



**HAL**  
open science

# Caractérisation de nouveaux médiateurs entre cancer, inflammation et thrombose : ADAMTS13, PSGL-1 et Siglec-5

Marion Pépin

► **To cite this version:**

Marion Pépin. Caractérisation de nouveaux médiateurs entre cancer, inflammation et thrombose : ADAMTS13, PSGL-1 et Siglec-5. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS571 . tel-01526679

**HAL Id: tel-01526679**

**<https://theses.hal.science/tel-01526679>**

Submitted on 23 May 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS571

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
"UNIVERSITE PARIS SUD"

ECOLE DOCTORALE N°569  
**Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué**

Spécialité de doctorat : Physiologie, physiopathologie

Par

**Marion PEPIN**

Caractérisation de nouveaux médiateurs entre cancer, inflammation  
et thrombose : VWF, ADAMTS13, PSGL-1 et Siglec-5

**Thèse présentée et soutenue au Kremlin Bicêtre, le 21 décembre 2016 :**

**Composition du Jury :**

M. VASSE Marc, PUPH, Université Paris Sud	Président
Mme REGNAULT Véronique, DR, Inserm	Rapporteur
Mme SUSEN Sophie, PUPH, Université Lille 2	Rapporteur
M. DUBOIS Christophe, PU, Aix Marseille Université	Examineur
M. STEPANIAN Alain, PH, AP-HP, Hôpital Lariboisière	Examineur
Mme DENIS Cécile, DR, Inserm, Université Paris Sud	Directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

*Aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail,*

M. le Professeur Vasse pour l'honneur que vous me faites de présider ce jury.

Madame le Docteur Regnault et Madame le Professeur Susen, merci d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Monsieur le Professeur Dubois, pour votre accueil et votre expertise lors de mon séjour à Marseille et pour votre présence à ce jury.

*A mes encadrants au cours de ces années,*

Cécile Denis, ma directrice de thèse, merci de m'avoir accueillie pendant ces années au laboratoire, de m'avoir fait confiance. Merci pour ta rigueur et ta clairvoyance scientifique ainsi que pour ta patience et ta compréhension.

Peter Lenting, merci pour ton encadrement, ton analyse précise et efficace, ta disponibilité et ton enthousiasme.

Alain Stepanian, pour m'avoir fait découvrir l'univers de la recherche, merci pour ton soutien et ta présence motivante.

*A toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail et l'ont enrichi*

Avec des remerciements particuliers au Dr Christophe pour sa participation aux échanges scientifiques ; au Dr Muczinski pour son aide précieuse à la fois technique et humaine ; à Cécile Loubière pour tous ses conseils ; au Dr Mezouar pour son expertise *in vivo*.

A Paulette, qui m'a patiemment encadrée pour mes premières manipulations et a continué à poser son regard protecteur par la suite.

*A tous les membres de l'unité,*

Pour tous les bons moments partagés au cours de ces années passées au laboratoire. Certains sont partis, d'autres plus récemment arrivés.

Un merci plus spécial pour :

Yasmine, ma grande sœur doctorante sans qui je n'aurais pas su comment me réinscrire à l'université.

Fatou, pour son sourire et sa bonne humeur constante.

Ziane, pour ses gâteaux cachés partout dans le bureau.

A François et Allan pour leurs connaissances en purification de protéines et en ballon rond.

Et tous les étudiants présents ou passés : Bérangère, Maxime, Awatef, Mahita

*Aux médecins et chercheurs rencontrés durant mon parcours en particulier le Pr Isabelle*

Mahé, le Pr Agnès Veyradier, le Pr Agathe Raynaud-Simon, le Pr Laurent Teillet, le Dr Sophie Moulias.

Mes remerciements vont également à mes collègues du service de gériatrie de l'hôpital Ambroise Paré qui m'ont permis de continuer à fréquenter la recherche.

A ma famille et belle-famille pour leur soutien sans faille et leurs relectures attentives à la recherche de mes fautes (même s'il en reste peut-être encore).

A Benoît et à nos filles, merci de me soutenir dans tous mes choix et de m'accompagner avec tant d'attention.

A mes amis, merci de m'entourer et de répondre toujours présents.

## TABLE DES MATIERES

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.</b>	<b>10</b>
<b>A/ Cancer et Thrombose</b>	<b>11</b>
<b>I) Epidémiologie</b>	<b>11</b>
<b>II) Physio-pathologie : mécanismes moléculaires et cellulaires</b>	<b>13</b>
1. Activité procoagulante : facteur tissulaire et facteur procoagulant du cancer	14
2. Cytokines	14
3. Angiogenèse	15
4. Interactions entre les cellules tumorales et les cellules de l'hôte	16
5. Microparticules (MPs)	17
6. P-sélectine	18
<b>III) Evaluation du risque individuel de thrombose</b>	<b>19</b>
1. Facteurs de risque cliniques	19
2. Biomarqueurs	20
a- Numération sanguine	20
b- P-sélectine soluble	21
c- Facteur Willebrand et ADAMTS13	22
d- D-Dimères	23
e- F1+2 de la prothrombine	24
f- Facteur VIII (FVIII)	24
g- Autres marqueurs liés à la coagulation	25
3. Intérêt d'un score de risque	26
<b>IV) Rôles du VWF et d'ADAMTS13</b>	<b>28</b>
1. VWF	28
a- <i>Synthèse</i>	28
b- <i>Structure</i>	29
c- <i>Régulation de la taille des multimères de VWF</i>	30
d- <i>Fonctions hémostatiques du VWF</i>	31
e- <i>Rôle du VWF dans la thrombose veineuse</i>	32
2. VWF et cancer	33
a- <i>Inflammation liée au cancer</i>	33
b- <i>VWF dans la thrombose liée au cancer</i>	34
c- <i>Rôle dans la progression tumorale</i>	35
3. ADAMTS13	36
a- <i>Généralités sur la famille des métalloprotéases ADAMTS</i>	36
b- <i>ADAMTS13 synthèse et structure</i>	38
c- <i>Fonctions ADAMTS13</i>	39
d- <i>Métalloprotéases et cancer</i>	41
e- <i>ADAMTS13 et cancer</i>	42

