatique à la maladie mortelle selon les individus **45**. Il est décrit que les lésions pulmonaires et la coagulopathie observées dans les cas sévères de COVID-19 pourraient être liées aux agrégats plaquettes-neutrophiles **46,47**.

En effet, les plaquettes exposées au virus sécrètent du GM-CSF, ce qui augmente le nombre de neutrophiles circulants **46**. Ces neutrophiles s'activent et forment des NETs qui activent à leur tour les plaquettes comme nous l'avons vu auparavant. Ainsi d'une part, les agrégats plaquettaires, formés à la suite de l'interaction plaquettes-NETs, se lient aux neutrophiles par l'intermédiaire de la GPIb, ce qui amplifie la NETose (Figure 2) **46,47**.

D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence une colocalisation des plaquettes et des NETs qui s'accompagne d'une augmentation des niveaux de facteurs solubles dérivés des plaquettes (PF4, RANTES, etc.) ainsi que de la P-sélectine **46,47**. Ces molécules sont capables d'induire respectivement la formation de NETs et d'agrégats plaquettes-neutrophiles **46,47**. Par conséquent, une boucle de rétroaction positive se met en place entre ces deux partenaires **46**. Celle-ci est également alimentée par le fait que l'interaction des plaquettes activées avec les neutrophiles peut augmenter l'expression de la protéine kinase-3 interagissant avec le récepteur (RIPK3) et de la pseudo-kinase MLKL impliquées dans le processus de NETose **46**. De plus, lorsque les plaquettes interagissent avec les neutrophiles *via* la P-sélectine, cela induit la sécrétion l'HMGB1 qui, à son tour, déclenche la formation de NETs **46,47**. Cette protéine est sur-exprimée dans la COVID-19 et joue un rôle clé dans la thrombose, le stress cellulaire et les réponses immunitaires **46,47**. Ainsi, en tant que DAMP (*damage-associated molecular patterns*), l'HMGB1 exerce de puissants effets inflammatoires sur les neutrophiles, *via* le TRL2 et le TLR4, ce qui peut provoquer une thrombose intravasculaire en raison des propriétés thrombogènes des NETs (Figure 2) **46,47**.

CONCLUSION

Les plaquettes et les neutrophiles sont des partenaires cellulaires intimement liés dans les mécanismes de formation du thrombus. Leurs interactions favorisent la formation de thrombi et contribuent à l'altération de l'état physiologique. L'étude de ces mécanismes est alors d'une importance cruciale pour développer une compréhension plus complète des conditions de développement de certaines pathologies. Nous citons l'exemple de deux pathologies avec des mécanismes physio-pathologiques fondamentalement différents où les interactions plaquettes-neutrophiles semblent être au cœur de leur progression. Une meilleure caractérisation de ces phénomènes permettra à la communauté scientifique et médicale de développer de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de pathologies liées à la dérégulation de la coagulation. ■

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Abréviations : ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; COVID-19 : coronavirus 19 ; EVs : vésicules extracellulaires ; FT : facteur tissulaire ; FvW : facteur de von Willebrand ; G-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes ; GP : glycoprotéine ; HMGB1 : *High Mobility Group Box 1* ; ICAM1 : molécule d'adhésion intercellulaire-1 ; IL : interleukine ; LES : lupus érythémateux systémique ; LFA-1 : antigène-1 associé à la fonction lymphocytaire ; MLKL : *Mixed lineage kinase domain-like* ; MPO : myéloperoxydase ; NADPH : phosphate de nicotinamide adénine dinucléotide ; NE : neutrophile élastase ; NETs : pièges extracellulaires des neutrophiles (*Neutrophils Extracellular Traps*) ; PAD4 : protéine arginine déiminasse 4 ; PAR1/PAR4 : récepteur activé par protéase 1/4 ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; PDI : protéine disulfure isomérase ; PF4 : facteur plaquettaire 4 ; PSGL-1 : ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; SARS-CoV-2 : coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère ; TCIPA : agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales (*Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation*) ; TFPI : inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; TGF-β : facteur de croissance transformant β ; TLR4 : récepteur de type Toll 4 ; TXA2 : thromboxane A2 ; TVP : thrombose veineuse profonde ; VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire.

RÉFÉRENCES

1. Wendelboe AM, Raskob GE. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. *Circ Res* 2016 ; 118 : 1340-7.
2. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, *et al*. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007 ; 98 : 756-64.
3. Palacios-Acedo AL, Mège D, Crescence L, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Front Immunol* 2019 ; 10 : 1805.
4. Pagel O, Walter E, Jurk K, Zahedi RP. Taking the stock of granule cargo: Platelet releasate proteomics. *Platelets* 2017 ; 28 : 119-28.
5. Darbousset R, Mezouar S, Dignat-George F, Panicot-Dubois L, Dubois C. Involvement of neutrophils in thrombus formation in living mice. *Pathol Biol* 2014 ; 62 : 1-9.
6. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 938-49.
7. Bekendam RH, Iyu D, Passam F, Stopa JD, De Ceunynck K, Muse O, *et al*. Protein disulfide isomerase regulation by nitric oxide maintains vascular quiescence and controls thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 2322-35.
8. Gibbins JM. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 2004 ; 117 : 3415-25.
9. Leader A, Mor-Cohen R, Ram R, Sheptovitsky V, Seligsohn U, Rosenberg N, *et al*. The role of protein disulfide isomerase in the post-ligation phase of β3 integrin-dependent cell adhesion. *Thromb Res* 2015 ; 136 : 1259-65.
10. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 3355-62.
11. Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 953-60.
12. Dale GL. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost* 2005 ; 3 : 2185-92.
13. Gremmel T, Frelinger AL 3, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016 ; 42 : 191-204.
14. Preissner KT. Biochemie und Physiologie der Blutgerinnung und Fibrinolyse [Biochemistry and physiology of blood coagulation and fibrinolysis]. *Hamostaseologie* 2004 ; 24 : 84-93.
15. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev* 2017 ; 36 : 195-8.
16. Carminita E, Crescence L, Panicot-Dubois L, Dubois C. Role of Neutrophils and NETs in Animal Models of Thrombosis. *Int J Mol Sci* 2022 ; 23 : 1411.
17. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, *et al*. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012 ; 120 : 2133-43.
18. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, *et al*. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012 ; 209 : 819-35.
19. Kimball AS, Obi AT, Diaz JA, Henke PK. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front Immunol* 2016 ; 7 : 236.
20. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, *et al*. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* 2010 ; 16 : 887-96.
21. Schwiebert LM, Rice WC, Kudlow BA, Taylor AL, Schwiebert EM. Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 ; 282 : C289-301.
22. Darbousset R, Delierneux C, Mezouar S, Hego A, Lecut C, Guillaumat I, *et al*. P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* 2014 ; 124 : 2575-85.
23. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, *et al*. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2012 ; 10 : 136-44.
24. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990 ; 6 : 217-46.
25. Carminita E, Crescence L, Brouilly N, Altié A, Panicot-Dubois L, Dubois C. DNAse-dependent, NET-independent pathway of thrombus formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021 ; 118 : e2100561118.
26. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, *et al*. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 8674-9.
27. Palacios-Acedo AL, Langiu M, Crescence L, Mège D, Dubois C, Panicot-Dubois L. Platelet and Cancer-Cell Interactions Modulate Cancer-Associated Thrombosis Risk in Different Cancer Types. *Cancers* 2022 ; 14 : 730.
28. Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindiër MJ, Osanto S, van der Meer FJ, Rosendaal FR. Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 529-35.
29. Chew HK, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch Intern Med* 2006 ; 166 : 458-64.
30. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. In: Cormack JR, editor. Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris (Lectures on Clinical Medicine at the Hotel-Dieu, Paris) Volume 5. New Sydenham Society; London, UK: 1872. pp. 281-332.
31. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007 ; 110 : 1723-9.
32. Langiu M, Palacios-Acedo AL, Crescence L, Mege D, Dubois C, Panicot-Dubois L. Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research. *Int J Mol Sci* 2022 ; 23 : 1257.
33. Palacios-Acedo AL, Mezouar S, Mège D, Crescence L, Dubois C, Panicot-Dubois L. P2RY12-Inhibitors Reduce Cancer-Associated Thrombosis and Tumor Growth in Pancreatic Cancers. *Front Oncol* 2021 ; 11 : 704945.
34. Syed V. TGF-β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem* 2016 ; 117 : 1279-87.
35. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, *et al*. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* 2013 ; 123 : 3446-58.
36. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* 2015 ; 126 : 242-6.
37. Plantureux L, Mège D, Crescence L, Carminita E, Robert S, Cointe S, *et al*. The Interaction of Platelets with Colorectal Cancer Cells Inhibits Tumor Growth but Promotes Metastasis. *Cancer Res* 2020 ; 80 : 291-303.
38. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, *et al*. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 2015 ; 28 : 666-76.

39. Lee W, Ko SY, Mohamed MS, Kenny HA, Lengyel E, Naora H. Neutrophils facilitate ovarian cancer premetastatic niche formation in the omentum. *J Exp Med* 2019 ; 216 : 176-94.
40. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol* 2019 ; 12 : 76.
41. Fresneda Alarcon M, McLaren Z, Wright HL. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. *Front Immunol* 2021 ; 12 : 649693.
42. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2012 ; 8 : 534-42.
43. Jarrot PA, Tellier E, Plantureux L, Crescence L, Robert S, Chareyre C, *et al*. Neutrophil extracellular traps are associated with the pathogenesis of diffuse alveolar hemorrhage in murine lupus. *J Autoimmun* 2019 ; 100 : 120-30.
44. Frangou E, Chrysanthopoulou A, Mitsios A, Kambas K, Arelaki S, Angelidou I, *et al*. REDD1/autophagy pathway promotes thrombo-inflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A). *Ann Rheum Dis* 2019 ; 78 : 238-48.
45. Chen PZ, Bobrovitz N, Premji ZA, Koopmans M, Fisman DN, Gu FX. SARS-CoV-2 shedding dynamics across the respiratory tract, sex, and disease severity for adult and pediatric COVID-19. *Elife* 2021 ; 10 : e70458.
46. Ghasemzadeh M, Ahmadi J, Hosseini E. Platelet-leukocyte crosstalk in COVID-19: How might the reciprocal links between thrombotic events and inflammatory state affect treatment strategies and disease prognosis? *Thromb Res* 2022 ; 213 : 179-94.
47. Caillon A, Trimaille A, Favre J, Jesel L, Morel O, Kauffenstein G. Role of neutrophils, platelets, and extracellular vesicles and their interactions in COVID-19-associated thrombopathy. *J Thromb Haemost* 2022 ; 20 : 17-31.
48. Vats R, Brzoska T, Bennewitz MF, Jimenez MA, Pradhan-Sundd T, Tutuncuoglu E, *et al*. Platelet Extracellular Vesicles Drive Inflammasome-IL-1β-Dependent Lung Injury in Sickle Cell Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2020 ; 201 : 33-46.

c) Introduction au concept de cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes

Les plaquettes éduquées par les cellules cancéreuses facilitent donc le potentiel invasif des cellules cancéreuses par différents moyens. Cependant, depuis une dizaine d'années, plusieurs études tendent à démontrer que l'interaction entre ces deux partenaires est réciproque. Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent également être éduquées par les plaquettes. En effet, Rodriguez-Martinez *et al.*, ont montré que les plaquettes éduquent les cellules cancéreuses par un transfert très efficace de lipides, de protéines et d'ARN *via* différents mécanismes[210]. Cela suggère ainsi que les cellules cancéreuses pourraient acquérir des phénotypes plus agressifs suite à leur interaction avec les plaquettes[210]. Par exemple, Placke *et al.*, ont mis en évidence que l'interaction entre les plaquettes et les cellules cancéreuses circulantes entraîne le transfert du CMH-I des plaquettes vers les cellules cancéreuses, ce qui altère la réactivité anti-tumorale médié par les cellules NK et participe à l'échappement immunitaire des cellules cancéreuses[211].

2. Dans le microenvironnement tumoral (MET)

Bien que de nombreuses études se soient penchées sur l'interaction entre les cellules cancéreuses et les plaquettes dans la circulation sanguine, peu d'entre elles ont exploré ce phénomène dans le MET.

C'est seulement en 2012 qu'il a été rapporté pour la première fois que des plaquettes extravasées étaient présentes dans le MET dans le cancer de l'ovaire, puis dans le cancer du sein et le mélanome[212,213]. Notre équipe a récemment montré que 20 % des plaquettes totales présentes dans le MET se trouvent à la périphérie et non au centre de la tumeur[214]. Leur présence n'est pas fortuite et est généralement corrélée à des stades avancés de la maladie[214]. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer comment les plaquettes peuvent atteindre l'espace extravasculaire et interagir directement avec les cellules cancéreuses : (I) à la suite d'un saignement intratumoral, (II) par transmigration directe ou indirecte par association avec des leucocytes, ou (III) en raison d'une hématopoïèse extramédullaire[215–220]. Jusqu'à présent, il n'a pas été démontré comment les plaquettes accèdent au site de la tumeur primaire.

Cependant, plusieurs études ont examiné leur rôle au sein de la tumeur primaire et ont mis en évidence leur capacité à provoquer des changements phénotypiques dans les cellules cancéreuses. Cela peut être bénéfique ou non pour le développement du cancer. En effet, les résultats obtenus jusqu'à présent sont controversés. D'une part, il est associé à la progression de la maladie, aux marqueurs de la TEM, à la chimiorésistance, à l'invasion immunitaire et à l'angiogenèse tumorale[213,221–227]. D'autre part, nous avons récemment montré que dans le cancer colorectal, les plaquettes et les cellules cancéreuses sont capables d'interagir entre elles grâce à la K-cadhérine dans le MET. Au cours de cette interaction, il y a une activation plaquettaire avec, d'une part, un transfert de matériel des plaquettes vers la cellule cancéreuse et d'autre part, une production de MP avec des protéines provenant des deux types cellulaires[214]. De plus, cette interaction induit la libération et la vectorisation de différentes cytokines pro-inflammatoires capables

d’attirer les macrophages et d’activer leur fonction anti-tumorale, ce qui conduit à une diminution de la croissance tumorale *in vivo*[214].

Ces données démontrent ainsi que le concept de cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes est également applicable au sein même de la tumeur primaire.

O B J E C T I F

de

I ' E T U D E

Comme nous l'avons vu précédemment, l'interaction entre les cellules cancéreuses et les plaquettes dans la circulation sanguine augmente le risque de CAT et amplifie leur potentiel invasif. Ce processus, nommé « plaquettes éduquées par les cellules cancéreuses », a été longuement étudié. Cependant, l'émergence récente du concept opposé, celui de « cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes », met en lumière l'influence réciproque entre ces deux acteurs cellulaires. Les plaquettes, en transférant des composants tels que des lipides, des protéines ou des ARNs, semblent également influencer le comportement des cellules cancéreuses, que ce soit dans la circulation sanguine ou dans le microenvironnement tumoral[210,214]. Néanmoins, les gènes et les protéines impliqués dans l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes ne sont que très peu caractérisés.

La récente mise en évidence de la présence des plaquettes dans le microenvironnement suscite un débat très controversé quant à leur rôle. Par conséquent, l'objectif de cette étude est de mieux comprendre le rôle de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes pour pouvoir éventuellement l'étendre au microenvironnement tumoral. Nous nous sommes focalisés sur les cancers digestifs, notamment colorectal et pancréatique, associés à un risque accru de thrombose, et nous avons étudié spécifiquement l'effet de cette interaction sur l'expression de protéines liés à des processus critiques dans le cancer tels que la glycosylation, l'inflammation et le processus métastatique.

RESULTATS

A. Introduction aux résultats

Les résultats de cette étude ont donné lieu à la rédaction d'un article intitulé "Consequences of platelet-educated cancer cells on the expression of inflammatory and metastatic glycoproteins" (**Mélanie Langiu**, Lydie Crescence, Diane Mège, Christophe Dubois et Laurence Panicot-Dubois). Celui-ci a été soumis dans le journal « Plos Biology ».

Dans cet article, nous étudions l'effet de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes sur l'expression de protéines impliquées dans la glycosylation, l'inflammation et le processus métastatique.

Brièvement, nos résultats démontrent qu'au sein de notre modèle *in vitro* d'interaction entre les cellules cancéreuses et les plaquettes, il n'y a pas de transfert moléculaire direct de GT des plaquettes vers les cellules cancéreuses. En revanche, cette interaction provoque des changements dans le transcriptome même des cellules cancéreuses. En effet, nous avons observé des variations marquées dans l'expression de plusieurs familles de GT telles que MGAT2, MGAT3 et B3GNT. De la même manière, plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation et/ou la formation de métastases étaient sur-exprimés dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes. Parmi les gènes les plus surexprimés, nous avons identifié ceux codant pour des protéines favorisant la formation de métastases telles que SERPINE1, MMP, TIMP et la FN1. La fibronectine (FN1) a été utilisée comme exemple pour illustrer les conséquences potentielles de sa surexpression sur le comportement des cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes. Outre ces gènes associés au processus métastastique, nous avons observé la surexpression de gènes reconnus comme des suppresseurs de tumeurs, notamment CTBP1, APC et TP53. Enfin, notre étude a également révélé la surexpression de gènes tels que IL2RG, GNRH1 et CACNA1D dont l'implication dans le cancer n'est que très peu documentée.

***Soumis dans Plos Biology*, 2024**

Consequences of platelet-educated cancer cells on the expression of inflammatory and metastatic glycoproteins

Mélanie Langiu[1], Lydie Crescence[1,2], Diane Mège[1,3], Christophe Dubois[1,2,*] and Laurence Panicot-Dubois[1,2]

[1] Aix Marseille University, INSERM 1263 (Institut National de la Santé et de la Recherche), INRAE 1260 (Institut National de la Recherche Agronomique et de l'Environnement), C2VN (Center for CardioVascular and Nutrition Research), 13885 Marseille, France; melanie.langiu@univ-amu.fr (M.L.); lydie.crescence@univ-amu.fr (L.C.); diane.mege@univ-amu.fr (D.M.); laurence.panicot-dubois@univ-amu.fr (L.P.-D.)

[2] Marseille University, PIVMI (Plateforme d'Imagerie Vasculaire et de Microscopie Intravitale), C2VN (Center for CardioVascular and Nutrition Research), 13385 Marseille, France

[3] Department of Digestive Surgery, La Timone University Hospital, 13005 Marseille, France

Correspondence: christophe.dubois@univ-amu.fr

Abstract

Cancer-associated thrombosis, a major cause of mortality in cancer patients, exhibits a 4 to 7 times higher incidence compared to the general population. Platelet activation by tumor cells contributes to this pro-thrombotic state. Cancer cell-educated platelets have also been described to be implicated in promoting metastasis. Intriguingly, our team, among others, unveils a reverse process, wherein platelets educate cancer cells by transferring lipids, RNAs, and proteins. Here, focusing on colorectal and pancreatic cancers, our study investigates genes and proteins mediating platelet education of cancer cells. We demonstrated, for the first time, that platelets can educate cancer cells by inducing changes in the transcription of genes related to glycosylation, inflammation, and metastasis in cancer cells themselves. These results indicate a direct impact of platelets on cancer cell phenotype. This novel insight suggests potential therapeutic avenues for cancer treatment, disrupting platelet-mediated alterations and influencing the course of cancer progression.

Introduction

Over a century ago, Armand Trousseau demonstrated a strong link between cancer and thrombosis[1]. Trousseau's Syndrome describes that cancer patients are three times more likely to develop deep vein thrombosis than those without cancer[2]. Consequently, cancer-associated thrombosis (CAT) is the second leading cause of death after the progression of the disease itself[3]. This hypercoagulable state in cancer patients is mainly due to the ability of cancer cells to activate the blood coagulation cascade and platelets by various mechanisms[4]. This lead, not only to the formation of CAT, but may also directly affect the tumor behavior and the formation of metastasis. Different studies have suggested that the use of anti-platelet drugs such as aspirin can prevent cancer from developing and spreading to distant sites[5] We previously demonstrated, in a mouse model of pancreatic cancer, that Clopidogrel, an antagonist of platelet P2Y12 ADP receptors, limits cancer-associated thrombosis, tumor progression, and metastasis[6]. The activation of platelets and their interaction with cancer cells led to the concept of cancer cells-educated platelets. Several studies have shown that cancer cells-educated platelets facilitate the transport of cancer cells in the bloodstream, their extravasation into tissues, the colonization of distant sites and the growth of metastases[7]. In the tumor microenvironment, the role of extravasated intratumoral platelets is more controversial. On one hand, it is associated with the progression of disease, EMT markers, chemoresistance, immune invasion, and tumor angiogenesis[8–10]. On the other hand, we recently shown that the cadherin-6-dependent interaction between cancer cells and platelets inhibits tumor growth[11]. Interestingly, these studies highlighted that platelets can also educate cancer cells. Platelets can influence cancer cell behaviors in a variety of ways, including by transferring material to them such as lipids, proteins or RNA[11,12]. However, to date, the genes, RNA and proteins involved in this education of cancer cells by platelets are not characterized.

Since digestive cancers (including colorectal and pancreatic) are associated with a thrombotic risk, we focused our study on the role of platelet-educated cancer cells in these types of cancers[4]. Specifically, we sought to further characterize what platelets can transfer to cancer cells in order to change their behavior.

Deregulation of protein glycosylation has recently become a hallmark of cancer, which explains why most proteins involved in metastasis are aberrantly glycosylated[13]. Platelets have been described to be able to release functional glycosyltransferases (GT) as well as associated sugar donors, which allow them to glycosylate extracellular acceptor molecules[14]. Therefore, we focused our studies on the consequences of cancer cell education on proteins involved in glycosylation, inflammation and metastasis. We identified that the interaction of cancer cells with platelets induced a change in the transcription of GT-encoding genes in the cancer cells themselves. We also found that 124 genes encoding for proteins associated with inflammation and metastasis were overexpressed in platelet-educated cancer cells, including fibronectin (FN1), a key glycoprotein involved in the adhesion processes. Taken together, our results demonstrate that platelets influence the composition of cancer cells, which may lead to changes in their behavior within the tumor microenvironment as well as the formation of metastasis.

Materials and methods

Cell Culture

The mouse pancreatic cancer cell line PANCO2 was generously provided by Dr Ruben Hernandez-Alcoceba (University of Navarra, Pamplona, Spain) to Dr Laurence Panicot-Dubois. Pancreatic cancer cell lines (mouse and human) PANCO2, BxPC-3 (CRL-1687, ATCC), MIA PaCa-2 (CRM-CRL-1420, ATCC), Capan2 (HTB-80, ATCC) and PANC-1 (CRL-1469, ATCC) and the human colorectal cancer cell line HT29 (HTB-38, ATCC) were grown in RPMI-1640 (31870025, Thermofisher Scientific), DMEM (11965092, Thermofisher Scientific), or McCoy's medium (16600082, Thermofisher Scientific) supplemented with 10% of heat-inactived fetal calf serum, 100 U/ml penicillin (Thermofisher Scientific), 100 µg/ml streptomycin (Thermofisher Scientific), and 2 mM glutamine (Thermofisher Scientific). The human breast cancer cell line MCF-7 (HTB-22, ATTC) was used as a positive control to detect the expression of GALNT3. All the cells used were tested negative for mycoplasma and grown mycoplasma-free at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO2.

Cell Transfection

PANCO2 low fibronectin (PANCO2 low FN1) or PANCO2 mock cells were obtained after transfection with pcDNA TM6.2-GW/EmGFP-miR plasmid containing FN1 or non-targeting control siRNA, respectively, using Lipofectamine 2000. Cells carrying the plasmid were then selected for resistance to blasticidin (10 µg/mL in complete medium).

Preparation of Human Washed Platelets

Blood was obtained from the French Blood Institute "Etablissement Français du Sang (EFS)" (agreement 7580). Healthy volunteers signed an informed consent form prior to blood collection. Blood was collected in 5 mL

citrated tubes. All blood samples were centrifuged at 200g for 13 minutes at 37°C to obtain plasma rich platelets (PRP). PRP was then centrifuged at 900g for 13 minutes at 37°C to obtain platelet pellets. Pellets were gently resuspended in CGS buffer (120 mM NaCl, 13 mM trisodium citrate, 30 mM dextrose, pH 7.4) supplemented with 0.02 U/mL apyrase (A6535, Sigma Aldrich) and 0.5 µM PGI2 (538925, Calbiochem). The platelets were washed twice in CGS buffer. Finally, platelets were resuspended in CGS buffer without apyrase and prostacyclin. Platelet concentration was obtained by flow cytometry using an antibody against human CD41 labelled with PC7 (6607115, Beckman Coulter) and MP-count beads (6607115, Biocytex).

Preparation of Murine Washed Platelets

Wild Type CR57Bl/6J mice (5 to 9 weeks old) were obtained from Janvier-Lab (Le Genest-Saint-Isle, France). Mice were housed as recommended by the European Community Guidelines (directive 2010/63/UE). The experimental procedure was approved by the Marseille Ethical Committee #14 (protocol number: APAFIS#20334-2019041811535225). Blood was collected on citrated buffer (1/9e) from anesthetized mice (100 mg/kg of ketamine, 12.5 mg/kg of xylazine and 0.25 mg/kg of atropine). Blood samples were centrifuged at 120g for 10 minutes at 30°C to obtain platelets rich plasma (PRP). PRP was then centrifuged at 400g for 10 minutes at 30°C to obtain platelet pellets. Pellets were gently resuspended in Tyrode buffer (133 mM NaCl, 2.7 M KCl, 11.9 mM NaHCO3, 0.36 mM NaH2PO4, 5 mM glucose, 10 mM Hepes, pH 7.4) supplemented with apyrase (20 U/mL) and PGI2 (1 mM). Then, platelets were washed twice in Tyrode buffer and resuspended in Tyrode buffer with calcium (2 mM) and magnesium (1 mM) and without apyrase and prostacyclin. The washed platelets were kept at 37°C for 30 minutes before use. Platelets were counted by flow cytometry using an antibody directed against GPIb coupled with the dylight 649 (X-649, Emfret) and MP-count beads (6607115, Biocytex).

Interactions between cancer cells and platelets

Washed human or mouse platelets were added to the cancer cells at a ratio of 50:1 (platelets to cancer cells[11]) in a respective prewarmed FCS-free medium and this interaction was allowed to persist for 3 hours. As a negative control, cancer cells were incubated in FCS-free non-complete medium. Interaction was stopped by extensive washing and the suitable pre-warmed complete medium was added to the cancer cells. Interaction supernatants were then collected after 3, 21 or 45 additional hours, finally samples were snap frozen and stored at -80°C. During the same time periods, cancer cells behavior after their interaction with platelets were recorded and /or retrieved to analyze proteins composition, glycosyltransferases activities or mRNA contents.

Holotomography Microscopy

Nanolive CX-A microscope was used to analyze the live response of PANC1 or PANCO2 cells during or after their interaction with platelets. For both experiments, 7.10^4 cancer cells were seeded in 35 mm dishes. Cells were recorded for at least 24 hours at 6 or 12 -minute intervals with or without platelets. All experiments were performed in triplicate. Results were analyzed using EVE Analytics and STEVE software (Nanolive).

Western Blot Analysis

Cell lysates were obtained with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton x-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) supplemented by a cocktail of protease (04693116001, Roche) and phosphatase inhibitors (88667, Thermofisher Scientific). The cell-RIPA mixture was collected and incubated at 4°C for 20 minutes. Protein lysate was obtained after centrifugation at 10,000 rpm for 30 minutes at 4°C and stored at -20°C until used. Protein concentrations were quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (23225, Thermofisher Scientific). Equal amounts of protein per sample were separated on 4 to 20% Tris-glycine gradient gels (XP04200BOX, Thermofisher Scientific) and transferred to nitrocellulose membranes. Each membrane was incubated in blocking buffer (Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 150 mM, 1% PVP K40, MnCl2 1 mM) for 1 hour and then with the primary antibody for 2 hours at room temperature. The primary antibodies used were directed against a human polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GALNT3), a human fibronectin (FN1) and a mouse FN1. As control for protein loading, the membranes were developed with anti-GAPDH antibody.

Some Lectins coupled to biotin were used to detect glycosylated structure such as *Vicia villosa* lectin (VVL/VVA), *Aleuria aurantia* lectin (AAL), Concanavalin A (ConA) and *Phaseolus vulgaris* lectin (PHA-E). Reactivity was determined by fluorescence using Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies or Alexa Fluor-conjugated streptavidin. Images were acquired and quantified using the iBright FL1500 and iBright Analysis software.

Immunofluorescence

Briefly, 2.10^5 PANCO2 cells were seeded in 24-well plates. 24 hours after seeding, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes, treated with 0.5% Triton X-100 for 20 minutes at room temperature, followed by blocking with PVPK40 1% for 20 minutes at room temperature. Cells were then immunostained with 2 µg/mL of an antibody directed against GALNT3 or with the corresponding irrelevant antibody for 2 hours at room temperature. After washing and 45 minutes of incubation with an appropriate secondary antibody, the DNA was stained with Hoechst 33342 for 10 minutes at room temperature. 10 random, non-overlapping pictures of each well were captured using a Leica DMi8 fluorescence microscope (40X objective).

Flow cytometry

Analysis of GALNT3 or fibronectin expression on human or mouse pancreatic cancer cells was performed using a flow cytometer (Gallios, Beckman Coulter) with appropriate antibodies. A least 10,000 cells were analyzed for each condition.

Glycosyltransferase activity test

BxPC-3 and Capan2 cell lysates were assayed for GALNT activity using the Glycosyltransferase Activity Kit according to the manufacturer's instructions (EA001, Bio-techne). GT activity is measured indirectly by colorimetry, as it results in the release of an inorganic phosphate, using a Thermo Scientific™ Multiskan™ FC microplate photometer with absorbance at 620 nm.

mRNA Extraction

After 3 hours of incubation/interaction of cancer cells with or without platelets RNA extraction was performed as described by the manufacturer (15596026, Thermofisher Scientific). To verify the purity of the extracted mRNA, we quantified the A260/A280 and A260/A230 ratios using the NanoVue Plus spectrophotometer (Biochrom). Finally, the mRNA was stored at -80°C until use.

Reverse Transcription, Real Time PCR (RT-qPCR)

The pre-incubation of reverse-transcription was performed with 2 µg of mRNA in presence of Oligod (T) 20 primer 50 µM and dNTP 10 mM at 65°C for 5 minutes. Then, Superscript IV Reverse Transcriptase 200 U/uL, DTT 100 mM, RNase out (RNase inhibitor) and SuperScript IV Buffer were added to the mRNA and incubated at 52°C for 10 minutes and at 80°C for another 10 minutes. The resulting cDNA was analyzed using the NanoVue Plus spectrophotometer. qPCR was performed on cDNA samples to compare gene expression between cancer cells alone and cancer cells after interaction with platelets. The qPCR was performed using a Step One Plus qPCR machine. Samples were tested on preconfigured 96-well qPCR plates (Human glycosylation – 4413255, Human Inflammation - 4418851 or Human tumor metastasis – 4418743, Thermofisher Scientific), with 100 ng added to each well. The microplate was then subjected to the following qPCR program: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and then 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The results were analyzed using Step One software.

Scratch Wound Healing Assay

PANCO2 cells were plated at 2.10^5 cells into a 24-well plate and incubated at 37°C 5% CO2 until a confluent monolayer was formed (24 hours). After 3 hours of interaction or not with platelets, a 100 µL pipette tip was used to make a wound in the center of the cell monolayer. Cells were then gently washed three times with $PBS^{-/-}$ to remove detached cells. Cells were replenished with complete medium and pictures were captured using an Evos M5000 microscope at T=0h and T=24h (10X objective). Pictures were analyzed using FIJI ImageJ software.

Cell Migration Test (Boyden Chamber)

8.10^4 PANCO2 or PANCO2 low FN1 cells were placed in 200 µL of RPMI FCS-free medium on an 8 µm pore diameter Boyden chamber insert in a 24-well plate. The lower chamber was filled with 600 µL of either RPMI medium with or without FCS (negative control). After 16 hours of incubation at 37°C 5% CO2, cells in the upper membrane were removed and those attached to the lower membrane were fixed with 2% paraformaldehyde and stained with Hoechst 33342 for 10 minutes at room temperature. The number of migrating cells was assessed by taking 10 random, non-overlapping images of each well using an Evos M5000 microscope (20X objective).

Multiplex ELISA workflow

After interaction with platelets or not, PANCO2 cell lysates were prepared and supernatants were collected as previously described. Protein concentrations were then quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (23225,

Thermofisher Scientific). Samples were loaded onto Codeplex chips precoated with 16 cytokine capture antibodies. These cytokines are part of the "murine innate immune" or "murine inflammation" panel. The chips were therefore placed in the IsoSpark-DUO machine along with all the necessary reagents according to the manufacturer's instructions (PhenomeX). After 8 hours of running for 4 chips simultaneously, the fluorescence signals were analyzed by IsoSpeak software.

Statistics

Significance was determined by T-test or ANOVA if the data followed a normal distribution and according to whether 2 or more conditions were to be compared together. If the data did not follow a normal distribution, the Mann-Whitney test was used. Bar graphs are shown as MEAN + SEM.

Results

Education by platelets affects the expression of glycosyltransferases in cancer cells.

In a previous study, we have demonstrated that platelets were able to transfer their material to cancer cells, highlighting the notion of platelet-educated cancer cell[11]. To determine the cellular consequences of this education on cancer cell behavior, we studied platelet-cancer cell interaction in real-time in “untouched conditions” by holotomographic microscopy coupled with Artificial Intelligence (AI) analysis (**Figure 1A and supplemental figure S1**). To note, the IA program was set-up to exclude isolated platelets from the analysis (**Supplemental figures S2/S3**). Following 48 hours of interaction with platelets, the phenotype of cancer cells was affected and become more proliferative (**Figure 1B**). Interestingly, the presence of platelets significantly increased the total dry mass of proliferative cancer cells (**Figure 1C**), as well as the dry mass in each newly formed cell (**Figure 1D**). These results suggest that a compositional change occur in cancer cells overtime, either by direct transfer of material from platelets to cancer cells or by indirect stimulation of intrinsic signaling pathways leading to an increase of intracellular compounds.

To determine if this change in dry mass was due to a transfer of material, ie of proteins, from platelets to cancer cells, we next focused on the possible transfer of glycosyltransferases (GT) between platelets and cancer cells. Platelets were indeed previously described to express and to secrete GT. We focused our analysis on the GALNT family, which catalyzes the first O-glycosylation reaction and includes 20 different members. We first determined the GALNT activity in platelets and cancer cells prior interaction (**Figure 2A**). Unexpectedly, a very low specific rate of catalysis of GALNT family was observed in washed platelets compared to cancer cells. These results were confirmed by focusing on GALNT3 main member of the GT family. We confirmed the absence of GALNT3 in platelets, using western Blot (**Figure 2B/C**) and flow cytometry (**Figure 2D/E**) in comparison with cancer cells (**Supplemental figures S4/S5**). Taken together, these results indicate that platelets do not express functional GALNT proteins.

We next studied the variation in the expression of mRNAs encoding for 43 different GT families in platelet-educated cancer cells compared to cancer cells alone. We observed strong differences in the mRNA

expression levels encoding for the different GT families studied in platelet-educated cancer cells compared to cancer cells alone (**Figure 3A**). Of interest, 3 GT families stood out in cancer cells after their interaction with platelets: MGAT2, MGAT3 and B3GNT which were significantly overexpressed by 343, 320 and 170%, respectively (**Table1**). As a consequence of this variation of mRNAs, we also observed a change in glycosylation patterns using different lectins (**Figures 3B-E**). The Tn antigen expression (recognized by VVL/VVA) at the surface of cancer cells is significantly decreasing in platelet-educated cancer cells (**Figure 3B**) in comparison with cancer cells alone, while fucosylation (revealed by AAL) is significantly increased (**Figure 3C**). Nevertheless, there is no change in the expression of α-mannosyl or α-glucosyl residues recognized by ConA (**Figure 3D**) or bisecting GlcNAc and galactose residues detected by PHA-E (**Figure 3E**), in platelet-educated cancer cells. Altogether these results indicate that the education by platelets affects the expression of several GT in cancer cells. Among them, the overexpression of B3GNT may contribute to the hyperglycosylation observed in cancer cells. Knowing that this GT family are implicated in the formation of carbohydrates involved in metastasis, such as poly-N-acetyllactosamine, their overexpression may affect cancer cell behavior.

Cancer cells educated by platelets overexpress 40 genes involved in metastasis and inflammation in cancer cells

We then studied if the education by platelets may affect the expression of various RNAs other than GT. We therefore analyzed the presence of mRNAs for 124 other genes encoding proteins involved in metastasis and inflammation. We observed by RT-qPCR that about 40 genes were overexpressed by more than 100% in platelet-educated cancer cells compared to cancer cells alone (**Figure 4A**). Among these genes, the most overexpressed in platelet-educated cancer cells are those encoding proteins involved in cancer progression and metastasis, including SERPINE1 (358%), MMP2 (297%), MMP10 (214%), TIMP1 (187%), FN1 (166%), TMPRSS4 (146%) and RHOC (102%) (**Table 1**). However, we also observed that there are mRNAs coding for CTBP1 (184%), APC (107%), and TP53 (104%) proteins, which are all tumor suppressors, that repair DNA damage, regulate cell cycle and apoptosis and so prevent cancer initiation and progression (**Table 1**). Taken together, these two mRNA clusters highlight the dual role of platelets in tumor progression. Finally, we have identified mRNAs encoding proteins such as IL2RG (155%), GNRH1 (153%) and CACNA1D (130%) that are overexpressed and whose role in cancer remains unclear (**Table 1**). For example, mRNA encoding IL2RG, the gamma subunit common to the IL-2, IL-4, IL-7 and IL-21 receptors, is overexpressed by 155% in platelet-educated cancer cells (**Table 1**). All these receptors are crucial for various functions, including immune development and regulation, inflammation, and cell proliferation.

In order to get a more precise view of the protein-protein interaction network of these genes we next used the STRING database. We classified only the 38 genes with an 100% overexpression in platelet-educated cancer cells into 5 gene clusters according to their biological function: (1 - red) ECM degradation, adhesion, migration and invasion (2 – yellow) tumor suppressors (3 – green) proliferation, motility and regulation of cell death (4 – dark blue) anti-metastatic and (5 – light blue) genes with no common function (**Figure 4B**). Within the

main cluster in red, one glycoprotein appeared to be central, fibronectin (FN1) which is overexpressed by 166% in platelet-educated cancer cells (**Figure 4A**). This glycoprotein is known to play a key role in cell adhesion and migration, and thus in the development of metastasis (**Table 1**). We confirmed this result by Western-blotting, demonstrating an overexpression of FN1 in platelet-educated cancer cells (**Figures 4C/D**). This overexpression was observed as early as 6 hours following the interaction with platelets (**Figures 4C/D**). Since FN1 is highly glycosylated and involved in many aspects of cancer metastasis, we next focused on it.