<b>B/ Inflammation et recrutement leucocytaire</b>	<b>43</b>
<b>I) Généralités</b>	<b>43</b>
1. Cellules et médiateurs de l'inflammation	44
2. Cascade de recrutement leucocytaire	47
3. Modèles in vivo	50
<b>II) PSGL-1 et P-sélectine</b>	<b>51</b>
1. PSGL-1	51
<i>a- Structure-Expression</i>	51
<i>b- Fonctions</i>	55
2. P-sélectine	57
<i>a- Structure-Expression</i>	57
<i>b- Fonctions</i>	58
3. Inhibiteurs de la liaison PSGL-1 / P-sélectine	59
<b>III) Siglecs</b>	<b>60</b>
1. Description générale de la famille des Siglecs	60
2. Expression, ligands et fonctions des CD33 related Siglecs	64
3. Siglec-5	70
4. Rôles dans l'immunomodulation	72
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b>	<b>75</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>78</b>
<b>Article 1</b> : ADAMTS-13 and von Willebrand factor predict venous thromboembolism in patients with cancer	79
<u>M. Pépin, A. Kleinjan, D. Hajage, H.R. Buller, M. Di Nisio, P. W. Kamphuisen L. Solomon, A. Veyradier, A. Stepanian and I. Mahé. (2016). J. Thromb. Haemost., 14: 306-315</u>	
<b>Article 2</b> : Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity	92
<u>M. Pépin, S. Mezouar, J. Pegon, V. Muczynski, F. Adam, E.P. Bianchini, A. Bazaa, V. Proulle, A. Rupin, J. Paysant, L. Panicot-Dubois, O.D. Christophe, C. Dubois, P.J. Lenting and C.V. Denis. En révision</u>	
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>127</b>

## **LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

Figure 1 : Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la thrombose médiée par les cellules cancéreuses	13
Figure 2 : Angiogenèse physiologique et tumorale	16
Figure 3 : Rôles de la P-sel dans la maladie cancéreuse	19
Figure 4 : Représentation des diverses localisations du VWF au niveau du vaisseau	29
Figure 5 : Représentation de la sous-unité de VWF avec les différents domaines d'homologie structurale	29
Figure 6 : Multimérisation du VWF	30
Figure 7 : Séquence d'évènements conduisant au clivage du VWF par ADAMTS13	31
Figure 8 : Rôle du VWF dans les différentes étapes de la formation du thrombus plaquettaire	32
Figure 9 : Rôles du VWF dans la progression tumorale	36
Figure 10 : Les différents membres de la famille ADAMTS et leur structure	37
Figure 11 : Structure de la protéase ADAMT13	38
Figure 12 : Structure d'ADAMTS13 et site de clivage sur le VWF	39
Figure 13 : Principe du purpura thrombotique thrombocytopénique	40
Figure 14 : Rôles positifs et négatifs des ADAMTS dans la progression tumorale	42
Figure 15 : Participation des cellules immunitaires résidentes et circulantes à la réaction inflammatoire innée	45
Figure 16 : Étapes du recrutement leucocytaire	49
Figure 17 : Domaines structuraux du PSGL-1	52
Figure 18 : Interaction entre la P-sel et le PSGL-1	54
Figure 19 : Interactions PSGL-1 et sélectines dans le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire	56
Figure 20 : Structure schématique de la P-sélectine	57



Figure 21 : Profil d'expression des Siglecs dans la lignée hématopoïétique	61
Figure 22 : Structures des différents membres de la famille des Siglecs	62
Figure 23 : Interactions des Siglecs en cis ou en trans	63
Figure 24 : Les différentes isoformes de Siglec-5	70
Figure 25 : Place du VWF dans la thrombose médiée par le processus néoplasique	119
Tableau 1 : Facteurs de risque cliniques identifiés dans la survenue d'une thrombose veineuse profonde chez les patients atteints de cancer	20
Tableau 2 : Biomarqueurs candidats dans la prédiction du risque thrombotique chez les patients atteints de cancer	26
Tableau 3 : Score de Khorana : modèle prédictif de thrombose associée à la chimiothérapie	27
Tableau 4 : Profil de liaison des différents Siglecs	67
Tableau 5 : Les différents Siglecs, leurs profils d'expression et leurs effets cellulaires	69

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**aa** : Acides aminés  
**ADAMTS13** : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type-1 repeats 13  
**ADAM28** : A Disintegrin And Metalloproteinase 28  
**ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique  
**AIRM1** : Adhesion inhibitory receptor molecule 1  
**BCR** : B cell receptor  
**C4BP** : C4b-binding protein  
**CAM** : Cell adhesion molecule  
**CATS** : Vienna Cancer and Thrombosis Study  
**CD** : Cluster de différenciation  
**CP** : Facteur pro-coagulant du cancer  
**EGF** : Epidermal growth factor  
**EP** : embolie pulmonaire  
**E-sel** : E-sélectine  
**ESL-1** : E-selectin ligand 1  
**ETEV** : évènements thrombo-emboliques veineux `   
**FT** : facteur tissulaire  
**FVII** : facteur VII de la coagulation  
**FVIII** : facteur VIII de la coagulation  
**FIX** : facteur IX de la coagulation  
**FX** : facteur X de la coagulation  
**GPIb** : Glycoprotéine Ib  
**HBPM** : Héparine de bas poids moléculaire  
**Hsp70** : heat shock protein70  
**IC<sub>50</sub>** : Concentration nécessaire pour une inhibition de 50 % de l'effet observé  
**ICAM1** : Inter cellular adhesion molecule 1  
**Ig** : immunoglobuline  
**IL** : interleukine  
**ITIM** : Inhibitory Tyrosine-based Inhibitor Motif  
**kb** : kilo bases  
**Kd** : Coefficient de dissociation  
**kDa** : kilo dalton  
**L-sel** : L-sélectine  
**LT** : lymphocytes T  
**MAG** : myelin-associated glycoprotein  
**MPs** : Microparticules  
**NETs** : Neutrophils Extracellular Traps  
**NK** : Natural Killer  
**VWF** : Facteur Willebrand  
**PAMP** : pathogen associated molecular pattern

**PRR** : pattern recognition receptors  
**P-sel** : P-sélectine  
**PSGL-1** : P-selectin glycoprotein ligand 1  
**PTT** : Purpura thrombotique thrombocytopénique  
**OR** : odds ratio  
**Siglecs** : Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins  
**sLe<sup>x</sup>** : sialyl lewis X  
**SLG2** : Siglec-like gene 2  
**Sn** : sialoadhésine  
**sP-sel** : P-sélectine soluble  
**ROC** : Receiver operating characteristic  
**THPM-VWF** : Multimères de VWF de Très Haut Poids Moléculaire  
**TNF** : tumor necrosis factor  
**TSP1** : Thrombospondine 1  
**VCAM-1** : Vascular cell adhesion molecule 1  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

## AVANT-PROPOS

J'ai effectué mon internat de médecine dans une spécialité dite « d'organe », la cardiologie, après avoir exercé en médecine interne, où la discipline est par définition multi-systémique. J'y ai régulièrement été confrontée à la prise en charge de situations médicales qui imposaient une vision globale comme la maladie thromboembolique veineuse et la maladie cancéreuse, situations qui ont grandement stimulé mon intérêt.

Pour améliorer et enrichir mes compétences cliniques, une formation complémentaire en biologie fondamentale me paraissait nécessaire. C'est au cours de mon projet de master que j'ai rencontré Cécile Denis, Alain Stépanian et toute l'équipe de recherche de l'ex-unité 770 de l'INSERM, devenue depuis l'unité 1176. Nous avons réalisé ensemble un travail à l'interface entre la clinique et la biologie. L'objectif de ce travail était d'étudier le couple formé par le facteur Willebrand (VWF) et sa protéase de clivage ADAMTS13 dans la maladie thromboembolique veineuse associée au cancer. Dans ce contexte, nos résultats ont mis en évidence un rôle potentiel de ces protéines dans le diagnostic précoce ou le pronostic, ainsi que des perspectives pour le rôle de ces protéines dans la physiopathologie des thromboses associées au cancer.

Dans la continuité de ce premier travail, nous avons élaboré un projet de recherche s'appuyant sur des résultats précédents de l'équipe décrivant un rôle protecteur du VWF dans la dissémination métastatique. Une publication récente suggérait alors qu'une autre métalloprotéase surexprimée par les cellules cancéreuses, ADAM28, était capable de se lier et de dégrader le VWF. L'objectif de notre projet était donc de caractériser la liaison entre ADAM28 et VWF, et d'explorer le rôle de cette interaction dans la thrombose et la dissémination métastatique médiées par le VWF. Malgré plusieurs mois d'efforts et la réalisation de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo*, nous avons dû abandonner ce projet, très intéressant mais trop prématuré car souffrant d'un énorme manque d'outils adéquats sur ADAM28.

Nous avons donc orienté le projet vers un sujet en relation avec l'inflammation, pour lequel l'unité avait également déjà obtenu des résultats préliminaires encourageants. L'objectif de ma seconde partie de thèse a donc été de caractériser l'interaction potentielle, en raison de leurs caractéristiques structurales, entre des récepteurs de la surface leucocytaire : PSGL-1 et Siglec.



## **INTRODUCTION**



## **A/ Cancer et thrombose**

Depuis les premières descriptions du début du 20<sup>ème</sup> siècle (*Bouillard and Bouillaud S, 1823; Trousseau, 1865*), de nombreuses études ont permis d'établir des liens entre la thrombose et la maladie cancéreuse. Ces études ont notamment mis en évidence une relation étroite entre la prolifération des cellules cancéreuses et le système cellulaire et moléculaire de la coagulation. Par ailleurs, les événements thromboemboliques veineux (ETEVE) représentent la seconde cause de décès chez les patients atteints de cancer. Une thromboprophylaxie permet de réduire ce risque, mais comporte un risque hémorragique. Ainsi, l'identification des patients atteints de cancer les plus à risque d'ETEVE est essentielle afin d'optimiser le rapport entre le bénéfice et le risque d'une thromboprophylaxie.

### **1) Épidémiologie**

En 2015, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine était estimé à 385 000 (211 000 hommes et 174 000 femmes) et le nombre de décès dus au cancer, à 149 500 (84 100 hommes et 65 400 femmes). La prévalence totale en France métropolitaine est de l'ordre de 3 millions d'individus : il s'agit du nombre de personnes de 15 ans et plus en vie en 2008 et ayant eu un cancer au cours de leur vie (1 570 000 hommes et 1 412 000 femmes) (*INCA, 2016*). A l'échelle internationale, le Centre International de Recherche sur le Cancer conduit par l'OMS estime l'incidence mondiale du cancer à 14,1 millions de nouveaux cas et à 8,2 millions de décès par cancer en 2012 (*Organisation Mondiale de la Santé, 2013*).

Les événements thromboemboliques veineux (ETEVE) comprennent la thrombose veineuse profonde et l'embolie pulmonaire (EP). Ils représentent des complications fréquentes chez les patients atteints de cancer : le risque thromboembolique est en effet multiplié par 4 à 7 par rapport à la population générale (*Blom et al., 2005*). Ainsi, on estime que 15 à 20 % des patients atteints de cancer feront un ETEVE durant leur maladie, l'incidence annuelle dans cette population étant de 1 pour 200 (*Heit, 2008*). Cependant, la population des patients atteints de cancer est très hétérogène et le risque thrombotique varie en fonction du site de la maladie, de son stade, des traitements reçus, du délai par rapport au diagnostic, et des antécédents de thrombose personnels et



familiaux du patient (*Blom et al., 2005*).

Inversement, la maladie thromboembolique veineuse est également un problème de santé publique fréquent avec une incidence d'environ 100 cas pour 100 000 personnes et par an (*Carrier et al., 2015; Heit, 2008*). Un cancer actif est en cause dans près de 20 % des événements thromboemboliques (*Heit, 2008*). Selon certains auteurs, un ETEV idiopathique (c'est-à-dire sans facteur favorisant connu) pourrait d'ailleurs être un signe précoce de maladie maligne. En effet, jusqu'à 10 % des patients ayant présenté un ETEV idiopathique auront un diagnostic de cancer dans l'année qui suit cet événement. Au-delà d'une durée comprise entre 6 mois et un an après l'ETEV, le risque de développer un cancer rejoint ensuite celui de la population générale (*Carrier et al., 2015; Prandoni et al., 2010; Sørensen et al., 1998*). Cependant, aucune étude clinique n'a réussi à prouver le bénéfice d'un dépistage extensif à la recherche d'un cancer dans les suites d'un ETEV idiopathique (*Carrier et al., 2015; Van Doormaal et al., 2011*).

La survenue d'un ETEV affecte fortement la morbidité et la mortalité des patients : cette complication est en effet la deuxième cause de décès chez les patients atteints de cancer (*Khorana et al., 2009*). Une étude de registre au sein de la population danoise a permis d'observer que les patients qui ont présenté un ETEV ont une survie à un an, diminuée d'un tiers par rapport à celle des patients atteints des mêmes cancers sans thrombose (12 % *versus* 36 %). La survenue d'ETEV est également associée à des signes d'une maladie cancéreuse plus évoluée, comme en témoigne la présence de métastases à distance dans 44 % des cas, *versus* 35 % chez les patients atteints de cancer sans ETEV (*Sørensen et al., 2000*). Par ailleurs, le risque de récurrence thromboembolique à un an est supérieur à 20 % chez les patients atteints de cancer alors qu'il est de 9 % chez les patients indemnes de cancer qui ont présenté un ETEV (*Hutten et al., 2000*).

Parallèlement au risque d'ETEV, les patients atteints de cancer présentent également un risque hémorragique sous traitement anticoagulant bien conduit deux fois supérieur par rapport aux patients sans cancer (*Hutten et al., 2000*). Ainsi, dans une étude prospective, l'incidence cumulative des hémorragies sévères à 12 mois était de 12,4 % (intervalle de confiance à 95 % - IC95 - 6,5 à 18,2 %) chez les patients atteints de cancer et de 4,9 % (IC95 2,5 à 7,4%) chez les patients sans cancer bénéficiant d'un traitement par la warfarine (*Prandoni et al., 2002*). Des résultats similaires ont été observés avec le rivaroxaban (*Bott-Kitslaar et al., 2016*).