The case study of fibronectin: Its overexpression affects cancer cell behavior

We used miRNA transfection to generate a murine pancreatic cancer cell line that underexpresses FN1 by 2-fold (**Figures 5A/B and supplemental figure S6**), referred to as PANCO2 low FN1. Our first step was to examine, using untouched holotomographic microscopy (**Figure 5C and supplemental figure S7**), the effect of FN1 underexpression on cancer cell death. No difference between PANCO2 and PANCO2 low FN1 cell was detected, suggesting that FN1 doesn't play a role in this process (**Figures 5D/E**). Cancer cell migration was evaluated by wound healing assay (**Figures 5F/G**). Results obtained indicate that PANCO2 low FN1 cells migrate faster than PANCO2 cells. This result was confirmed using a Boyden chamber (**Figures 5H/I**). These data indicate that the level of expression of FN1 in cancer cells affects the migration of cancer cells.

Next, we wanted to access the effect of platelets on cancer cells. To do this, we allowed cancer cells to interact with platelets for 3 hours. After extensive washes, we let cancer cell to grow for 3, 24 or 45 additional hours (**Figure 6A**). Using holotomographic microscopy, we evaluated the percentage of cell death (**Figures 6B-E and supplemental figure S7**). As a result, we found no differences between cancer cells that interacted with platelets and those that did not. Thus, platelets do not seem to be involved in cancer cell death. We also evaluated cancer cell migration by wound healing assay (**Figures 6F/G**). Interestingly, we observed that PANCO2 cells that didn't interact with platelets and PANCO2 low FN1 cells that interact with platelets had a similar migration. This means that the previously observed migratory difference between these two cell types was compensated in the presence of platelets. These data highly suggested that platelets can stimulate FN1 production in cancer cells. This result was confirmed by Western blot analysis. We observed an 80% increase in FN1 expression in PANCO2 low FN1 cells 48 hours after their interaction with platelets (**Figures 6H/I**).

To determine how the education of platelets could lead to the overexpression of FN1, we next assessed the expression of cytokines in PANCO2 low FN1 cells 6 (**Figure 6J**) and 24h (**Figure 6K**) after their interaction with platelets using PhenomeX technology. Among 21 cytokines tested, the expression of 5 cytokines TNF-α, EGF, PDGF, IL-6 and IFNγ increased during the first 24 hours. These cytokines are all known to be involved in FN1 production though different signaling pathways such as MAPK/PI3K/Akt, STAT3 or JAK/STAT1 pathways[15–19]. Taken together our results indicate that platelet-educated cancer cells produce different cytokines involved in the overexpression of fibronectin at their surface, facilitating, in turn, their adhesion.

Discussion

In the blood circulation, platelets play an important role in cancer, but their role in the tumor microenvironment, in which they can directly interact with the tumor, is poorly understood. It was first reported in 2012 that extravasated platelets were present in the tumor microenvironment in an ovarian cancer and then in breast cancer and melanoma[10,20]. We have previously shown that 20% of the total platelets present in the tumor microenvironment are found in the periphery and not in the center of the tumor[11]. Their presence is not coincidental and usually correlates with advanced stages of the disease[11]. Several hypotheses have been proposed to explain how platelets can reach the extravascular space and interact directly with cancer cells: (I) following intratumoral bleeding, (II) *via* transmigration directly or indirectly through association with leukocytes, or (III) due to extramedullary hematopoiesis[21]. Until now, it has not been demonstrated how platelets access the primary tumor site. However, several studies have investigated their role within the primary tumor and highlighted their ability to drive phenotypic changes in cancer cells. This may or may not be beneficial for cancer development.

Previously, we showed that platelets can influence cancer cell behavior by educating them, i.e. by transferring material to them (lipids, proteins or RNA)[11,12]. We had demonstrated that platelets were capable of releasing the contents of their α-granules into tumor cells, or generating MPs enabling the transfer of adhesive proteins from one cell type to another[11]. In the present study, we wanted to characterize exactly which genes and proteins are involved in this education of cancer cells by platelets. Initially, our focus was on the enzymes responsible for protein glycosylation, the glycosyltransferases (GT). In many cancers, several studies have shown that deregulation of GT expression leads to aberrant glycosylation with overexpression, deletion or truncation of specific carbohydrate structures, which can alter the behavior of cancer cells. Changes in glycosylation have even become a hallmark of cancer over the years[22,23]. Interestingly, Wandall *et al*. demonstrated in 2012 that platelets are capable of secreting or expressing functional GT and associated sugar nucleotides on their surface, enabling them to glycosylate extracellular molecules (proteins or lipids)[14]. We therefore hypothesized that platelets may be able to extracellularly glycosylate proteins present on the surface of cancer cells during their interaction, thereby modifying their phenotype.

Among the GTs highlighted in this process GALNT1, GALNT2 and GALNT3, members of the UDP-N-α-D galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GALNT) family, were described to be involved in different biological processes, including tumor progression, proliferation, and migration[24]. Surprisingly, in our model, we showed that the expression of GALNTs in platelets is very low and they are not functional. However, we demonstrated an increase in the total dry mass of cancer cells in the presence of platelets, reflecting an alteration in their composition. We observed variations in the expression of mRNAs encoding 43 different GT families; half of which were over-expressed (by 0 to 343%) and the other half underexpressed (by 0 to -25%) in platelet-educated cancer cells compared to cancer cells uneducated. Among the most significantly overexpressed are MGAT2, MGAT3 and B3GNT. The deregulation of these 3 GT families can have a significant impact on cancer progression. For example, MGAT2 (GnT-II) overexpression in neuroblastoma increases N-glycan

structures promoting cell proliferation and invasion[25]. However, deregulation of MGAT3 (or GnT-III), as observed in breast cancer and melanoma, can inhibit the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells and thus suppress metastasis[26,27]. Finally, B3GNT3 is associated with immune cell infiltration in lung adenocarcinoma and, with pelvic lymph node metastasis in cervical cancer patients[28,29]. Thus, the education of cancer cells by platelets in the tumor microenvironment may partially explain the increase in GT expression and this may potentiate their effect on cancer cells. To our knowledge, we have been the first to describe that the interaction of cancer cells with platelets induces a change in the cancer cell transcriptome itself.

We then extended this study to 124 additional genes encoding inflammatory and metastatic proteins and found that all were overexpressed (from 8% to 358%) in platelet-educated cancer cells compared to cancer cells alone. Among the most over-expressed genes were those known to be involved in metastasis, such as SERPINE1, MMP2 and 10, TIMP1 and FN1[30–37]**.** Interaction between platelets and cancer cells increases the expression of SERPINE 1, an inhibitor of fibrinolysis. This over-expression, combined with the presence of microvesicles carrying active tissue factor, contributes to the pro-thrombotic profile of digestive cancers[6,38,39]. The presence of overexpression of RNA encoding tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) seems to counterbalance the sharp increase in metalloproteases (MMP2 and 10) [40–42]. We therefore turned our attention to the effects of overexpressing FN1 on cancer cells. FN1 is a glycoprotein that plays a role in the adhesion and migration of cells and it has also been shown to promote tumor growth, metastasis, and chemoresistance in the tumor microenvironment[43]. Its ability to bind to integrins, such as the αvβ1 integrin, enables it to activate the Akt and Ras signaling pathways which promote cell proliferation[44]. Moreover, several studies demonstrated that FN1 can activates different signaling pathways such as focal adhesion kinase (FAK), SNAIL-related zinc-finger transcription factor (SLUG), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and ERK/MAP to trigger EMT and increase the metastatic potential of the cancer cells[43,45–48]. Finally, FN1 can, for example, activate the integrins α5β1 and α4β1, which increase the ability of cancer cells to transport drugs like doxorubicin out of the cytoplasm *via* the drug transporter ABCC1[49]. This transport mechanism allows cancer cells to survive and grow even when exposed to high doses of chemotherapy[49]. Additionally, increased FN1 expression in pancreatic cancer cells makes them resistant to gemcitabine through activation of the ERK1/2 pathway, protecting the cells from its proapoptotic effects[50]. Here, we have shown that FN1 does not contribute to cell death, but that its overexpression in platelet-educated cancer cells reduces tumor cell migration. This suggests a potential anti-metastatic effect of FN1, which contradicts previous knowledge in this field. We also confirmed that platelets can stimulate FN1 transcription in cancer cells using cancer cells underexpressing FN1 by 2-fold. We have shown that the mechanism involved appears to be through cytokines such as EGF, PDGF, TNF-α, IFN-γ or IL-6, which activate signaling pathways within the cancer cells themselves that lead to FN1 production. These cytokines are all known to be involved in FN1 production though different signaling pathways such as MAPK/PI3K/Akt, STAT3 or JAK/STAT1 pathways[15–19].

Interestingly, FN1 glycosylation plays a role in the metastatic process. Studies have highlighted that in oral and mammary squamous cell carcinomas, FN1 undergoes a specific glycosylation that contributes to cell invasion and multidrug resistance of cancer cells[51,52]. This particular glycosylation, known as "oncofoetal FN1", is

characterized by the addition of a glycan to a specific Thr in the C-terminal region of FN1[51]. This is found exclusively in cancer and embryonic tissues[52]. A study showed that changes in the N-glycosylation of FN1 modulate integrin-mediated signaling to induce mediated cell adhesion and directed cell migration[53]. Given our previous findings on the variations in GT expression in platelet-educated cancer cells, it would be valuable to further investigate the glycosylation of FN1. Specifically, it would be interesting to examine whether there are changes in the carbohydrate motifs of FN1 after the interaction between cancer cells and platelets.

In addition to the increased expression of metastasis-related genes in platelet-educated cancer cells, our study also revealed the overexpression of tumor suppressor genes like CTBP1, APC and TP53[54–56]. While the pro-metastatic effect of overexpressed metastasis-related genes is clear, the impact of upregulation of tumor suppressor genes is more complex. Overexpression of CTBP1 has been observed in metastatic prostate cancer cells and leads to its mislocalization. As a result, this tumor-suppressing gene becomes pro-tumorigenic [54]. In contrast APC and TP53 mutations usually lead to their inactivation, affecting many cellular processes such as resistance to chemotherapy[55,56]. In our case, however, their unaltered forms are overexpressed, suggesting that they still may exert their tumor suppressor functions. These results highlight the dual role of platelets in the tumor microenvironment.

Finally, we have also showed the overexpression of genes whose role in cancer is not yet well understood such as IL2RG, CACNA1D and GNRH1. IL2RG encodes the γ subunit of the IL-2, IL-4, IL-7 and IL-21 receptors which plays crucial roles in the development and function of different immune cells such as NK, T and B cells. Knockdown of IL2RG is a common method to generate mouse models with impaired immune function, allowing the study of human immunodeficiency diseases. Although its direct contribution in cancer development is unclear, it has been found to be overexpressed in advanced gastric cancer and associated with poor survival rates[57]. Several studies have demonstrated that elevated levels of IL2RG as well as genes such as IL2RA, IL7R and IFNγ can promote melanoma metastasis by increasing intratumoral regulatory T cells through activation of the JAK-STAT signaling pathway[58]. In 2017, Ayars and al, using CRISPR-mediated knockout of *IL2RG* in orthotopically implanted pancreatic cancer cells, observed a reduction in tumor growth in mice and decreased JAK3 in orthotopic tumors. These findings suggest that the IL2Rγ/JAK3 signaling pathway may contribute to the growth of pancreatic cancer cells *in vivo*[59]. CACNA1D encodes a voltage-gated, L-type, α-subunit 1D calcium channel. It has been linked to adenomas (benign tumors) that produce aldosterone and endocrine disorders. McKerr *et al.* demonstrated that its modulation could induce a therapeutic advantage in prostate cancer, and several teams have also shown that its expression varies depending on the type of cancer, which means that it is referred to as a potential prognostic marker[60,61]. However, the mechanisms underlying its involvement in cancer are not well defined. Finally, studies have yielded mixed results regarding the association between GNRH1 and cancer. Some have found no clear association, while others have observed gender differences in bladder cancer prognosis or suggested that GNRH1 is a prognostic factor for the spread of tumor cells or cell cycle in breast and prostate cancers[62–64]. Taken together, our results shed light on interesting new target genes in platelet-educated cancer cells, to either inhibit or enhance, depending on their effects on cancer progression and metastasis.

In conclusion, we have demonstrated for the first time that platelets can educate cancer cells by inducing an increase or decrease in the transcription of genes related to glycosylation, inflammation, and metastasis. Although the underlying mechanisms of this process require further investigation, it represents a promising approach for potential therapeutic interventions in cancer treatment.

Table 1: Summary of genes over-expressed by at least 100% in platelet-educated cancer cells compared to cancer cells alone.

Genes	Complete Name	% of overexpression in platelet-educated cancer cells vs. cancer cells alone	Functions	Type of cancer in which its involvement has been demonstrated
SERPINE1 / A1PI / A1AT	Serpin Family E Member 1 / alpha-1 proteinase inhibitor / alpha-1 antitrypsin	358	Serine protease inhibitor, Protecting lung damage tissue, Anti-inflammatory, Immune responses regulation, Cancer metastasis	Breast, lung, colorectal, ovarian, gastric, kidney, bladder, melanoma and glioblastoma
MGAT2 / GnT-II	Mannosyl (Alpha-1,6-)-Glycoprotein Beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferas	343	Catalyses the addition of N-acetylglucosamine to mannose, part of the common structure of N-glycan complexes and hydrides - Stability, function and localization of proteins	Breast, ovarian, neuroblastoma, pancreas (current study)
MGAT3 / GnT-III	Mannosyl (Beta-1,4-)-Glycoprotein Beta-1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase	320	Adds an N-acetylglucosamine to the central mannose of the common structure of complex and hydride N-glycans - Stability, function and good localization of proteins	Breast, colorectal, melanoma, pancreas (current study)
MMP2	Matrix MetalloProteinase-2 / Gelatinase A	297	Extracellular matrix degradation, Tissue remodeling, Tissue repair and regeneration, Angiogenesis, Inflammation, Cardiovascular health, Neurological function, Cancer metastasis	Breast, lung, colorectal, ovarian, prostate, glioma, melanoma and pancreatic
KLK14	Kallikrein 14	269	Proteolytic activity (serine protease), Tissue remodeling, Inflammation, Skin barrier function, Salivary gland function, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian, prostate and pancreatic
MMP10	Matrix MetalloProteinase-10 / Stromelysin-2	214	Extracellular matrix degradation, Tissue remodeling, Tissue repair and regeneration, Angiogenesis, Inflammation, Cardiovascular health, Neurological processes, Cancer metastasis	Breast, lung, colorectal, ovarian, pancreatic, gastric and oral
TIMP1	Tissue Inhibitor MetalloProteinases 1	187	MMP inhibitor, Tissue homeostasis, Wound healing, Angiogenesis, Anti-inflammatory, Neurological function, Cancer metastasis	Breast, lung, colorectal, ovarian, prostate, pancreatic, gastric, bladder, head and neck
PLCE1	Phospholipase C Epsilon 1	185	Phospholipase activity, Intracellular Signaling, (calcium signaling, cell proliferation, cardiovascular and immune functions), Development, Cancer	Lung, colorectal, gastric and esophageal
CTBP1	C-Terminal Binding Protein 1	184	Transcriptional corepressor, Epigenetic regulation, Cellular signaling, Cellule differentiation, proliferation (cell cycle regulation) and apoptosis, Metabolic regulation, DNA damage response, Development, Tumor suppression	Breast, lung, colorectal, bladder and liver
KISS1	Kisspeptin-1	178	Puberty initiation, Gonadotropin regulation, Reproductive cycle regulation, Pregnancy and placental function, Metabolism, Cancer	Breast, colorectal, ovarian, prostate, gastric, cervical and endometrial
B3GNT2/4/8	UDP-GlcNAc: BetaGal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase	169	On Core 2 N-glycans and O-glycans, they transfer an N-acetylglucosamine onto a Galactose which creates a structure called "poly-N-acetyllactosamine" which has 3 main functions: - Provide a base structure for further modifications - Serve as a ligand for antibodies and lectins, modulating the function of the proteins that carry it, and even the fate of cells. - Sometimes masks the original structures of sugars and helps cancer cells evade the immune system.	Breast, lung, colorectal, ovarian, pancreas (current study)
FN1	**Fibronectin 1**	**166**	**Cell adhesion, Wound healing, Tissue development, Cell migration, Angiogenesis, Inflammation, Cell signaling (proliferation, survival, gene**	**Breast, lung, colorectal, ovarian, prostate, melanoma, pancreatic, gastric and liver**

		expression), Stem cell differentiation, Support of tissue and organs, Cancer metastasis	
IL2RG	Interleukin-2 Receptor Subunit Gamma	155	Interleukin-2 signaling (T cell and NK cell development), Immune regulation, Cytokines signaling (immune regulation, proliferation, differentiation)	-
GNRH1 / LHRH	GoNadotropin-Releasing Hormone 1 / Luteinizing Hormone-Releasing Hormone / Gonadorelin	153	Gonadotropin release and sex hormone production, Puberty Onset, Menstrual cycle regulation	-
ANXA1	Annexin A1 / Lipocortin-1	147	Phospholipids binding, Anti-inflammatory, Cell membrane function, Tissue repair and wound healing, Immune system regulation Cardiovascular health, Neurological function, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian, prostate, pancreatic, gastric, bladder, head and neck
PTGS2 / COX-2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 / CycloOygenase-2	147	Inflammation (prostaglandins production, pain sensation, fever), Gastric protection, Reproductive health, Tissue repair, Cardiovascular health, Neurological function, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian, prostate, brain, pancreatic, gastric, bladder, liver, head and neck, esophageal and skin
TMPRSS4	TransMembrane Protease Serine 4	146	Proteolytic activity (serine protease), Inflammation, Cell signaling, Cancer metastasis	Breast, lung, colorectal, ovarian, pancreatic, gastric and liver
CEACAM1	CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1	143	Cell-Cell adhesion, Immune cell regulation, Angiogenesis, Infection, Reproduction, Tissue development, Cell signaling, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian, pancreatic, prostate and liver
PLCG2	PhosphoLipase C Gamma 2	136	Signal transduction (calcium release and protein kinase C activation), Immune responses, Hematopoiesis, Cell growth and proliferation, Inflammation, Neurological function, Cancer	Leukemia (CLL, CMML) and lymphoma (DLBCL, PTCL, CTCL)
PLA2G1B	PhosphoLipase A2, Group IB	135	Digestive enzyme (lipid metabolism), Cell signaling (arachidonic acid), Inflammation, Immune responses, Phospholipids turnover	Breast, colorectal, ovarian and pancreatic
CACNA1D	Calcium Chanel, Voltage-Dependent, L Type, Alpha 1D Subunit	130	Calcium channel formation (voltage sensing), Cardiovascular function, Neuronal signaling, Smooth muscle contraction, Hormone secretion	-
HRH1	Histamine H1 Receptor	127	Allergic responses (itch sensation, ocular effects), Inflammation, Angiogenesis, Cell proliferation and growth, Smooth muscle contraction, Central nervous system effects, Appetite regulation, Cardiovascular function	Breast, lung, colorectal, ovarian, thyroid and gastric
LAMB1	Laminin subunit Beta-1	123	Extracellular matrix formation, Cell adhesion, Basement membrane, Tissue organization, Neurological function, Skin integrity, Renal function, Muscle function, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian, pancreatic and gastric
NFKB1	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1	120	Transcription factor, Immune responses, Bacterial and viral infections, Inflammation, Cell survival, Anti-oxidative response, Cell development and differentiation, Metabolism regulation, Neurological function, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian, prostate, pancreatic, liver, multiple myeloma, lymphomas and leukemias
GCNT1/3/4 / C2GnT	Beta-1,3-Galactosyl-O-Glycosyl-Glycoprotein Beta-1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase	116	In O-glycosylation, GCNTs convert Core 1 into Core 2, giving rise to structures such as SLe^X. They also initiate the synthesis of a structure known as "poly-N-acetyllactosamine"	Breast, colorectal, ovarian, pancreas (current study)
PECAM1 / CD31	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1	115	Cell adhesion, Leukocyte transendothelial migration, Platelet function, Thrombosis and hemostasis, Inflammation, Angiogenesis Immune cell trafficking (T cells), Autoimmunity, Cancer	Breast, lung, colorectal, prostate and pancreatic
SMAD2	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2	114	TGF-β signaling (cell growth, proliferation, differentiation, immune responses, wound healing, tissue repair, apoptosis), Embryonic development, Cancer	Breast, lung, colorectal, pancreatic and liver

CTSK	Cathepsin K	113	Bone resorption (bone remodeling, growth, repair), Extracellular degradation, Connective tissue turnover, Lysosomal function, Periodontal disease and arthritis, Cancer	Breast, lung and prostate
FAT1	Fat Mass and Obesity-Associated Protein	112	Cell-cell adhesion, Tissue development and organization (planar cell polarity regulation), Brain and kidney development, Immune responses, Cell signaling, Cardiovascular function, Cancer	Breast, colorectal, glioblastoma, head and neck squamous cell carcinoma
ALOX5	Arachidonate-5-Lipoxygenase	110	Leukotriene biosynthesis, Inflammation, Asthma and allergic reactions, Cell growth and differentiation, Cardiovascular and neurological functions, Cancer	Breast, lung, colorectal and prostate
IL2RB	Interleukin-2 Receptor subunit Beta	109	Interleukin-2 signaling (immune system regulation, viral infections, immune tolerance, T cell activation, transplantation), Cancer	Melanoma, kidney, leukemia and T-cell lymphomas
PLCB4	PhosphoLipase C Beta 4	108	Signal transduction (calcium release and protein kinase C activation), Cell proliferation and migration, Immune responses, Cardiovascular and neurological functions, Cancer	Breast, lung, colorectal and ovarian
ANXA5	Annexin A5 / Annexin V	107	Phospholipids binding, Apoptosis regulation, Blood coagulation, Anti-inflammatory, Membrane repair, Cell growth and differentiation, Cardiovascular and neurological functions, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian and prostate
ANXA3	Annexin A3	107	Phospholipids binding, Anti-inflammatory, Thrombosis, Anti-coagulant, Cell homeostasis (cell membrane and cytoskeletal organization, intracellular signaling), Cancer	Breast, lung, pancreatic, gastric and liver
APC	Adenomatous Polyposis Coli	107	Tumor suppressor gene (Wnt signaling), Cell adhesion and migration, Cancer	Colorectal
FXYD5	FXYD domain-containing ion transport regulator 5	107	Sodium-potassium pumps regulation (renal function), Cancer	Breast, lung and ovarian
BRMS1	Breast cancer Metastasis Suppressor 1	104	Metastasis suppressor	Breast and melanoma
TP53	Tumor Protein P53	104	Tumor suppressor, Cell cycle regulation, DNA repair (genome stability), Apoptosis and senescence, Anti-angiogenic, Metabolism regulation, Immune system modulation, Cancer	Breast, lung, colorectal, ovarian, pancreatic, liver, bladder, head and neck, esophageal and leukemias
HRH2	Histamine Receptor H2	103	Histamine signaling, Gastric acid regulation (digestive role)	Breast, colorectal, pancreatic and gastric
PLCB3	PhosphoLipase C Beta 3	102	Signal transduction (calcium release and protein kinase C activation), Cell proliferation and differentiation, Neuronal signaling, Immune responses, Cancer	Breast, lung, colorectal and ovarian
TNFSF10	Tumor Necrosis Factor ligand SuperFamily Member 10	102	TNF signaling – TRAIL (apoptosis induction, immune responses, inflammation), Cancer	Breast, lung, colorectal, pancreatic and prostate
RHOC	Rho GTPase C	102	Cell adhesion and migration, Angiogenesis, Cytoskeletal dynamics, Gene expression regulation, Cancer metastasis	Breast, lung, colorectal and melanoma

Figure 1.

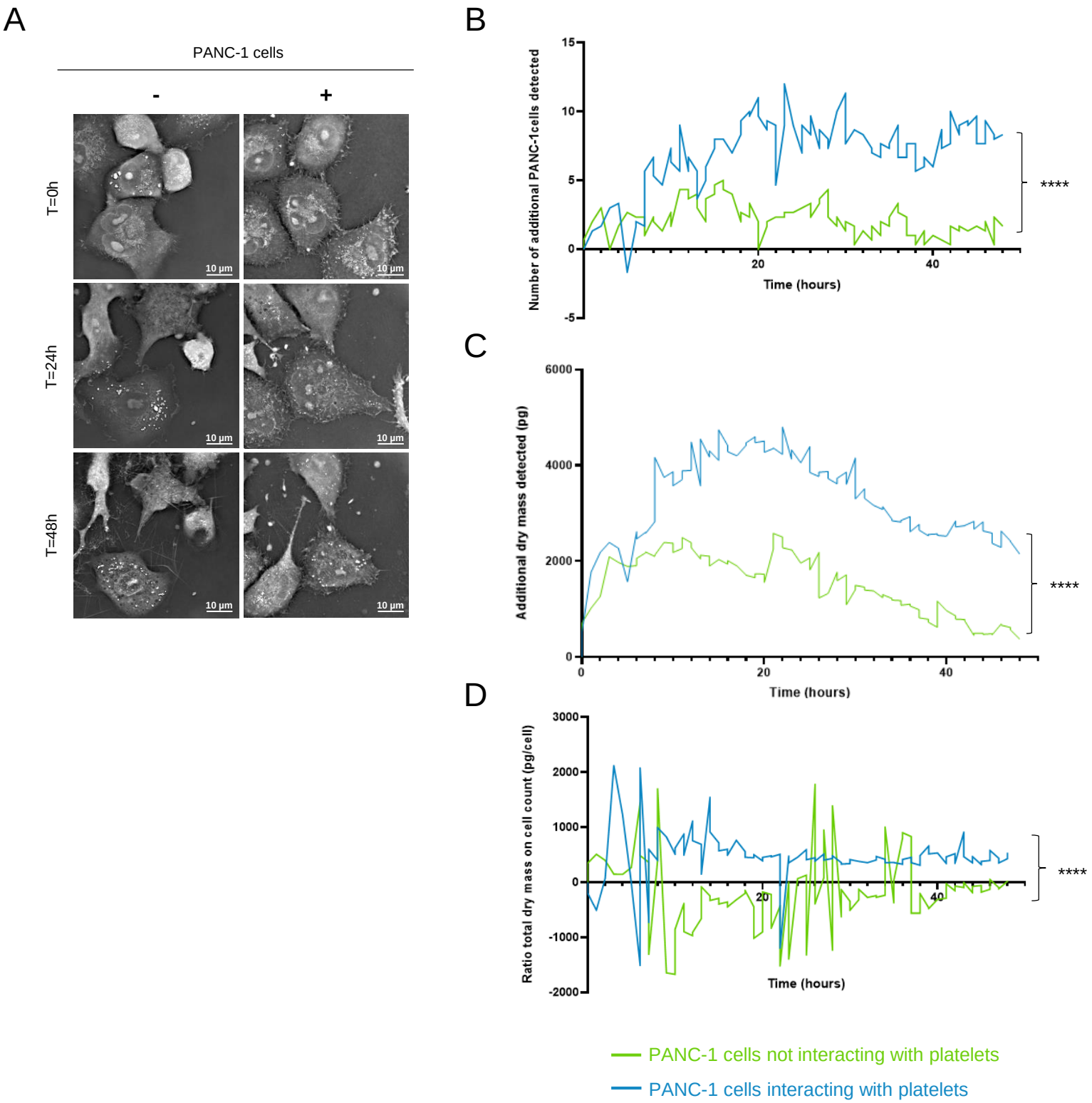

A
PANC-1 cells
-
+
T=0h
T=24h
T=48h
10 µm
B
Number of additional PANC-1cells detected
15
10
5
0
-5
20
40
Time (hours)
****
C
Additional dry mass detected (pg)
6000
4000
2000
0
0
20
40
Time (hours)
****
D
Ratio total dry mass on cell count (pg/cell)
3000
2000
1000
0
-1000
-2000
20
40
Time (hours)
****
PANC-1 cells not interacting with platelets
PANC-1 cells interacting with platelets

Figure 2.

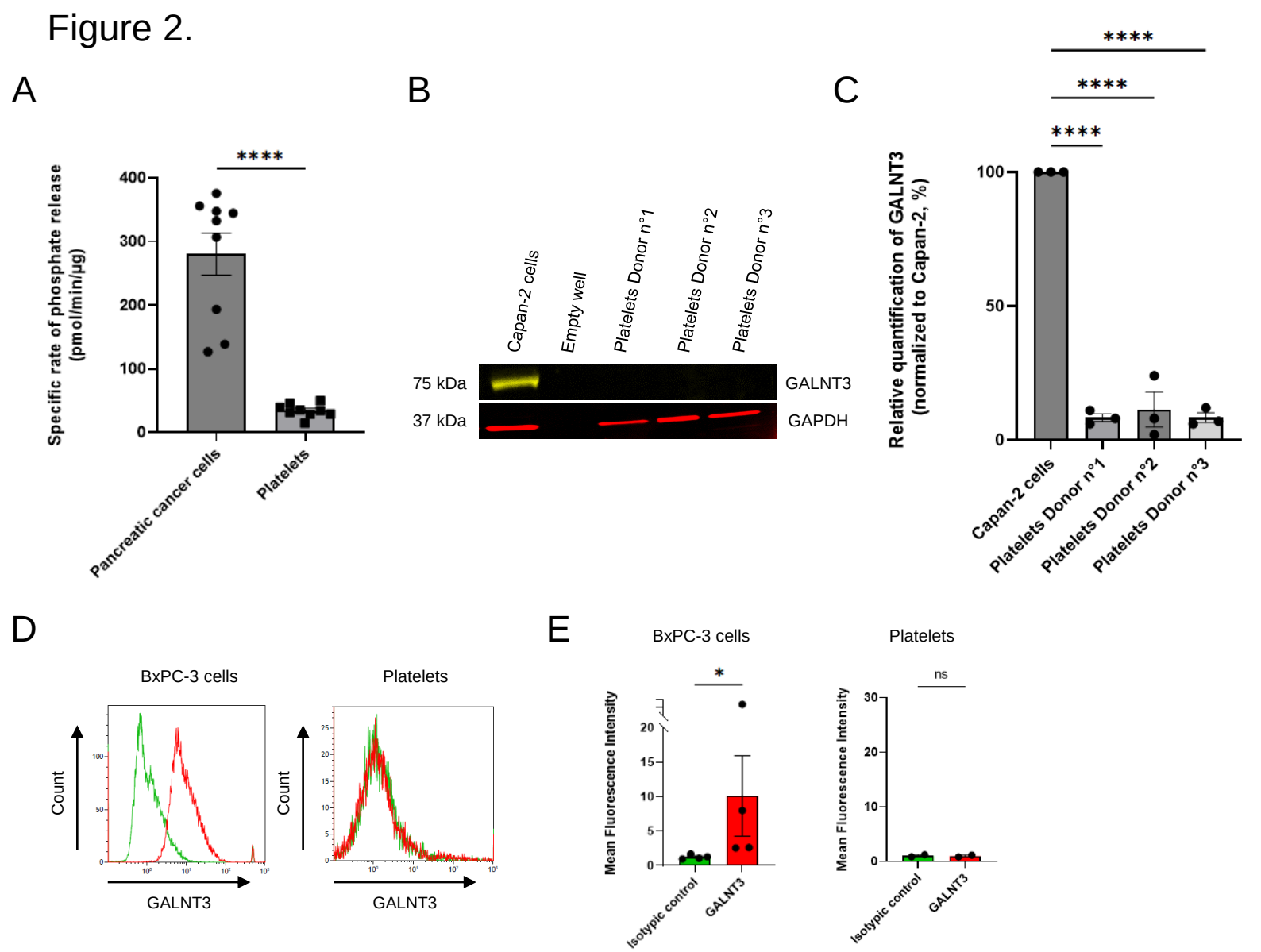
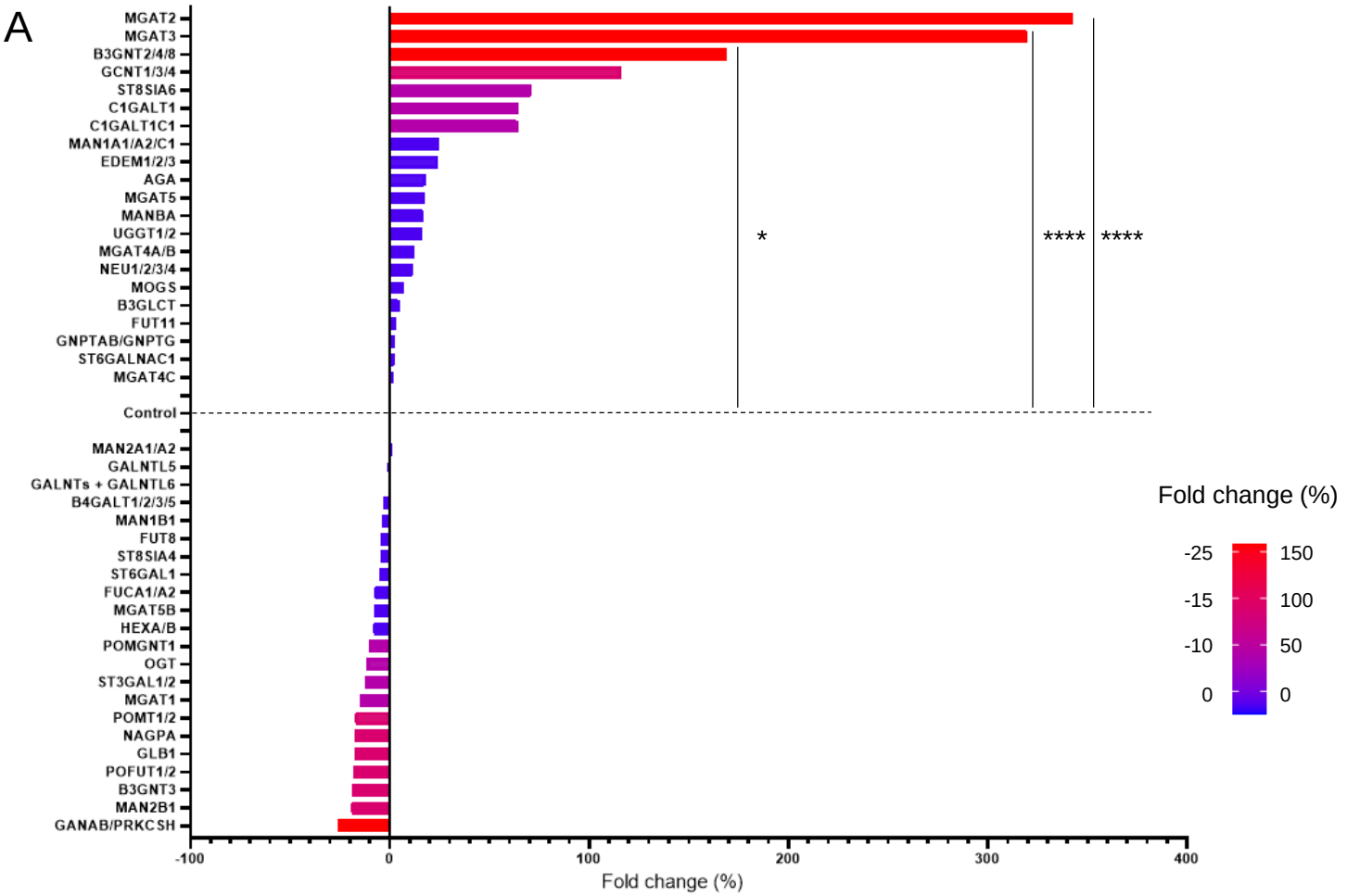
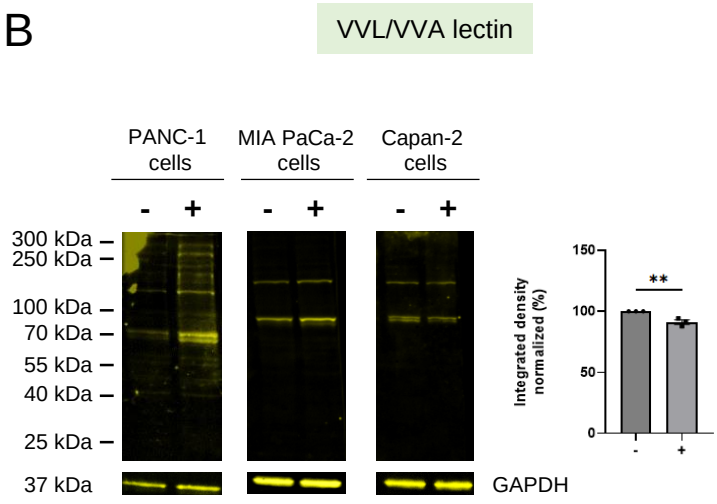
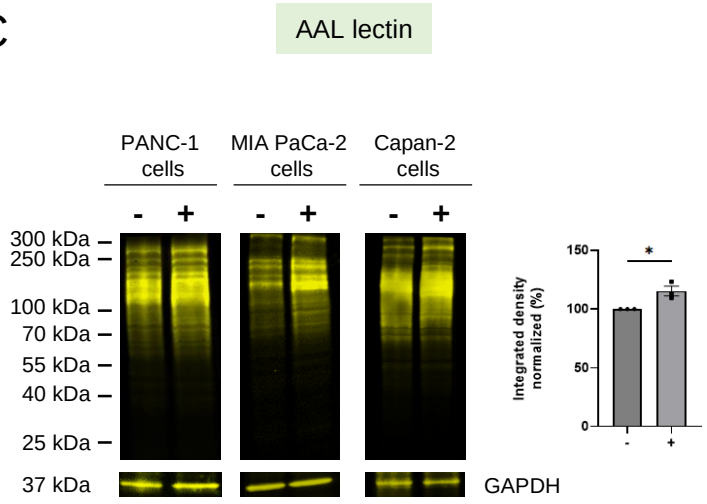
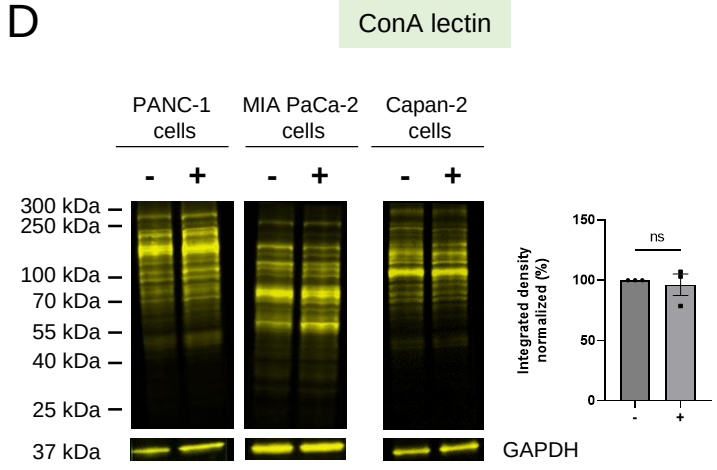

A
Specific rate of phosphate release (pmol/min/µg)
****
400
300
200
100
0
Pancreatic cancer cells
Platelets
B
Capan-2 cells
Empty well
Platelets Donor n°1
Platelets Donor n°2
Platelets Donor n°3
75 kDa
GALNT3
37 kDa
GAPDH
C
****
****
****
Relative quantification of GALNT3 (normalized to Capan-2, %)
100
50
0
Capan-2 cells
Platelets Donor n°1
Platelets Donor n°2
Platelets Donor n°3
D
BxPC-3 cells
Platelets
Count
GALNT3
E
BxPC-3 cells
Platelets
*
ns
Mean Fluorescence Intensity
Isotypic control
GALNT3

Figure 3.