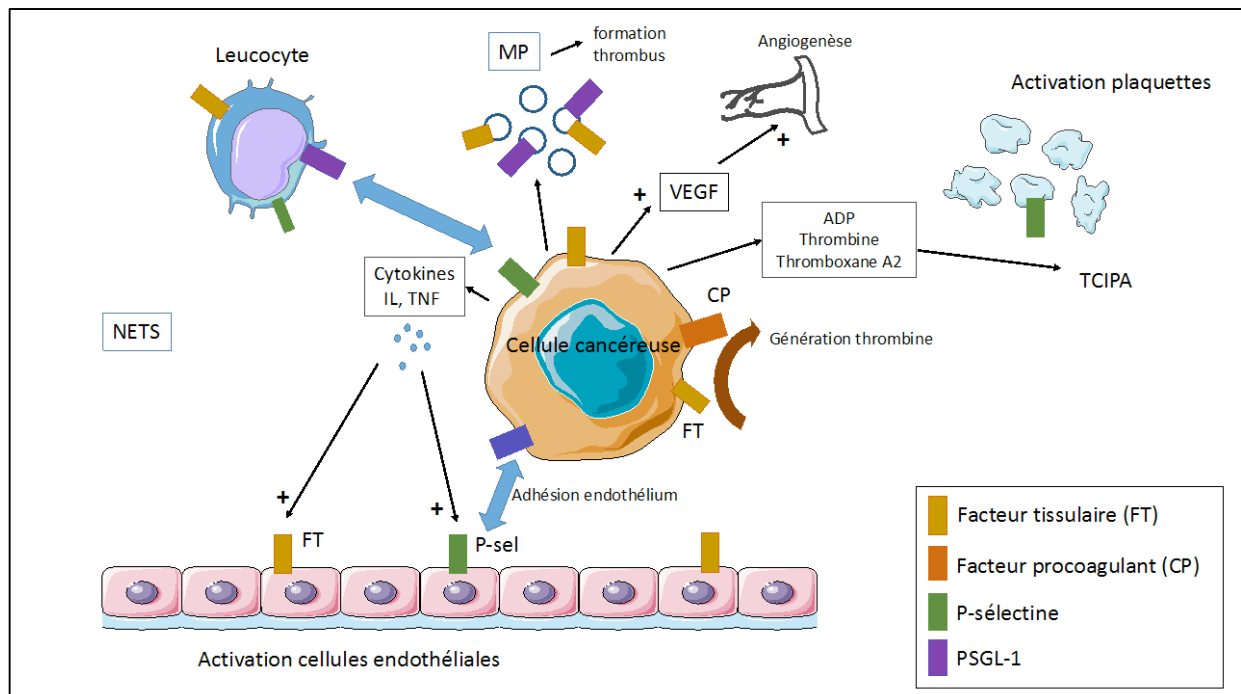
## II) Physio-pathologie : mécanismes moléculaires et cellulaires

A la relecture des écrits de Trousseau, il est extrêmement intéressant de se rendre compte qu'il n'y a pour lui aucun doute sur la nature causale de la maladie cancéreuse dans le développement de la thrombose veineuse. De même, il énonce déjà qu'il s'agit d'une condition générale et non locale ou mécanique, et propre à l'hémostase chez le patient atteint de cancer.

Plusieurs facteurs impliqués dans la réponse immune à la néoplasie, le métabolisme anormal de certaines protéines, la nécrose, les modifications hémodynamiques peuvent contribuer à l'activation globale de la coagulation chez le patient cancéreux.

Les cellules malignes peuvent activer le système hémostatique selon des voies différentes, notamment à travers l'expression de protéines procoagulantes, la sécrétion de cytokines inflammatoires et l'émission de microparticules. Elles sont également capables d'interagir directement avec les cellules sanguines : les plaquettes, les cellules endothéliales et les monocytes (*Figure 1*).

*Figure 1 : Mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la thrombose médiée par les cellules cancéreuses.*



## **1) Activité procoagulante : facteur tissulaire et facteur procoagulant du cancer**

Le facteur tissulaire (FT) est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa qui est capable de former un complexe avec le facteur VII de la coagulation (FVII), et d'initier la cascade de la coagulation (*Nemerson, 1992*). Le FT est exprimé par de nombreuses cellules de la paroi vasculaire. Dans certains types cellulaires comme les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages, il est uniquement produit en réponse à des stimuli proinflammatoires (cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , endotoxines bactériennes). Les cellules cancéreuses, quant à elles, ont la particularité de produire et d'exprimer constitutivement le FT ce qui leur confère une activité procoagulante (*Karimi and Cohan, 2010*). Le FT joue également un rôle dans la progression tumorale en induisant directement l'expression du VEGF (Vascular endothelial growth factor). Cette propriété régule la vascularisation tumorale et constitue un lien important entre la coagulation, l'inflammation, la thrombose, la progression tumorale et le processus métastatique (*Falanga et al., 2013*).

Le facteur procoagulant du cancer (CP) est une cystéine protéase de 68 kDa dont le seul substrat connu est le facteur X (FX), qu'il clive au niveau d'un site différent des autres activateurs du FX (*Gordon and Mourad, 1991*). Le CP a été détecté dans des extraits de cellules tumorales mais n'est pas retrouvé dans les cellules non cancéreuses (*Caine et al., 2002; Falanga and Gordon, 1985*).

Parallèlement à ses activités procoagulantes, la cellule cancéreuse est également capable d'activer la fibrinolyse. Ces modifications de l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs du plasminogène semblent ainsi contribuer au processus d'invasion tumorale, de progression tumorale et de dissémination métastatique (*Bekes et al., 2011; Caine et al., 2002; Jiang et al., 2015*).

## **2) Cytokines**

Les cellules tumorales produisent et sécrètent directement ou indirectement, plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine IL-1 $\beta$ , le tumor necrosis factor TNF- $\alpha$ , ou le VEGF qui ont des effets majeurs sur la coagulation. Ces cytokines peuvent en effet induire la production de FT par les cellules endothéliales, réguler négativement l'expression de la thrombomoduline, et augmenter l'expression des molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales (*Caine et al., 2002; Karimi and Cohan, 2010*).

L'endothélium vasculaire perd ainsi son phénotype anticoagulant et augmente sa capacité de liaison aux cellules sanguines (plaquettes et leucocytes), ce qui peut favoriser localement la formation du thrombus (*Falanga et al., 2013; Karimi and Cohan, 2010*).

### 3) Angiogenèse

L'angiogenèse représente la capacité à former de nouveaux vaisseaux sanguins. Dans un contexte physiologique, elle est limitée à quelques tissus adultes en dehors des processus de cicatrisation (ovaire et endomètre par exemple). En contexte néoplasique, l'angiogenèse est essentielle pour la survie et le développement des cellules cancéreuses (*Daly et al., 2003*). Il existe des relations entre l'hémostase et l'angiogenèse. En cas de lésion endothéliale, ces deux processus sont initiés en même temps lorsque la perméabilité du vaisseau endommagé augmente. En effet, le fibrinogène et la fibronectine forment de façon temporaire un échafaudage moléculaire sur lequel les cellules endothéliales peuvent migrer. L'activation des plaquettes au site de la lésion et la libération du contenu de leurs granules, notamment le VEGF, contribuent également à l'angiogenèse. Le VEGF est le plus puissant agent angiogénique connu, il favorise la prolifération des cellules endothéliales et a un effet procoagulant indirect en augmentant la perméabilité vasculaire ainsi que l'expression de facteur tissulaire par les cellules endothéliales (*Figure 2*).

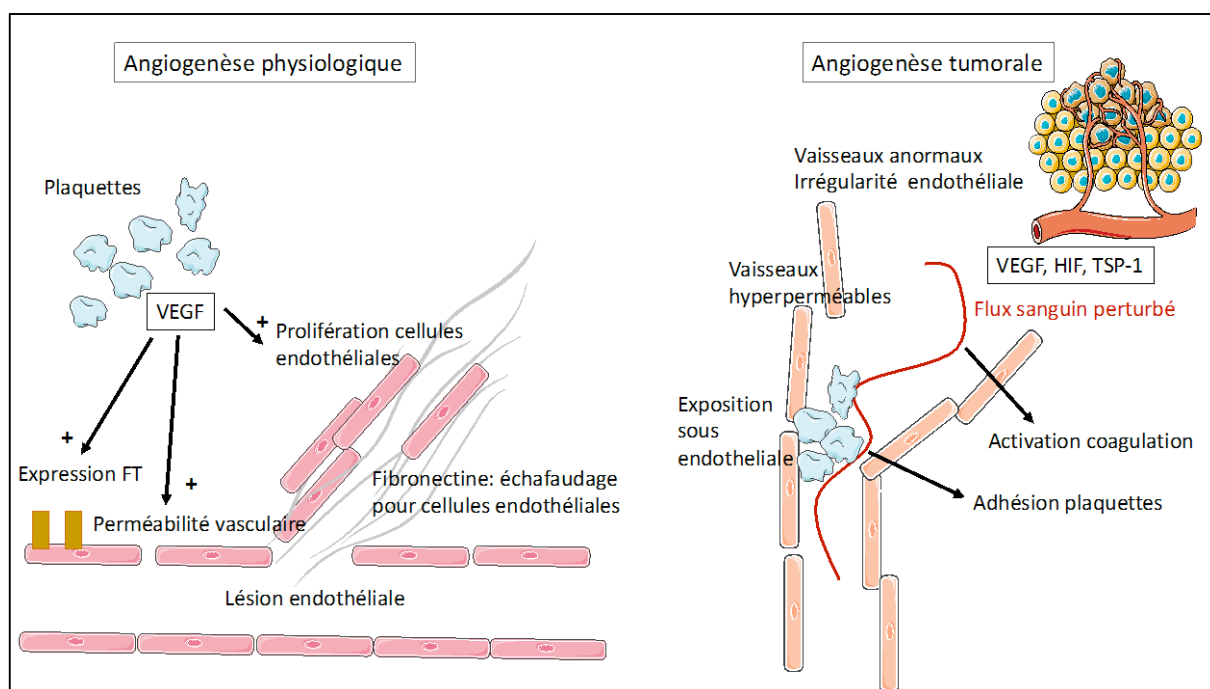
Au cours de la maladie cancéreuse, les cellules néoplasiques adoptent un phénotype proangiogénique de manière précoce, dès que la tumeur *in situ* entre en contact avec le milieu sanguin. Ce tournant est caractérisé par une augmentation de l'expression du VEGF. L'hypoxie joue également un rôle important, en induisant une augmentation de la transcription de HIF (hypoxia induced factor) 1 et 2 proangiogéniques, dans les cellules tumorales et stromales, ainsi qu'une diminution des facteurs antiangiogéniques comme la thrombospondin-1 (*Daly et al., 2003*).

L'angiogenèse tumorale entraîne la formation de vaisseaux anormaux dans lesquels l'irrégularité endothéliale constitue une source de perturbations du flux sanguin qui activent la coagulation. Ces vaisseaux tumoraux sont également hyperperméables ce qui entraîne une exposition du sous-endothélium qui facilite l'adhésion des plaquettes. Par ailleurs, le VEGF sécrété par la tumeur peut stimuler la sécrétion endothéliale de facteur Willebrand qui supporte également l'adhésion plaquettaire. En retour, la présence des

plaquettes au sein de la vascularisation tumorale dans certaines tumeurs contribue à l'angiogenèse tumorale, ce qui entretient le système (Daly et al., 2003) (Figure 2).

Certains traitements anti-cancéreux ont une action antiangiogénique par inhibition du récepteur au VEGF, ou du VEGF lui-même. De façon inattendue, ces traitements augmentent le risque thromboembolique, ainsi que le risque hémorragique. Ces événements dépendraient des concentrations locales dans les différents régulateurs de l'hémostase et de la thrombose (Daly et al., 2003).

Figure 2 : Angiogenèse physiologique et tumorale



#### 4) Interactions entre les cellules tumorales et les cellules de l'hôte

##### - Cellules endothéliales

Comme décrit plus haut, les cellules cancéreuses interagissent de manière indirecte avec les cellules endothéliales en sécrétant des cytokines inflammatoires qui modifient le caractère naturellement antithrombotique de l'endothélium vasculaire. Elles peuvent également adhérer directement aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de molécules d'adhésion et ainsi promouvoir l'activation locale de la coagulation et la formation du thrombus. En effet, le relargage local de cytokines va favoriser le recrutement plaquettaire et leucocytaire (Caine et al., 2002).

#### - Leucocytes

Les cellules tumorales ont la capacité d'interagir avec le système des monocytes-macrophages et d'induire l'expression de FT procoagulant par ces cellules, mimant ainsi l'effet de stimuli pro-inflammatoires (*Rambaldi et al., 1986*). Ces expériences n'ont toutefois été réalisées que dans des systèmes *in vitro* dans lesquelles des macrophages associés à des tumeurs expérimentales semblent exprimer davantage de FT que les cellules contrôles et développent une activité pro-coagulante plus importante (*Caine et al., 2002; Hawbaker, 2012*). Les neutrophiles sont également importants dans la biologie tumorale. Ils pourraient participer à la thrombose associée au cancer par la formation des NETs (Neutrophil extra cellular traps) (*Demers and Wagner, 2014*).

#### - Plaquettes

Chez des patients porteurs de cancers évolués, l'expression des molécules d'adhésion plaquettaire est augmentée ce qui indique un certain degré d'activation plaquettaire (*Caine et al., 2002; Nash et al., 2002*). En effet, les cellules tumorales peuvent sécréter différents activateurs des plaquettes comme la thrombine, l'ADP ou le thromboxane A2 (*Mezouar et al., 2016*). Plusieurs études ont également démontré la capacité de cellules tumorales à induire l'activation et l'agrégation plaquettaire *in vitro*. Cette agrégation plaquettaire induite par les cellules tumorales (TCIPA) semble liée au potentiel de dissémination métastatique des lignées tumorales (*Mezouar et al., 2016*).