A
MGAT2
MGAT3
B3GNT2/4/8
GCNT1/3/4
ST8SIA6
C1GALT1
C1GALT1C1
MAN1A1/A2/C1
EDEM1/2/3
AGA
MGAT5
MANBA
UGGT1/2
MGAT4A/B
NEU1/2/3/4
MOGS
B3GLCT
FUT11
GNPTAB/GNPTG
ST6GALNAC1
MGAT4C
Control
MAN2A1/A2
GALNTL5
GALNTs + GALNTL6
B4GALT1/2/3/5
MAN1B1
FUT8
ST8SIA4
ST6GAL1
FUCA1/A2
MGAT5B
HEXA/B
POMGNT1
OGT
ST3GAL1/2
MGAT1
POMT1/2
NAGPA
GLB1
POFUT1/2
B3GNT3
MAN2B1
GANAB/PRKCSH
*
****
****
-100
0
100
200
300
400
Fold change (%)
Fold change (%)
-25
-15
-10
0
150
100
50
0


B
VVL/VVA lectin
PANC-1 cells
MIA PaCa-2 cells
Capan-2 cells
- + - + - +
300 kDa
250 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
40 kDa
25 kDa
37 kDa
GAPDH
Integrated density normalized (%)
**
150
100
50
0
- +


C
AAL lectin
PANC-1 cells
MIA PaCa-2 cells
Capan-2 cells
- + - + - +
300 kDa
250 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
40 kDa
25 kDa
37 kDa
GAPDH
Integrated density normalized (%)
*
150
100
50
0
- +


D
ConA lectin
PANC-1 cells
MIA PaCa-2 cells
Capan-2 cells
- + - + - +
300 kDa
250 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
40 kDa
25 kDa
37 kDa
GAPDH
Integrated density normalized (%)
ns
150
100
50
0
- +

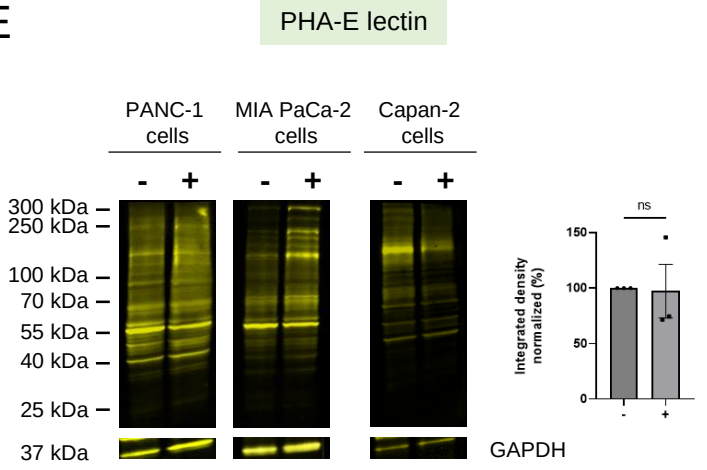

E
PHA-E lectin
PANC-1 cells
MIA PaCa-2 cells
Capan-2 cells
- + - + - +
300 kDa
250 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
40 kDa
25 kDa
37 kDa
GAPDH
Integrated density normalized (%)
ns
150
100
50
0
- +

Figure 4.

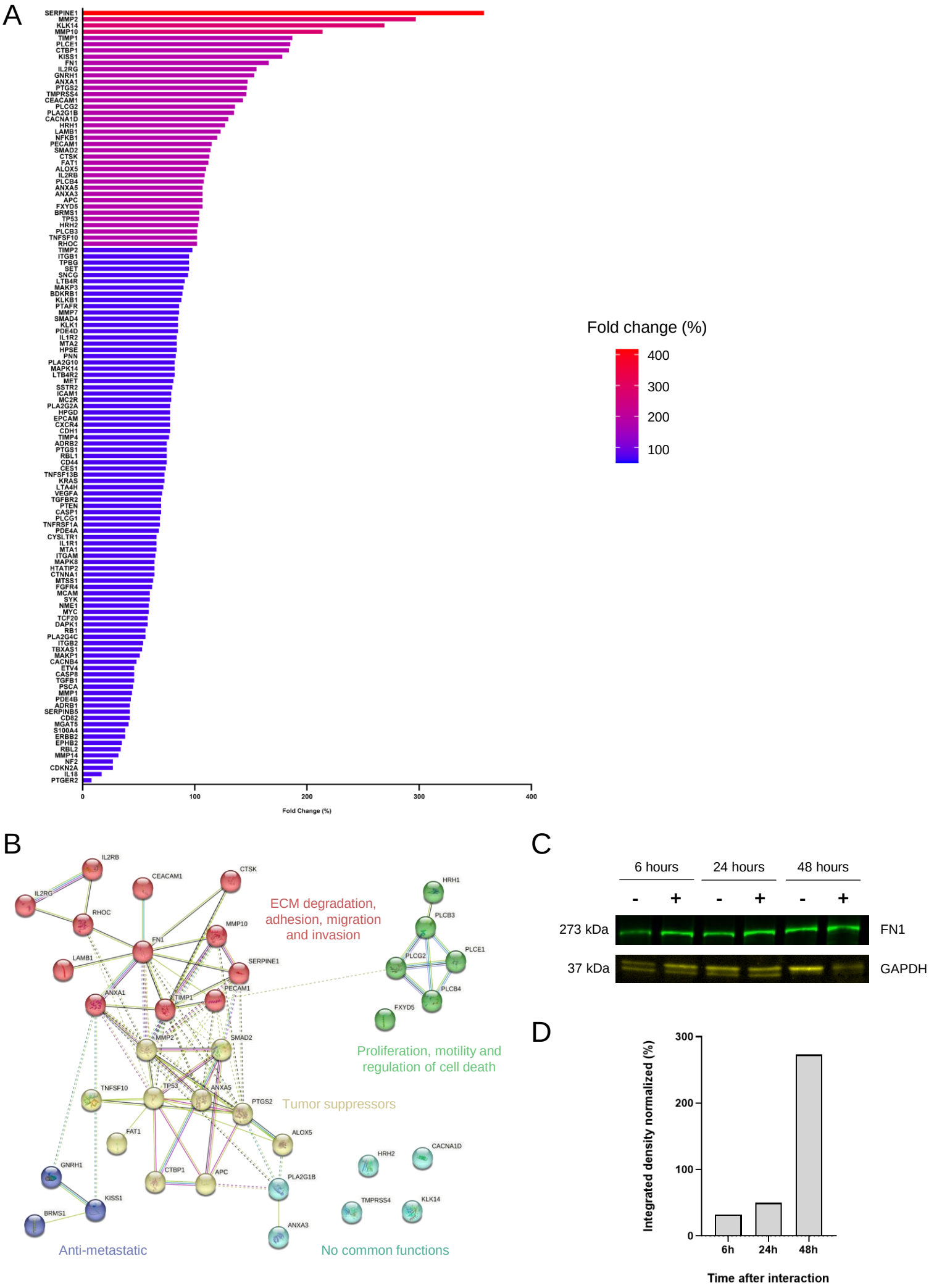

A
SERPINE1
MMP2
KLK14
MMP10
TIMP1
PLCE1
CTBP1
KISS1
FN1
IL2RG
GNRH1
ANXA1
PTGS2
TMPRSS4
CEACAM1
PLCG2
PLA2G1B
CACNA1D
HRH1
LAMB1
NFKB1
PECAM1
SMAD2
CTSK
FAT1
ALOX5
IL2RB
PLCB4
ANXA5
ANXA3
APC
FXYD5
BRMS1
TP53
HRH2
PLCB3
TNFSF10
RHOC
TIMP2
ITGB1
TPBG
SET
SNCG
LTB4R
MAKP3
BDKRB1
KLKB1
PTAFR
MMP7
SMAD4
KLK1
PDE4D
IL1R2
MTA2
HPSE
PNN
PLA2G10
MAPK14
LTBAR2
MET
SSTR2
ICAM1
MC2R
PLA2G2A
HPGD
EPCAM
CXCR4
CDH1
TIMP4
ADRB2
PTGS1
RBL1
CD44
CES1
TNFSF13B
KRAS
LTA4H
VEGFA
TGFBR2
PTEN
CASP1
PLCG1
TNFRSF1A
PDE4A
CYSLTR1
IL1R1
MTA1
ITGAM
MAPK8
HTATIP2
CTNNA1
MTSS1
FGFR4
MCAM
SYK
NME1
MYC
TCF20
DAPK1
RB1
PLA2G4C
ITGB2
TBXAS1
MAKP1
CACNB4
ETV4
CASP8
TGFB1
PSCA
MMP1
PDE4B
ADRB1
SERPINB5
CD82
MGAT5
S100A4
ERBB2
EPHB2
RBL2
MMP14
NF2
CDKN2A
IL18
PTGER2
0
100
200
300
400
Fold Change (%)
Fold change (%)
400
300
200
100
B
IL2RB
CEACAM1
CTSK
IL2RG
RHOC
MMP10
FN1
LAMB1
SERPINE1
ANXA1
PECAM1
TIMP1
MMP2
SMAD2
TNFSF10
TP53
ANXA5
PTGS2
FAT1
ALOX5
GNRH1
CTBP1
APC
PLA2G1B
KISS1
BRMS1
ANXA3
ECM degradation, adhesion, migration and invasion
HRH1
PLCB3
PLCG2
PLCE1
PLCB4
FXYD5
Proliferation, motility and regulation of cell death
Tumor suppressors
HRH2
CACNA1D
TMPRSS4
KLK14
Anti-metastatic
No common functions
C
6 hours
24 hours
48 hours
- + - + - +
273 kDa
FN1
37 kDa
GAPDH
D
Integrated density normalized (%)
300
200
100
0
6h
24h
48h
Time after interaction

Figure 5.

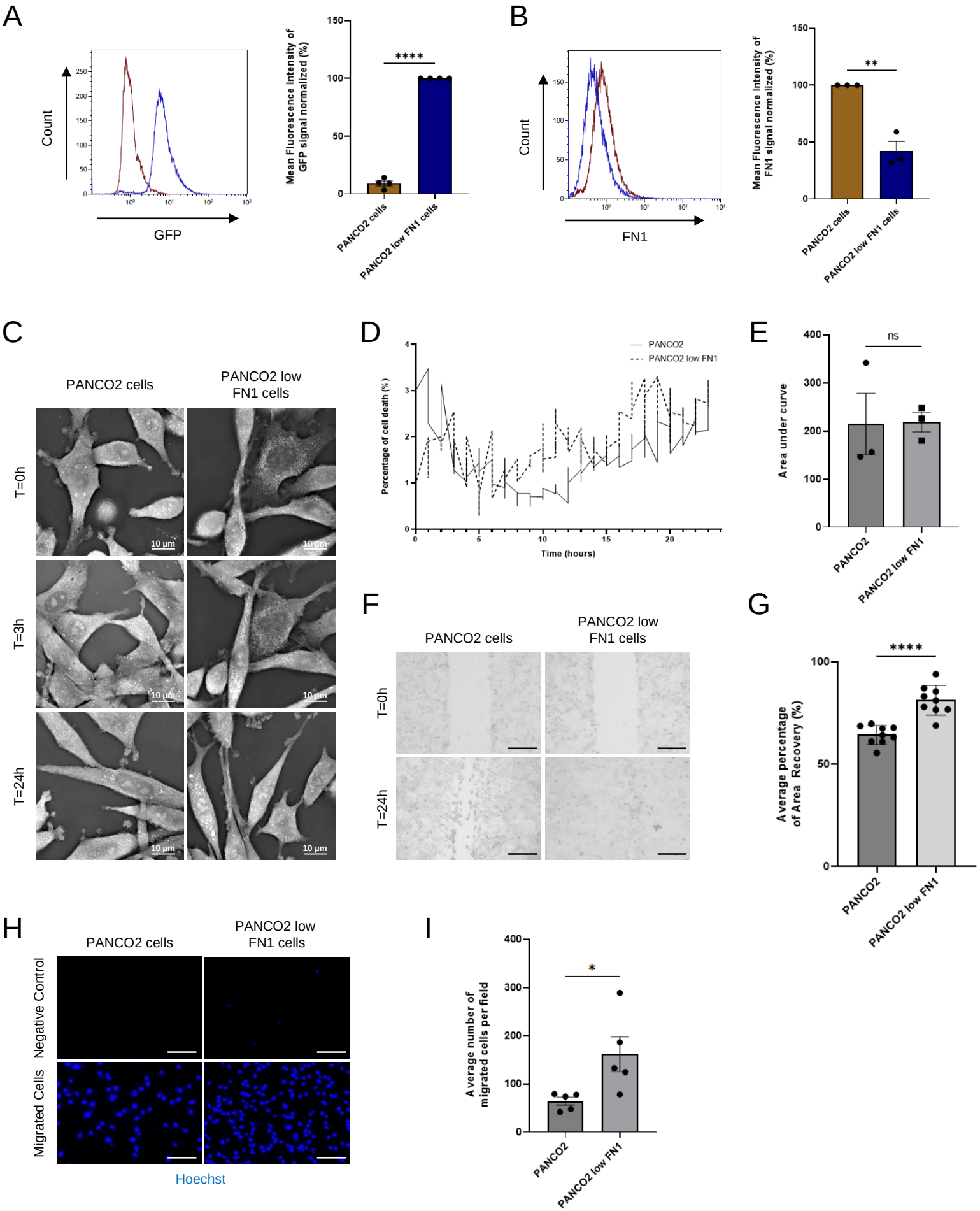

A
Count
GFP
Mean Fluorescence Intensity of GFP signal normalized (%)
****
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
B
Count
FN1
Mean Fluorescence Intensity of FN1 signal normalized (%)
**
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
C
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
T=0h
T=3h
T=24h
10 µm
D
PANCO2
PANCO2 low FN1
Percentage of cell death (%)
Time (hours)
E
ns
Area under curve
PANCO2
PANCO2 low FN1
F
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
T=0h
T=24h
G
****
Average percentage of Area Recovery (%)
PANCO2
PANCO2 low FN1
H
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
Negative Control
Migrated Cells
Hoechst
I
*
Average number of migrated cells per field
PANCO2
PANCO2 low FN1

Figure 6.

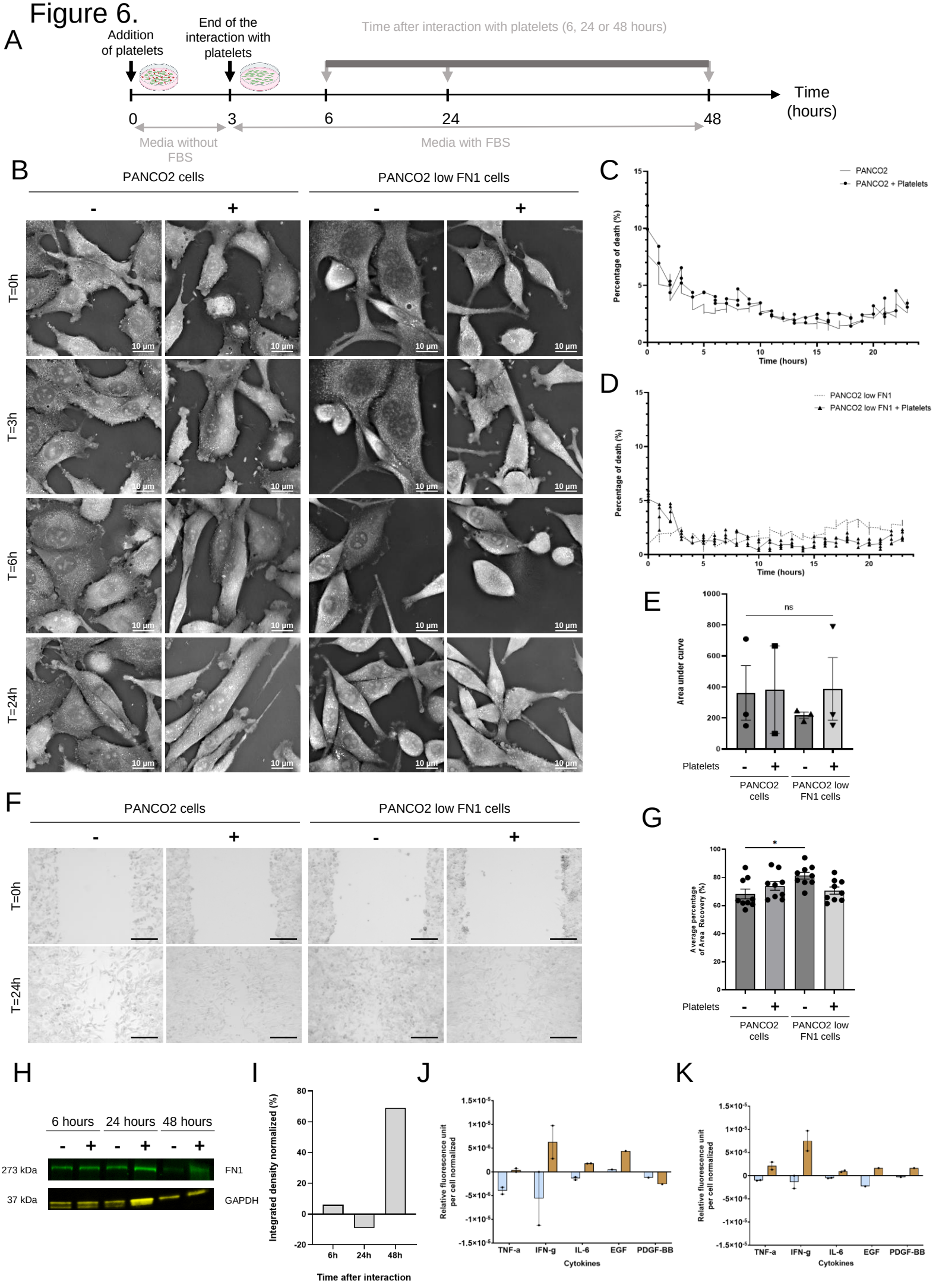

A
Addition of platelets
End of the interaction with platelets
Time after interaction with platelets (6, 24 or 48 hours)
Time (hours)
0
3
6
24
48
Media without FBS
Media with FBS
B
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
-
+
T=0h
T=3h
T=6h
T=24h
10 µm
C
PANCO2
PANCO2 + Platelets
Percentage of death (%)
Time (hours)
D
PANCO2 low FN1
PANCO2 low FN1 + Platelets
Percentage of death (%)
Time (hours)
E
Area under curve
ns
Platelets
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
F
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
T=0h
T=24h
G
Average percentage of Area Recovery (%)
*
Platelets
PANCO2 cells
PANCO2 low FN1 cells
H
6 hours
24 hours
48 hours
273 kDa
FN1
37 kDa
GAPDH
I
Integrated density normalized (%)
6h
24h
48h
Time after interaction
J
Relative fluorescence unit per cell normalized
TNF-a
IFN-g
IL-6
EGF
PDGF-BB
Cytokines
K
Relative fluorescence unit per cell normalized
TNF-a
IFN-g
IL-6
EGF
PDGF-BB
Cytokines

Figure legends:

Figure 1. Platelets increase material content in human pancreatic cancer cells during their interaction. (A) Representative images of three independent experiments of PANC-1 cells, in the presence (+) or in absence (-) of platelets over time up to 48 hours (holotomographic microscopy bars, 10 µm). **(B-D)** Graph was obtained with "Standard Analysis" module showing the increase of newly synthesized cells **(B)**, the accumulation of dry mass **(C)** or the ratio of total dry mass per cell **(D)** over time in presence (blue) or in absence (green) of platelets. Each curve represents the mean of three independent experiments (Mann-Whitney test, ****P<0.0001).

Figure 2. Platelets express a low level of the GALNT family. (A) Evaluation of GALNT family activity in pancreatic cancer cells (BxPC-3 and Capan-2) and in human platelets (three independent donors) using an indirect colorimetric glycosyltransferase activity assay. Graph depicts the mean value (+/- SEM) from three independent experiments of the rate of phosphate release corresponding to the specific activity of the GALNT family (including 20 members). T-test, ****P<0.0001. **(B)** Representative image of GALNT3 detection by Western Blot in 50 µg of lysate of Capan-2 cells or human platelets (three independent donors). Detection of GAPDH was used as a loading control for the experiment. **(C)** Graph shows the relative quantification of the GALNT3/GAPDH ratio in human platelets normalized to Capan-2 cells. Histogram represents mean (+/- SEM) obtained from three independent experiments (ANOVA test, ****P<0.001). **(D)** Representative graphs of indirect GALNT3 detection using unconjugated anti-human GALNT3 antibody (2 µg/mL) and AF680-conjugated anti-sheep IgG secondary antibody (2 µg/mL) by flow cytometry in BxPC-3 cells (red curve, left panel) or human platelets (red curve, right panel) compared to isotype control (2 µg/mL) revealed with AF680-conjugated anti-sheep IgG secondary antibody in both cases (green curves, all panels). **(E)** Quantification of GALNT3 expression in BxPC-3 cells and in human platelets assessed by flow cytometry. Histogram shows mean fluorescence intensity (+/- SEM) from two or four independent experiments (Mann-Whitney test, *P<0.0286, ns = not significant).

Figure 3. Changes in the expression of mRNAs encoding glycosyltransferases in the cancer cells after platelets interaction. **(A)** Graph shows the mean fold change (percentage) of mRNA expression of 43 GT families in pancreatic cancer cells (PANC-1, MIA PaCa-2, Capan-2) after 3 hours of interaction of cancer cells with platelets compared to before their interaction (control). Colors represent an overexpression of at least 150% (red), 100% (pink), 50% (purple) or less than 50% (blue) of the mRNA of GT families in cancer cells after platelet interaction or, conversely, an underexpression of at least 25% (red), 15% (pink), 10% (purple) or less than 10% (blue). Data were normalized to the housekeeping gene HPRT1 and histogram represents the mean of three independent experiments (ANOVA test, ****P<0.0001, *P=0.0401). **(B-E)** Representative images and corresponding quantification of glycan motif detection using 4 lectins: VVL/VVA, **(B)** AAL **(C)**, ConA **(D)**, PHA-E **(E)** by Western Blot of pancreatic cancer cell lysates (PANC-1, MIA PaCa-2 or Capan-2, 40 µg) interacting (+) or not (-) with platelets for 3 hours. GAPDH expression was detected as a loading control for the experiment. The graphs show the mean of integrated density (+/- SEM) of glycan motif expression normalized to cancer cells alone (t-test, **P=0.0090, *P=0.0207, ns = not significant).

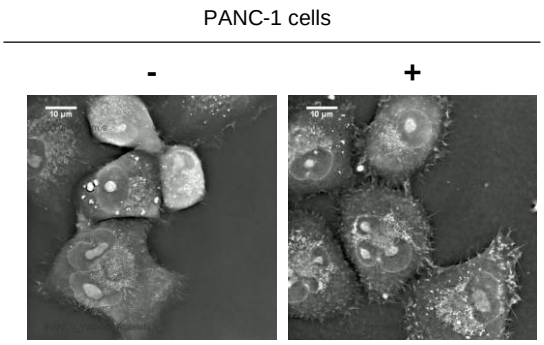
Figure 4. mRNAs encoding proteins involved in inflammation and metastasis are overexpressed in platelet-educated cancer cells. (A) Graph represents the mean fold change (percentage) of mRNA expression of 124 genes encoding proteins involved in inflammation and metastasis in a human colorectal cancer cell line (HT-29) after 3 hours of interaction with platelets compared to before their interaction. Colors represent an overexpression of at least 300% (red), 200% (pink), 100% (purple) or less than 100% (blue) of the mRNA in platelet-educated cancer cells. Data were normalized to the housekeeping gene HPRT1. **(B)** Protein-protein interaction network using STRING database 12.0. Only the 38 genes with at least an 100% overexpression were considered to perform this analysis. Nodes represent proteins and each node color (red, yellow, dark blue, light blue or green) indicates a gene cluster. Edges represent known interactions from the curated database (light blue) or experimentally determined (pink) ; scientific literature (yellow/green) ; co-expression (black) or protein homology (dark blue). **(C)** Representative image of fibronectin (FN1, 273 kDa) detection by Western Blot in 15 µg of PANCO2 cell lysates 6, 24 or 48 hours after their interaction with platelets (+) or not (-). As a loading control for the experiment, the expression of GAPDH was detected. **(D)** Histogram shows the relative quantification of the FN1/GAPDH ratio in PANCO2 cells + platelets normalized to PANCO2 cells alone over time up to 48 hours.

Figure 5. Overexpression of fibronectin (FN1) in platelet-educated cancer cells reduces cell migration w/o affecting the death rate. (A) Representative graph and corresponding quantification of GFP detection by flow cytometry in PANCO2 mock (brown) *vs.* PANCO2 low FN1 (blue) cells. The histogram represents the mean value of four independent experiments (t-test, ****P<0.0001). **(B)** Representative graphs and respective quantification of FN1 detection with unconjugated anti-mouse FN1 antibody (2 µg/mL) and AF647-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (2 µg/mL) by flow cytometry in PANCO2 mock (brown) *vs.* PANCO2 low FN1 (blue) cells compared to isotype control (2 µg/mL) detected with AF47-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (brown curves). Histogram shows mean fluorescence intensity (+/- SEM) from three independent experiments (t-test, **P=0.0025). **(C)** Representative images of three independent experiments of PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cells over time up to 24 hours (holotomographic microscopy bars, 10 µm). **(D-E)** Curves **(D)** were generated with the "Cell Death Assay" module showing the percentage of cell death in PANCO2 mock (solid line) or PANCO2 low FN1 (dashed line) cells over 24 hours. The histogram **(E)** shows the mean area under the preceding curve (+/- SEM) of three independent experiments (t-test, ns = not significant). **(F)** Representative images of nine independent experiments of wound healing assay experiments evaluating PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cell migration over 24 hours (10X objective, bars 250 µm). **(G)** Graph shows the mean percentage of area recovery (+/- SEM), from nine independent experiments, corresponding to the migration of PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cells (5 images per experiment and per well, t-test, ****P<0,0001). **(H)** Representative images of five independent migration assays to detect PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 migrated cells, with Hoechst 33342 after 16 hours. The negative control was performed with the same cells but without FCS in the lower chamber (20X objective, bars 125 µm). **(I)** Graph represents the mean (+/- SEM) of the number of migrated PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cells, from five independent experiments, after 16 hours of incubation (10 images per experiment and per well, t-test, *P=0.03, n=5).

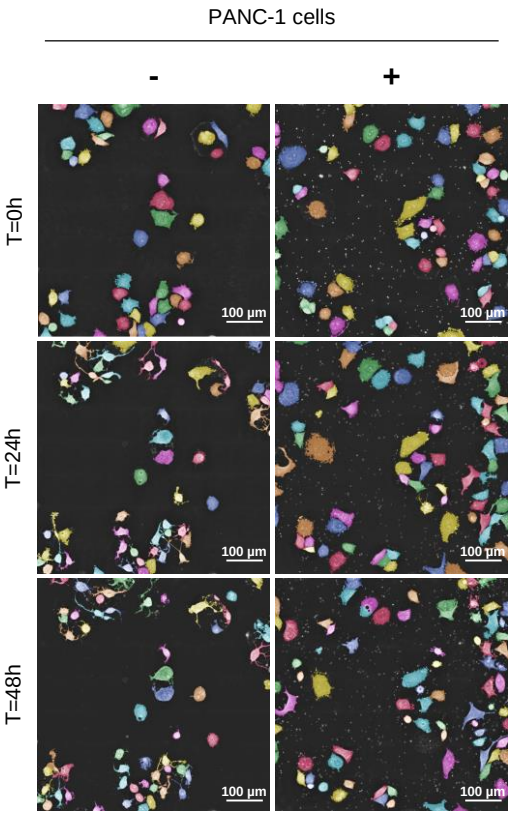
Figure 6. Platelets stimulate FN1 production in cancer cells. (A) Schematic diagram of the experimental procedure: platelets were allowed to interact with the cancer cells (cancer cell:platelet ratio = 1:50) for 3 hours. The interactions were stopped by extensively washing the cancer cells with PBS-/-. the cancer cells were recorded to detect any changes in cancer cell behavior for another 3, 21 or 45 hours. **(B)** Representative images of three independent experiments of PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cells, in the presence (+) or in absence (-) of platelets over time up to 24 hours (holotomographic microscopy bars, 10 µm). **(C)** Curves were generated with the "Cell Death Assay" module and represent the percentage of cell death in PANCO2 mock (solid line) or PANCO2 + Platelets (solid line with circle) cells over 24 hours. **(D)** Curves were obtained with the "Cell Death Assay" module and depict the percentage of cell death in PANCO2 low FN1 (dashed line) or PANCO2 low FN1 + Platelets (solid line with triangle) cells over 24 hours. **(E)** Histogram shows the mean area under the preceding curves (C-D) (+/- SEM) of three independent experiments in presence (+) or in absence (-) of platelets (ANOVA test, ns = not significant). **(F)** Representative images of nine independent experiments of wound healing assay experiments evaluating PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cell migration in the presence (+) or absence (-) of platelets over 24 hours (10X objective, bars 250 µm). **(G)** Graph depicts the mean percentage of area recovery (+/- SEM), from nine independent experiments, corresponding to the migration of PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cells, in presence (+) or in absence (-) of platelets (5 images per experiment and per well, ANOVA test, *P<0.0188). **(H)** Representative image of FN1 detection by Western Blot in 15 µg of PANCO2 low FN1 lysates 6, 24 or 48 hours after their interaction with platelets (+) or not (-). Detection of GAPDH was used as a loading control for the experiment. **(I)** Graph shows the relative quantification of the FN1/GAPDH ratio in PANCO2 low FN1 cells normalized to PANCO2 low FN1 cells alone over time up to 48 hours**. (J-K)** Evaluation of cytokine expression in PANCO2 mock (light blue) or PANCO2 low FN1 (brown) cells after 6 **(J)** or 24 hours **(K)** interaction with platelets using a multiplex ELISA workflow. Graphs represent the mean (+/- SEM) of relative fluorescence unit per cell normalized to PANCO2 or PANCO2 low FN1 cells alone, respectively from three independent experiments.

Supplementary figures

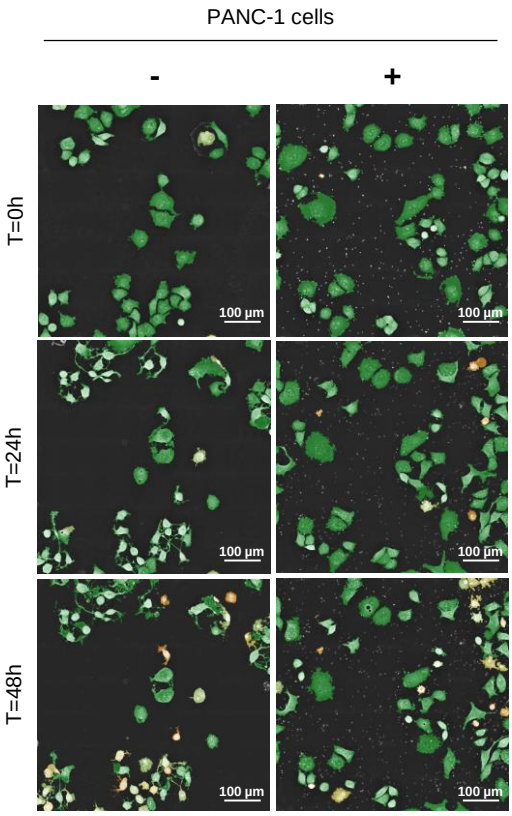
S1



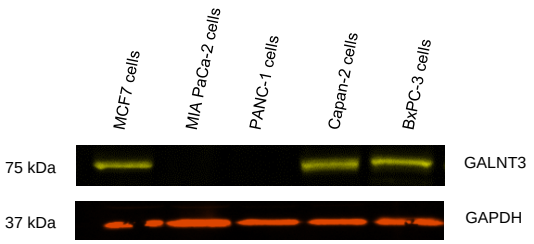
S2



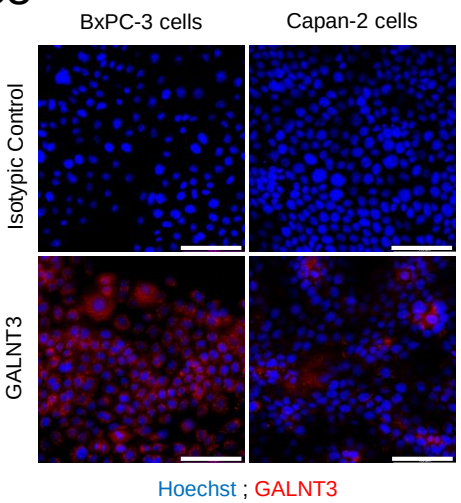
S3



S4

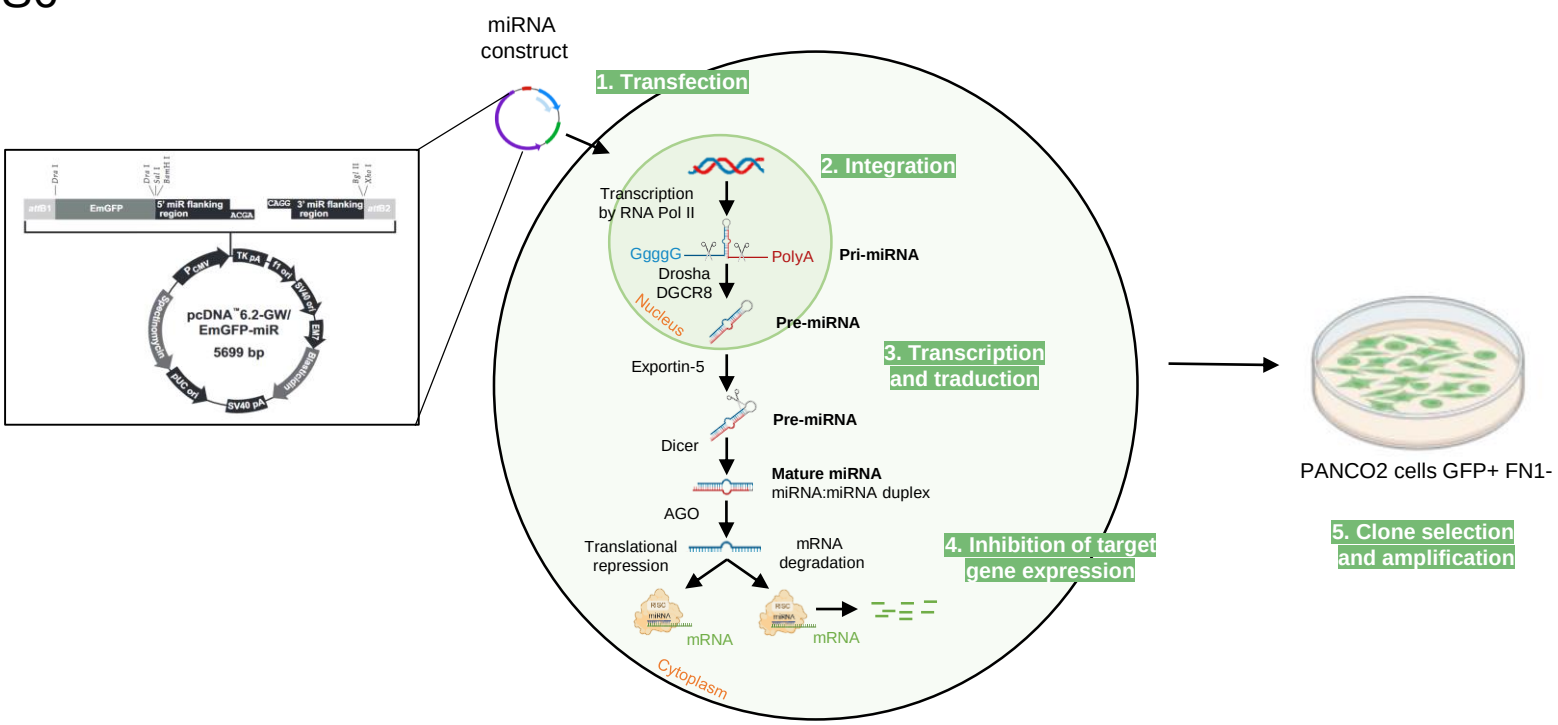


S5



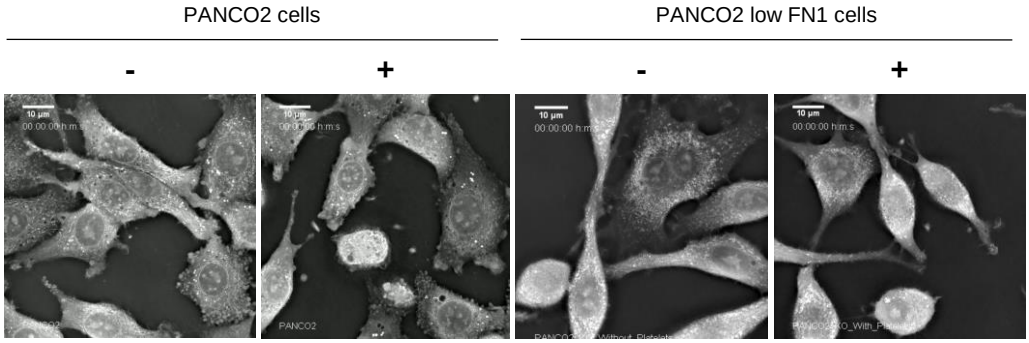
Hoechst ; GALNT3

S6



Supplementary figures

S7



Supplementary figures

(S1) Representative videos of three independent experiments of PANC-1 cells, in the presence (+) or in absence (-) of platelets over time up to 48 hours (holotomographic microscopy bars, 10 µm). **(S2)** Representative images of three independent experiments of PANC-1 cells in the presence (+) or absence (-) of platelets over time up to 48 hours (holotomographic microscopy bars, 100 µm). Segmentation was performed using "Standard Analysis" module, excluding platelets from the analysis. **(S3)** Representative images of three independent experiments of PANC-1 cells in the presence (+) or absence (-) of platelets over time up to 48 hours (holotomographic microscopy bars, 100 µm). Segmentation was performed using "Cell Death Assay" module, excluding platelets from the analysis. Colors represent live cells (green) or dead cells (yellow). **(S4)** Representative image of GALNT3 (75 kDa) detection by Western Blot in 50 µg of lysate of four different human pancreatic cancer cell lines. MCF7 cell line was used as positive control. Detection of GAPDH was used as a loading control for the experiment. **(S5)** Representative images of indirect GALNT3 (red) detection by immunofluorescence in two human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and Capan-2 using unconjugated anti-human GALNT3 antibody (2 µg/mL) and AF680-conjugated anti-sheep IgG secondary antibody (2 µg/mL) by immunofluorescence in BxPC-3 (bottom, left panel) or Capan-2 cells (bottom, right panel) compared to isotype control (2 µg/mL) revealed with AF680-conjugated anti-sheep IgG secondary antibody in both cases (top, all panels). Cell nuclei (blue) were stained with Hoechst. Images were taken with a 40X objective, 5 images per sample, bars 100 µm. These cell lines were then used as positive controls for GALNT3 expression. **(S6)** Using miRNA transfection, we generated a murine pancreatic cancer line that underexpress fibronectin, called PANCO2 low FN1 cells. **(S7)** Representative videos of three independent experiments of PANCO2 or PANCO2 low FN1 cells during 3 hours of interaction (+) or not (-) with platelets (bars 10 µm).