### **5) Microparticules (MPs)**

Les microparticules sont des vésicules de taille variable (0,1-1 $\mu$ m), formées par bourgeonnement cellulaire. Elles sont porteuses de FT ainsi que de marqueurs antigéniques spécifiques de la cellule dont elles sont originaires. Les concentrations de MPs portant le FT sont augmentées chez les patients qui développent un cancer associé à une thrombose (*Falanga et al., 2013; Tesselaar et al., 2007*). Certaines lignées de cellules cancéreuses produisent des MPs portant du FT et du PSGL-1 (P-sélectine glycoprotéine ligand 1). Ces MPs cancéreuses modulent la formation du thrombus *in vivo* et participent à l'état pro-thrombotique observé dans la maladie cancéreuse. Les microparticules tumorales exprimant le FT augmentent également l'incidence de la thrombose veineuse dans un modèle murin (*Thomas et al., 2009, 2015*).

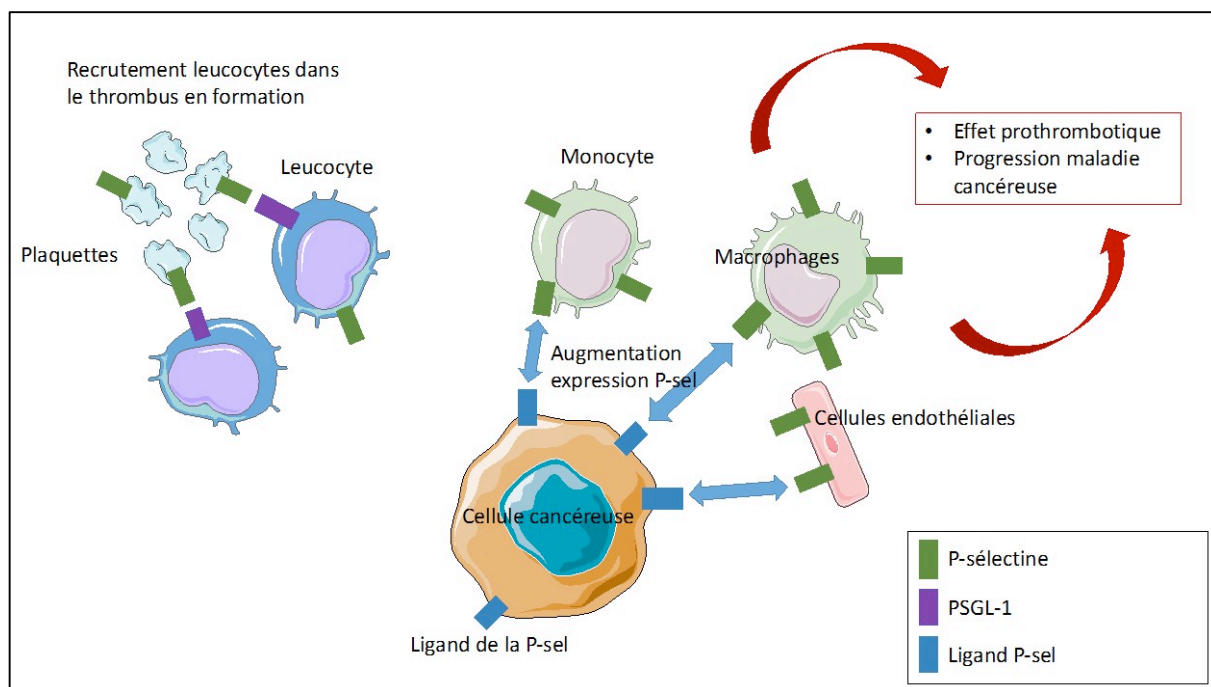
## 6) P-sélectine

La P-sélectine (P-sel) est glycoprotéine transmembranaire synthétisée de manière constitutive par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales. Elle est localisée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, elle est mobilisée rapidement à la surface cellulaire en cas d'activation. Elle joue un rôle dans l'adhésion cellulaire via l'interaction avec différents ligands. Son principal ligand est le contre-récepteur PSGL-1 sur les leucocytes. Elle est présente sous deux formes à la fois au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes : une forme transmembranaire d'environ 140 kDa et une forme soluble (sP-sel). Les deux formes sont capables de se lier aux leucocytes (*Chen and Geng, 2006*). La forme transmembranaire exprimée sur les plaquettes et les cellules endothéliales agit en tant que molécule d'adhésion, elle promeut la liaison des leucocytes à l'endothélium et celle des plaquettes aux leucocytes ou aux cellules cancéreuses.

A côté de ses rôles dans l'inflammation et le recrutement leucocytaire, rôles sur lesquels je reviendrai de manière plus détaillée dans la seconde partie de l'introduction, la P-sel joue également un rôle dans l'hémostase et la thrombose. Ce rôle passe notamment par les interactions entre la P-sel des plaquettes et le PSGL-1 des leucocytes. En effet *in vivo*, la P-sel exprimée sur les plaquettes activées participe au recrutement de leucocytes circulants dans le thrombus en croissance (*Palabrica et al., 1992*).

Dans la maladie cancéreuse, la P-sel peut jouer un rôle indirect via son rôle dans la thrombose, et un rôle direct dans la prolifération de la maladie. En effet, les cellules cancéreuses augmentent l'expression de P-sel sur les monocytes, macrophages et cellules endothéliales. Elles expriment elles-mêmes des ligands de la P-sel qui vont leur permettre de se lier à ces leucocytes (*Buller et al., 2007*). Ainsi, l'expression de ces molécules d'adhésion peut avoir un rôle indirect pro-thrombotique. Mais la P-sel va surtout jouer un rôle majeur dans la progression de la maladie cancéreuse. En effet, de nombreux types de cellules cancéreuses se lient à la P-sel. L'interaction des cellules cancéreuses avec la P-sel endothéliale peut ainsi médier la diffusion des métastases par voie hématogène (*Chen and Geng, 2006*) (*Figure 3*).

Figure 3 : Rôles de la P-sel dans la maladie cancéreuse



### III) Evaluation du risque individuel de thrombose

#### 1) Facteurs de risque cliniques

A l'échelle individuelle, le risque de développer une thrombose en contexte néoplasique varie beaucoup en fonction de facteurs liés au patient lui-même, à la maladie cancéreuse ou encore aux traitements reçus. Ainsi, un certain nombre de paramètres cliniques en relation avec les comorbidités ou les antécédents du patient constituent une augmentation du risque de thrombose comme le sexe féminin, l'âge élevé, l'origine ethnique, l'obésité, l'athérosclérose, le diabète, les antécédents personnels d'ETEVE ou certaines anomalies génétiques de l'hémostase comme la mutation Leiden du facteur V (Blom et al., 2005; Buller et al., 2007; Elyamany et al., 2014; Lyman, 2009) (Tableau 1).

Plusieurs études mettent également en évidence des facteurs de risque liés à la maladie cancéreuse comme le site de la tumeur primitive, les données histologiques, le délai précoce par rapport au diagnostic, ou la présence de métastases.