Supplementary materials and methods

Antibody	Supplier	Catalog No.
Mouse anti-human CD41, PC7	Beckman Coulter	#6607115
Rat anti-mouse GPIb, Dylight 649	Emfret	#X-649
Sheep anti-human GALNT3 primary antibody	Bio-techne	#AF7174
Sheep IgG Isotype Control	Thermofisher Scientific	#31243
Rabbit anti-human FN1 primary antibody	Cell Signaling Technology	#26836
Rabbit anti-mouse FN1 primary antibody	Abcam	#Ab199056
Rabbit anti-human and mouse GAPDH primary antibody	Cell Signaling Technology	#2118
Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody, Alexa Fluor Plus 647	Thermofisher Scientific	#A32733TR
Donkey anti-Sheep IgG secondary antibody, Alexa Fluor 680	Thermofisher Scientific	#A21102
Donkey anti-Sheep IgG secondary antibody, Alexa Fluor 488	Thermofisher Scientific	#A11015
Hoechst 33342	Thermofisher Scientific	#H1399

Table 1 : References of antibodies used

Lectin	Supplier	Catalog No.
VVL/VVA – Biotinylated	Glycomatrix	#21510196
ConA lectin – Biotinylated	Genetex	#GTX01504
AAL – Biotinylated	MyBioSource	#MBS656584
PHA-E – Biotinylated	Glycomatrix	#30330017
Streptavidin, Alexa Fluor 647	Thermofisher Scientific	#S21374

Table 2 : References of lectins used

References

1. Varki, A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* **110**, 1723–1729 (2007).
2. Levitan, N. *et al.* Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. *Medicine (Baltimore)* **78**, 285–291 (1999).
3. Khorana, A. A. Venous Thromboembolism and Prognosis in Cancer. *Thromb Res* **125**, 490–493 (2010).
4. Palacios-Acedo, A.-L. *et al.* Platelet and Cancer-Cell Interactions Modulate Cancer-Associated Thrombosis Risk in Different Cancer Types. *Cancers (Basel)* **14**, 730 (2022).
5. Tao, D. L., Tassi Yunga, S., Williams, C. D. & McCarty, O. J. T. Aspirin and antiplatelet treatments in cancer. *Blood* **137**, 3201–3211 (2021).
6. Palacios-Acedo, A. L. *et al.* P2RY12-Inhibitors Reduce Cancer-Associated Thrombosis and Tumor Growth in Pancreatic Cancers. *Frontiers in Oncology* **0**, 3536 (2021).
7. Stegner, D., Dütting, S. & Nieswandt, B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thrombosis Research* **133**, S149–S157 (2014).
8. Miyashita, T. *et al.* Metastasis-promoting role of extravasated platelet activation in tumor. *J Surg Res* **193**, 289–294 (2015).
9. Hinterleitner, C. *et al.* Platelet PD-L1 reflects collective intratumoral PD-L1 expression and predicts immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Nat Commun* **12**, 7005 (2021).
10. Li, R. *et al.* Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. *BMC Cancer* **14**, 167 (2014).
11. Plantureux, L. *et al.* The interaction of platelets with colorectal cancer cells inhibits tumor growth but promotes metastasis. *Cancer Research* **80**, 291–303 (2020).
12. Rodriguez-Martinez, A. *et al.* Exchange of cellular components between platelets and tumor cells: impact on tumor cells behavior. *Theranostics* **12**, 2150–2161 (2022).
13. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* **15**, 540–555 (2015).
14. Wandall, H. H. *et al.* The origin and function of platelet glycosyltransferases. *Blood* **120**, 626–635 (2012).
15. Kaiura, T. L. *et al.* The effect of growth factors, cytokines, and extracellular matrix proteins on fibronectin production in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Vascular Surgery* **31**, 577–584 (2000).
16. Glasner, A. *et al.* NKp46 Receptor-Mediated Interferon-γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity* **48**, 107-119.e4 (2018).
17. Hagiwara, T. *et al.* Regulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 and interleukin-6 in rat hepatocytes. *Am J Pathol* **136**, 39–47 (1990).
18. Bürger, A. *et al.* Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: Effects of PDGF and TGF-β on synthesis and splicing. *Kidney International* **54**, 407–415 (1998).
19. Kim, K. K., Sheppard, D. & Chapman, H. A. TGF-β1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, a022293 (2018).

20. Stone, R. L. *et al.* Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* **366**, 610–618 (2012).
21. Le Chapelain, O. & Ho-Tin-Noé, B. Intratumoral Platelets: Harmful or Incidental Bystanders of the Tumor Microenvironment? *Cancers (Basel)* **14**, 2192 (2022).
22. Munkley, J. & Elliott, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* **7**, 35478–35489 (2016).
23. Vajaria, B. N. & Patel, P. S. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J* **34**, 147–156 (2017).
24. Hussain, M. R. M., Hoessli, D. C. & Fang, M. N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget* **7**, 54067–54081 (2016).
25. Hall, M. K. *et al.* Limited N-Glycan Processing Impacts Chaperone Expression Patterns, Cell Growth and Cell Invasiveness in Neuroblastoma. *Biology (Basel)* **12**, 293 (2023).
26. Taniguchi, N. *et al.* True significance of N-acetylglucosaminyltransferases GnT-III, V and α1,6 fucosyltransferase in epithelial-mesenchymal transition and cancer. *Molecular Aspects of Medicine* **79**, 100905 (2021).
27. Yoshimura, M., Nishikawa, A., Ihara, Y., Taniguchi, S. & Taniguchi, N. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8754–8758 (1995).
28. Wu, Y. *et al.* B3GNT3 as a prognostic biomarker and correlation with immune cell infiltration in lung adenocarcinoma. *Ann Transl Med* **10**, 295 (2022).
29. Zhang, W., Hou, T., Niu, C., Song, L. & Zhang, Y. B3GNT3 Expression Is a Novel Marker Correlated with Pelvic Lymph Node Metastasis and Poor Clinical Outcome in Early-Stage Cervical Cancer. *PLoS One* **10**, e0144360 (2015).
30. Sun, J., Zhang, Z., Chen, J., Xue, M. & Pan, X. ELTD1 promotes invasion and metastasis by activating MMP2 in colorectal cancer. *Int J Biol Sci* **17**, 3048–3058 (2021).
31. Gobin, E. *et al.* A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer* **19**, 581 (2019).
32. Song, G. *et al.* TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *J Exp Clin Cancer Res* **35**, 148 (2016).
33. Tian, Z. *et al.* TIMP1 derived from pancreatic cancer cells stimulates Schwann cells and promotes the occurrence of perineural invasion. *Cancer Lett* **546**, 215863 (2022).
34. Wang, H. *et al.* FN1 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancers. *Front Oncol* **12**, 918719 (2022).
35. Li, J., Chen, C., Chen, B. & Guo, T. High FN1 expression correlates with gastric cancer progression. *Pathol Res Pract* **239**, 154179 (2022).
36. Chen, S. *et al.* SERPINE1 Overexpression Promotes Malignant Progression and Poor Prognosis of Gastric Cancer. *J Oncol* **2022**, 2647825 (2022).
37. Kim, W.-T. *et al.* Secretory SERPINE1 Expression Is Increased by Antiplatelet Therapy, Inducing MMP1 Expression and Increasing Colon Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* **23**, 9596 (2022).
38. 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*. *International Journal of Cancer* **136**, 462–475 (2015).
39. Pavón, M. A. *et al.* uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget* **7**, 57351–57366 (2016).

40. Zhu, Y. *et al.* MMP2/3 promote the growth and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via PI3K/Akt-NF-κB-mediated epithelial-mesenchymal transformation. *J Cell Physiol* **234**, 15847–15855 (2019).
41. Justilien, V. *et al.* Matrix metalloproteinase-10 is required for lung cancer stem cell maintenance, tumor initiation and metastatic potential. *PLoS One* **7**, e35040 (2012).
42. Würtz, S. Ø. *et al.* Plasma and serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are associated with prognosis in node-negative breast cancer: a prospective study. *Mol Cell Proteomics* **7**, 424–430 (2008).
43. Qiao, P. & Lu, Z.-R. Fibronectin in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1245**, 85–96 (2020).
44. Ahmed, N., Riley, C., Rice, G. & Quinn, M. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin Exp Metastasis* **22**, 391–402 (2005).
45. Li, C.-L. *et al.* Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain. *Oncol Lett* **13**, 3889–3895 (2017).
46. Knowles, L. M. *et al.* Integrin αvβ3 and fibronectin upregulate Slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer research* **73**, (2013).
47. Balanis, N. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition promotes breast cancer progression via a fibronectin-dependent STAT3 signaling pathway. *J Biol Chem* **288**, 17954–17967 (2013).
48. Park, J. & Schwarzbauer, J. E. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* **33**, 1649–1657 (2014).
49. Berrazouane, S. *et al.* Beta1 integrin blockade overcomes doxorubicin resistance in human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis* **10**, 1–13 (2019).
50. Amrutkar, M., Aasrum, M., Verbeke, C. S. & Gladhaug, I. P. Secretion of fibronectin by human pancreatic stellate cells promotes chemoresistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* **19**, 596 (2019).
51. Mandel, U. *et al.* Cancer-associated changes in glycosylation of fibronectin. Immunohistological localization of oncofetal fibronectin defined by monoclonal antibodies. *APMIS* **100**, 817–826 (1992).
52. Reis, J. S. D. *et al.* Increased expression of the pathological O-glycosylated form of oncofetal fibronectin in the multidrug resistance phenotype of cancer cells. *Matrix Biol* **118**, 47–68 (2023).
53. Hsiao, C.-T. *et al.* Fibronectin in cell adhesion and migration via N-glycosylation. *Oncotarget* **8**, 70653–70668 (2017).
54. Wang, R. *et al.* Role of transcriptional corepressor CtBP1 in prostate cancer progression. *Neoplasia* **14**, 905–914 (2012).
55. Stefanski, C. D. & Prosperi, J. R. Wnt-Independent and Wnt-Dependent Effects of APC Loss on the Chemotherapeutic Response. *Int J Mol Sci* **21**, 7844 (2020).
56. Petitjean, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**, 622–629 (2007).
57. Wang, D.-P. *et al.* High Expression of Interleukin-2 Receptor Subunit Gamma Reveals Poor Prognosis in Human Gastric Cancer. *J Oncol* **2021**, 6670834 (2021).
58. Zhang, C., Dang, D., Cong, L., Sun, H. & Cong, X. Pivotal factors associated with the immunosuppressive tumor microenvironment and melanoma metastasis. *Cancer Med* **10**, 4710–4720 (2021).

59. Ayars, M. *et al.* IL2RG, identified as overexpressed by RNA-seq profiling of pancreatic intraepithelial neoplasia, mediates pancreatic cancer growth. *Oncotarget* **8**, 83370–83383 (2017).
60. Phan, N. N. *et al.* Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett* **14**, 2059–2074 (2017).
61. McKerr, N. *et al.* CACNA1D overexpression and voltage-gated calcium channels in prostate cancer during androgen deprivation. *Sci Rep* **13**, 4683 (2023).
62. Wu, H.-H. *et al.* GNRH1 and LTB4R might be novel immune-related prognostic biomarkers in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). *Cancer Cell International* **21**, 354 (2021).
63. Andrusiewicz, M. *et al.* CGB and GNRH1 expression analysis as a method of tumor cells metastatic spread detection in patients with gynecological malignances. *J Transl Med* **9**, 130 (2011).
64. Song, Y. *et al.* GNRH family genes contributed to gender-specific disparity of bladder cancer prognosis through exerting opposite regulatory roles between males and females. *J Cancer Res Clin Oncol* **149**, 6827–6840 (2023).

1. L'expression des glycosyltransférases est modifiée dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes

Pour déterminer si le changement de masse sèche était dû à un transfert de matériel, c'est-à-dire de protéines, des plaquettes vers les cellules cancéreuses, nous nous sommes concentrés sur le transfert possible de glycosyltransférases (GT) entre les plaquettes et les cellules cancéreuses. En effet, les plaquettes ont été décrites comme exprimant et sécrétant des GT fonctionnelles[172]. Dans notre article original, nous nous sommes concentrés sur l'analyse de la famille GALNT, qui catalyse la première réaction de O-glycosylation et comprend 20 membres différents. Nous nous sommes également intéressés à la famille de GT qui est à l'origine de motifs extrêmement importants tels que l'antigène sialyl-Tn (sTn), qui est détecté dans les cancers métastatiques et notamment dans le cancer de la prostate[228]. Cette famille ST6GALNAC qui est constituée de 6 membres catalyse spécifiquement le transfert d'un résidu d'acide sialique en α-2,6 sur une GalNAc. De la même manière que pour la famille GALNT, nous avons observé un faible taux spécifique de catalyse de la famille ST6GALNAC dans les plaquettes lavées par rapport aux cellules cancéreuses (**Figure 1A**). Ces résultats indiquent que les plaquettes n'expriment pas de protéines GALNT mais aussi de ST6GALNAC fonctionnelles et, que nos observations pourraient s'étendre à d'autres familles de GT.

Nous avions ensuite étudié par qPCR la variation de l'expression des ARNm codant pour 43 familles de GT différentes dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes, en les comparant aux cellules cancéreuses non éduquées. Nous avons constaté une augmentation de 170% de l'expression de la famille B3GNT, incluant B3GNT2, B3GNT4 et B3GNT8, dans les cellules cancéreuses éduquées. Pour confirmer que cette augmentation n'était pas due à un transfert de matériel protéique des plaquettes vers les cellules cancéreuses, nous avons montré par cytométrie en flux que B3GNT8 était absente dans les plaquettes lavées par comparaison aux cellules cancéreuses (**Figure 1B**). Un résultat similaire a été obtenu pour B3GNT2 (résultats non montrés), renforçant l'idée que les plaquettes agissent de manière indirecte sur la composition des cellules cancéreuses.

2. Implication de la N-glycosylation dans la migration cellulaire

Nous avons souhaité évaluer l'importance de la N-glycosylation sur la migration des cellules cancéreuses. À cet effet, nous avons traité les cellules PANCO2 et PANCO2 low FN1 avec 1 µg/mL de Tunicamycine (inhibiteur de la N-glycosylation) pendant 24 heures. Une diminution drastique de la migration a été observée dans les deux lignées de cellules cancéreuses (**Figures 2A-B**). Il est essentiel de noter, que malgré l'effet de la Tunicamycine, les cellules PANCO2 low FN1 migrent toujours davantage que les cellules PANCO2, soulignant le rôle central de la FN1 dans ce processus (**Figures 2A-B**).

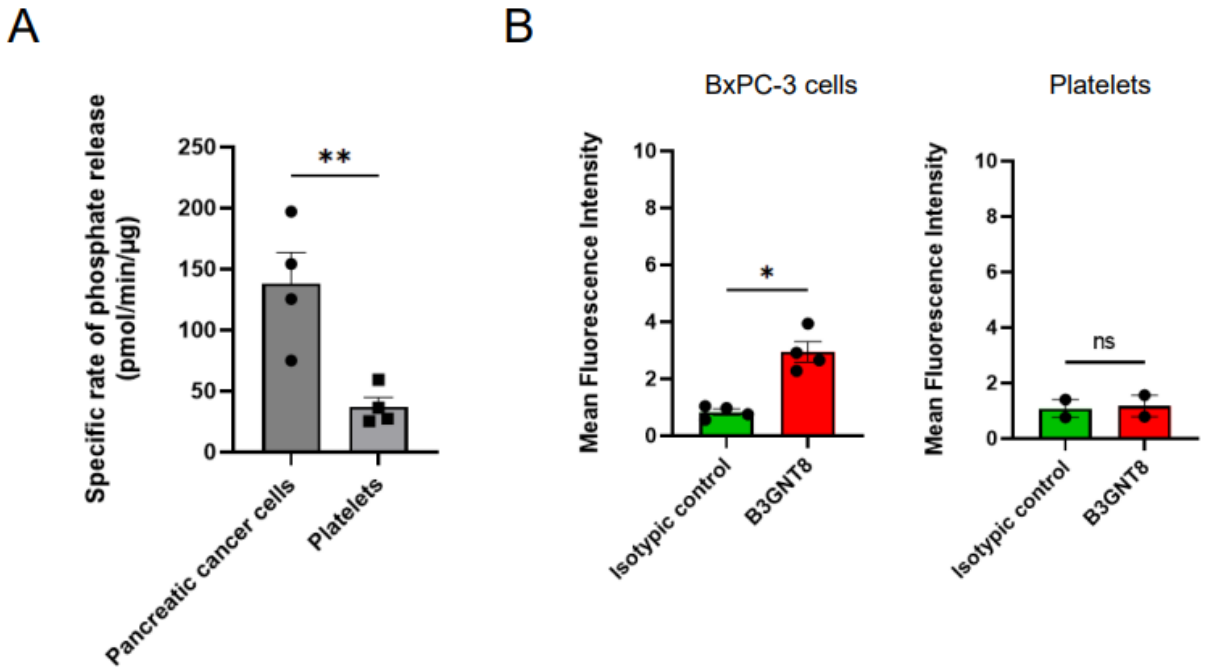
Nous avons également exploré si la présence de plaquettes pourrait stimuler la N-glycosylation dans les deux types de cellules cancéreuses, similairement à ce qui a été observé pour la FN1. Bien que nous ayons remarqué une tendance à l'augmentation de la migration, cette différence n'était pas statistiquement significative en présence ou en absence de plaquettes (**Figures 2A-B**). Une étude sur des temps plus prolongés (plus de 24 heures) pourrait nous permettre de conclure sur cette tendance à l'augmentation.

3. Signalisation intracellulaire des cellules cancéreuses éduquées

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes, nous avons évalué l'expression de cinq cytokines connues pour leur implication dans la production de la FN1 : TNF-α, l'IL-6, l'IFN-γ, l'EGF et le PDGF.

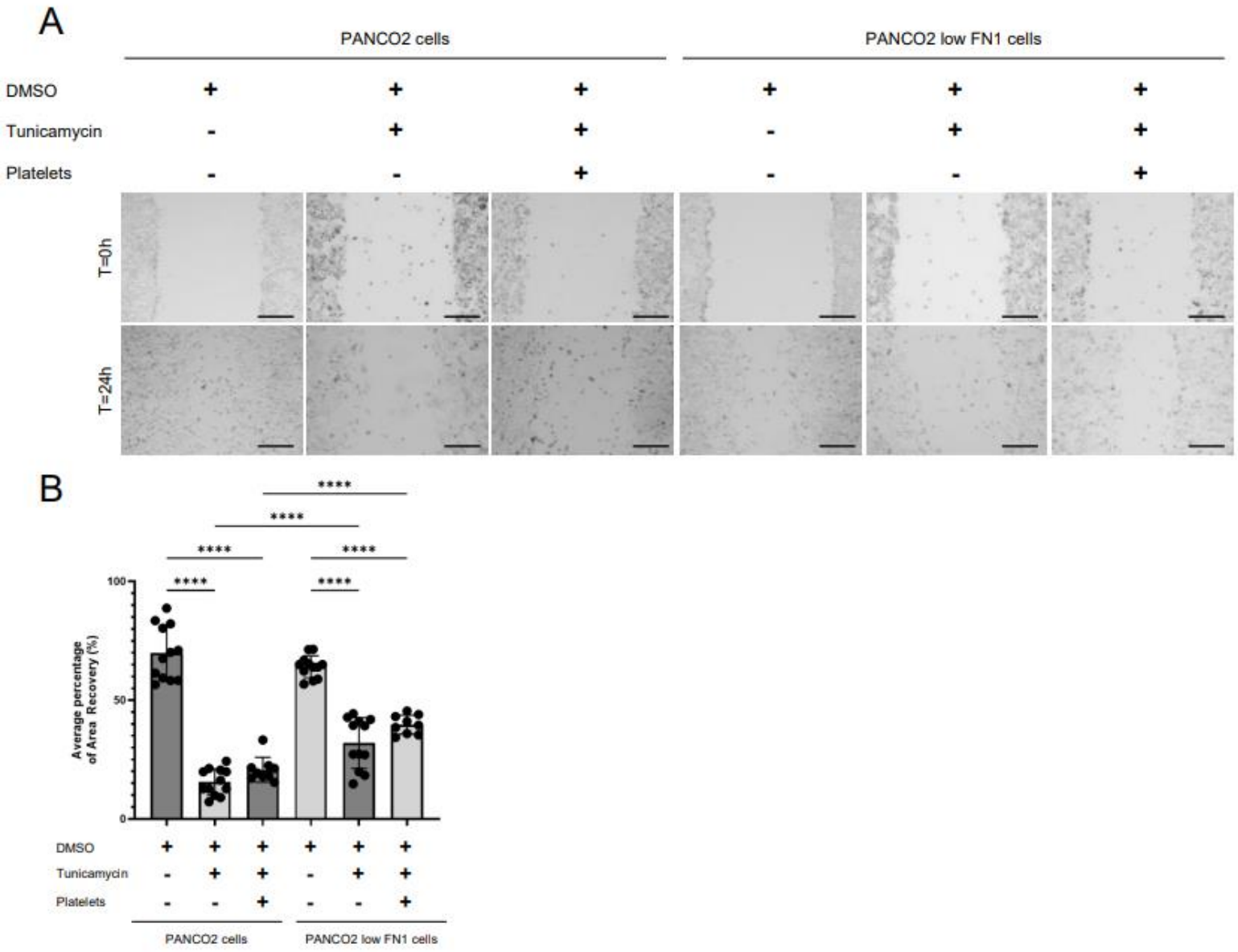
En parallèle à ces cinq cytokines d'intérêt, nous avons également examiné l'expression de seize autres cytokines (**Figures 3A/B**). Nous avons observé une augmentation de l'IL-10, MIP-1α, l'IL-1β, l'IL-2 et KC au cours des 24 premières heures suivant l'interaction des cellules PANCO2 low FN1 avec les plaquettes. Ces cytokines sont toutes impliquées dans des voies de signalisation aboutissant à la modulation des réponses immunitaires, la régulation de la croissance, la différenciation cellulaire ainsi que la coordination des interactions entre les cellules. Pour une sécrétion similaire de cytokines dans les deux types cellulaires non éduqués, nous avons mis en évidence que l'IL-10, MIP-1α, l'IL-1β, l'IL-2 et KC sont peu exprimées, voire, sous-exprimées dans les cellules PANCO2 éduquées (**Figures 3A/B**). Ces résultats suggèrent que l'effet de l'éducation des plaquettes varie selon la présence ou l'absence de FN1 dans les cellules cancéreuses, mettant en lumière l'importance de la FN1 dans ce processus.

Figure n°1 : L'expression des glycosyltransférases est modifiée dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes.



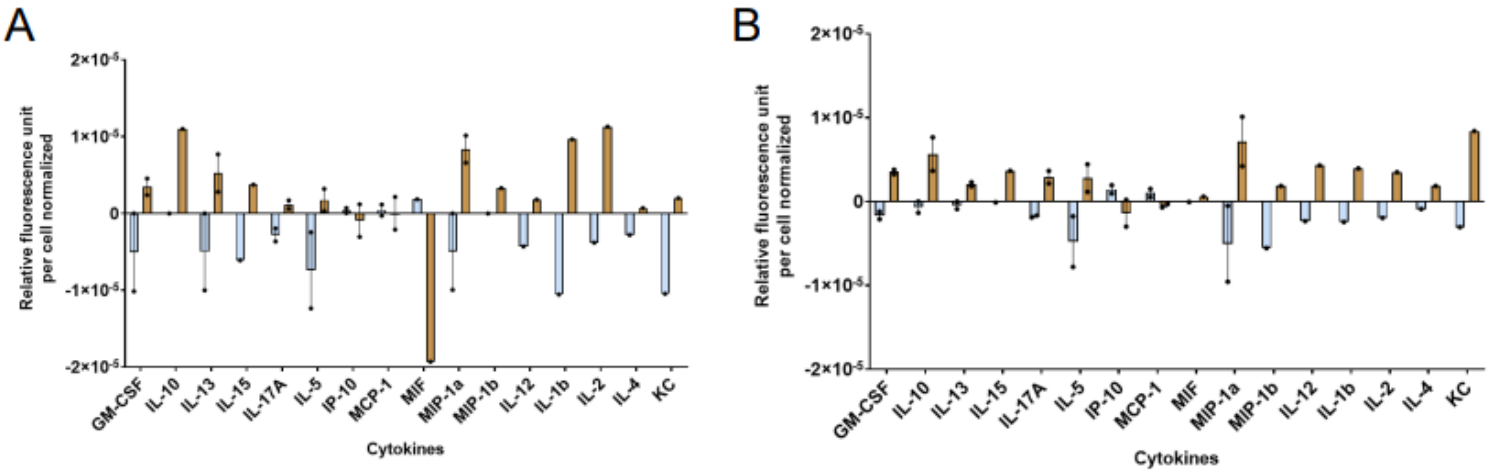
(A) Evaluation of ST6GALNAC family activity in pancreatic cancer cells (BxPC-3 and Capan-2) and in human platelets (three independent donors) using an indirect colorimetric glycosyltransferase activity assay. Graph depicts the mean value (+/- SEM) from three independent experiments of the rate of phosphate release corresponding to the specific activity of the ST6GALNAC family (including 6 members). T-test, **P=0.0093. **(B)** Quantification of B3GNT8 expression in BxPC-3 cells and in human platelets assessed by flow cytometry. Histogram shows mean fluorescence intensity (+/- SEM) from two or four independent experiments (Mann-Whitney test, *P<0.0286, ns = not significant).

Figure n°2 : Implication de la N-glycosylation dans la migration cellulaire.



(A) Representative images of nine to twelve independent experiments of wound healing assay experiments evaluating PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cell migration in different conditions over 24 hours (10X objective, bars 250 µm). **(B)** Graph depicts the mean percentage of area recovery (+/- SEM), from nine to twelve independent experiments, corresponding to the migration of PANCO2 mock or PANCO2 low FN1 cells, in different conditions (5 images per experiment and per well, ANOVA test, ****P<0.0001).

Figure n°3 : Signalisation intracellulaire des cellules cancéreuses éduquées.



(A-B) Evaluation of cytokine expression in PANCO2 mock (light blue) or PANCO2 low FN1 (brown) cells after 6 **(A)** or 24 hours **(B)** interaction with platelets using a multiplex ELISA workflow. Graphs represent the mean (+/- SEM) of relative fluorescence unit per cell, normalized to PANCO2 or PANCO2 low FN1 cells alone respectively, from three independent experiments.

DISCUSSION

Discussion, limites, perspectives et conclusion

A. Discussion des résultats

Plusieurs études ont montré que les plaquettes peuvent influencer le comportement des cellules cancéreuses en les éduquant, c'est-à-dire en leur transférant du matériel, que ce soit des lipides, des protéines ou des ARN[210,214]. En 2019, notre équipe a mis en évidence que les plaquettes étaient capables de libérer le contenu de leurs granules α dans les cellules cancéreuses, et de générer des MPs permettant le transfert de protéines adhésives d'un type cellulaire à un autre[214]. Cela ayant un impact sur leur phénotype. Dans la présente étude, nous avons voulu caractériser précisément les gènes et les protéines impliqués dans l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux enzymes responsables de la glycosylation des protéines, les glycosyltransférases (GT). Dans de nombreux cancers, plusieurs études ont montré que la dérégulation de l'expression des GT conduit à une glycosylation aberrante avec une surexpression, une délétion ou une troncation de structures glucidiques spécifiques, ce qui peut modifier le comportement des cellules cancéreuses[70,229,230]. Les modifications de la glycosylation sont même devenues une caractéristique du cancer au fil des ans[117,231]. De manière intéressante, Wandall *et al.*, ont démontré en 2012 que les plaquettes seraient capables de sécréter ou d'exprimer des GT fonctionnelles et des nucléotides-ose associés à leur surface, ce qui leur permet de glycosyler des molécules extracellulaires (protéines ou lipides)[172]. Nous avons donc émis l'hypothèse que **les plaquettes puissent transférer directement des GT aux cellules cancéreuses ou moduler la glycosylation de leurs protéines au cours de leur interaction, ce qui pourrait altérer le phénotype de ces dernières.**

Parmi les GT mises en évidence par Wandall *et al.* : GALNT1, GALNT2 et GALNT3, membres de la famille des UDP-N-α-D galactosamine:polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférases (**GALNT**) (**Figure n°14**)[172,232]. Ces enzymes initient la O-glycosylation en ajoutant une N-acétylgalactosamine (GalNAc) à un résidu de sérine (Ser) ou de thréonine (Thr) d'une protéine de type mucine pour former l'antigène Thomsen-nouvelle (Tn) (GalNAc-Ser/Thr), un motif glucidique associé aux tumeurs[233,234]. La famille GALNT comprend 20 membres, de GALNT1 à 14 et de GALNTL1 à L6[233]. L'altération de la O-glycosylation induite par les GALNT peut influencer plusieurs processus biologiques tels que la progression, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses[232,235]. Cependant, dans nos mains, l'expression protéique et fonctionnelle des GALNT dans les plaquettes est quasiment indétectable.

Étant donné que les plaquettes ont été décrites comme source de sialyltransférases, nous avons également évalué la fonctionnalité de la famille ST6 N-acétylgalactosaminide α-2,6-sialyltransférase (**ST6GALNAC**) (**Figure n°14**)[172,173]. Cette famille, composée de 6 membres allant de ST6GALNAC1 à 6, catalyse spécifiquement le transfert d'un résidu d'acide sialique en α-2,6 sur une GalNAc, formant ainsi des motifs glucidiques tels que l'antigène sialyl-Tn (sTn), un O-glycane tronqué. Celui-ci est généralement observé à des stades avancés du cancer, notamment dans le cancer de la prostate, du sein ou du poumon[228,236,237]. Toutefois, nos résultats suggèrent que les différentes ST6GALNAC ne sont pas fonctionnelles dans les plaquettes, ce qui corrobore nos résultats obtenus précédemment.

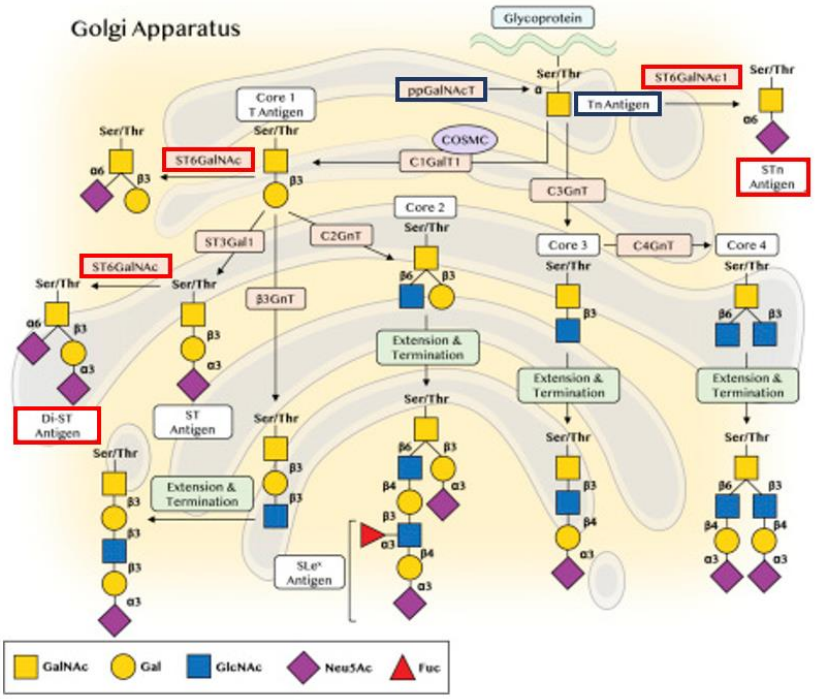


Figure n°14 : Liaison(s) glucidique(s) catalysée(s) par les familles **GALNT** (bleu foncé) et **ST6GALNAC** (rouge)

Adaptation - "The role of O-glycosylation in human disease", Magalhães et al., Molecular Aspects of Medicine (2021)

Il est important de noter que nous avons également tenté de détecter par Western Blot la présence de GALNT1, GALNT2, ST3Gal1 et B4GALT1, les GT identifiées dans les plaquettes selon les travaux de Wandall *et al.* Néanmoins, malgré nos multiples essais, nous n'avons pas réussi à les mettre en évidence. Cela peut s'expliquer de différentes manières.

D'une part, les plaquettes humaines lavées ont été préparées de manière légèrement différente. Dans leur étude, Wandall et ses collègues ont employé la prostacycline E1 (PGE1), tandis que nous avons opté pour l'utilisation de la prostacycline (PGI2) afin de prévenir l'activation plaquettaire. Même si ces deux substances ont des effets antiplaquettaires, la PGI2 est généralement considérée comme plus efficace pour inhiber l'activation des plaquettes que la PGE1. Cela pourrait ainsi influencer la composition moléculaire des plaquettes.

D'autre part, nous avons employé des tests d'activité différents. Traditionnellement, la méthode radioactive, qui utilise des isotopes radioactifs pour marquer les substrats ou les produits des réactions catalysées par les GT, est considérée comme la technique de référence. Wandall *et al.* ont, par exemple, utilisé des donneurs nucléotide-ose marqués au carbone-14 (^{14}C) pour suivre et quantifier l'activité des GT. Cependant, ce n'est que très récemment, grâce aux avancées technologiques, que des tests sans utilisation de radioactivité ont été développés, notamment les tests colorimétriques. Dans notre étude, le test que nous avons utilisé repose sur la capacité de la nucléotidase ENTPD3/CD39L3 à catalyser l'hydrolyse du phosphate inorganique du donneur (phosphonucléotide-ose), processus qui se produit uniquement si l'ose a été ajouté à l'accepteur par les GT. La présence de ce phosphate inorganique est ensuite détectée grâce à l'ajout de la Malachite Green. Ces deux méthodes diffèrent considérablement et

présentent chacune leurs avantages et inconvénients. Les méthodes utilisant la radioactivité pour évaluer l'activité des GT sont connues pour leur sensibilité élevée, leur précision dans la quantification des substrats et des produits marqués, ainsi que leur capacité à suivre en temps réel les réactions enzymatiques. Cependant, elles comportent des inconvénients majeurs liés à la sécurité en raison de l'utilisation de matières radioactives, à la gestion complexe et coûteuse des déchets radioactifs et à la courte durée de vie de certains isotopes. De plus, selon les conditions expérimentales, leur sensibilité accrue peut générer un bruit de fond assez élevé. D'autre part, les méthodes utilisant la colorimétrie offrent une facilité d'utilisation, un coût moindre et une sécurité accrue. Cependant, elles peuvent présenter une sensibilité variable, ce qui peut rendre difficile la détection de changements subtils.

En dernier lieu, les anticorps employés pour détecter la présence des GT *via* la technique du Western Blot diffèrent également. Wandall et ses collègues ont utilisé des anticorps conçus en laboratoire, tandis que nous avons opté pour différents anticorps commerciaux. Ainsi, les épitopes spécifiques reconnus par ces anticorps peuvent varier, ce qui pourrait expliquer les différences observées dans l'ensemble des résultats.

Ainsi, l'hypothèse d'un transfert direct de GT des plaquettes vers les cellules cancéreuses ou de la glycosylation des protéines des cellules cancéreuses par les plaquettes semble peu probable puisque les GT ne sont pas exprimées dans les plaquettes. Cependant, nous avons mis en évidence une augmentation de la masse sèche totale des cellules cancéreuses en présence de plaquettes, traduisant une modification de leurs compositions.

Par conséquent, à notre connaissance, nous sommes les premiers à décrire que l'interaction des cellules cancéreuses avec les plaquettes induit un changement dans le transcriptome même des cellules cancéreuses. Plus précisément, nous avons observé des variations dans l'expression des ARNm codant pour 43 familles de GT différentes, dont la moitié était surexprimée (de 0 à 170%) et l'autre moitié sous-exprimée (de 0 à -25%) dans les cellules cancéreuses éduquées. Parmi les familles de GT les plus surexprimés figurent MGAT2, MGAT3 et B3GNT. Celles-ci ont un rôle important dans la N- et la O-glycosylation (**Figure n°15**). En effet, **MGAT2**, aussi appelée GnT-II (N-acétylglucosaminyltransférase II), catalyse l'addition d'une GlcNAc en position β1-2 sur un mannose, positionné en α1-6 au sein des N-glycanes complexes et hydrides. En revanche, **MGAT3**, ou GnT-III (N-acétylglucosaminyltransférase III), qui fait partie de la même famille que MGAT2, effectue l'ajout d'une GlcNAc en position β1-4 sur le mannose, qui est en position β1-4 central sur le core pentasaccharidique commun des N-glycanes complexes et hydrides. Il en découle la formation de N-glycanes particuliers appelés « N-glycanes bissectés », ce qui empêche l'ajout de sucres supplémentaires sur cette branche. Concernant la famille **B3GNT** (β-1,3-N-acétylglucosaminyltransférases), nous avons particulièrement ciblé B3GNT2, B3GNT4 et B3GNT8, qui ajoutent un résidu GlcNAc en position β-1,3 sur un résidu Gal d'un N-glycane complexe ou hydride ou d'un O-glycane. Ces GT agissent en synergie avec les B4GALTs (β-1,4-galactosyltransférase) pour former une structure appelée Poly-N-acetyllactosamine (Poly-LacNAc). Celle-ci se caractérise par en enchaînement de GalNAc lié à Glc par une liaison β1-4 et, elle est impliquée dans

plusieurs processus biologiques comme la régulation de l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire ainsi que la reconnaissance moléculaire et les interactions protéine-protéine.

Ainsi, la dérégulation de ces trois familles de GT peut avoir un impact significatif sur la progression du cancer. À titre d'exemple, la surexpression de **MGAT2** (GnT-II) dans les neuroblastomes augmente les structures de N-glycanes, ce qui favorise la prolifération et l'invasion des cellules[238]. En revanche, la dérégulation de **MGAT3** (ou GnT-III), observée dans le cancer du sein et le mélanome, peut inhiber la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules cancéreuses et donc supprimer la formation de métastases[91,239]. Enfin, **B3GNT3** est associée positivement à l'infiltration de cellules immunitaires dans l'adénocarcinome pulmonaire et au processus métastatique des ganglions lymphatiques pelviens chez les patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus[240,241].