Enfin, certaines thérapeutiques augmentent de manière indépendante le risque de thrombose veineuse profonde, comme les interventions chirurgicales majeures, la présence d'un cathéter veineux central, l'hospitalisation, les chimiothérapies,



l'hormonothérapie, les thérapies angiogéniques ou encore l'utilisation d'érythropoïétine (Khorana et al., 2009).

*Tableau 1 : Facteurs de risque cliniques identifiés dans la survenue d'une thrombose veineuse profonde chez les patients atteints de cancer*

<b>Facteurs liés au patient</b>	<b>Facteurs liés à la tumeur</b>	<b>Facteurs liés au traitement</b>
Sexe féminin	Site anatomique	Chirurgie majeure
Age élevé	Histologie	Cathéter veineux central
Origine ethnique	Stade avancé (métastatique)	Hospitalisation
Antécédents de thrombose	Période initiale après diagnostic	Chimiothérapie
Obésité		Hormonothérapie
Comorbidités : diabète, athérosclérose		Agents anti-angiogéniques
Anomalies génétiques hémostase		Traitement par EPO
Performans status		

*\*Le performans status est une évaluation standardisée proposée par l'OMS de l'état général d'un patient atteint de cancer, il est basé sur la capacité à effectuer des tâches habituelles et le temps d'alitement quotidien. EPO : érythropoïétine.*

## **2) Biomarqueurs**

Les marqueurs biologiques peuvent être utilisés pour dépister une pathologie, établir un diagnostic, suivre la pathologie, ou bien en apprécier le pronostic. La corrélation observée entre le taux mesuré du marqueur et la survenue d'une pathologie ne présage pas de la nature causale du marqueur dans le processus étudié. Cependant, l'existence de cette corrélation peut permettre de discuter des mécanismes physiopathologiques. L'étude de la relation entre la thrombose et le cancer comprend l'utilisation de nombreux biomarqueurs.

Dans leur étude, Gordon *et al* ont cherché à montrer que l'activité procoagulante mesurée dans le sérum des patients pouvait être utilisée comme marqueur de cancer (Gordon and Benson, 1989). Depuis, un grand nombre d'études ont été basées sur le raisonnement inverse, en cherchant à identifier dans le sang des patients atteints de cancer des marqueurs prédictifs du risque de survenue de la thrombose.

### *a- Numération sanguine*

La numération sanguine, qui comprend la numération plaquettaire et la numération leucocytaire, est un examen usuel réalisé chez les patients atteints de cancer avant tout traitement. L'étude prospective d'un registre de plus de 3000 patients atteints de cancer inclus avant le début d'une chimiothérapie a permis d'observer qu'une numération plaquettaire supérieure à 350 G/L était fortement associée à la survenue d'une thrombose

veineuse avec un odds ratio (OR) à 1,8 (*Khorana et al., 2005, 2008*).

Une autre analyse effectuée sur la même cohorte a montré qu'une numération leucocytaire supérieure à 11 G/L litre était également associée de manière indépendante à l'augmentation du risque de survenue de thrombose veineuse avec un OR de 2,2 (*Khorana et al., 2008*). Par ailleurs, le registre RIETE a permis de montrer qu'une hyperleucocytose > 11 G/L est associée à un risque supérieur de récurrence de thrombose mais aussi de saignements majeurs et de décès dans une population de patients bénéficiant d'une chimiothérapie adjuvante (*Trujillo-Santos et al., 2008*).

Chez des patients atteints de cancer, le rôle prédictif de la thrombocytose dans la survenue des ETEV a également été confirmé dans deux études prospectives, notamment celle de la cohorte CATS (Vienna Cancer and Thrombosis Study) où une thrombocytose (numération plaquettaire supérieure à 443 G/L représentant le 95<sup>ème</sup> percentile de la population d'étude) était associée à une augmentation de 3,5 fois du taux d'ETEV (*Mandalà et al., 2010; Simanek et al., 2010*). Dans cette dernière étude, chez les patients porteurs d'une thrombocytose, la probabilité de développer un ETEV était de 13 % dans les 3 mois après l'inclusion, contre 2,9 % chez les patients ayant une numération plaquettaire inférieure (*Simanek et al., 2010*).

De manière intéressante, une étude norvégienne d'une durée de 15 ans (1994-2009) a analysé la numération plaquettaire chez plus de 25 000 patients qui ne présentaient pas de cancer au moment de l'inclusion. Les résultats ont montré qu'une numération plaquettaire initiale élevée n'était pas associée à l'apparition d'un cancer ; en revanche, chez les patients qui développaient ensuite un cancer, la thrombocytose (pré clinique) était proportionnellement associée au risque de présenter un ETEV (*Jensvoll et al., 2014*).

#### *b- P-sélectine soluble*

Comme mentionné auparavant, une formule soluble de la P-sélectine (sP-sel) de 140 kDa peut être dosée dans le plasma (*Dunlop et al., 1992*). Dans des études cas-témoins menées chez des patients non cancéreux ayant une histoire thrombotique (artérielle ou veineuse), un taux élevé de sP-sel était fortement associé à la thrombose veineuse (*Ay et al., 2007; Blann et al., 2000*). Au cours du suivi prospectif de la cohorte CATS (patients avec un diagnostic récent de cancer ou de récurrence cancéreuse), les auteurs ont observé des taux de sP-sel significativement plus élevés lors de l'inclusion chez les patients

qui développaient par la suite une thrombose. En analyse multivariée, un taux de sP-sel élevé (> 53.1 ng/mL, représentant le 75<sup>ème</sup> percentile de la population de l'étude) pouvait être utilisé comme marqueur prédictif des ETEV avec un rapport de risque à 2.6 (intervalle de confiance 1.4-4.9) (Ay et al., 2008).

#### c- Facteur Willebrand et ADAMTS13

Le facteur Willebrand (VWF) est une glycoprotéine multimérique qui circule dans le plasma et qui est impliquée dans l'hémostase primaire dont nous détaillerons les fonctions dans la partie IV à suivre. Les taux de VWF sont sensiblement supérieurs chez les patients atteints de cancer et plus élevés dans les formes disséminées, dépassant régulièrement 250 % (Böhm et al., 2003; Mannucci et al., 2003; Oleksowicz et al., 1999). Dans différentes études cliniques chez des patients atteints de cancer, les taux antigéniques plasmatiques de VWF ont été mesurés élevés à la fois dans des tumeurs solides ou hématologiques : leucémie aiguë lymphoblastique (Hatzipantelis et al., 2011), carcinome colo-rectal (Schellerer et al., 2011; Wang et al., 2005), carcinome vésical (Zietek et al., 1996), cancer du larynx (Paczuski et al., 1999), cancer de l'ovaire (Gadducci et al., 1994), cancer du sein (Yigit et al., 2008). Cette élévation des taux est parfois associée à un stade évolué de la maladie et à un mauvais pronostic (Gadducci et al., 1994; Wang et al., 2005).

ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats) est la protéase qui clive spécifiquement le VWF, régulant ainsi les fonctions hémostatiques de ce dernier (détails dans la partie IV à suivre).