L'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes induit donc l'augmentation de l'expression des GT, qui participent à la modification du phénotype des cellules cancéreuses.

Pour aller plus loin, il serait intéressant d'explorer si les changements d'expression des GTs dans les cellules cancéreuses sont attribuables à un contact direct avec les plaquettes ou s'ils résultent plutôt d'une interaction indirecte. Une stratégie envisageable serait de comparer nos observations actuelles avec celles issues de l'exposition des cellules cancéreuses aux surnageants générés suite à leur interaction avec les plaquettes. Nous pourrions également utiliser un modèle de co-culture à compartiments séparés, tel que la chambre de Boyden, qui permettrait de maintenir une séparation physique entre les cellules cancéreuses et les plaquettes, tout en leur permettant de communiquer à distance. De plus, étant donné que les plaquettes sont une source majeure de microparticules (MPs), il serait intéressant d'évaluer l'effet des MPs plaquettaires sur le transcriptome des cellules cancéreuses.

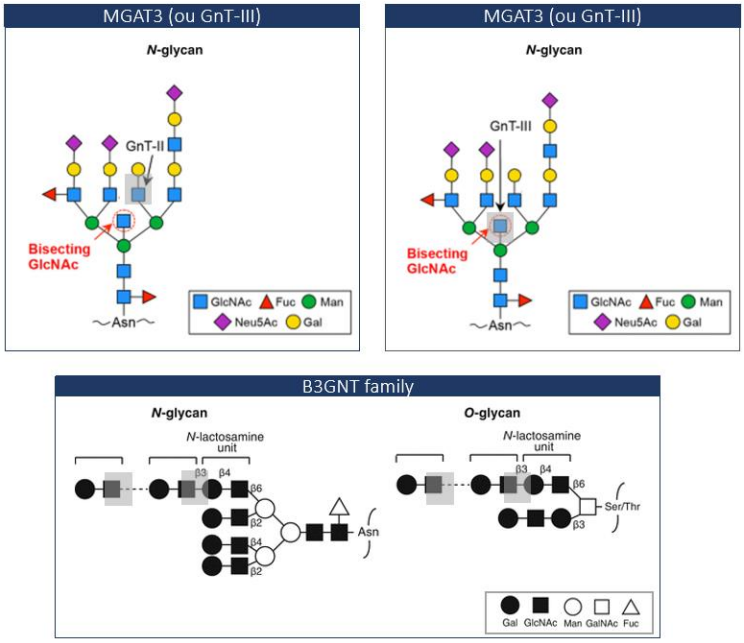


Figure n°15 : Liaison(s) glucidique(s) catalysée(s) par les 3 familles de GT d'intérêt (encadrés gris)

Pour visualiser les modifications d'activité des GT entre les cellules éduquées et non éduquées, nous avons étudié leur profil glucidique global grâce à quatre lectines différentes (VVL/VVA, AAL, ConA et PHA-E). Ces lectines nous ont permis de cibler des motifs glucidiques connus comme essentiels dans le processus tumoral et sont décrits en **figure n°16**.

Dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes, nous avons observé une diminution de l'expression de l'antigène Tn, reconnu par VVL/VVA, et une augmentation de la fucosylation terminale, révélée par AAL. Cela suggère que l'interaction avec les plaquettes entraîne plutôt une élongation de la O-glycosylation sur les protéines présentes dans les cellules cancéreuses, notamment *via* l'ajout de résidus fucoses puisqu'il y a une réduction de l'antigène Tn, caractéristique des O-glycanes immatures et tronqués. La fucosylation anormale est une caractéristique de la transformation maligne des cellules et, elle est associée à la prolifération, l'invasion, la formation de métastases, l'échappement immunitaire et la sensibilité aux traitements[242]. En effet, les fucosyltransférases (FUTs) sont impliquées dans la formation de motifs glucidiques tels que les antigènes SLe^X qui ont la capacité de se lier aux sélectines-E exprimées par les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'extravasation des cellules cancéreuses[243,244]. Récemment, Cao *et al.*, ont mis en évidence que FUT11 pourrait servir de nouveau biomarqueur pour le cancer gastrique, car elle module la prolifération et la migration des cellules de cancer gastrique *via* la voie de signalisation PI3K/AKT[245]. Par conséquent, les plaquettes pourraient provoquer des altérations dans la glycosylation des protéines des cellules cancéreuses, les rendant potentiellement plus agressives.

Afin de compléter cette étude et, en tenant compte, des résultats précédents révélant la surexpression des familles de GT, MGAT2, MGAT3 et B3GNT dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes, nous pourrions regarder les changements de motifs glucidiques en utilisant les lectines *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (PHA-L) ou *Lycopersicon esculentum* (LEL/LEA) (**Figure n°16**). En effet, PHA-L détecte plus spécifiquement les motifs glucidiques résultant de l'action de la MGAT2, quant à LEL/LEA, elle reconnaît la structure Poly-LacNAC dont la formation est catalysée par la famille B3GNT[246]. Cependant, nous avions utilisé la lectine PHA-E, spécifique notamment des N-glycanes bissectés générés par MGAT3, mais cela n'a pas révélé de modifications significatives dans la composition glucidiques des protéines des cellules cancéreuses suite à leur interaction avec les plaquettes[246]. Cela peut s'expliquer notamment par la durée de l'interaction, qui était de 3 heures dans notre étude. En effet, le laps de temps entre la transcription de l'ADN en ARNm et sa traduction en protéine varie sensiblement selon les conditions cellulaires, la nature des protéines ainsi que les besoins spécifiques de la cellule. Ainsi, bien que cette durée soit utilisée dans notre étude, elle pourrait potentiellement être trop brève pour permettre une observation précise de l'effet de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes sur les motifs glucidiques des protéines présentes au sein des cellules cancéreuses. Il serait alors intéressant de reproduire cette expérience et d'examiner, par exemple, les changements survenant 24 à 48 heures après le début de l'interaction entre les plaquettes et les cellules cancéreuses.

Nous avions également mis les cellules cancéreuses et les plaquettes en interaction dans un milieu dépourvu de sérum de veau fœtal. Ce sérum, riche en facteurs de croissance, nutriments et protéines, pourrait contenir des molécules bioactives pouvant potentiellement influencer l'activité, la fonction ou la survie des plaquettes ; ce que nous souhaitions éviter. Toutefois, les résultats obtenus peuvent par ailleurs être expliqués par son absence dans le milieu, puisque les cellules cancéreuses, privées de cet élément, présentent une croissance plus lente et peuvent nécessiter plus de temps pour s'adapter aux nouvelles conditions de culture.

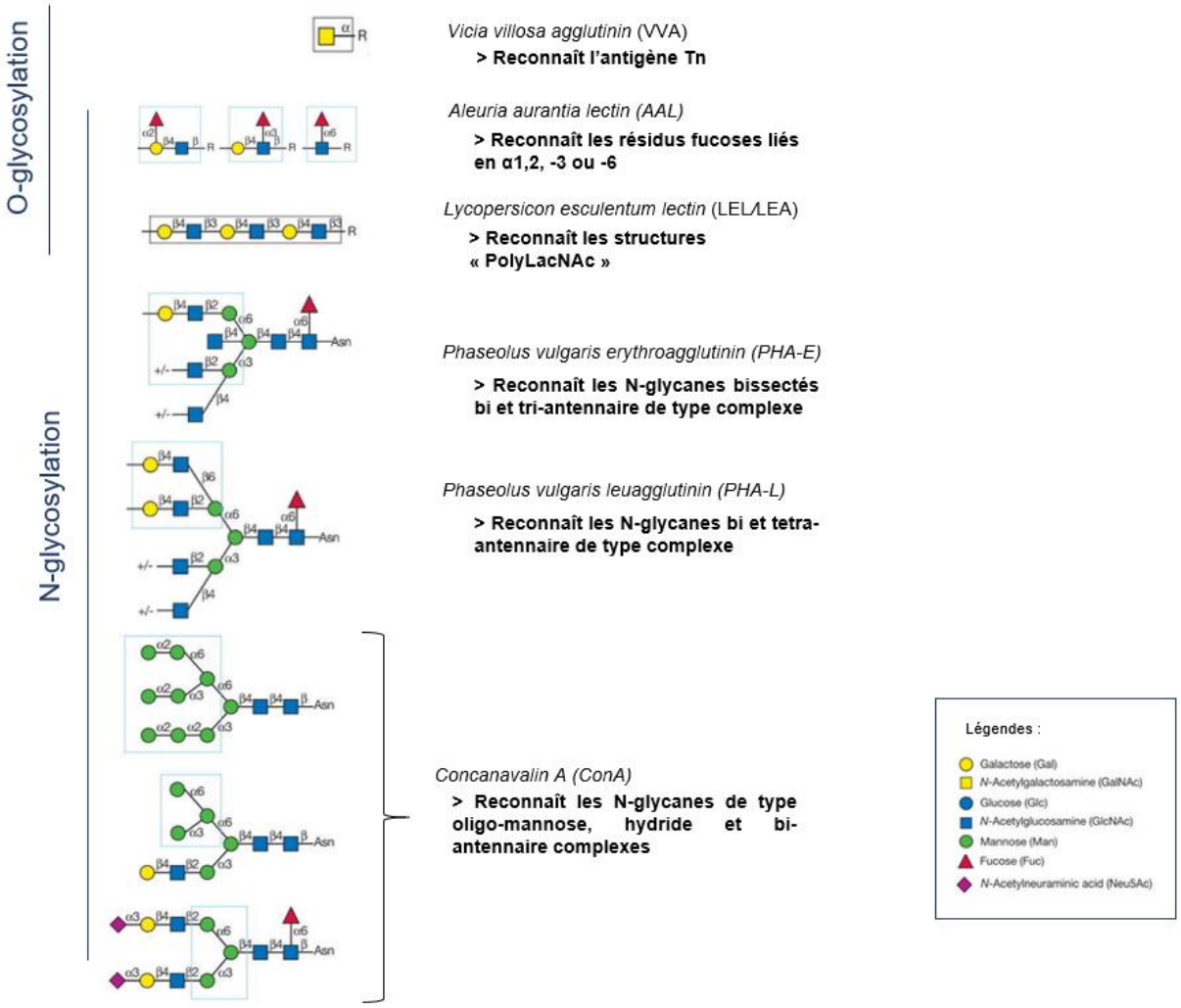


Figure n°16 : Spécificités des différentes lectines utilisées

Adaptation – "Antibodies and Lectins in Glycan Analysis", Essentials of Glycobiology, Richard D Cummings and Marilynn E Etzler (2009)

Nous avons ensuite étendu cette étude à 124 gènes supplémentaires, codant pour des protéines inflammatoires et métastatiques. Nous avons constaté que tous étaient surexprimés (de 8 % à 358 %) dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes par rapport aux cellules cancéreuses non éduquées.

Les gènes les plus surexprimés sont ceux connus pour leur implication dans le processus métastatique, tels que **SERPINE1**, **MMP2** et **10**, **TIMP1** et **FN1**[247–256].

Le gène **SERPINE1** code pour PAI-1 dont le rôle, comme introduit précédemment, consiste à inhiber l'activité du complexe formé par le t-PA et l'u-PA. Ces activateurs sont essentiels pour convertir le plasminogène en plasmine, une enzyme clé dans la dissolution des thrombi durant la fibrinolyse qui permet de réguler la thrombose[257]. En effet, la plasmine dégrade la fibrine nécessaire au maintien et à la stabilité du thrombus. Par conséquent, la surexpression de la SERPINE1 peut entraîner une inhibition accrue de ces activateurs du plasminogène, induisant la persistance des thrombi dans la circulation sanguine et, augmentant le risque de thrombose veineuse. Cela a notamment été rapporté dans le cas du cancer du pancréas et participe au phénomène de CAT[258]. Outre son rôle dans la fibrinolyse, la plasmine participe au remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). Ainsi, dans le contexte du cancer, elle favorise la dégradation de la MEC et la migration des cellules cancéreuses, ce qui nous laisse penser que la SERPINE1, au contraire, exercerait un effet anti-métastatique en inhibant l'activité du complexe uPA/uPAR[255]. Cependant, plusieurs études ont rapporté que son expression est liée à un mauvais pronostic et à un risque accru de métastases[259]. Cette association s'explique par le fait que SERPINE1 agit non seulement par le biais du système d'activation du plasminogène, mais aussi *via* diverses voies de signalisation indépendantes[255]. En effet, elle peut interagir avec différents composants de la MEC, l'héparine et le LRP1[257]. Par exemple, Langlois *et al.*, ont démontré que l'interaction de la SERPINE1 avec LRP1 stimule la voie ERK et inhibe les voies dépendantes de JNK, maintenant ainsi la capacité invasive des cellules cancéreuses[260]. Chen *et al.*, ont également montré que la SERPINE1 peut réguler l'expression du VEGF et de l'IL-6 par le biais des voies de signalisation du VEGF et de JAK-STAT3, influençant l'invasion et la migration des cellules de cancer gastrique[253]. Outre son implication dans le processus métastatique, la SERPINE1, joue un rôle dans la croissance tumorale, la TEM, le caractère souche des cellules cancéreuses et contribue à la résistance aux traitements anticancéreux[255].

Les **MMP2 et 10** appartiennent à une famille d'enzymes endopeptidases zinc-dépendantes qui participent au remodelage de la MEC. Leur activité est cruciale dans la croissance tumorale et le processus métastatique, car elles agissent à plusieurs niveaux tels que la dégradation protéolytique de la MEC, l'altération des interactions cellule-cellule et cellule-MEC, la migration et l'angiogenèse[261,262]. Zhu *et al.* ont mis en évidence que les MMP2/3 favorisent la croissance et la migration du carcinome épidermoïde laryngé *via* la TEM médiée par PI3K/Akt-NF-κB[263]. Justilien *et al.* ont montré qu'il existait une forte corrélation positive entre l'expression de MMP10 et le comportement métastatique des cellules cancéreuses[264]. Et pour cause, MMP10 serait nécessaire au maintien d'une population de cellules souches hautement tumorigènes, permettant l'initiation tumorale et la formation de métastases dans le cancer du poumon[264].

L'inhibiteur tissulaire des MMPs, **TIMP1**, est également impliqué dans la formation de métastases et, sa surexpression peut être observée en réponse à celles des MMP. Son rôle essentiel dans la prolifération des métastases a été mis en évidence par Song *et al.*, grâce à la suppression de TIMP1 dans le cancer colorectal. Cette délétion a été associée à une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses *via* les voies de signalisation spécifiquement régulées par TIMP1, comme FAK-PI3K/AKT et MAPK[249]. De plus, TIMP1 est capable d'activer les neutrophiles dans les tissus tumoraux dérivés de patients ayant un cancer pancréatique[265]. Schoeps *et al.*, ont ainsi mis en évidence que TIMP1, en se liant à son récepteur CD63, active la voie de signalisation ERK, ce qui déclenche la libération de « Neutrophils Extracellular Traps » (NETs)[265]. Les neutrophiles et les NETs jouant un rôle important dans le développement du cancer et la formation des métastases (**Annexe n°1**). Outre son rôle pro-métastatique, TIMP1 participe à la prolifération cellulaire et la résistance aux traitements[266,267].

Nous avons opté pour la **FN1** comme modèle d'étude pour la suite de nos travaux. Ce choix s'explique par le fait que la FN1 est une protéine hautement glycosylée qui joue un rôle crucial dans l'adhésion et la migration cellulaire. Des études ont démontré son implication dans la croissance tumorale, la formation de métastases et la chimiorésistance dans le microenvironnement tumoral (MET)[268]. Sa capacité à se lier aux intégrines, comme l'intégrine αvβ1, déclenche les voies de signalisation Akt et Ras favorisant la prolifération cellulaire[269]. Plusieurs études ont aussi montré que la FN1 peut activer diverses voies de signalisation telles que la kinase d'adhésion focale (FAK), le facteur de transcription à doigt de zinc lié à SNAIL (SLUG), le transducteur de signal et activateur de transcription 3 (STAT3) et ERK/MAP induisant la TEM et augmentant le potentiel métastatique des cellules cancéreuses[268,270–273]. La FN1 confère également une résistance aux traitements chimiothérapeutiques, un aspect observé notamment dans les cancers digestifs, en particulier dans le cancer du pancréas. Berrazouane *et al.* ont identifié que la FN1 peut activer les intégrines α5β1 et α4β1, ce qui permet aux cellules cancéreuses d'expulser les chimiothérapies, comme la Doxorubicine, de leur cytoplasme *via* le transporteur de médicaments ABCC1[274]. Ce mécanisme de transport leur confère la capacité de survivre et de se développer même lorsqu'elles sont exposées à de fortes doses de chimiothérapie[274].

Dans notre étude, nous avons montré que la FN1 ne contribue pas à la mort cellulaire, mais que sa surexpression dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes réduit leur migration. Étant donné l'implication de la FN1 dans l'adhésion cellulaire, il serait pertinent d'approfondir ces conclusions en comparant les capacités d'adhésion des cellules PANCO2 et des cellules PANCO2 sous-exprimant la FN1, appelées « PANCO2 *low* FN1 ». À cette fin, des essais d'adhésion *in vitro* sont disponibles pour explorer la capacité d'adhésion de ces cellules à des substrats adhésifs spécifiques tels que la BSA, la fibronectine ou le collagène[275]. Ces tests impliquent le marquage des cellules adhérentes avec du cristal violet ou de la fluorescence (DAPI…), par exemple, pour les compter et les analyser. Pour mimer la circulation sanguine, la culture cellulaire en flux pourrait être utilisée afin de comparer l'adhésion des cellules cancéreuses PANCO2 et PANCO2 *low* FN1 aux cellules endothéliales. Cela pourrait révéler si l'effet de la surexpression de la FN1 dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes est

plutôt anti-métastatique ou pro-métastatique, selon que l'interaction se produise dans le microenvironnement tumoral ou la circulation sanguine.

Nous avons également démontré que les plaquettes peuvent induire la transcription de la FN1 dans les cellules cancéreuses. En effet, nous avons observé que le phénotype des cellules PANCO2 *low* FN1 en présence de plaquettes est similaire à celui des cellules cancéreuses de "type sauvage" non éduquées. Ces constatations ont été confirmées au niveau protéique avec une augmentation de 70% de l'expression de la FN1 48 heures après l'interaction des PANCO2 *low* FN1 avec les plaquettes. Nos résultats suggèrent que le mécanisme impliqué dans ce processus semble être régulé par des cytokines telles que l'EGF, le PDGF, le TNF-α, l'IFN-γ ou l'IL-6 (**Figure n°17**). Ces cytokines sont toutes reconnues pour leur participation dans la production de FN1, et ce, *via* différentes voies de signalisation, telles que les voies MAPK/PI3K/Akt, STAT3 ou JAK/STAT1[276–280]. Une compréhension approfondie des mécanismes moléculaires sous-jacents à la production de FN1 nécessite une exploration détaillée des voies de signalisation spécifiques. Pour atteindre cet objectif, des approches pharmacologiques d'inhibition de la voie de signalisation présumée impliquée pourraient être envisagées, de même que la réduction de l'expression d'un composant clé de la voie de signalisation à l'aide de techniques telles que l'ARNi (knockdown) ou le CRISPR-Cas9 (knockout). Une autre possibilité serait de stimuler sélectivement la voie de signalisation d'intérêt, soit en administrant des agonistes spécifiques, soit en induisant la surexpression contrôlée de ses composants. L'observation des effets de ces manipulations sur la production de FN1 offrirait une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à ce processus.

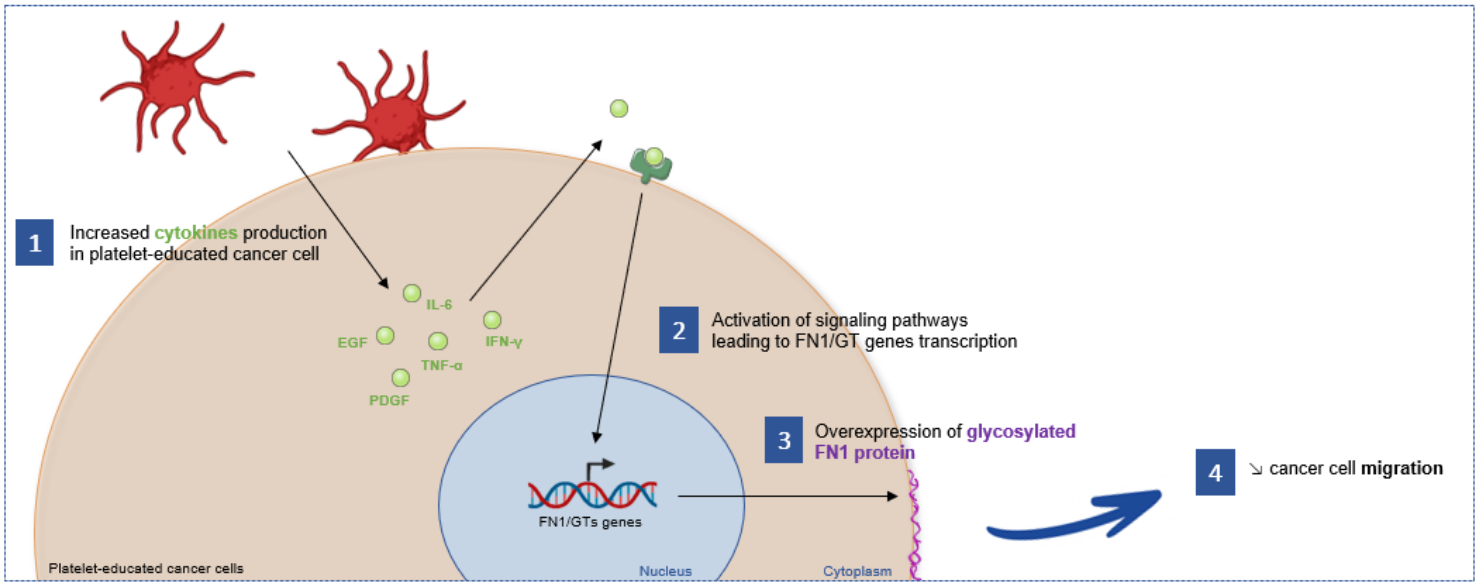


Figure n°17 : Schéma récapitulatif montrant l'effet de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes sur la production de FN1

Dans notre étude, nous avons montré qu'il y a une augmentation de la production de cytokines dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes. Ces cytokines, telles que l'EGF, le TNF-α, l'IFN-γ, le PDGF et l'IL-6, sont capables d'activer les voies de signalisation impliquées dans la transcription de la FN1. Cela conduit finalement à une surexpression de la protéine FN1 glycosylée. Il en résulte une diminution de la migration des cellules cancéreuses.

En plus des cytokines participant à la production de la FN1, nous avons également noté une augmentation de l'**IL-10**, de **MIP-1α**, de l'**IL-1β**, de l'**IL-2** et de la **KC**, dans les cellules PANCO2 low FN1 au cours des premières 24 heures suivant leur interaction avec les plaquettes. Chacune de ces cytokines est impliquée dans différents aspects du cancer.

Par exemple, l'**IL-10** est connue pour son rôle immunosuppresseur et contribue à la promotion du caractère souche des cellules, notamment dans le cancer de l'ovaire *via* la voie de signalisation NF-κB[281].

La protéine inflammatoire des macrophages 1α (**MIP-1α**) ou CCL3, exerce à la fois des effets pro- et anti-tumoraux[282]. D'une part, il a été montré que cette cytokine favorise le développement tumoral dans la carcinogenèse orale en induisant des voies de signalisation pro-inflammatoires et pro-angiogénique et en recrutant des éosinophiles. D'autre part, des études ont révélé que le Docetaxel, un agent anti-néoplasique, induit la sécrétion de CCL3, laquelle polarise les macrophages vers un phénotype de type M1 (pro-inflammatoire) pour faciliter la phagocytose des cellules cancéreuses[283,284].

L'**IL-1β** est associée à l'inflammation chronique et peut contribuer à la croissance tumorale, la dissémination et la formation de métastases, en particulier dans le cancer du sein[285]. L'IL-2, essentielle pour l'activation des cellules T, est une cible dans les immunothérapies contre le cancer[286]. Elle active la voie de signalisation JAK-STAT et dans le traitement du cancer du rein avancé, elle permet de stimuler le système immunitaire afin d'augmenter la réponse antitumorale[287].

Enfin, **KC** ou CXCL1 est impliquée dans la progression de la maladie et la formation de métastases. L'étude de Wang *et al.*, ont montré que CXCL1, dérivée des macrophages associés aux tumeurs (TAM), favorise le processus métastatique dans le cancer du sein *via* l'activation de la voie de signalisation NF-κB/SOX4[288]. Zhuo *et al.*, ont également montré que cette cytokine stimule la progression du cancer colorectal par le biais de l'activation de la voie NF-κB/P300[289].

La glycosylation de la FN1 joue un rôle crucial dans le processus métastatique. Des études ont montré que dans les carcinomes épidermoïdes oraux et mammaires, la FN1 subit une glycosylation spécifique qui contribue à l'invasion cellulaire et à la résistance multiples aux médicaments des cellules cancéreuses[290,291]. Cette glycosylation particulière, connue sous le nom de "FN1 oncofœtale", se caractérise par l'ajout d'un sucre à une Thr spécifique dans la région C-terminale de la FN1[290]. Cette modification est exclusive aux tissus cancéreux et embryonnaires[291]. Hsiao *et al.*, ont montré que les changements dans la N-glycosylation de la FN1 modulent la signalisation médiée par l'intégrine pour augmenter l'adhésion et la migration cellulaire[292]. En tenant compte de nos conclusions antérieures, il est plausible d'émettre l'hypothèse que la FN1, en plus d'être surexprimée, pourrait être hyperglycosylée en raison des variations observées dans l'expression des GT dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes. Cette hyperglycosylation pourrait potentiellement altérer le comportement des cellules cancéreuses. Par conséquent, une analyse par spectrométrie de masse des changements dans la glycosylation de la FN1 suite à l'interaction des cellules cancéreuses avec les plaquettes serait une approche intéressante pour compléter notre étude.

Outre l'élévation de l'expression des gènes associés au processus métastatique dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes, notre étude a également mis en évidence la surexpression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que **CTBP1**, **APC** et **TP53**[293–295]. Alors que l'effet pro-métastatique des gènes surexprimés favorisant le processus métastatique est clair, celui de la surexpression des gènes suppresseurs de tumeurs est plus complexe.

La surexpression de **CTBP1** provoque une localisation anormale de la protéine traduite CTPB1 dans les cellules métastatiques du cancer de la prostate, transformant ainsi ce gène, initialement suppresseur de tumeur, en un gène promouvant la croissance tumorale[293].

Pour **APC** et **TP53**, il est largement reconnu que les mutations de ces gènes conduisent à leur inactivation, affectant souvent de nombreux processus cellulaires dont la résistance à la chimiothérapie[294,295]. Dans notre étude, ces gènes sont surexprimés dans leurs formes natives (non mutées), ce qui suggère qu'ils puissent encore exercer leurs fonctions de suppresseurs de tumeurs.

Ces résultats soulignent le rôle complexe des plaquettes dans le développement tumoral. La coexistence de la surexpression de gènes à la fois pro-tumoraux et anti-tumoraux dans le cancer est également observée chez les patients et résulte de la complexité des interactions moléculaires, cellulaires et environnementales au sein de la tumeur. Cette dualité génique est un défi majeur dans la compréhension du cancer et dans le développement de stratégies thérapeutiques efficaces pour cibler spécifiquement les voies pro-tumorales tout en renforçant les mécanismes anti-tumoraux.

Nous avons également démontré la surexpression de gènes dont le rôle dans le cancer n'est peu ou pas encore bien compris tels que **IL2RG**, **CACNA1D** et **GNRH1**.

IL2RG code pour la sous-unité γ du récepteur IL-2 qui joue un rôle crucial dans le développement et la fonction de différentes cellules immunitaires telles que les cellules NK, T et B. Ainsi, le *knockdown* de l'IL2RG est une méthode courante pour générer des modèles de souris dont la fonction immunitaire est altérée, ce qui en fait un des modèles de choix pour étudier le cancer et réaliser des xénotransplantations. Bien que sa contribution directe dans le développement du cancer ne soit pas claire, Wang *et al.*, ont montré que sa surexpression est associée à de faibles taux de survie dans le cancer gastrique avancé[296]. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des niveaux élevés d'IL2RG (ainsi que des gènes tels que IL2RA, IL7R et IFNγ) peuvent favoriser la formation de métastases du mélanome en augmentant le nombre de cellules T régulatrices intratumorales *via* l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT[297]. Récemment, Ayars *et al.*, ont mis en évidence, grâce à un *knock-out* de l'IL2RG par CRISPR-Cas9 dans des cellules de cancer pancréatique, une réduction de la croissance tumorale chez les souris et une diminution de l'expression de JAK3 dans les tumeurs orthotopiques[298]. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation IL2Rγ/JAK3 peut contribuer à la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques *in vivo*[298].

CACNA1D code pour la sous-unité α 1D du canal calcique de type L, voltage-dépendant. Il a été associé à des adénomes (tumeurs bénignes) produisant de l'aldostérone et à des troubles endocriniens. McKerr *et al.* ont démontré que sa

modulation pouvait induire un avantage thérapeutique dans le cancer de la prostate et plusieurs équipes ont également montré que son expression varie en fonction du type de cancer, ce qui lui vaut d'être désigné comme un marqueur pronostique potentiel[299–301]. Néanmoins, les mécanismes qui sous-tendent son implication dans le cancer ne sont pas bien définis.

Différentes études ont donné des conclusions controversées quant à l'association entre l'expression de **GNRH1** et le cancer[302,303]. Certaines n'ont pas trouvé d'association claire, tandis que d'autres ont suggéré que GNRH1 soit un facteur pronostique pour la propagation des cellules cancéreuses dans les cancers du sein et de la prostate[304–306].

Dans leur ensemble, nos résultats soulignent l'identification de nouveaux gènes cibles pertinents dans les cellules cancéreuses éduquées par les plaquettes, particulièrement dans le contexte des cancers digestifs.

Par la suite, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces gènes chez les patients en utilisant des bases de données en accès libre comme *The Cancer Genome Atlas*. Cette comparaison pourrait nous aider à établir d'éventuelles corrélations entre leur expression et l'évolution du cancer. De plus, dans notre laboratoire, nous disposons d'une biobanque de tissus provenant de patients atteints de cancer pancréatique ou colorectal. En analysant l'expression de ces gènes dans ces échantillons, nous pourrions peut-être classifier les patients selon des critères spécifiques tels que leur survie ou la réponse aux traitements, par exemple.

B. Limites et perspectives

Dans notre étude, nous avons examiné les interactions entre les plaquettes et les cellules cancéreuses *in vitro*, en absence de plasma. Cette approche, simplifiée, nous a permis de nous concentrer uniquement sur l'effet des plaquettes sur les cellules cancéreuses. Cependant, ce modèle expérimental ne tient pas en considération la complexité inhérente au microenvironnement tumoral (MET) ou au compartiment sanguin.

Par conséquent, dans un premier temps, il serait intéressant d'étudier le rôle des interactions entre les cellules cancéreuses et les plaquettes, dans un modèle *in vitro* de **culture cellulaire en 3D**, comme les **organoïdes**[307]. Les organoïdes peuvent être générés à partir de diverses sources cellulaires, notamment des cellules souches ou des tissus spécifiques[308]. En effet, les cellules souches embryonnaires provenant de tissus embryonnaires humains ou les cellules souches pluripotentes induites provenant de tissus adultes, subissent d'abord une différenciation dirigée afin de générer des sphéroïdes flottants qui seront ensuite implantés sur une matrice extracellulaire dans un milieu de culture spécifique pour initier la culture d'organoïdes[308]. Les tissus primaires des patients peuvent être, quant à eux, dissociés en unités fonctionnelles, qui contiennent des cellules souches somatiques[308]. Ces cellules souches somatiques sont enrichies et cultivées dans un milieu 3D pour former des organoïdes[308]. Les cellules tumorales isolées des tissus cancéreux peuvent ainsi former des tumoroïdes dans des cultures 3D[308]. L'ensemble génère des structures auto-organisées composées de différentes cellules

spécifiques à l'organe d'origine, ce qui permet de reproduire partiellement la structure et les fonctions des organes. Cette approche fournit donc un modèle *in vitro* plus complexe et pertinent que les cultures cellulaires traditionnelles. Cela nous permettrait de déterminer si l'évolution de l'expression des gènes d'intérêt est similaire avec celle observée dans notre système expérimental simplifié.

Bien que les cultures en 3D d'organoïdes représentent une avancée significative par rapport aux cultures cellulaires en monocouche, et malgré les résultats de plusieurs études, dont celle de Lee et ses collègues, mettant en évidence la conservation de l'hétérogénéité tumorale d'origine et la présence de changements génomiques cohérents avec l'évolution de la tumeur, ces modèles ne reproduisent pas l'architecture complète des tissus[309]. En effet, ils excluent la vascularisation et les flux des fluides interstitiels. Récemment, une nouvelle technologie a été développée, celle des « **organes sur puce** ». Ce sont des dispositifs miniatures conçus pour reproduire certaines fonctions et caractéristiques des organes humains ou des tissus spécifiques à l'échelle microscopique. Pour cela, ils combinent la microfluidique avec des cultures cellulaires ou tissulaires afin de recréer des conditions physiologiques telles que la force de cisaillement fluidique, pour simuler la vascularisation, la mécanique tissulaire, pour imiter les mouvements naturels des organes, ainsi que les processus de la nutrition, de transport des gaz et des déchets, pour reproduire les tissus vascularisés *in vivo*[310,311]. Ce modèle pourrait permettre de recréer de manière plus précise et, *in vitro*, les processus se déroulant dans le microenvironnement tumoral (MET). En introduisant les plaquettes dans des fluides qui imitent les vaisseaux sanguins, nous pourrions ainsi observer directement leur effet sur la tumeur primaire et nos gènes d'intérêt.

Hormis les expériences *in vitro*, une option serait d'implanter des morceaux de tumeurs ou des cellules dissociées issus de patients dans des souris immunodéficientes comme les souris *Nude* ou NOD/SCID (**PDX**) afin d'étudier le développement tumoral et/ou la réponse aux médicaments dans un contexte *in vivo*. Cependant, dans ce type de modèle, bien que la xénogreffe se rapproche de la physiopathologie réelle de la maladie, cela ne prend pas en considération la composante du système immunitaire[312]. Il serait alors intéressant de générer des **souris humanisées** à partir de ces souris PDX, en les soumettant à une myéloablation par des substances chimiques ou des radiations. Par la suite, une greffe de cellules souches hématopoïétiques humaines $CD34^+$ pourrait être effectuée pour rétablir le système immunitaire humain dans ces modèles animaux[312].

Dans notre équipe, nous avons également généré des **modèles murins syngéniques** en utilisant des lignées de cellules cancéreuses murines comme les PANCO2, qui ont été préalablement mises en interaction ou non avec les plaquettes (allogreffe)[214]. Cela nous a permis de voir l'effet de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes. Dans le cadre de cette étude, l'utilisation de ce modèle serait bénéfique pour évaluer l'impact *in vivo* sur les gènes qui nous intéressent. Nous pouvons par ailleurs modifier génétiquement les lignées cellulaires injectées, à l'aide de techniques de transfection, afin de sur-exprimer, par exemple, MGAT2, MGAT3, B3GNT ou la FN1 et/ou d'induire la luminescence et d'étudier leur rôle dans le développement et la progression de la maladie *in vivo*. Cela peut se faire de manière **ectopique**, c'est-à-dire que les cellules sont injectées par voie sous-cutanée, ce qui permet de mesurer la croissance tumorale,

cependant, cela ne mime pas le microenvironnement tumoral et ne produit pas de métastases. Ainsi, il existe aussi l'injection dite **orthotopique**, où le site d'implantation dépend de l'origine du type de cellules cancéreuses. Cela permet d'avoir un microenvironnement qui ressemble à celui de la tumeur d'origine et de maintenir la capacité des cellules cancéreuses à métastaser. L'expression de la luciférase, par exemple, sous le promoteur PDX-1-Cre, permettrait alors de suivre la croissance tumorale ainsi que la dissémination. Le principal inconvénient de ces modèles animaux réside dans le fait que les lignées cellulaires sont des aberrations génétiques, qui peuvent avoir un comportement cellulaire complètement différent d'une réelle tumeur.

Dans ces différents modèles murins, il serait également pertinent d'étudier l'effet de l'éducation des cellules cancéreuses par les plaquettes sur la thrombose associée au cancer, notamment en utilisant la **microscopie intravitale** pour évaluer la thrombose artérielle en temps réel ou un **modèle de thrombose veineuse profonde (DVT)** pour étudier la thrombose veineuse.

Comme nous l'avons vu en introduction, l'interaction des plaquettes avec les cellules cancéreuses est bien mieux caractérisée dans la circulation sanguine. Ainsi, il serait peut-être intéressant d'étudier *in vitro*, l'impact de cette interaction en culture en flux (microfluidique) en comparant la capacité d'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales en présence ou en absence de plaquettes et, en analysant à la fois la composition du surnageant ainsi que celle des cellules cancéreuses elles-mêmes par qPCR (ARN) ou ELISA (protéines). Nous pourrions aussi regarder les marqueurs de la TEM comme la vimentine, Snail, Slug, Twist ou la N-cadhérine dans ces deux groupes de cellules pour les caractériser davantage. Récemment, Gold *et al.*, ont élaboré un vaisseau imprimé en 3D capable de reproduire les réactions thrombo-inflammatoires, généralement observées exclusivement dans des modèles précliniques avancés *in vitro* avancés ou *in vivo*[313]. Il pourrait être bénéfique d'exploiter cette avancée technologique pour enrichir nos études. L'ensemble, nous permettra ainsi de comparer les résultats obtenus en circulation et dans le microenvironnement tumoral, afin d'identifier potentiellement une cible commune.

Les plaquettes et les cellules cancéreuses sont en interaction constante, à la fois dans le microenvironnement tumoral et dans la circulation sanguine. Cependant, l'effet de ces interactions dépend également du type de cancer. Il sera alors nécessaire d'étendre par la suite ce concept à d'autres types de cancer.

C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons souhaité caractériser les gènes et les protéines impliquées dans l'éducation des cellules cancéreuses pour les plaquettes. Pour la première fois, nous avons mis en évidence que la présence des plaquettes peut influencer le transcriptome des cellules cancéreuses en régulant à la hausse ou à la baisse l'activité des gènes associés à la glycosylation, à l'inflammation et aux processus de dissémination métastatique. Cela affecte le phénotype des cellules cancéreuses, qui tendent à devenir plus agressives. Bien que ces découvertes nécessitent une confirmation au sein de systèmes *in vitro* et *in vivo* plus complexes, il nous semble nécessaire d'approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents de ce phénomène qui représente une piste prometteuse pour envisager des interventions thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018 – IARC. https://www.iarc.who.int/featured-news/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-18-1-million-new-cases-and-9-6-million-cancer-deaths-in-2018/.
2. Panorama des cancers en France - Edition 2022 - Ref : PANOKFR2022. https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Panorama-des-cancers-en-France-Edition-2022.
3. Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019) - Ref : ETKAFR19. https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2018-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-edition-2019.
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
5. Eun, J. W. *et al.* Cancer-associated fibroblast-derived secreted phosphoprotein 1 contributes to resistance of hepatocellular carcinoma to sorafenib and lenvatinib. *Cancer Commun (Lond)* **43**, 455–479 (2023).
6. Galbo, P. M., Zang, X. & Zheng, D. Molecular Features of Cancer-associated Fibroblast Subtypes and their Implication on Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Immunotherapy Resistance. *Clin Cancer Res* **27**, 2636–2647 (2021).
7. Wen, S. *et al.* Cancer-associated fibroblast (CAF)-derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis via integrin β3-p38 MAPK signalling. *Cancer Lett* **442**, 320–332 (2019).
8. Provenzano, P. P. *et al.* Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* **4**, 38 (2006).
9. Gaggioli, C. *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* **9**, 1392–1400 (2007).
10. Wn, B., Jt, I. & Sr, D. Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Molecular cancer therapeutics* **11**, (2012).
11. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. *Genes Cancer* **2**, 1097–1105 (2011).
12. Crinò, L. & Metro, G. Therapeutic options targeting angiogenesis in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev* **23**, 79–91 (2014).
13. Loizzi, V. *et al.* Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* **18**, 1967 (2017).
14. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
15. Picoli, C. C. *et al.* Pericytes cross-talks within the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1876**, 188608 (2021).
16. Ribeiro, A. L. & Okamoto, O. K. Combined Effects of Pericytes in the Tumor Microenvironment. *Stem Cells Int* **2015**, 868475 (2015).
17. Jiang, Z. *et al.* Pericytes in the tumor microenvironment. *Cancer Lett* **556**, 216074 (2023).

18. Sun, R., Kong, X., Qiu, X., Huang, C. & Wong, P.-P. The Emerging Roles of Pericytes in Modulating Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol* **9**, 676342 (2021).
19. Huang, T. *et al.* Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance. *Theranostics* **10**, 8721–8743 (2020).
20. Phi, L. T. H. *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int* **2018**, 5416923 (2018).
21. Shangguan, W. *et al.* Endothelium originated from colorectal cancer stem cells constitute cancer blood vessels. *Cancer Sci* **108**, 1357–1367 (2017).
22. Maniotis, A. J. *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* **155**, 739–752 (1999).
23. Nappo, G. *et al.* The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling. *Oncogenesis* **6**, e342 (2017).
24. Zhou, W. *et al.* Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol* **17**, 170–182 (2015).
25. Yamashina, T. *et al.* Cancer stem-like cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells. *Cancer Res* **74**, 2698–2709 (2014).
26. Grivennikov, S. *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* **15**, 103–113 (2009).
27. Langowski, J. L. *et al.* IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* **442**, 461–465 (2006).
28. Kortylewski, M. *et al.* Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **15**, 114–123 (2009).
29. Umezu, D. *et al.* Inhibitory functions of PD-L1 and PD-L2 in the regulation of anti-tumor immunity in murine tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* **68**, 201–211 (2019).
30. Blando, J. *et al.* Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 1692–1697 (2019).
31. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
32. Lin, E. Y. *et al.* Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* **66**, 11238–11246 (2006).
33. Cursiefen, C. *et al.* VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* **113**, 1040–1050 (2004).
34. Koch, A. E. *et al.* Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**, 1798–1801 (1992).
35. 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).
36. Halbrook, C. J. *et al.* Macrophage-Released Pyrimidines Inhibit Gemcitabine Therapy in Pancreatic Cancer. *Cell Metab* **29**, 1390-1399.e6 (2019).

37. Peranzoni, E. *et al.* Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E4041–E4050 (2018).
38. Langiu, M. *et al.* Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1257 (2022).
39. Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D. & Werb, Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* **103**, 481–490 (2000).
40. Erpenbeck, L. & Schön, M. P. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene* **36**, 2483–2490 (2017).
41. Dumitru, C. A., Lang, S. & Brandau, S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. *Semin Cancer Biol* **23**, 141–148 (2013).
42. Grecian, R., Whyte, M. K. B. & Walmsley, S. R. The role of neutrophils in cancer. *Br Med Bull* **128**, 5–14 (2018).
43. Wislez, M. *et al.* Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* **63**, 1405–1412 (2003).
44. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).
45. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* **15**, 540–555 (2015).
46. CAZy - GT. http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.
47. Varki, A. *et al.* N-Glycans. in *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999).
48. Nakano, M. *et al.* Bisecting GlcNAc Is a General Suppressor of Terminal Modification of N-glycan. *Mol Cell Proteomics* **18**, 2044–2057 (2019).
49. Pearce, O. M. T. Cancer glycan epitopes: biosynthesis, structure and function. *Glycobiology* **28**, 670–696 (2018).
50. Varki, A. *et al.* O-Glycans. in *Essentials of Glycobiology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999).
51. Wu, Y., Chen, X., Wang, S. & Wang, S. Advances in the relationship between glycosyltransferases and multidrug resistance in cancer. *Clinica Chimica Acta* **495**, 417–421 (2019).
52. Jin, F. & Wang, F. The physiological and pathological roles and applications of sialyl Lewis x, a common carbohydrate ligand of the three selectins. *Glycoconj J* **37**, 277–291 (2020).
53. Cohen, E. N. *et al.* Elevated serum levels of sialyl Lewis X (sLeX) and inflammatory mediators in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **176**, 545–556 (2019).
54. Trinchera, M., Aronica, A. & Dall'Olio, F. Selectin Ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in Gastrointestinal Cancers. *Biology (Basel)* **6**, 16 (2017).
55. Mereiter, S., Balmaña, M., Campos, D., Gomes, J. & Reis, C. A. Glycosylation in the Era of Cancer-Targeted Therapy: Where Are We Heading? *Cancer Cell* **36**, 6–16 (2019).
56. Dall'Olio, F., Malagolini, N., Trinchera, M. & Chiricolo, M. Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. *FBL* **17**, 670–699 (2012).

57. Meezan, E., Wu, H. C., Black, P. H. & Robbins, P. W. Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry* **8**, 2518–2524 (1969).
58. Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J. & Pouysségur, J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl)* **85**, 1301–1307 (2007).
59. Belo, A. I. *et al.* Hypoxia inducible factor 1α down regulates cell surface expression of α1,2-fucosylated glycans in human pancreatic adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* **589**, 2359–2366 (2015).
60. Greville, G. *et al.* Hypoxia Alters Epigenetic and N-Glycosylation Profiles of Ovarian and Breast Cancer Cell Lines in-vitro. *Front Oncol* **10**, 1218 (2020).
61. Lin, M.-C. *et al.* GATA3 interacts with and stabilizes HIF-1α to enhance cancer cell invasiveness. *Oncogene* **36**, 4243–4252 (2017).
62. Koike, T. *et al.* Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8132–8137 (2004).
63. Arriagada, C., Silva, P. & Torres, V. A. Role of glycosylation in hypoxia-driven cell migration and invasion. *Cell Adh Migr* **13**, 13–22 (2018).
64. Trinchera, M., Zulueta, A., Caretti, A. & Dall'Olio, F. Control of Glycosylation-Related Genes by DNA Methylation: the Intriguing Case of the B3GALT5 Gene and Its Distinct Promoters. *Biology* **3**, 484 (2014).
65. Chakraborty, A. K. *et al.* GnT-V expression and metastatic phenotypes in macrophage-melanoma fusion hybrids is down-regulated by 5-Aza-dC: evidence for methylation sensitive, extragenic regulation of GnT-V transcription. *Gene* **374**, 166–173 (2006).
66. Ide, Y. *et al.* Aberrant expression of N-acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 478–482 (2006).
67. Chachadi, V. B., Cheng, H., Klinkebiel, D., Christman, J. K. & Cheng, P.-W. 5-Aza-2′-deoxycytidine Increases Sialyl Lewis X on MUC1 by Stimulating β-Galactoside α2,3-Sialyltransferase 6 Gene. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 586–593 (2011).
68. Kawamura, Y. I. *et al.* DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* **135**, 142-151.e3 (2008).
69. Takamatsu, S. *et al.* Physiological and glycomic characterization of N-acetylglucosaminyltransferase-IVa and -IVb double deficient mice. *Glycobiology* **20**, 485–497 (2010).
70. H, R. & L, C.-C. Recent advances toward the development of inhibitors to attenuate tumor metastasis via the interruption of lectin-ligand interactions. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **69**, (2013).
71. Pinho, S. S. *et al.* Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression. *BMC Cancer* **7**, 124 (2007).

72. Guo, H.-B., Lee, I., Kamar, M. & Pierce, M. N-acetylglucosaminyltransferase V expression levels regulate cadherin-associated homotypic cell-cell adhesion and intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* **278**, 52412–52424 (2003).
73. Carvalho, S. *et al.* Preventing E-cadherin aberrant N-glycosylation at Asn-554 improves its critical function in gastric cancer. *Oncogene* **35**, 1619–1631 (2016).
74. Liu, D., Gao, Z. & Yue, L. Fucosyltransferase 8 deficiency suppresses breast cancer cell migration by interference of the FAK/integrin pathway. *Cancer Biomark* **25**, 303–311 (2019).
75. Liwosz, A., Lei, T. & Kukuruzinska, M. A. N-glycosylation affects the molecular organization and stability of E-cadherin junctions. *J Biol Chem* **281**, 23138–23149 (2006).
76. Nita-Lazar, M., Rebustini, I., Walker, J. & Kukuruzinska, M. A. Hypoglycosylated E-cadherin promotes the assembly of tight junctions through the recruitment of PP2A to adherens junctions. *Exp Cell Res* **316**, 1871–1884 (2010).
77. Nonaka, M. & Fukuda, M. Expression and Function of Poly-N-Acetyllactosamine Type Glycans in Cancer. in *Glycosignals in Cancer: Mechanisms of Malignant Phenotypes* (eds. Furukawa, K. & Fukuda, M.) 141–161 (Springer Japan, 2016). doi:10.1007/978-4-431-55939-9_9.
78. Dimitroff, C. J. Galectin-binding O-glycosylations as Regulators of Malignancy. *Cancer Res* **75**, 3195–3202 (2015).
79. Okamoto, T. *et al.* Core2 O-glycan-expressing prostate cancer cells are resistant to NK cell immunity. *Mol Med Rep* **7**, 359–364 (2013).
80. Läubli, H. & Borsig, L. Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis. *Front Immunol* **10**, 2120 (2019).
81. Hudak, J. E., Canham, S. M. & Bertozzi, C. R. Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nat Chem Biol* **10**, 69–75 (2014).
82. Stanczak, M. A. *et al.* Targeting cancer glycosylation repolarizes tumor-associated macrophages allowing effective immune checkpoint blockade. *Sci Transl Med* **14**, eabj1270 (2022).
83. Vuagnat, P. & Champiat, S. Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux. *MISE AU POINT* (2018).
84. Hsu, J.-M., Li, C.-W., Lai, Y.-J. & Hung, M.-C. Posttranslational Modifications of PD-L1 and Their Applications in Cancer Therapy. *Cancer Res* **78**, 6349–6353 (2018).
85. Wang, Y.-N., Lee, H.-H., Hsu, J. L., Yu, D. & Hung, M.-C. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis. *J Biomed Sci* **27**, 77 (2020).
86. Verdura, S. *et al.* Resveratrol targets PD-L1 glycosylation and dimerization to enhance antitumor T-cell immunity. *Aging (Albany NY)* **12**, 8–34 (2020).
87. Huang, Y. *et al.* FUT8-mediated aberrant N-glycosylation of B7H3 suppresses the immune response in triple-negative breast cancer. *Nat Commun* **12**, 2672 (2021).
88. Shan, M., Yang, D., Dou, H. & Zhang, L. Chapter Four - Fucosylation in cancer biology and its clinical applications. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. Zhang, L.) vol. 162 93–119 (Academic Press, 2019).
89. Janik, M. E., Przybyło, M., Pocheć, E., Pokrywka, M. & Lityńska, A. Effect of alpha3beta1 and alphavbeta3 integrin glycosylation on interaction of melanoma cells with vitronectin. *Acta Biochim Pol* **57**, 55–61 (2010).

90. Pocheć, E. *et al.* Aberrant glycosylation of αvβ3 integrin is associated with melanoma progression. *Anticancer Res* **35**, 2093–2103 (2015).
91. Yoshimura, M., Nishikawa, A., Ihara, Y., Taniguchi, S. & Taniguchi, N. Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8754–8758 (1995).
92. Kariya, Y., Oyama, M., Hashimoto, Y., Gu, J. & Kariya, Y. β4-Integrin/PI3K Signaling Promotes Tumor Progression through the Galectin-3-N-Glycan Complex. *Mol Cancer Res* **16**, 1024–1034 (2018).
93. Seales, E. C. *et al.* Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res* **65**, 4645–4652 (2005).
94. Dai, Y. *et al.* Overexpression of MUC13, a Poor Prognostic Predictor, Promotes Cell Growth by Activating Wnt Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Am J Pathol* **188**, 378–391 (2018).
95. Lahdaoui, F. *et al.* Depletion of MUC5B mucin in gastrointestinal cancer cells alters their tumorigenic properties: implication of the Wnt/β-catenin pathway. *Biochem J* **474**, 3733–3746 (2017).
96. Sengupta, P. K., Bouchie, M. P. & Kukuruzinska, M. A. N-Glycosylation Gene DPAGT1 Is a Target of the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway. *J Biol Chem* **285**, 31164–31173 (2010).
97. Sengupta, P. K., Bouchie, M. P., Nita-Lazar, M., Yang, H.-Y. & Kukuruzinska, M. A. Coordinate regulation of N-glycosylation gene DPAGT1, canonical Wnt signaling and E-cadherin adhesion. *J Cell Sci* **126**, 484–496 (2013).
98. Zhang, J. *et al.* GALNT1 Enhances Malignant Phenotype of Gastric Cancer via Modulating CD44 Glycosylation to Activate the Wnt/β-catenin Signaling Pathway. *Int J Biol Sci* **18**, 6068–6083 (2022).
99. Thomas, D., Rathinavel, A. K. & Radhakrishnan, P. Altered glycosylation in cancer: A promising target for biomarkers and therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1875**, 188464 (2021).
100. Che, M.-I. *et al.* β1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase III modulates cancer stemness through EGFR signaling pathway in colon cancer cells. *Oncotarget* **5**, 3673–3684 (2014).
101. Lin, M.-C. *et al.* C1GALT1 predicts poor prognosis and is a potential therapeutic target in head and neck cancer. *Oncogene* **37**, 5780–5793 (2018).
102. Vignais, M.-L. Signalisation cellulaire en réponse au TGFbeta : le paradoxe d'une cytokine à la fois inhibitrice de la prolifération cellulaire et inductrice de métastases. *Bulletin du Cancer* **86**, 903–10 (1999).
103. Kim, Y.-W., Park, J., Lee, H.-J., Lee, S.-Y. & Kim, S.-J. TGF-β sensitivity is determined by N-linked glycosylation of the type II TGF-β receptor. *Biochem J* **445**, 403–411 (2012).
104. Park, S. *et al.* Altered expression of fucosylation pathway genes is associated with poor prognosis and tumor metastasis in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* **56**, 559–567 (2020).
105. Tu, C.-F., Wu, M.-Y., Lin, Y.-C., Kannagi, R. & Yang, R.-B. FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF-β receptor core fucosylation. *Breast Cancer Res* **19**, 111 (2017).

106. Hirakawa, M. *et al.* Fucosylated TGF-β receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* **110**, 156–163 (2014).
107. Lu, J. *et al.* β-Galactoside α2,6-sialyltranferase 1 promotes transforming growth factor-β-mediated epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* **289**, 34627–34641 (2014).
108. Partridge, E. A. *et al.* Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* **306**, 120–124 (2004).
109. Xu, Q. *et al.* Roles of N-acetylglucosaminyltransferase III in epithelial-to-mesenchymal transition induced by transforming growth factor β1 (TGF-β1) in epithelial cell lines. *J Biol Chem* **287**, 16563–16574 (2012).
110. Takeuchi, H. & Haltiwanger, R. S. Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 235–242 (2014).
111. Chabanais, J., Labrousse, F., Chaunavel, A., Germot, A. & Maftah, A. POFUT1 as a Promising Novel Biomarker of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **10**, 411 (2018).
112. Ma, W. *et al.* hCLP46 regulates U937 cell proliferation via Notch signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **408**, 84–88 (2011).
113. Yuan, Q. *et al.* Modification of α2,6-sialylation mediates the invasiveness and tumorigenicity of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo via Notch1/Hes1/MMPs pathway. *Int J Cancer* **143**, 2319–2330 (2018).
114. Tuccillo, F. M. *et al.* Aberrant Glycosylation as Biomarker for Cancer: Focus on CD43. *Biomed Res Int* **2014**, 742831 (2014).
115. Xu, Y., Zhang, P., Zhang, K. & Huang, C. The application of CA72-4 in the diagnosis, prognosis, and treatment of gastric cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1876**, 188634 (2021).
116. Gao, Y. *et al.* Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. *Sci Rep* **8**, 2732 (2018).
117. Munkley, J. & Elliott, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* **7**, 35478–35489 (2016).
118. Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Azevedo, R., Santos, L. L. & Ferreira, J. A. Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks. *Frontiers in Oncology* **9**, (2019).
119. Meany, D. L. & Chan, D. W. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clinical Proteomics* **8**, 7 (2011).
120. de Laurentiis, A. *et al.* Mass spectrometry-based identification of the tumor antigen UN1 as the transmembrane CD43 sialoglycoprotein. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111.007898 (2011).
121. Saldova, R. *et al.* Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology* **17**, 1344–1356 (2007).
122. Zhao, J., Qiu, W., Simeone, D. M. & Lubman, D. M. N-linked glycosylation profiling of pancreatic cancer serum using capillary liquid phase separation coupled with mass spectrometric analysis. *J Proteome Res* **6**, 1126–1138 (2007).
123. Alley, W. R. *et al.* N-linked Glycan Structures and Their Expressions Change in the Blood Sera of Ovarian Cancer Patients. *J Proteome Res* **11**, 2282–2300 (2012).

124. Goldman, R. *et al.* Detection of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Clin Cancer Res* **15**, 1808–1813 (2009).
125. Christiansen, M. N. *et al.* Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* **14**, 525–546 (2014).
126. Benešová, I., Paulin Urminský, A., Halámková, J. & Hernychová, L. Changes of serum protein N-glycosylation in cancer. *Klin Onkol* **35**, 174–180 (2022).
127. Abd-El-Halim, Y. M. *et al.* A glycosyltransferase gene signature to detect pancreatic ductal adenocarcinoma patients with poor prognosis. *eBioMedicine* **71**, (2021).
128. Humphries, M. J., Matsumoto, K., White, S. L., Molyneux, R. J. & Olden, K. Augmentation of murine natural killer cell activity by swainsonine, a new antimetastatic immunomodulator. *Cancer Res* **48**, 1410–1415 (1988).
129. Dennis, J. W. Effects of swainsonine and polyinosinic:polycytidylic acid on murine tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res* **46**, 5131–5136 (1986).
130. Galustian, C., Foulds, S., Dye, J. F. & Guillou, P. J. Swainsonine, a glycosylation inhibitor, enhances both lymphocyte efficacy and tumour susceptibility in LAK and NK cytotoxicity. *Immunopharmacology* **27**, 165–172 (1994).
131. Wu, J. *et al.* Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *J Exp Clin Cancer Res* **37**, 272 (2018).
132. Ling, Y.-H., Li, T., Perez-Soler, R. & Haigentz, M. Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**, 539–548 (2009).
133. Han, X. *et al.* Tunicamycin enhances the antitumor activity of trastuzumab on breast cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget* **6**, 38912–38925 (2015).
134. Guo, X. *et al.* Tunicamycin enhances human colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by JNK-CHOP-mediated DR5 upregulation and the inhibition of the EGFR pathway. *Anticancer Drugs* **28**, 66–74 (2017).
135. Wang, Y. *et al.* Tunicamycin induces ER stress and inhibits tumorigenesis of head and neck cancer cells by inhibiting N-glycosylation. *Am J Transl Res* **12**, 541–550 (2020).
136. Huang, J., Byrd, J. C., Yoon, W. H. & Kim, Y. S. Effect of benzyl-alpha-GalNAc, an inhibitor of mucin glycosylation, on cancer-associated antigens in human colon cancer cells. *Oncol Res* **4**, 507–515 (1992).
137. Kojima, N., Handa, K., Newman, W. & Hakomori, S. Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells. *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 1288–1295 (1992).
138. Nakano, T., Matsui, T. & Ota, T. Benzyl-alpha-GalNAc inhibits sialylation of O-glycosidic sugar chains on CD44 and enhances experimental metastatic capacity in B16BL6 melanoma cells. *Anticancer Res* **16**, 3577–3584 (1996).
139. Gouyer, V. *et al.* Differential effect of GalNAcalpha-O-bn on intracellular trafficking in enterocytic HT-29 and Caco-2 cells: correlation with the glycosyltransferase expression pattern. *J Cell Sci* **114**, 1455–1471 (2001).
140. Byrd, J. C., Dahiya, R., Huang, J. & Kim, Y. S. Inhibition of mucin synthesis by benzyl-alpha-GalNAc in KATO III gastric cancer and Caco-2 colon cancer cells. *Eur J Cancer* **31A**, 1498–1505 (1995).

141. Denis, M. M. *et al.* Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* **122**, 379–391 (2005).
142. Darbousset, R., Mezouar, S., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L. & Dubois, C. Involvement of neutrophils in thrombus formation in living mice. *Pathol Biol (Paris)* **62**, 1–9 (2014).
143. Gibbins, J. M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* **117**, 3415–3425 (2004).
144. Holinstat, M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev* **36**, 195–198 (2017).
145. Plantureux, L. *et al.* Impacts of Cancer on Platelet Production, Activation and Education and Mechanisms of Cancer-Associated Thrombosis. *Cancers* **10**, 441 (2018).
146. Hisada, Y. & Mackman, N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood* **130**, 1499 (2017).
147. 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).
148. 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).
149. 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).
150. 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).
151. De Candia, E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thrombosis Research* **129**, 250–256 (2012).
152. 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).
153. Schoen, P. & Lindhout, T. Flow and the inhibition of prothrombinase by antithrombin III and heparin. *Blood* **78**, 118–124 (1991).
154. Lijnen, H. R. Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci* **936**, 226–236 (2001).
155. Sidelmann, J. J., Gram, J., Jespersen, J. & Kluft, C. Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms. *Semin Thromb Hemost* **26**, 605–618 (2000).
156. Ma, L. & Dorling, A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* **34**, 63–72 (2012).
157. Liverani, E., Kilpatrick, L. E., Tsygankov, A. Y. & Kunapuli, S. P. The role of $P2Y_{12}$ receptor and activated platelets during inflammation. *Curr Drug Targets* **15**, 720–728 (2014).
158. Thuillier, R. *et al.* Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. *Transplantation* **90**, 612–621 (2010).

159. Kalle, M. *et al.* Host defense peptides of thrombin modulate inflammation and coagulation in endotoxin-mediated shock and Pseudomonas aeruginosa sepsis. *PLoS One* **7**, e51313 (2012).
160. Kassel, K. M., Sullivan, B. P., Cui, W., Copple, B. L. & Luyendyk, J. P. Therapeutic administration of the direct thrombin inhibitor argatroban reduces hepatic inflammation in mice with established fatty liver disease. *Am J Pathol* **181**, 1287–1295 (2012).
161. 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).
162. Garcia, A. E., Mada, S. R., Rico, M. C., Dela Cadena, R. A. & Kunapuli, S. P. Clopidogrel, a P2Y12 receptor antagonist, potentiates the inflammatory response in a rat model of peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. *PLoS One* **6**, e26035 (2011).
163. Fang, W. *et al.* MC-002 exhibits positive effects against platelets aggregation and endothelial dysfunction through thromboxane A2 inhibition. *Thromb Res* **133**, 610–615 (2014).
164. Herter, J. M., Rossaint, J. & Zarbock, A. Platelets in inflammation and immunity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **12**, 1764–1775 (2014).
165. Zhang, G. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol* **182**, 7997–8004 (2009).
166. 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).
167. Koupenova, M., Clancy, L., Corkrey, H. A. & Freedman, J. E. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis. *Circ Res* **122**, 337–351 (2018).
168. Miga, A., Masters, S., Gonzalez, M. & Noelle, R. J. The Role of CD40-CD154 Interactions in the Regulation of Cell Mediated Immunity. *Immunological Investigations* **29**, 111–114 (2000).
169. Semple, J. W., Italiano, J. E. & Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* **11**, 264–274 (2011).
170. Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 448–462 (2012).
171. Condac, E. *et al.* Xylosyltransferase II is a significant contributor of circulating xylosyltransferase levels and platelets constitute an important source of xylosyltransferase in serum. *Glycobiology* **19**, 829–833 (2009).
172. Wandall, H. H. *et al.* The origin and function of platelet glycosyltransferases. *Blood* **120**, 626–635 (2012).
173. Lee-Sundlov, M. M. *et al.* Circulating blood and platelets supply glycosyltransferases that enable extrinsic extracellular glycosylation. *Glycobiology* **27**, 188–198 (2017).
174. Falanga, A., Schieppati, F. & Russo, L. Pathophysiology 1. Mechanisms of Thrombosis in Cancer Patients. *Cancer Treat Res* **179**, 11–36 (2019).

175. Gao, S. & Escalante, C. Venous thromboembolism and malignancy. *Expert Rev Anticancer Ther* **4**, 303–320 (2004).
176. Gücer, F. *et al.* Thrombocytosis as a prognostic factor in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* **70**, 210–214 (1998).
177. Ikeda, M. *et al.* Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **9**, 287–291 (2002).
178. Palacios-Acedo, A.-L. *et al.* Platelet and Cancer-Cell Interactions Modulate Cancer-Associated Thrombosis Risk in Different Cancer Types. *Cancers (Basel)* **14**, 730 (2022).
179. Schlesinger, M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *Journal of Hematology & Oncology* **11**, 125 (2018).
180. Palacios-Acedo, A. L. *et al.* Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating With the Enemy. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
181. Cattaneo, M. P2Y12 receptors: structure and function. *J Thromb Haemost* **13 Suppl 1**, S10-16 (2015).
182. Menter, D. G. *et al.* Platelet 'first responders' in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **36**, 199–213 (2017).
183. 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).
184. Dogné, J. M. *et al.* Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (I/II). Effects of BM-567 on platelet function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **68**, 49–54 (2003).
185. Nie, D. *et al.* Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 245–251 (2000).
186. Moussa, O. *et al.* Prognostic and functional significance of thromboxane synthase gene overexpression in invasive bladder cancer. *Cancer Res* **65**, 11581–11587 (2005).
187. Mezouar, S. *et al.* Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: Experimental and clinical evidences. *Thrombosis Research* **139**, 65–76 (2016).
188. Thaler, J. *et al.* Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost* **10**, 1363–1370 (2012).
189. Zwicker, J. I. *et al.* Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* **15**, 6830–6840 (2009).
190. Thomas, G. M. *et al.* Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **13**, 1310–1319 (2015).
191. 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*. *International Journal of Cancer* **136**, 462–475 (2015).
192. Buergy, D., Wenz, F., Groden, C. & Brockmann, M. A. Tumor–platelet interaction in solid tumors. *International Journal of Cancer* **130**, 2747–2760 (2012).

193. 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).
194. Guillem-Llobat, P. *et al.* Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget* **7**, 32462 (2016).
195. Patrignani, P. & Patrono, C. Aspirin, platelet inhibition and cancer prevention. *Platelets* **29**, 779–785 (2018).
196. Rothwell, P. M. *et al.* Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet (London, England)* **376**, 1741–1750 (2010).
197. Palacios-Acedo, A. L. *et al.* P2RY12-Inhibitors Reduce Cancer-Associated Thrombosis and Tumor Growth in Pancreatic Cancers. *Frontiers in Oncology* **0**, 3536 (2021).
198. Stegner, D., Dütting, S. & Nieswandt, B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. *Thrombosis Research* **133**, S149–S157 (2014).
199. Bierie, B. & Moses, H. L. Transforming growth factor beta (TGF-β) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**, 49–59 (2010).
200. Ward, Y. *et al.* Platelets Promote Metastasis via Binding Tumor CD97 Leading to Bidirectional Signaling that Coordinates Transendothelial Migration. *Cell Rep* **23**, 808–822 (2018).
201. Harper, M. T., Savage, J. S. & Poole, A. W. Comment on 'Platelet-derived nucleotides promote tumor cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor' by Schumacher et al. *Cancer Cell* **24**, 287 (2013).
202. 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).
203. Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E3053–E3061 (2014).
204. Spicer, J. D. *et al.* Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells. *Cancer Res* **72**, 3919–3927 (2012).
205. Huh, S. J., Liang, S., Sharma, A., Dong, C. & Robertson, G. P. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer Res* **70**, 6071–6082 (2010).
206. Erpenbeck, L. & Schön, M. P. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* **115**, 3427–3436 (2010).
207. Wojtukiewicz, M. Z., Sierko, E., Hempel, D., Tucker, S. C. & Honn, K. V. Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer metastasis reviews* **36**, 249–262 (2017).
208. Dvorak, H. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* **107**, 233–235 (1995).
209. Goel, H. L. & Mercurio, A. M. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* **13**, 871–882 (2013).
210. Rodriguez-Martinez, A. *et al.* Exchange of cellular components between platelets and tumor cells: impact on tumor cells behavior. *Theranostics* **12**, 2150–2161 (2022).

211. Placke, T. *et al.* Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* **72**, 440–448 (2012).
212. Stone, R. L. *et al.* Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med* **366**, 610–618 (2012).
213. Li, R. *et al.* Presence of intratumoral platelets is associated with tumor vessel structure and metastasis. *BMC Cancer* **14**, 167 (2014).
214. Plantureux, L. *et al.* The interaction of platelets with colorectal cancer cells inhibits tumor growth but promotes metastasis. *Cancer Research* **80**, 291–303 (2020).
215. Vellutini, E. de A. S. & de Oliveira, M. F. Intradural chordoma presenting with intratumoral bleeding. *J Clin Neurosci* **25**, 139–142 (2016).
216. Haemmerle, M. *et al.* FAK regulates platelet extravasation and tumor growth after antiangiogenic therapy withdrawal. *J Clin Invest* **126**, 1885–1896 (2016).
217. Cho, W. C. & Mandavilli, S. Intratumoral extramedullary hematopoiesis in solitary fibrous tumor of the breast. *Breast J* **26**, 755–758 (2020).
218. Williamson, S. R., Mast, K. J., Cheng, L. & Idrees, M. T. Clear cell renal cell carcinoma with intratumoral and nodal extramedullary megakaryopoiesis: a potential diagnostic pitfall. *Hum Pathol* **45**, 1306–1309 (2014).
219. Cruz, R. J., Vincenzi, R., Ketzer, B. M., Cecilio, A. L. & Cepeda, L. A. Spontaneous intratumoral bleeding and rupture of giant gastric stromal tumor (> 30 cm) in a young patient. *World J Surg Oncol* **6**, 76 (2008).
220. Le Chapelain, O. & Ho-Tin-Noé, B. Intratumoral Platelets: Harmful or Incidental Bystanders of the Tumor Microenvironment? *Cancers (Basel)* **14**, 2192 (2022).
221. Qi, C. *et al.* P-Selectin-Mediated Adhesion between Platelets and Tumor Cells Promotes Intestinal Tumorigenesis in Apc(Min/+) Mice. *Int J Biol Sci* **11**, 679–687 (2015).
222. Ishikawa, S. *et al.* Platelets surrounding primary tumor cells are related to chemoresistance. *Oncol Rep* **36**, 787–794 (2016).
223. Miyashita, T. *et al.* Metastasis-promoting role of extravasated platelet activation in tumor. *J Surg Res* **193**, 289–294 (2015).
224. Zhang, S.-R. *et al.* Tumor-Infiltrating Platelets Predict Postsurgical Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* **25**, 3984–3993 (2018).
225. Xu, S.-S. *et al.* Tumor-infiltrating platelets predict postoperative recurrence and survival in resectable pancreatic neuroendocrine tumor. *World J Gastroenterol* **25**, 6248–6257 (2019).
226. Hinterleitner, C. *et al.* Platelet PD-L1 reflects collective intratumoral PD-L1 expression and predicts immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Nat Commun* **12**, 7005 (2021).
227. Zhang, Y. *et al.* Platelet-Specific PDGFB Ablation Impairs Tumor Vessel Integrity and Promotes Metastasis. *Cancer Res* **80**, 3345–3358 (2020).
228. Li, M. *et al.* Integrative analysis of the ST6GALNAC family identifies GATA2-upregulated ST6GALNAC5 as an adverse prognostic biomarker promoting prostate cancer cell invasion. *Cancer Cell Int* **23**, 141 (2023).

229. Blanas, A. *et al.* FUT9-Driven Programming of Colon Cancer Cells towards a Stem Cell-Like State. *Cancers (Basel)* **12**, 2580 (2020).
230. Guerrero, P. E. *et al.* Knockdown of α2,3-Sialyltransferases Impairs Pancreatic Cancer Cell Migration, Invasion and E-selectin-Dependent Adhesion. *Int J Mol Sci* **21**, 6239 (2020).
231. Vajaria, B. N. & Patel, P. S. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J* **34**, 147–156 (2017).
232. Hussain, M. R. M., Hoessli, D. C. & Fang, M. N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer. *Oncotarget* **7**, 54067–54081 (2016).
233. Bennett, E. P. *et al.* Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* **22**, 736–756 (2012).
234. Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A. & Tabak, L. A. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* **13**, 1R-16R (2003).
235. Beaman, E.-M. & Brooks, S. A. The extended ppGalNAc-T family and their functional involvement in the metastatic cascade. *Histol Histopathol* **29**, 293–304 (2014).
236. Julien, S. *et al.* ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology* **16**, 54–64 (2006).
237. Lakshmanan, I. *et al.* ST6GalNAc-I promotes lung cancer metastasis by altering MUC5AC sialylation. *Mol Oncol* **15**, 1866–1881 (2021).
238. Hall, M. K. *et al.* Limited N-Glycan Processing Impacts Chaperone Expression Patterns, Cell Growth and Cell Invasiveness in Neuroblastoma. *Biology (Basel)* **12**, 293 (2023).
239. Taniguchi, N. *et al.* True significance of N-acetylglucosaminyltransferases GnT-III, V and α1,6 fucosyltransferase in epithelial-mesenchymal transition and cancer. *Molecular Aspects of Medicine* **79**, 100905 (2021).
240. Wu, Y. *et al.* B3GNT3 as a prognostic biomarker and correlation with immune cell infiltration in lung adenocarcinoma. *Ann Transl Med* **10**, 295 (2022).
241. Zhang, W., Hou, T., Niu, C., Song, L. & Zhang, Y. B3GNT3 Expression Is a Novel Marker Correlated with Pelvic Lymph Node Metastasis and Poor Clinical Outcome in Early-Stage Cervical Cancer. *PLoS One* **10**, e0144360 (2015).
242. Zhang, K. & Wang, H. [Role of Fucosylation in Cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* **19**, 760–765 (2016).
243. Fujita, K. *et al.* Fucosylation in Urological Cancers. *Int J Mol Sci* **22**, 13333 (2021).
244. Carrascal, M. A. *et al.* Inhibition of fucosylation in human invasive ductal carcinoma reduces E-selectin ligand expression, cell proliferation, and ERK1/2 and p38 MAPK activation. *Mol Oncol* **12**, 579–593 (2018).
245. Cao, W. *et al.* Knockdown of FUT11 inhibits the progression of gastric cancer via the PI3K/AKT pathway. *Heliyon* **9**, e17600 (2023).
246. Cummings, R. D. & Etzler, M. E. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. in *Essentials of Glycobiology* (eds. Varki, A. et al.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
247. Sun, J., Zhang, Z., Chen, J., Xue, M. & Pan, X. ELTD1 promotes invasion and metastasis by activating MMP2 in colorectal cancer. *Int J Biol Sci* **17**, 3048–3058 (2021).

248. Gobin, E. *et al.* A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer* **19**, 581 (2019).
249. Song, G. *et al.* TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *J Exp Clin Cancer Res* **35**, 148 (2016).
250. Tian, Z. *et al.* TIMP1 derived from pancreatic cancer cells stimulates Schwann cells and promotes the occurrence of perineural invasion. *Cancer Lett* **546**, 215863 (2022).
251. Wang, H. *et al.* FN1 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancers. *Front Oncol* **12**, 918719 (2022).
252. Li, J., Chen, C., Chen, B. & Guo, T. High FN1 expression correlates with gastric cancer progression. *Pathol Res Pract* **239**, 154179 (2022).
253. Chen, S. *et al.* SERPINE1 Overexpression Promotes Malignant Progression and Poor Prognosis of Gastric Cancer. *J Oncol* **2022**, 2647825 (2022).
254. Kim, W.-T. *et al.* Secretory SERPINE1 Expression Is Increased by Antiplatelet Therapy, Inducing MMP1 Expression and Increasing Colon Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* **23**, 9596 (2022).
255. Pavón, M. A. *et al.* uPA/uPAR and SERPINE1 in head and neck cancer: role in tumor resistance, metastasis, prognosis and therapy. *Oncotarget* **7**, 57351–57366 (2016).
256. Sang, Y. *et al.* TEL2 suppresses metastasis by down-regulating SERPINE1 in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **6**, 29240–29253 (2015).
257. Lee, C.-C. & Huang, T.-S. Plasminogen Activator Inhibitor-1: The Expression, Biological Functions, and Effects on Tumorigenesis and Tumor Cell Adhesion and Migration. (2005).
258. Hisada, Y. *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1 and venous thrombosis in pancreatic cancer. *Blood Adv* **5**, 487–495 (2021).
259. Duffy, M. J., McGowan, P. M. & Gallagher, W. M. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* **214**, 283–293 (2008).
260. Langlois, B. *et al.* LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways. *PLoS One* **5**, e11584 (2010).
261. Gialeli, C., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* **278**, 16–27 (2011).
262. Vihinen, P. & Kähäri, V.-M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* **99**, 157–166 (2002).
263. Zhu, Y. *et al.* MMP2/3 promote the growth and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via PI3K/Akt-NF-κB-mediated epithelial-mesenchymal transformation. *J Cell Physiol* **234**, 15847–15855 (2019).
264. Justilien, V. *et al.* Matrix metalloproteinase-10 is required for lung cancer stem cell maintenance, tumor initiation and metastatic potential. *PLoS One* **7**, e35040 (2012).
265. Schoeps, B. *et al.* TIMP1 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* **81**, 3568–3579 (2021).
266. Würtz, S. Ø. *et al.* Plasma and serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are associated with prognosis in node-negative breast cancer: a prospective study. *Mol Cell Proteomics* **7**, 424–430 (2008).

267. Nalluri, S. *et al.* TIMP-1 Inhibits Apoptosis in Lung Adenocarcinoma Cells via Interaction with Bcl-2. *PLoS One* **10**, e0137673 (2015).
268. Qiao, P. & Lu, Z.-R. Fibronectin in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1245**, 85–96 (2020).
269. Ahmed, N., Riley, C., Rice, G. & Quinn, M. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin Exp Metastasis* **22**, 391–402 (2005).
270. Li, C.-L. *et al.* Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain. *Oncol Lett* **13**, 3889–3895 (2017).
271. Knowles, L. M. *et al.* Integrin αvβ3 and fibronectin upregulate Slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer research* **73**, (2013).
272. Balanis, N. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition promotes breast cancer progression via a fibronectin-dependent STAT3 signaling pathway. *J Biol Chem* **288**, 17954–17967 (2013).
273. Park, J. & Schwarzbauer, J. E. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* **33**, 1649–1657 (2014).
274. Berrazouane, S. *et al.* Beta1 integrin blockade overcomes doxorubicin resistance in human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis* **10**, 1–13 (2019).
275. Humphries, M. J. Cell adhesion assays. *Methods Mol Biol* **522**, 203–210 (2009).
276. Kaiura, T. L. *et al.* The effect of growth factors, cytokines, and extracellular matrix proteins on fibronectin production in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Vascular Surgery* **31**, 577–584 (2000).
277. Glasner, A. *et al.* NKp46 Receptor-Mediated Interferon-γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity* **48**, 107-119.e4 (2018).
278. Hagiwara, T. *et al.* Regulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 and interleukin-6 in rat hepatocytes. *Am J Pathol* **136**, 39–47 (1990).
279. Bürger, A. *et al.* Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: Effects of PDGF and TGF-β on synthesis and splicing. *Kidney International* **54**, 407–415 (1998).
280. Kim, K. K., Sheppard, D. & Chapman, H. A. TGF-β1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, a022293 (2018).
281. Batchu, R. B. *et al.* IL-10 Signaling in the Tumor Microenvironment of Ovarian Cancer. *Adv Exp Med Biol* **1290**, 51–65 (2021).
282. Ntanasis-Stathopoulos, I., Fotiou, D. & Terpos, E. CCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1231**, 13–21 (2020).
283. Sheng, D. *et al.* Ccl3 enhances docetaxel chemosensitivity in breast cancer by triggering proinflammatory macrophage polarization. *J Immunother Cancer* **10**, e003793 (2022).
284. da Silva, J. M. *et al.* Relevance of CCL3/CCR5 axis in oral carcinogenesis. *Oncotarget* **8**, 51024–51036 (2017).
285. Tulotta, C. & Ottewell, P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocr Relat Cancer* **25**, R421–R434 (2018).
286. Wrangle, J. M. *et al.* IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy. *J Interferon Cytokine Res* **38**, 45–68 (2018).

287. Chatzkel, J. *et al.* Coordinated Pembrolizumab and High Dose IL-2 (5-in-a-Row Schedule) for Therapy of Metastatic Clear Cell Renal Cancer. *Clin Genitourin Cancer* **20**, 252–259 (2022).
288. Wang, N. *et al.* CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF-κB/SOX4 signaling. *Cell Death Dis* **9**, 880 (2018).
289. Zhuo, C., Ruan, Q., Zhao, X., Shen, Y. & Lin, R. CXCL1 promotes colon cancer progression through activation of NF-κB/P300 signaling pathway. *Biol Direct* **17**, 34 (2022).
290. Mandel, U. *et al.* Cancer-associated changes in glycosylation of fibronectin. Immunohistological localization of oncofetal fibronectin defined by monoclonal antibodies. *APMIS* **100**, 817–826 (1992).
291. Reis, J. S. D. *et al.* Increased expression of the pathological O-glycosylated form of oncofetal fibronectin in the multidrug resistance phenotype of cancer cells. *Matrix Biol* **118**, 47–68 (2023).
292. Hsiao, C.-T. *et al.* Fibronectin in cell adhesion and migration via N-glycosylation. *Oncotarget* **8**, 70653–70668 (2017).
293. Wang, R. *et al.* Role of transcriptional corepressor CtBP1 in prostate cancer progression. *Neoplasia* **14**, 905–914 (2012).
294. Stefanski, C. D. & Prosperi, J. R. Wnt-Independent and Wnt-Dependent Effects of APC Loss on the Chemotherapeutic Response. *Int J Mol Sci* **21**, 7844 (2020).
295. Petitjean, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**, 622–629 (2007).
296. Wang, D.-P. *et al.* High Expression of Interleukin-2 Receptor Subunit Gamma Reveals Poor Prognosis in Human Gastric Cancer. *J Oncol* **2021**, 6670834 (2021).
297. Zhang, C., Dang, D., Cong, L., Sun, H. & Cong, X. Pivotal factors associated with the immunosuppressive tumor microenvironment and melanoma metastasis. *Cancer Med* **10**, 4710–4720 (2021).
298. Ayars, M. *et al.* IL2RG, identified as overexpressed by RNA-seq profiling of pancreatic intraepithelial neoplasia, mediates pancreatic cancer growth. *Oncotarget* **8**, 83370–83383 (2017).
299. Wang, C.-Y., Lai, M.-D., Phan, N. N., Sun, Z. & Lin, Y.-C. Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS One* **10**, e0125766 (2015).
300. Phan, N. N. *et al.* Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett* **14**, 2059–2074 (2017).
301. McKerr, N. *et al.* CACNA1D overexpression and voltage-gated calcium channels in prostate cancer during androgen deprivation. *Sci Rep* **13**, 4683 (2023).
302. Berndt, S. I. *et al.* Variant in sex hormone-binding globulin gene and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 165–168 (2007).
303. Canzian, F. *et al.* Genetic polymorphisms of the GNRH1 and GNRHR genes and risk of breast cancer in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). *BMC Cancer* **9**, 257 (2009).

304. Wu, H.-H. *et al.* GNRH1 and LTB4R might be novel immune-related prognostic biomarkers in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). *Cancer Cell International* **21**, 354 (2021).
305. Andrusiewicz, M. *et al.* CGB and GNRH1 expression analysis as a method of tumor cells metastatic spread detection in patients with gynecological malignances. *J Transl Med* **9**, 130 (2011).
306. Song, Y. *et al.* GNRH family genes contributed to gender-specific disparity of bladder cancer prognosis through exerting opposite regulatory roles between males and females. *J Cancer Res Clin Oncol* **149**, 6827–6840 (2023).
307. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
308. Xu, H. *et al.* Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol* **11**, 116 (2018).
309. Lee, S. H. *et al.* Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell* **173**, 515-528.e17 (2018).
310. Sontheimer-Phelps, A., Hassell, B. A. & Ingber, D. E. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer* **19**, 65–81 (2019).
311. Ingber, D. E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat Rev Genet* **23**, 467–491 (2022).
312. Palacios-Acedo, A.-L., Mege, D., Crescence, L., Panicot-Dubois, L. & Dubois, C. Cancer animal models in thrombosis research. *Thromb Res* **191 Suppl 1**, S112–S116 (2020).
313. Gold, K. A. *et al.* 3D Bioprinted Multicellular Vascular Models. *Adv Healthc Mater* **10**, e2101141 (2021).

ANNEXES

PUBLICATION

Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research

Mélanie Langiu*, Ana-Luisa Palacios-Acedo*, Lydie Crescence, Diane Mège, Christophe Dubois and Laurence Panicot-Dubois. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 1257. * co first author-ship.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research

Mélanie Langiu [1,†], Ana-Luisa Palacios-Acedo [1,†], Lydie Crescence [1], Diane Mege [1,2], Christophe Dubois [1,*] and Laurence Panicot-Dubois [1]

[1] Aix Marseille Univ INSERM, INRAE, C2VN, 13005 Marseille, France; melanie.langiu@univ-amu.fr (M.L.); ana-luisa.palacios-acedo@univ-amu.fr (A.-L.P.-A.); Lydie.crescence@univ-amu.fr (L.C.); diane.mege@univ-amu.fr (D.M.); laurence.panicot-dubois@univ-amu.fr (L.P.-D.)
[2] Department of Digestive Surgery, La Timone University Hospital, 13005 Marseille, France
* Correspondence: christophe.dubois@univ-amu.fr
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Spontaneous venous thrombosis is often the first clinical sign of cancer, and it is linked to a worsened survival rate. Traditionally, tumor-cell induced platelet activation has been the main actor studied in cancer-associated-thrombosis. However, platelet involvement alone does not seem to be sufficient to explain this heightened pro-thrombotic state. Neutrophils are emerging as key players in both thrombus generation and cancer progression. Neutrophils can impact thrombosis through the release of pro-inflammatory cytokines and expression of molecules like P-selectin and Tissue Factor (TF) on their membrane and on neutrophil-derived microvesicles. Their role in cancer progression is evidenced by the fact that patients with high blood-neutrophil counts have a worsened prognosis. Tumors can attract neutrophils to the cancer site via pro-inflammatory cytokine secretions and induce a switch to pro-tumoral (or N2) neutrophils, which support metastatic spread and have an immunosuppressive role. They can also expel their nuclear contents to entrap pathogens forming Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and can also capture coagulation factors, enhancing the thrombus formation. These NETs are also known to have pro-tumoral effects by supporting the metastatic process. Here, we strived to do a comprehensive literature review of the role of neutrophils as drivers of both cancer-associated thrombosis (CAT) and cancer progression.

Keywords: cancer; thrombosis; neutrophil; NET

check for updates

Citation: Langiu, M.; Palacios-Acedo, A.-L.; Crescence, L.; Mege, D.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1257. https://doi.org/10.3390/ijms23031257

Academic Editor: Isabella Russo

Received: 24 November 2021
Accepted: 21 January 2022
Published: 23 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 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 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The connection between cancer and thrombosis has been described since the XIX century by Dr Trousseau who described the presence of spontaneous coagulation in oncological patients [1,2]. Cancer patients have an increased incidence of both venous thromboembolism (VTE) (4% to 20%) and arterial thrombosis (2% to 5%) [3,4]. In fact, between 20 to 30% of all first venous thrombotic events are cancer related, and their presence portends poor prognosis and a significant decrease in patient survival [5,6]. The incidence of cancer-associated-thrombosis (CAT) is also associated with the tumor type, stage and treatment administered. CAT is the second most common cause of death in cancer patients (after cancer evolution itself) and thrombi can be found in half of deceased cancer patients during autopsy [1,7–9].

Platelets are at the crossroads of hemostasis, thrombosis, and inflammation. As such, their involvement in CAT has been largely investigated. Cancer cells can activate platelets through tumor cell induced platelet activation (TCIPA) [2]. In a direct manner, platelet receptors like αIIbβ3 and αVIβ1 can bind to tumor αVβ3 and ADAM9 respectively, as well as binding with P-selectins through PSGL-1 interaction, platelet toll-like receptor 4 and facilitating CLEC2-podoplanin interactions [10–14]. In an indirect manner, tumor cells secrete platelet agonists (like thromboxane A2 and ADP) into the tumor microenvironment,

activating platelets which then release more platelet agonists and create a potent activation loop [11–13,15]. Tumor-activated platelets can also secrete growth factors into the tumor microenvironment like transforming growth factor beta (TGF-β), vascular endothelial growth factor (VEGF), and platelet derived growth factor (PDGF) [2,13,16]. This platelet degranulation can also support local angiogenesis and increase the endothelial expression of adhesion molecules [13,17,18]. This overall increased platelet activity is related to a heightened risk of venous and arterial thrombosis in cancer patients [2,19–21].

However, platelet involvement alone does not seem to be sufficient to explain the heightened pro-thrombotic state in cancer patients. Recently, neutrophils have been beginning to enter the spotlight for their role in both tumor progression and CAT. Indeed, recent studies described that an increase in circulating neutrophil numbers was indicative of a worsened prognosis in gliomas, lung, and esophageal cancer [22–24]. To date, the relevant molecular mechanisms are not entirely clear into the literature. In this review will strive to compile the current state of the art of neutrophil involvement in cancer progression and in cancer-associated thrombosis.

2. Neutrophils and Thrombosis

Neutrophils are the most abundant leucocytes in humans and constitute an important pillar of the innate immunity [25,26]. They are the first immune cells to be recruited to inflammatory sites [25,26]. Neutrophils are also key players in intravascular immunity; their microbicidal activity prevents the spread of circulating pathogens [25]. Neutrophils have the capacity to mediate phagocytosis and intracellular killing of different pathogens as well as eliminate cellular debris in their phagolysosomal granules [25,27,28].

Circulating neutrophils are recruited to extra-vascular inflammatory sites via a chemokine gradient [29]. Studies have shown that neutrophils react preferentially to a hierarchy of chemokines, allowing them to reach the desired endothelial placement and then transmigrate to the surrounding tissue [29]. For example, bacterial-derived N-formyl-Methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and complement C5a override CXCL8/IL-8 and LTB4 chemotactic stimuli [29,30]. The actual recruiting cascade involves several well characterized steps: rolling-adhesion-tethering-crawling and transmigration. The endothelium is stimulated by inflammatory mediators like histamine and cytokines or pattern-recognition-receptors that will enhance P-selectin and E-selectin expression on the endothelial-cell surface to maximize neutrophil recruitment [29]. Neutrophils will begin "rolling" on the endothelial surface before being primed and activated by molecules like tumor-necrosis-factor-α (TNFα) as well as by direct contact with activated endothelial cells [29]. Priming of the neutrophils is necessary to achieve activation of the NADPH oxidase pathway used to destroy pathogens [29–31]. As the neutrophils slow down, they "crawl" between endothelial cells to reach the cell-cell junctions via ICAM1-MAC1 signaling [29,30]. Eventually neutrophils tether to the endothelium before transmigrating, a complex process that requires multiple integrin interactions (ICAM1 and 2, VCAM1, PECAM1 and EPCAM to name a few) [29]. Transmigration can occur between endothelial cells or transcellularly, and once neutrophils are in the tissue, they can zoom-in on the inflammatory site [26,29,30].

Neutrophils can eliminate pathogens in different ways; in both an intra and extracellular manner [27,31]. They can internalize opsonized pathogens or cellular debris into their phagolysosomal granules for destruction with reactive oxygen species (NADPH oxidase pathway) [29]. They also secrete their granule content to combat extracellular pathogens [29,31,32]. Neutrophils have three distinct granule types: **(1) Azurophilic or primary** containing myeloperoxidase (MPO), cathepsin G, neutrophil elastase (NE) and bactericidal/permeability increasing protein (BPI) [31–33]. **(2) Specific or secondary granules** with alkaline phosphatase, NAPDH oxidase, collagenase, lactoferrin and histaminase and **(3) the tertiary granules** with collagenase, cathepsin and gelatinase [29,31–33].

The role of neutrophils in the innate immunity is well characterized; however, their importance in other phenomena like thrombosis and hemostasis has only recently begun to be determined. It is also clear that in an altered pathological state like cancer, most

of the known mechanisms can be heightened, creating an amplification loop. The role of neutrophils in thrombosis began to be elucidated in 2005 when it was reported that leukocytes were rolling onto the growing thrombus site within the first two minutes post laser injury [34]. However, it was not until 2012 that the importance of neutrophils in thrombus formation was cemented [35]. Indeed, it was shown by Darbousset et al. that mice neutrophils were the first cells to accumulate at the site of arterial injury, even before platelets were detected [35]. Neutrophils accumulate through the interaction of intracellular-adhesion-molecule-1 (ICAM1) with leukocyte-function-associated-antigen-1 (LFA1) and express TF [35]. Moreover, neutrophil depletion has been shown to have a significant attenuation effect on thrombus formation in mice in vivo [36]. Interestingly, soluble fibrinogen found in prothrombotic conditions can also activate neutrophils in a CD11-b dependent mechanism which contributes to an increase in proinflammatory signals [37].

Neutrophils are a crucial leukocyte subset recruited at the site of injury, in fact, they release neutrophil elastase and augment their intracellular calcium mobilization, evidencing their activated state [38–40]. Additionally, ATP secreted during the thrombo-inflammatory process can directly activate neutrophils through the P2X1 membrane receptor [38]. It has been shown that P2X1 present on PMNs is involved in thrombin generation, and that its expression at the surface of platelets is needed for thrombus formation [38]. Several researchers, like Darbousset, R. et al. have shown the effect of ATP on thrombosis; and how it can activate human neutrophils in vitro [38]. On the other hand, in in vivo studies, P2X1-deficient mice had less neutrophil-accumulation and decreased thrombus formation at a laser-induced-injury site [38]. P2X1 activation leads to both platelet and neutrophil activation and activated platelets will then secrete their granules containing ADP, which enhances the platelet activation at the thrombus site [2,38,41]. These platelets will undergo intracellular calcium mobilization and adhere to the forming thrombus [42].

Another possible route in which neutrophils can impact thrombus formation is through the direct expression of TF on their membrane; this TF can be "obtained" after the neutrophil interacts with monocytes and/or macrophages [28,43]. Neutrophils that are first to arrive to the site of a laser injury can also express TF on their surface after interaction with endothelial cells [35]. More specifically, human neutrophils can express TF after stimulation with P-selectins and fMLP [44]. In inflammatory conditions, IgG triggers complement activation and C5a generation, which can induce TF gene transcription in activated human neutrophils [45].

A proposed molecular mechanism through which neutrophils impact thrombosis is through the generation of microvesicles (MVs). Microvesicles are small membrane vesicles released during cellular activation that contain the same membrane markers and proteins as the cell of origin [46–48]. MVs are known to have important contributions in inter-cellular communications and in pathological conditions like cancer [48–50]. MVs express phosphatidyl-serine on their outer membrane, which not only facilitates formation of coagulation complexes, but also promotes the ability of tissue factor (TF) to initiate coagulation [51]. Moreover, neutrophil-derived MVs may contain MPO, which has been shown to play a role in thrombus propagation by causing endothelial damage [28–48,52]. Human Neutrophil-MVs obtained after a PMA stimulation contain functionally active MAC-1 integrins that interact with GPIb on resting platelets. This interaction can activate platelets and induce the expression of the adhesion molecule P-selectin [53]. Please find a schematic revision of the role of neutrophils in thrombosis in Figure 1.

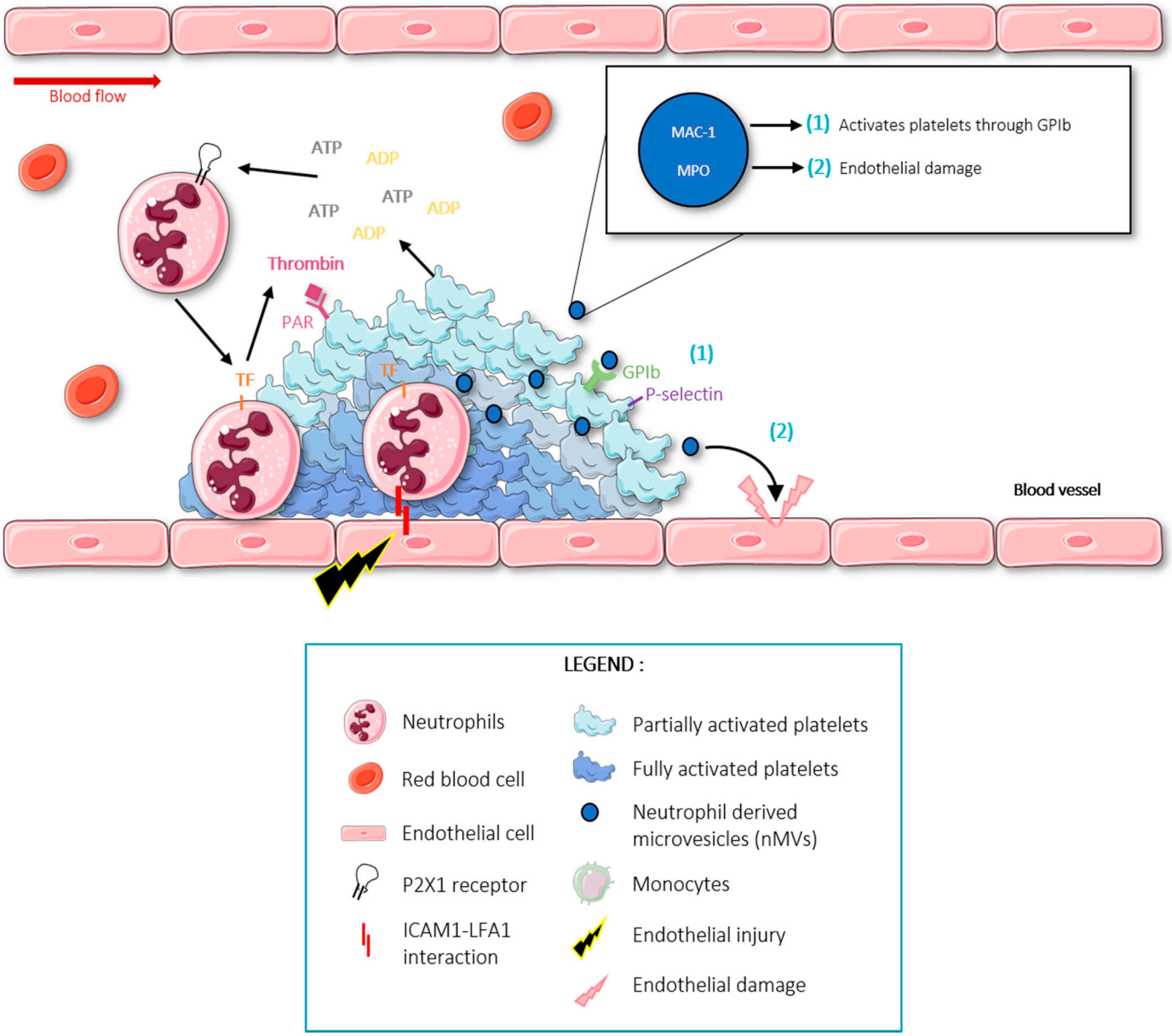


Figure 1. Schematic representation of neutrophil interactions and implications in thrombosis. Following endothelial injury, activated neutrophils express TF, which initiates the coagulation cascade resulting in thrombin generation and platelet activation. Activated platelets create a positive feedback loop to recruit more circulating platelets. Figure created using Servier Medical Art available at http://smart.servier.com/ (accessed on 15 September 2021).

3. Neutrophil Extracellular Traps or Activated Neutrophils in Venous Thrombosis

The role of neutrophil extracellular traps (NETs) in thrombosis has been recently described (Figure 2). NETs are part of the innate immunity's defense against pathogens in which the neutrophil sacrifices itself by expulsing its genetic material, thus forming «neutrophil extracellular traps» (NETs) [54].

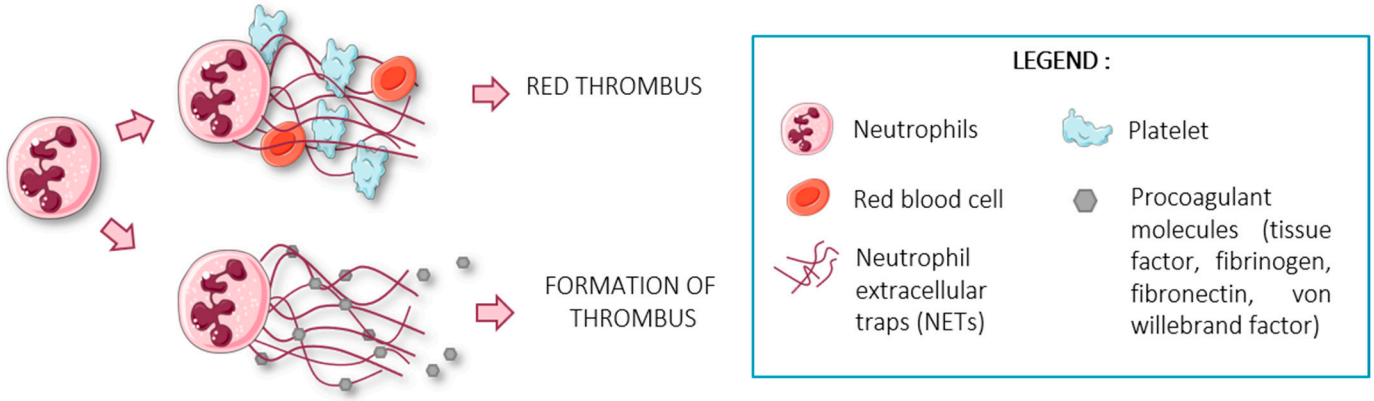


Figure 2. Schematic representation of NET interactions and implications in thrombosis. NETs are capable of trapping platelets and red blood cells, forming a red thrombus. In addition, they express pro-coagulant molecules such as tissue factor, fibrinogen, fibronectin or Von Willebrand factor, which initiate the coagulation cascade and participated to the thrombus formation. Figure created using Servier Medical Art available at http://smart.servier.com/ (accessed on 15 September 2021).

NETs are fibers of decondensed chromatin (DNA and histones) coated with antimicrobial proteins (myeloperoxidase (MPO), cathepsin G and neutrophil elastase (NE)) that are released by the neutrophil when it detects pathogens (bacteria, protozoa, fungi) in the extracellular environment [54]. These chromatin fibers create a network that entraps pathogens, preventing their dissemination in the host organism and eliminating them due to their anti-microbial properties [54,55].

The reaction of NET formation is catalyzed by peptidyl-arginine deiminase 4 (PAD4); which enables the chromatin de-condensation; causing Histone 3 to be citrullinated (CitH3) [56]. Therefore, by detecting either CitH3 or extracellular DNA, researchers can identify NETs. Indeed, the involvement of NETs in thrombosis was demonstrated when CitH3 was found in the thrombi of patients with VTE, and it was shown that the dissociation of NETs could promote the lysis of the thrombus [57].

Interestingly, studies have also highlighted the role of the enzyme PAD4 in the involvement of NETs in thrombosis [58]. Indeed, Martinod and colleagues demonstrated that after 48 h of inferior vena cava ligation only 10% of PAD4-deficient mice developed thrombi versus 90% in wild-type mice [58]. So PAD4 appears to be crucial in pathological venous thrombosis formation. Furthermore, no NETs were found in the thrombi from the PAD4-deficient mice, further highlighting their role in thrombus formation [55].

The network formed by NETs to trap pathogens can also trap platelets, an essential player in thrombosis [59]. In fact, Fuchs and colleagues have shown that NETs provide a scaffold for the activation and aggregation of platelets, as well as for red blood cells which form the red portion of the thrombus [59]. These data are supported by the fact that when mice were injected with DNase-I (a DNA-cleaving nuclease), NETs were degraded and no platelet aggregates were formed [59]. This suggests that NETs form an essential pro-thrombotic substrate for thrombosis.

The interaction of platelets and molecules that are entrapped in the NETs like von Willebrand factor (vWF), fibronectin and fibrinogen can also induce platelet aggregation [59]. The presence of fibrinogen causes the clots to consolidate through its transformation into fibrin in a thrombin-dependent manner [59]. In fact, Longstaff and colleagues have shown that contact between NETs (DNA + histones) and fibrin induces thicker fibers with improved stability and stiffness, and that the combination of histones and DNA significantly prolongs clot lysis time [60].

Additionally, Stakos and colleagues demonstrated that NETs were capable of secreting functional tissue factor (TF) [61]. TF is the initiating molecule of the extrinsic coagulation pathway and ultimately leads to thrombus formation [62]. The chromatin fibers can

also inhibit the inhibitors of the extrinsic pathway, resulting in an over-activity of this coagulation pathway [63].

Nevertheless, Carminita et al. have demonstrated that following laser-induced injury, neutrophils -but not NETs- are involved in thrombus formation [41]. In fact, activated neutrophils already express CitH3 and PAD4, confirming that they are markers of neutrophil activation rather than NET formation [41]. Moreover, they showed that the inhibition of thrombus formation by DNase-I could be independent of NET formation [41]. This shows the current need for more research on the real role of NETs in thrombus formation.

4. Neutrophils in Cancer Development

Neutrophils can play a role in the development of cancer. This is highlighted in the relationship between neutrophilia and worsened prognosis in oncological patients [64]. Cancer cells can secrete chemokines, like IL-8, as well as GRO chemokines (CXCL1/2/3) and TGF-β to induce neutrophil migration to the primary tumor [64,65]. This chemokine explains why tumor-associated neutrophils (TANs) are localized at the margins of the tumor site in the early stages of cancer and may then massively infiltrate the tumor center in advanced stages [64].

Neutrophil secretion of chemokines is also enhanced during cancer development [66,67]. Cytokine IL17 can impact the tumoral microenvironment and cause the tumoral stroma to develop pro-tumorigenic functions, indeed Hayata et al. showed that in a mouse model inhibition of IL17a actually increased the cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes [66,68]. They also participate in immune cell recruitment to the tumor and enhancing the cancer-associated inflammation and promoting pathogenic T-cells [67].

In 2019, Wisdom and colleagues demonstrated that neutrophils could promote tumor resistance to radiation therapy in a genetically modified mouse model of sarcoma [69]. They do so by increasing a MAPK-regulated transcriptional program downstream of Kras and upregulating the expression of the AP-1 family transcription factors Fos and Jun, to promote cell proliferation [69]. Moreover, TANs are divided into two subpopulations: the N1, which have an anti-tumor behavior, and the N2, which have a pro-tumor one [70] (Figure 3). This pro-tumor profile of neutrophils can be favored by the cancer cells themselves [71,72]. It is described in the literature that tumor cells can differentially secrete cytokines such as IL-35, IL-10 or TGF-β to induce a switch from N1 to N2 neutrophil phenotype in the early stages of cancer [71,72]. Indirectly, tumor-derived exosomes can also polarize neutrophils into a N2 phenotype via HMGB1/TLR4/NF-κB signaling [73–75]. Therefore, tumor cells themselves can tip the N1-N2 balance to favor a pro-tumoral phenotype of neutrophils.

Pro-tumoral N2 neutrophils can produce reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) to create DNA damage and genetic instability which can potentially initiate the tumor process [74,76]. They can also secrete mediators such as Oncostatin M (OSM), Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9), IL-17 and VEGF into the tumoral microenvironment to induce angiogenesis and support tumor growth [72,77,78].

Pro-tumoral N2 neutrophils play a key role in the formation of metastases by secreting MMP9 and neutrophil elastase (NE) to favor the remodeling of the extracellular matrix necessary for tumor progression [77]. In addition, Li, S. et al. have shown that neutrophils can secrete IL-17A to activate the JAK2/STAT3 pathway to induce the epithelial-mesenchymal transition (EMT) [78]. Moreover, N2 neutrophils secrete inflammatory cytokines such as IL-1B and OSM to promote cancer cell migration and invasion [79]. Pro-tumoral N2 neutrophils are important allies that contribute to the tumor growth and spread through different mechanisms.

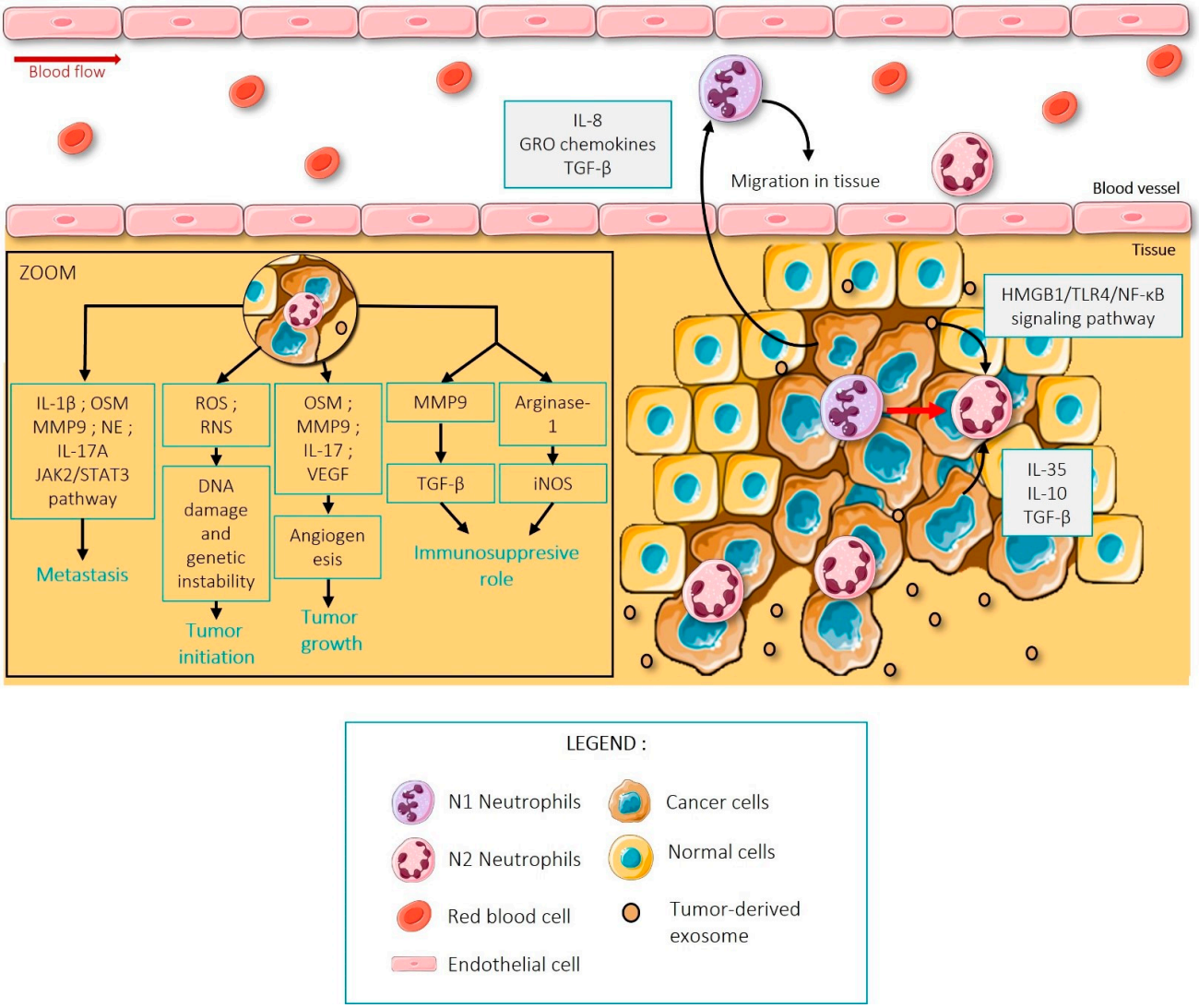


Figure 3. Summary of the role of N2 neutrophils during tumor development. Tumor cells can recruit circulating neutrophils and induce a switch from N1 to N2 neutrophils. Indeed, N2 neutrophils play an important role in several stages of cancer development, like tumor initiation and growth or metastasis formation by secreting several key molecules. Figure created using Servier Medical Art available at http://smart.servier.com/ (accessed on 15 September 2021).

Interestingly, N2 neutrophils also have an immunosuppressive role [72,80,81]. They can eliminate tumor-infiltrating T lymphocytes (TIL) by activating TGF-β via MMP9 [80,81]. They also secrete high levels of arginase-1 and can activate the STAT3 and ERK pathways that lead to iNOS production and suppression of T-lymphocyte activation [70,72,81]. Arginase-1 and iNOS allow the transformation of L-arginine either into urea and L-Ornithine or Nitric Oxide (NO) and citrulline. Resulting in a decrease in L-Arginine levels, a molecule that is essential for the generation of CD3ζ75 [70,81,82]. CD3ζ is a chain of the CD3 complex that associates with the T cell receptor (TCR) and is essential for TCR signaling via the ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) [82]. Without ITAM, the formation of a functional TCR and the proliferation of T lymphocytes are impacted [83]. In addition, extracellular vesicles derived from gastric cancer cells have been shown to induce PD-L1 expression on neutrophils to inactivate TLs [80,83].

Tumors are known to recruit macrophages and platelets to their microenvironment [14,84,85]. Indeed, high-infiltration of both macrophages and platelets can be correlated to a worsened prognosis [2]. Tumor-associated-neutrophils can influence macrophage

polarization to tumor-associated-macrophages (TAM) by secreting Il-8, TNF-α and MPO [84,86–88]. These TAMs have T-cell immunosuppressive properties through PD-PD-L1 signaling and can upregulate Treg functions, thus contributing to the local immunosuppression that favors tumor growth [83,87,88].

Tumoral platelet infiltration is known to give tumors a survival advantage by degranulation, supporting both angiogenesis and tumor-growth [2]. It is logical to assume that neutrophils also interact with these cell types. Activated platelets express P-selectin, which can bind to neutrophils through the PSGL-1 receptor to create platelet-neutrophil aggregates that support metastasis by hiding cancer cells from shear forces in circulation [14,89,90]. Activated platelets can also secrete transforming growth factor beta (TGF-β1) to recruit more neutrophils to the tumoral site and increase T-cell immunosuppression [2,65,70,80].

5. NETs in Cancer Development

NETs can support a pro-tumoral role as they are believed to be involved in tumor growth, metastasis, and the awakening of dormant cancer cells [91] (Figure 4). This could explain why NETs are a marker of poor prognosis in cancer patients, especially in terminal cancer patients [92]. In 2016, Demers et colleagues demonstrated with PAD4-deficient mice that NETs are essential for promoting tumor growth [93]. However, the exact mechanisms involved remain unknown to date. In 2019, Yazdani et al. proposed that neutrophil elastase (NE) released by NETs activates TLR4 in cancer cells which results in upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1A), a transcription coactivator that leads to increased mitochondrial biogenesis to provide additional energy for the tumor to accelerate its growth [94].

Interestingly, Zhang et al. found that the number of circulating NETs in peripheral blood correlated with disease stage in gastric cancer [95]. Indeed, Zhang et al. considered nucleosome-bound NE to indicate NET formation in serum and plasma of peripheral blood samples; these complexes were identified using capture ELISA [95].

In 2017, Park and colleagues demonstrated that blocking NET formation with DNase-I treatment reduced cancer invasion and prevented lung metastasis in mice [96]. Similarly, in colorectal cancer (CRC), it has been shown that increased NETs contribute to the development of CRC liver metastasis and that their digestion with DNase-I limits the increase in liver metastasis associated with NETs [97].

The exact mechanisms by which NETs are involved in metastasis remain somewhat unclear and controversial. Indeed, two initial hypotheses as to their involvement have been put forward: **(1)** that the DNA network formed by NETs may trap circulating cancer cells at the site of dissemination or **(2)** that they may increase local vascular permeability that facilitates the extravasation of cancer cells into the surrounding tissues [96]. Several studies support the first hypothesis that NETs facilitate the adhesion of circulating tumor cells to form metastases [98–100]. In 2020, Yang and colleagues demonstrated that NETs trap cancer cells but do not exert cytotoxicity on them [97]. NETs can increase the cancer cell's proliferative and invasive capacity by triggering tumor IL-8 expression [97]. The over-expression of IL-8 can in turn activate neutrophils and generate NETs that promote metastasis [97].

A third hypothesis **(3)** regarding the role of NETs in metastasis formation has recently been put forward [101]. The extracellular DNA represented by NETs can act as a chemotactic factor to attract cancer cells, instead of simply entrapping them [101]. This has been shown in several mouse models and would occur via the CCDC25 receptor present on the surface of cancer cells [101]. In fact, the CCDC25 receptor then interacts with NETs to recruit ILK to initiate the β-parvin-RAC1-CDC42 cascade, which induces cytoskeletal rearrangement and tumor cell migration [101].

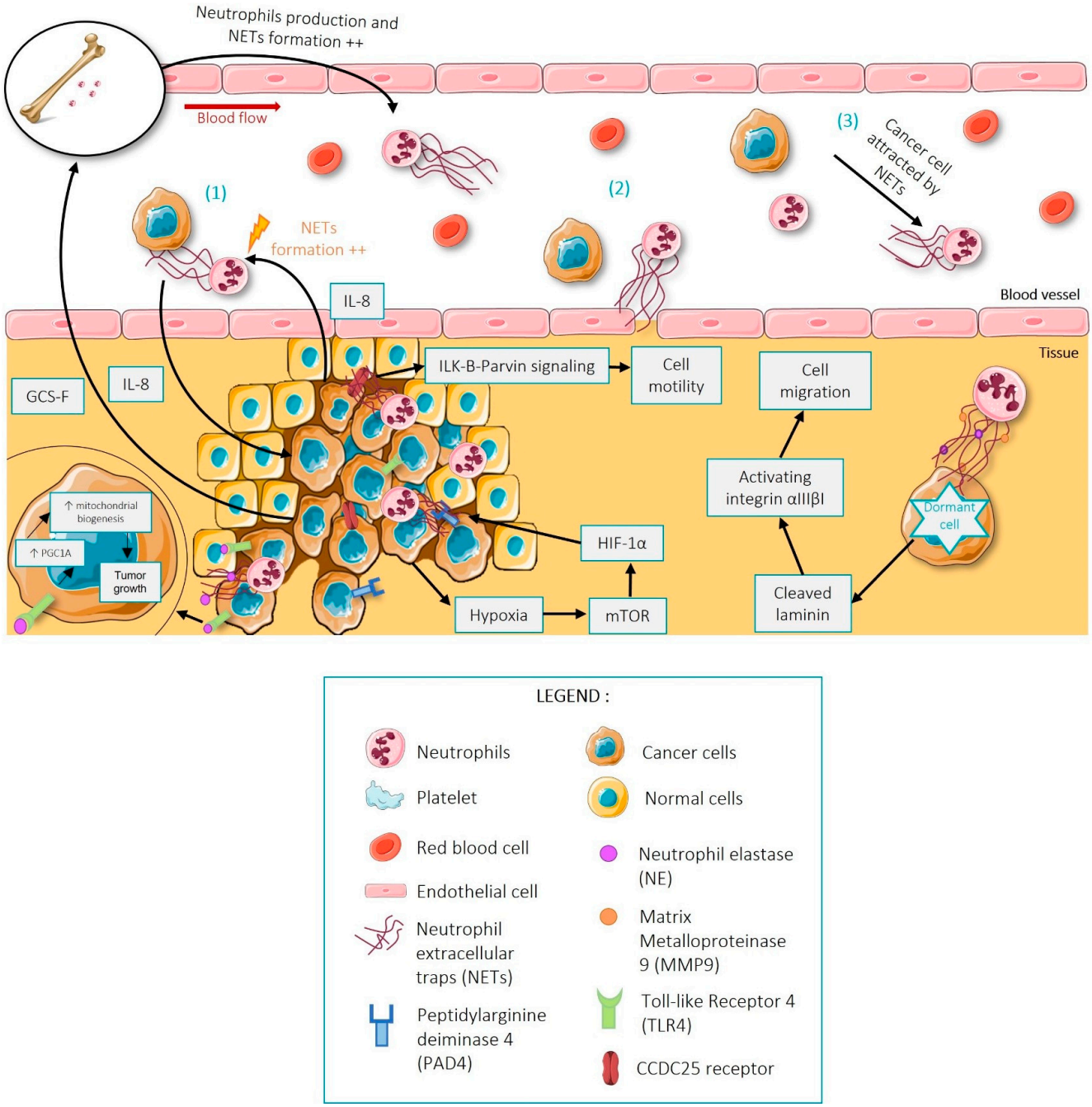


Figure 4. Schematic representation of the 3 main hypotheses of NETs in cancer (1) DNA network formed by NETs may trap circulating cancer cells at the site of dissemination. (2) DNA network formed by NETs may increase local vascular permeability that facilitates the extravasation of cancer cells into the surrounding tissues. (3) The extracellular DNA represented by NETs can act as a chemotactic factor to attract cancer cells. Figure created using Servier Medical Art available at http://smart.servier.com/ (accessed on 15 September 2021).

Last but not least, it has been shown in the literature that NETs are also involved in the awakening of so-called "dormant" or senescent cancer cells [102]. Tumor cells originating from the primary site can be disseminated in other tissues and remain dormant [102]. The stimuli that induce them to awaken are not well known. It has been described in mouse models that NE and MMP9 released by NETs can cleave laminin and induce the proliferation of dormant cancer cells by activating integrin α3β1 to mediate cell migration [102,103].

Thus, NETs seem to have many pro-tumor effects, but the exact molecular mechanisms remain elusive.

However, the role of NETs in cancer progression remains controversial as anti-tumor effects have also been described [104]. For example, Arelaki and colleagues demonstrated in 2016 that NETs generated in vitro prevent the growth of colorectal cancer cells and primary myeloid leukemia cells, by inducing their apoptosis and/or inhibiting their proliferation [104]. These anti-tumor effects remain to date mostly unknown.

6. NETs and Cancer-Associated Thrombosis

Recently, researchers began to study the role of NETs in CAT, especially since CitH3 was shown to be present in the thrombi of cancer patients [105,106]. Numerous studies have corroborated the link between NETs and CAT, including a 2-year prospective study of 946 patients that shows that patients with elevated blood CitH3 levels had a higher cumulative incidence of VTE [107,108].

As we have previously stated, NETs can induce a pro-thrombotic and pro-coagulant state via multiple mechanisms. This pro-coagulant state can be amplified by the cancer cells themselves since they can secrete G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) in very large quantities [93,109,110]. G-CSF release induces a higher production of neutrophils and, as Demers and colleagues have shown, it also allows neutrophils to spontaneously create more NETs [109]. In addition, cancer cells themselves are also able to release PAD4 into their microenvironment, which promotes citrullination of histone 3 and chromatin de-condensation, leading to NET formation [95].

On the other hand, the tumor microenvironment can also increase the pro-thrombotic state. Indeed, tumors often grow faster than their blood supply, thus provoking hypoxia (which is characteristic of most solid tumors) [110]. McInturff et al. have shown that hypoxia favors the formation of NETs via the mammalian target rapamycin (mTOR) which regulates NET formation by post-transcriptional control of the expression of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1α) [111].

Thus, NETs may be an attractive target for reducing CAT. Indeed, Boone and colleagues have shown that the use of chloroquine reduces the hypercoagulability observed in pancreatic cancer by inhibiting NETs [112]. Furthermore, it has been shown in an orthotopic mouse model of breast cancer that the use of dunnione, a potent substrate of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, attenuates the pro-thrombotic state by inhibiting TF and NETs formation [113].

Elaskani et al. studied the NET-induced platelet aggregation and found that targeting the NET scaffold was not an effective strategy to reduce platelet activation [114]. More traditionally used anticoagulant and anti-platelet drugs like low molecular weight or unfractioned heparin or direct-acting oral anticoagulants (Apixaban, dabigatran, rivaroxaban or endoxaban) continue to be the gold standard for thrombosis treatment in CAT [115,116]. Recently, the use of platelet P2RY12 inhibitors has been proposed to both prevent and treat TCIPA and CAT, but this application has not yet been validated in clinical trials [15,117].

7. Conclusions

We have endeavored to describe the current state of the literature on the relationship between neutrophils, thrombosis, and cancer. Neutrophilia is associated with worse prognosis in cancer patients and this increased neutrophil count has a direct impact on the development of cancer and CAT. Cancer cells themselves can participate in this relationship, creating a vicious circle that enhances both tumor growth and CAT. An important contributor to this relationship appears to be NET formation by neutrophils. NETS potentially sustain not only cancer growth, but also the development of cancer-associated thrombosis; yet the exact molecular mechanisms remain to be elucidated. We have shown that neutrophils play a key role in thrombus and CAT development; highlighting the necessity for further research to harness the power of neutrophils as new potential therapeutic or diagnostic targets in cancer.

Author Contributions: Conceptualization, M.L., A.-L.P.-A., L.C., C.D. and L.P.-D.; investigation, M.L. and A.-L.P.-A.; data curation, M.L. and A.-L.P.-A.; writing—original draft preparation, M.L. and A.-L.P.-A.; writing—review and editing M.L., A.-L.P.-A., L.C., D.M., C.D. and L.P.-D.; supervision, L.C., C.D. and L.P.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Ana-Luisa Palacios-Acedo was supported by the PAUSE program (College de France-PARIS).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Abbreviations

ATP	Adenosine triphosphate
BPI	Bactericidal/permeability increasing protein
CAT	Cancer associated thrombosis
CCDC25	Coiled-Coil Domain Containing 25
CitH3	Citrullinated histone H3
CRC	Colorectal cancer
CXCL8/IL-8	Interleukin 8
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
fMLP	N-formyl-Methionyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1 α
HMGB1	High-mobility group box 1
ICAM1/CD54	Intercellular Adhesion Molecule-1
ILK	Integrin-linked kinase
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK2	Janus kinase 2
LFA1	Leukocyte-function-associated-antigen-1
LTB4	Leukotriene B4
MAC1	Macrophage-1 Antigen
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
MPO	Myeloperoxidase
mTOR	Mammalian target rapamycin
TNFα	Tumor-necrosis-factor-α
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
MV	Microvesicles
NE	Neutrophil elastase
NET	Neutrophil extracellular traps
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
nMV	Neutrophil derived MVs
NO	Nitric Oxide
OSM	Oncostatin M
P2RX1/P2X1	P2X purinoceptor 1
PAD4	Peptidylarginine deiminase 4

PDGF	Platelet derived growth factor
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PGC1A	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PMN	Polymorphonuclear cells
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAM	Tumor-associated macrophage
TAN	Tumor-associated neutrophils
TCIPA	Tumor cell induced platelet activation
TCR	T cell receptor
TF	Tissue Factor
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIL	Tumor-infiltrating T lymphocytes
TLR4	Toll Like Receptor 4
TLs	T Lymphocytes
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VTE	Venous thromboembolism
vWF	von Willebrand factor
MV	Microvesicles
NE	Neutrophil elastase

References

1. Ikushima, S.; Ono, R.; Fukuda, K.; Sakayori, M.; Awano, N.; Kondo, K. Trousseau's syndrome: Cancer-associated thrombosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2015**, *46*, 204–208. [CrossRef] [PubMed]
2. Palacios-Acedo, A.L.; Mège, D.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Platelets, Thrombo-Inflammation, and Cancer: Collaborating with the Enemy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1805. [CrossRef] [PubMed]
3. Falanga, A.; Marchetti, M.; Vignoli, A. Coagulation and cancer: Biological and clinical aspects. *J. Thromb. Haemost.* **2012**, *11*, 223–233. [CrossRef] [PubMed]
4. Hisada, Y.; Mackman, N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood* **2017**, *130*, 1499–1506. [CrossRef] [PubMed]
5. Timp, J.F.; Braekkan, S.K.; Versteeg, H.; Cannegieter, S.C. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood* **2013**, *122*, 1712–1723. [CrossRef]
6. Plantureux, L.; Crescence, L.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Effects of platelets on cancer progression. *Thromb. Res.* **2018**, *164*, S40–S47. [CrossRef]
7. Varki, A. Trousseau's syndrome: Multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* **2007**, *110*, 1723–1729. [CrossRef]
8. Croninfenton, D.P.; Søndergaard, F.; Pedersen, L.; Fryzek, J.P.; Cetin, K.; Acquavella, J.F.; Baron, J.A.; Sørensen, H.T. Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: A population-based cohort study in Denmark, 1997–2006. *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 947–953. [CrossRef]
9. Khorana, A.A.; Francis, C.W.; Culakova, E.; Kuderer, N.M.; Lyman, G.H. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5*, 632–634. [CrossRef]
10. 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 α6β1 controls lung metastasis through direct binding to cancer cell–derived ADAM9. *JCI Insight* **2016**, *1*, e88245. [CrossRef]
11. 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]
12. Kloss, L.; Dollt, C.; Schledzewski, K.; Krewer, A.; Melchers, S.; Manta, C.; Sticht, C.; De La Torre, C.; Utikal, J.; Umansky, V.; et al. ADP secreted by dying melanoma cells mediates chemotaxis and chemokine secretion of macrophages via the purinergic receptor P2Y12. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 760. [CrossRef] [PubMed]
13. Xu, X.R.; Yousef, G.M.; Ni, H. Cancer and platelet crosstalk: Opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents. *Blood* **2018**, *131*, 1777–1789. [CrossRef] [PubMed]
14. Schlesinger, M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 125. [CrossRef] [PubMed]
15. Palacios-Acedo, A.L.; Mezouar, S.; Mège, D.; Crescence, L.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. P2RY12-Inhibitors Reduce Cancer-Associated Thrombosis and Tumor Growth in Pancreatic Cancers. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 704945. [CrossRef]
16. 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]

17. Plantureux, L.; Mège, D.; Crescence, L.; Carminita, E.; Robert, S.; Cointe, S.; Brouilly, N.; Ezzedine, W.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; et al. The Interaction of Platelets with Colorectal Cancer Cells Inhibits Tumor Growth but Promotes Metastasis. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 291–303. [CrossRef]
18. 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* **2014**, *136*, 462–475. [CrossRef]
19. Mitrugno, A.; Yunga, S.T.; Sylman, J.L.; Zilberman-Rudenko, J.; Shirai, T.; Hebert, J.F.; Kayton, R.; Zhang, Y.; Nan, X.; Shatzel, J.J.; et al. The role of coagulation and platelets in colon cancer-associated thrombosis. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2019**, *316*, C264–C273. [CrossRef]
20. 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]
21. Franco, A.T.; Corken, A.; Ware, J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* **2015**, *126*, 582–588. [CrossRef] [PubMed]
22. Schernberg, A.; Moureau-Zabotto, L.; Del Campo, E.R.; Escande, A.; Ducreux, M.; Nguyen, F.; Goere, D.; Chargari, C.; Deutsch, E. Leukocytosis and neutrophilia predict outcome in locally advanced esophageal cancer treated with definitive chemoradiation. *Oncotarget* **2017**, *8*, 11579–11588. [CrossRef] [PubMed]
23. Schernberg, A.; Nivet, A.; Dhermain, F.; Ammari, S.; Escande, A.; Pallud, J.; Louvel, G.; Deutsch, E. Neutrophilia as a biomarker for overall survival in newly diagnosed high-grade glioma patients undergoing chemoradiation. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* **2018**, *10*, 47–52. [CrossRef] [PubMed]
24. Schernberg, A.; Mezquita, L.; Boros, A.; Botticella, A.; Caramella, C.; Besse, B.; Escande, A.; Planchard, D.; Le Péchoux, C.; Deutsch, E. Neutrophilia as prognostic biomarker in locally advanced stage III lung cancer. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204490. [CrossRef]
25. Pfeiler, S.; Stark, K.; Massberg, S.; Engelmann, B. Propagation of thrombosis by neutrophils and extracellular nucleosome networks. *Haematologica* **2016**, *102*, 206–213. [CrossRef]
26. Castanheira, F.V.S.; Kubes, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood* **2019**, *133*, 2178–2185. [CrossRef]
27. Noubouossie, D.F.; Reeves, B.N.; Strahl, B.D.; Key, N.S. Neutrophils: Back in the thrombosis spotlight. *Blood* **2019**, *133*, 2186–2197. [CrossRef]
28. Kapoor, S.; Opneja, A.; Nayak, L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb. Res.* **2018**, *170*, 87–96. [CrossRef]
29. Kolaczkowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 159–175. [CrossRef]
30. Phillipson, M.; Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1381–1390. [CrossRef]
31. Cassatella, M.A.; Östberg, N.; Tamassia, N.; Soehnlein, O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol.* **2019**, *40*, 648–664. [CrossRef] [PubMed]
32. Cowland, J.B.; Borregaard, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol. Rev.* **2016**, *273*, 11–28. [CrossRef] [PubMed]
33. Kobayashi, S.D.; Malachowa, N.; DeLeo, F.R. Influence of Microbes on Neutrophil Life and Death. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 159. [CrossRef] [PubMed]
34. Gross, P.L.; Furie, B.C.; Merrill-Skoloff, G.; Chou, J.; Furie, B. Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 1318–1326. [CrossRef] [PubMed]
35. Darbousset, R.; Thomas, G.; Mezouar, S.; Frère, C.; Bonier, R.; Mackman, N.; Renné, T.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Tissue factor–positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* **2012**, *120*, 2133–2143. [CrossRef] [PubMed]
36. 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]
37. Rubel, C.; Fernández, G.C.; Dran, G.; Bompadre, M.B.; Isturiz, M.A.; Palermo, M.S. Fibrinogen Promotes Neutrophil Activation and Delays Apoptosis. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2002–2010. [CrossRef]
38. Darbousset, R.; Delierneux, C.; Mezouar, S.; Hego, A.; Lecut, C.; Guillaumat, I.; Riederer, M.A.; Evans, R.J.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; et al. P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* **2014**, *124*, 2575–2585. [CrossRef]
39. Schaff, U.Y.; Dixit, N.; Procyk, E.; Yamayoshi, I.; Tse, T.; Simon, S.I. Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood* **2010**, *115*, 657–666. [CrossRef]
40. 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. Investig.* **2007**, *117*, 953–960. [CrossRef]
41. Carminita, E.; Crescence, L.; Brouilly, N.; Altié, A.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. DNAse-dependent, NET-independent pathway of thrombus formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2100561118. [CrossRef] [PubMed]
42. Dubois, C.; Panicot-Dubois, L.; Furie, B.C.; Furie, B. Dynamics of Calcium Mobilization in Platelets during Thrombus Formation in a Living Mouse. *Blood* **2005**, *106*, 649. [CrossRef]

43. Egorina, E.M.; Sovershaev, M.A.; Olsen, J.O.; Østerud, B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: Evidence for a direct transfer. *Blood* **2008**, *111*, 1208–1216. [CrossRef] [PubMed]
44. Maugeri, N.; Brambilla, M.; Camera, M.; Carbone, A.; Tremoli, E.; Donati, M.B.; DE Gaetano, G.; Cerletti, C. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation1. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 1323–1330. [CrossRef]
45. Ritis, K.; Doumas, M.; Mastellos, D.; Micheli, A.; Giaglis, S.; Magotti, P.; Rafail, S.; Kartalis, G.; Sideras, P.; Lambris, J. A Novel C5a Receptor-Tissue Factor Cross-Talk in Neutrophils Links Innate Immunity to Coagulation Pathways. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 4794–4802. [CrossRef]
46. Mege, D.; Crescence, L.; Ouaissi, M.; Sielezneff, I.; Guieu, R.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Fibrin-bearing microparticles: Marker of thrombo-embolic events in pancreatic and colorectal cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 97394–97406. [CrossRef]
47. Willms, A.; Müller, C.; Julich, H.; Klein, N.; Schwab, R.; Güsgen, C.; Richardsen, I.; Schaaf, S.; Krawczyk, M.; Krawczyk, M.; et al. Tumour-associated circulating microparticles: A novel liquid biopsy tool for screening and therapy monitoring of colorectal carcinoma and other epithelial neoplasia. *Oncotarget* **2016**, *7*, 30867–30875. [CrossRef]
48. Mege, D.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Tumor-Derived Microparticles to Monitor Colorectal Cancer Evolution. In *Advanced Structural Safety Studies*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; Volume 1765, pp. 271–277.
49. Gong, J.; Jaiswal, R.; Dalla, P.; Luk, F.; Bebawy, M. Microparticles in cancer: A review of recent developments and the potential for clinical application. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *40*, 35–40. [CrossRef]
50. 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]
51. Nomura, S.; Shimizu, M. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J. Intensiv. Care* **2015**, *3*, 2–11. [CrossRef]
52. Pitanga, T.N.; França, L.D.A.; Rocha, V.C.J.; Meirelles, T.; Borges, V.M.; Gonçalves, M.S.; Pontes-De-Carvalho, L.C.; Noronha-Dutra, A.A.; Dos-Santos, W.L.C. Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC Cell Biol.* **2014**, *15*, 21. [CrossRef]
53. Pluskota, E.; Woody, N.M.; Szpak, D.; Ballantyne, C.M.; Soloviev, D.A.; Simon, D.I.; Plow, E.F. Expression, activation, and function of integrin αMβ2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* **2008**, *112*, 2327–2335. [CrossRef] [PubMed]
54. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D.S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1532–1535. [CrossRef] [PubMed]
55. Kumar, S.; Gupta, E.; Kaushik, S.; Jyoti, A. Neutrophil Extracellular Traps: Formation and Involvement in Disease Progression. *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* **2018**, *17*, 208–220.
56. Wang, Y.; Li, M.; Stadler, S.C.; Correll, S.; Li, P.; Wang, D.; Hayama, R.; Leonelli, L.; Han, H.; Grigoryev, S.A.; et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **2009**, *184*, 205–213. [CrossRef] [PubMed]
57. Savchenko, A.S.; Martinod, K.; Seidman, M.; Wong, S.L.; Borissoff, J.I.; Piazza, G.; Libby, P.; Goldhaber, S.Z.; Mitchell, R.N.; Wagner, D.D. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 860–870. [CrossRef] [PubMed]
58. Martinod, K.; Demers, M.; Fuchs, T.A.; Wong, S.L.; Brill, A.; Gallant, M.; Hu, J.; Wang, Y.; Wagner, D.D. Neutrophil histone modi fi cation by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8674–8679. [CrossRef]
59. Fuchs, T.A.; Brill, A.; Duerschmied, D.; Schatzberg, D.; Monestier, M.; Myers, D.D., Jr.; Wrobleski, S.K.; Wakefield, T.W.; Hartwig, J.H.; Wagner, D.D. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15880–15885. [CrossRef]
60. Longstaff, C.; Varjú, I.; Sótonyi, P.; Szabó, L.; Krumrey, M.; Hoell, A.; Bóta, A.; Varga, Z.; Komorowicz, E.; Kolev, K. Mechanical Stability and Fibrinolytic Resistance of Clots Containing Fibrin, DNA, and Histones. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 6946–6956. [CrossRef]
61. Stakos, D.A.; Kambas, K.; Konstantinidis, T.; Mitroulis, I.; Apostolidou, E.; Arelaki, S.; Tsironidou, V.; Giatromanolaki, A.; Skendros, P.; Konstantinides, S.; et al. Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur. Hearth J.* **2015**, *36*, 1405–1414. [CrossRef]
62. Butenas, S.; Orfeo, T.; Mann, K.G. Tissue Factor in Coagulation. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 1989–1996. [CrossRef] [PubMed]
63. Massberg, S.; Grahl, L.; von Bruehl, M.-L.; Manukyan, D.; Pfeiler, S.; Goosmann, C.; Brinkmann, V.; Lorenz, M.; Bidzhekov, K.; Khandagale, A.B.; et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 887–896. [CrossRef] [PubMed]
64. Mishalian, I.; Bayuh, R.; Levy, L.; Zolotarov, L.; Michaeli, J.; Fridlender, Z.G. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol. Immunother.* **2013**, *62*, 1745–1756. [CrossRef] [PubMed]
65. SenGupta, S.; Hein, L.E.; Xu, Y.; Zhang, J.; Konwerski, J.R.; Li, Y.; Johnson, C.; Cai, D.; Smith, J.L.; Parent, C.A. Triple-Negative Breast Cancer Cells Recruit Neutrophils by Secreting TGF-β and CXCR2 Ligands. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 973. [CrossRef]
66. Mucciolo, G.; Curcio, C.; Roux, C.; Li, W.Y.; Capello, M.; Curto, R.; Chiarle, R.; Giordano, D.; Satolli, M.A.; Lawlor, R.; et al. IL17A critically shapes the transcriptional program of fibroblasts in pancreatic cancer and switches on their protumorigenic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2020395118. [CrossRef]

67. McGinley, A.M.; Sutton, C.E.; Edwards, S.C.; Leane, C.M.; Decourcey, J.; Teijeiro, A.; Hamilton, J.A.; Boon, L.; Djouder, N.; Mills, K.H. Interleukin-17A Serves a Priming Role in Autoimmunity by Recruiting IL-1β-Producing Myeloid Cells that Promote Pathogenic T Cells. *Immunity* **2020**, *52*, 342–356.e6. [CrossRef]
68. Hayata, K.; Iwahashi, M.; Ojima, T.; Katsuda, M.; Iida, T.; Nakamori, M.; Ueda, K.; Nakamura, M.; Miyazawa, M.; Tsuji, T.; et al. Inhibition of IL-17A in Tumor Microenvironment Augments Cytotoxicity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Tumor-Bearing Mice. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53131. [CrossRef]
69. Wisdom, A.J.; Hong, C.S.; Lin, A.J.; Xiang, Y.; Cooper, D.E.; Zhang, J.; Xu, E.S.; Kuo, H.-C.; Mowery, Y.M.; Carpenter, D.; et al. Neutrophils promote tumor resistance to radiation therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 18584–18589. [CrossRef]
70. Fridlender, Z.G.; Sun, J.; Kim, S.; Kapoor, V.; Cheng, G.; Ling, L.; Scott Worthen, G.; Albelda, S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil pheno-type by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 183–194. [CrossRef]
71. Sagiv, J.Y.; Michaeli, J.; Assi, S.; Mishalian, I.; Kisos, H.; Levy, L.; Damti, P.; Lumbroso, D.; Polyansky, L.; Sionov, R.V.; et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 562–573. [CrossRef]
72. Zou, J.-M.; Qin, J.; Li, Y.-C.; Wang, Y.; Li, D.; Shu, Y.; Luo, C.; Wang, S.-S.; Chi, G.; Guo, F.; et al. IL-35 induces N2 phenotype of neutrophils to promote tumor growth. *Oncotarget* **2017**, *8*, 33501–33514. [CrossRef] [PubMed]
73. Scalerandi, M.V.; Peinetti, N.; Leimgruber, C.; Rubio, M.M.C.; Nicola, J.P.; Menezes, G.B.; Maldonado, C.A.; Quintar, A. Inefficient N2-Like Neutrophils Are Promoted by Androgens During Infection. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1980. [CrossRef] [PubMed]
74. Powell, D.R.; Huttenlocher, A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* **2015**, *37*, 41–52. [CrossRef] [PubMed]
75. Zhang, X.; Shi, H.; Yuan, X.; Jiang, P.; Qian, H.; Xu, W. Tumor-derived exosomes induce N2 polarization of neutrophils to promote gastric cancer cell migration. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 146. [CrossRef]
76. Furumaya, C.; Martinez-Sanz, P.; Bouti, P.; Kuijpers, T.W.; Matlung, H.L. Plasticity in Pro- and Anti-tumor Activity of Neutrophils: Shifting the Balance. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, e2100. [CrossRef]
77. Wang, X.; Qiu, L.; Li, Z.; Wang, X.-Y.; Yi, H. Understanding the Multifaceted Role of Neutrophils in Cancer and Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2456. [CrossRef]
78. Li, T.-J.; Jiang, Y.-M.; Hu, Y.-F.; Huang, L.; Yu, J.; Zhao, L.-Y.; Deng, H.-J.; Mou, T.-Y.; Liu, H.; Yang, Y.; et al. Interleukin-17–Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *23*, 1575–1585. [CrossRef]
79. Bruchard, M.; Ghiringhelli, F. Microenvironnement tumoral. *Med./Sci. Paris* **2014**, *30*, 429–435. [CrossRef]
80. Germann, M.; Zangger, N.; Sauvain, M.O.; Sempoux, C.; Bowler, A.D.; Wirapati, P.; Kandalaft, L.E.; Delorenzi, M.; Tejpar, S.; Coukos, G.; et al. Neutrophils suppress tumor-infiltrating T cells in colon cancer via matrix metalloproteinase-mediated activation of TGF β. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12*, e10681. [CrossRef]
81. Li, S.; Cong, X.; Gao, H.; Lan, X.; Li, Z.; Wang, W.; Song, S.; Wang, Y.; Li, C.; Zhang, H.; et al. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 6. [CrossRef]
82. Bald, T.; Quast, T.; Landsberg, J.; Rogava, M.; Glodde, N.; Lopez-Ramos, D.; Kohlmeyer, J.; Riesenberg, S.; van den Boorn-Konijnenberg, D.; Hömig-Hölzel, C.; et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature* **2014**, *507*, 109–113. [CrossRef] [PubMed]
83. Shi, Y.; Zhang, J.; Mao, Z.; Jiang, H.; Liu, W.; Shi, H.; Ji, R.; Xu, W.; Qian, H.; Zhang, X. Extracellular Vesicles from Gastric Cancer Cells Induce PD-L1 Expression on Neutrophils to Suppress T-Cell Immunity. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 629. [CrossRef] [PubMed]
84. Kim, J.; Bae, J.-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 6058147. [CrossRef] [PubMed]
85. Lin, Y.; Xu, J.; Lan, H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: Biological roles and clinical therapeutic applications. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 76. [CrossRef]
86. Casazza, A.; Laoui, D.; Wenes, M.; Rizzolio, S.; Bassani, N.; Mambretti, M.; Deschoemaeker, S.; Van Ginderachter, J.A.; Tamagnone, L.; Mazzone, M. Impeding Macrophage Entry into Hypoxic Tumor Areas by Sema3A/Nrp1 Signaling Blockade Inhibits Angiogenesis and Restores Antitumor Immunity. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 695–709. [CrossRef]
87. Laoui, D.; Keirsse, J.; Morias, Y.; Van Overmeire, E.; Geeraerts, X.; Elkrim, Y.; Kiss, M.; Bolli, E.; Lahmar, Q.; Sichien, D.; et al. The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13720. [CrossRef]
88. Savage, N.D.L.; De Boer, T.; Walburg, K.V.; Joosten, S.A.; Van Meijgaarden, K.; Geluk, A.; Ottenhoff, T.H.M. Human Anti-Inflammatory Macrophages Induce Foxp3+GITR+CD25+ Regulatory T Cells, Which Suppress via Membrane-Bound TGFβ-1. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 2220–2226. [CrossRef]
89. Templeton, A.J.; Mcnamara, M.G.; Šeruga, B.; Vera-Badillo, F.E.; Aneja, P.; Ocaña, A.; Leibowitz-Amit, R.; Sonpavde, G.; Knox, J.J.; Tran, B.; et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*, dju124. [CrossRef]
90. Lecot, P.; Sarabi, M.; Abrantes, M.P.; Mussard, J.; Koenderman, L.; Caux, C.; Bendriss-Vermare, N.; Michallet, M.-C. Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2155. [CrossRef]
91. Nolan, E.; Malanchi, I. Neutrophil 'safety net' causes cancer cells to metastasize and proliferate. *Nature* **2020**, *583*, 32–33. [CrossRef]

92. Rosell, A.; Aguilera, K.; Hisada, Y.; Schmedes, C.; Mackman, N.; Wallén, H.; Lundström, S.; Thålin, C. Prognostic value of circulating markers of neutrophil activation, neutrophil extracellular traps, coagulation and fibrinolysis in patients with terminal cancer. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5074. [CrossRef] [PubMed]
93. Demers, M.; Wong, S.L.; Martinod, K.; Gallant, M.; Cabral, J.E.; Wang, Y.; Wagner, D.D. Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *OncoImmunology* **2016**, *5*, e1134073. [CrossRef] [PubMed]
94. Yazdani, H.O.; Roy, E.; Comerci, A.J.; van der Windt, D.J.; Zhang, H.; Huang, H.; Loughran, P.; Shiva, S.; Geller, D.A.; Bartlett, D.L.; et al. Neutrophil Extracellular Traps Drive Mitochondrial Homeostasis in Tumors to Augment Growth. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 5626–5639. [CrossRef] [PubMed]
95. Zhang, Y.; Hu, Y.; Ma, C.; Sun, H.; Wei, X.; Li, M.; Wei, W.; Zhang, F.; Yang, F.; Wang, H.; et al. Diagnostic, Therapeutic Predictive, and Prognostic Value of Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Gastric Adenocarcinoma. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1036. [CrossRef] [PubMed]
96. Park, J.; Wysocki, R.W.; Amoozgar, Z.; Maiorino, L.; Fein, M.R.; Jorns, J.; Schott, A.F.; Kinugasa-Katayama, Y.; Lee, Y.; Won, N.H.; et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 361ra138. [CrossRef] [PubMed]
97. Yang, L.; Liu, L.; Zhang, R.; Hong, J.; Wang, Y.; Wang, J.; Zuo, J.; Zhang, J.; Chen, J.; Hao, H. IL-8 mediates a positive loop connecting increased neutrophil extracellular traps (NETs) and colorectal cancer liver metastasis. *J. Cancer* **2020**, *11*, 4384–4396. [CrossRef]
98. Ferrucci, P.F.; Ascierto, P.A.; Pigozzo, J.; Del Vecchio, M.; Maio, M.; Cappellini, G.C.A.; Guidoboni, M.; Queirolo, P.; Savoia, P.; Mandalà, M.; et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: Prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 732–738. [CrossRef]
99. Tohme, S.; Yazdani, H.O.; Al-Khafaji, A.B.; Chidi, A.P.; Loughran, P.; Mowen, A.K.; Wang, Y.; Simmons, R.L.; Huang, H.; Tsung, A. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 1367–1380. [CrossRef]
100. Cools-Lartigue, J.; Spicer, J.; Najmeh, S.; Ferri, L. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 4179–4194. [CrossRef]
101. Yang, L.; Liu, Q.; Zhang, X.; Liu, X.; Zhou, B.; Chen, J.; Huang, D.; Li, J.; Li, H.; Chen, F.; et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature* **2020**, *583*, 133–138. [CrossRef]
102. Albrengues, J.; Shields, M.A.; Ng, D.; Park, C.G.; Ambrico, A.; Poindexter, M.E.; Upadhyay, P.; Uyeminami, D.L.; Pommier, A.; Küttner, V.; et al. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* **2018**, *361*, eaao4227. [CrossRef] [PubMed]
103. Kreidberg, J.A. Functions of α3β1 integrin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 548–553. [CrossRef]
104. Arelaki, S.; Arampatzioglou, A.; Kambas, K.; Papagoras, C.; Miltiades, P.; Angelidou, I.; Mitsios, A.; Kotsianidis, I.; Skendros, P.; Sivridis, E.; et al. Gradient Infiltration of Neutrophil Extracellular Traps in Colon Cancer and Evidence for Their Involvement in Tumour Growth. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154484. [CrossRef] [PubMed]
105. Thålin, C.; Hisada, Y.; Lundström, S.; Mackman, N.; Wallén, H. Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 1724–1738. [CrossRef] [PubMed]
106. Thålin, C.; Demers, M.; Blomgren, B.; Wong, S.L.; von Arbin, M.; von Heijne, A.; Laska, A.C.; Wallén, H.; Wagner, D.D.; Aspberg, S. NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. *Thromb. Res.* **2016**, *139*, 56–64. [CrossRef]
107. Mauracher, L.-M.; Posch, F.; Martinod, K.; Grilz, E.; Däullary, T.; Hell, L.; Brostjan, C.; Zielinski, C.; Ay, C.; Wagner, D.D.; et al. Citrullinated histone H3, a biomarker of neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of venous thromboembolism in cancer patients. *J. Thromb. Haemost.* **2018**, *16*, 508–518. [CrossRef]
108. Hisada, Y.; Grover, S.P.; Maqsood, A.; Houston, R.; Ay, C.; Noubouossie, D.F.; Cooley, B.C.; Wallén, H.; Key, N.S.; Thålin, C.; et al. Neutrophils and neutrophil extracellular traps enhance venous thrombosis in mice bearing human pancreatic tumors. *Haematologica* **2019**, *105*, 218–225. [CrossRef]
109. Demers, M.; Krause, D.S.; Schatzberg, D.; Martinod, K.; Voorhees, J.R.; Fuchs, T.A.; Scadden, D.T.; Wagner, D.D. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13076–13081. [CrossRef]
110. Bertout, J.A.; Patel, S.A.; Simon, M.C. The impact of O_2 availability on human cancer. *Nat. Cancer* **2008**, *8*, 967–975. [CrossRef]
111. McInturff, A.M.; Cody, M.J.; Elliott, E.A.; Glenn, J.W.; Rowley, J.W.; Rondina, M.T.; Yost, C.C. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1α. *Blood* **2012**, *120*, 3118–3125. [CrossRef]
112. Boone, B.A.; Murthy, P.; Miller-Ocuin, J.; Doerfler, W.R.; Ellis, J.T.; Liang, X.; Ross, M.A.; Wallace, C.T.; Sperry, J.L.; Lotze, M.T.; et al. Chloroquine reduces hypercoagulability in pancreatic cancer through inhibition of neutrophil extracellular traps. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 678. [CrossRef] [PubMed]
113. Cao, W.; Zhu, M.-Y.; Lee, S.-H.; Lee, S.-B.; Kim, H.-J.; Park, B.-O.; Yoon, C.-H.; Khadka, D.; Oh, G.-S.; Shim, H.; et al. Modulation of Cellular NAD^+ Attenuates Cancer-Associated Hypercoagulability and Thrombosis via the Inhibition of Tissue Factor and Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12085. [CrossRef] [PubMed]

114. Elaskalani, O.; Razak, N.B.A.; Metharom, P. Neutrophil extracellular traps induce aggregation of washed human platelets independently of extracellular DNA and histones. *Cell Commun. Signal.* **2018**, *16*, 24. [CrossRef] [PubMed]
115. Streiff, M.B.; Abutalib, S.A.; Farge, D.; Murphy, M.; Connors, J.M.; Piazza, G. Update on Guidelines for the Management of Cancer-Associated Thrombosis. *Oncology* **2020**, *26*, e24–e40. [CrossRef]
116. Sikorska, J.; Uprichard, J. Direct Oral Anticoagulants: A Quick Guide. *Eur. Cardiol. Rev.* **2017**, *12*, 40–45. [CrossRef]
117. Elaskalani, O.; Domenichini, A.; Razak, N.B.A.; Dye, D.E.; Falasca, M.; Metharom, P. Antiplatelet Drug Ticagrelor Enhances Chemotherapeutic Efficacy by Targeting the Novel P2Y12-AKT Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Cancers* **2020**, *12*, 250. [CrossRef]