Du fait des observations clinico-biologiques entre la maladie cancéreuse et les taux plasmatiques de VWF, plusieurs équipes se sont intéressées au dosage de la protéase spécifique du VWF, s'interrogeant sur la régulation du substrat par l'enzyme.

Dans l'étude d'Oleksowicz et al, les taux d'ADAMTS13 sont significativement diminués et les taux de VWF significativement augmentés dans les cancers disséminés par rapport aux cancers non disséminés (Oleksowicz et al., 1999). Une autre étude a confirmé un déficit en ADAMTS13 chez des patients atteints de cancer disséminé (Koo et al., 2002). Plus récemment, deux études ont mis en évidence une diminution d'ADAMTS13 chez des patients atteints de cancer, sans différence entre les formes métastatiques ou localisées (Böhm et al., 2003; Mannucci et al., 2003).

#### *d- D-Dimères*

Une activation globale de la coagulation est observée chez des patients atteints de cancer par le biais de taux plasmatiques élevés de marqueur d'activation de la coagulation comme les fragments 1 + 2 de la prothrombine ou les D-Dimères (DDi). Les D-Dimères sont libérés par l'action de la plasmine qui dégrade le caillot de fibrine générée par la thrombine lors du processus de fibrinolyse. Ce sont des produits de dégradation de la fibrine (*Ay and Pabinger, 2010*) et à ce titre ils représentent donc des marqueurs indirects de l'activation de la coagulation.

Les DDi sont déjà utilisés comme biomarqueurs diagnostics en pratique clinique puisqu'ils sont dosés dans le plasma des patients pour établir le diagnostic de maladie thrombo-embolique (embolie pulmonaire ou thrombose veineuse profonde). En effet, avec une valeur seuil de 0,5 µg/mL, les D-Dimères ont une très bonne valeur prédictive négative : lorsque le dosage est inférieur au seuil, le risque que le patient ait une thrombose est quasi nul.

A côté de ce rôle diagnostic, certaines études chez le patient non cancéreux laissent penser que les DDi pourraient également avoir un rôle prédictif de la thrombose en indiquant un état d'hypercoagulabilité plasmatique (*Cushman et al, 2003; Lippi et al, 2008*). Chez les patients atteints de cancer, les taux plasmatiques des DDi sont plus élevés. Ainsi, les taux de DDi ont été dosés chez des patients ayant un diagnostic récent de cancer de la prostate et comparés à des taux mesurés chez des patients de même âge indemnes de pathologie néoplasique : les taux étaient significativement plus élevés chez les patients cancéreux (*Kohli et al., 2002*). Dans une autre étude sur un petit nombre de patients porteurs d'un cancer du poumon, il existe une corrélation entre l'élévation du taux des DDi et l'extension de la maladie cancéreuse ou à la réponse au traitement anti-cancéreux (*Seitz et al., 1993*).

Des auteurs ont donc cherché à évaluer le potentiel prédictif des DDi dans la thrombose associée au cancer. Les investigateurs de la cohorte CATS ont inclus prospectivement 821 patients peu après un diagnostic de cancer *de novo* ou de récurrence après rémission et les ont suivis pendant plus d'un an. Environ 8 % des patients ont présenté un événement thrombo-embolique au cours du suivi. Le taux plasmatique des DDi à l'inclusion était significativement plus élevé dans le groupe des patients qui ont présenté un ETEV (0,96 µg/mL contre 0,71 µg/mL). En utilisant une valeur seuil à

1,44 µg/mL, et après une analyse multivariée, les auteurs ont également montré que le poids des biomarqueurs dans la prédiction du risque de thrombose pouvait être supérieur à celui des marqueurs cliniques (âge, sexe, traitements reçus) (Ay et al., 2009).

#### *e- F1+2 de la prothrombine*

Les fragments 1+2 (F1+2) de la prothrombine sont libérés après que le facteur X activé (FXa) a clivé la prothrombine en thrombine et sont le reflet de la génération de thrombine *in vivo*.

Des taux plasmatiques élevés de F1+2 de la prothrombine ont été retrouvés chez des patients atteints de cancer d'organes solides de la sphère génitale, en l'absence de thrombose (Hanzal and Tatra, 1993; Kohli et al., 2002). Dans la première étude, les taux de certains marqueurs de la coagulation notamment les F1+2 de la prothrombine ont été dosés chez des patients avec un diagnostic récent de cancer de la prostate et comparés à des taux mesurés chez des patients de même âge indemnes de pathologie néoplasique : les taux étaient significativement plus élevés chez les patients cancéreux (Kohli et al., 2002). Dans la seconde étude, seul le dosage des F1+2 de la prothrombine a été effectué chez 76 patientes porteuses de différents cancers du tractus génital et comparé à 25 femmes de même âge : plus de 2/3 des patientes cancéreuses avaient des taux élevés contre aucune dans le groupe contrôle (Hanzal and Tatra, 1993).

L'étude de la cohorte CATS décrite plus haut a également démontré la valeur prédictive d'un taux élevé de F1+2 de la prothrombine dans la survenue de thrombose au décours d'une maladie cancéreuse (Ay et al., 2009).

#### *f- Facteur VIII (FVIII)*

Le FVIII joue un rôle clé dans la cascade de la coagulation et son déficit est associé à une pathologie hémorragique, l'hémophilie A.

Plusieurs études menées sur la population générale ont montré qu'un taux élevé de FVIII plasmatique était un marqueur de risque de thrombo-embolisme et de récurrence de la maladie thrombo-embolique (Vormittag et al., 2009).

Parallèlement, plusieurs études ont observé une augmentation des taux de FVIII chez des patients atteints de différents types de cancer. Une étude a dosé plusieurs marqueurs de la coagulation (FVIII, FIX, VWF, protéine C réactive) dans le plasma de 100

patientes venant d'être opérées d'un cancer du sein et comparé ces taux à 100 témoins de même âge : l'ensemble des paramètres biologiques précités étaient présents à des taux supérieurs chez les patientes suivies pour cancer. Le taux de FVIII était également fortement corrélé au stade du cancer (ganglions envahis, nombre de métastases ganglionnaires), augmentant avec le degré d'invasion de la maladie cancéreuse (*Yigit et al., 2008*). D'autres études ont obtenu des résultats similaires chez des patients atteints de myélome multiple ou de cancer colo-rectal (*Auwerda et al., 2007; Battistelli et al., 2008*).

Le FVIII a donc lui aussi été évalué en tant que biomarqueur candidat de la prédiction de la thrombose associée au cancer. Une première étude prospective de faible effectif a étudié les taux plasmatiques de FVIII chez des patients atteints de cancer localement avancé ou métastatique. Le taux de FVIII était significativement plus élevé dans le groupe de patients qui présentaient une thrombose par rapport aux patients cancéreux qui ne thrombosaient pas au cours du suivi (*Dogan et al., 2006*). Une deuxième étude publiée en 2009 a repris les patients de la cohorte CATS et dosé le FVIII à l'inclusion de 840 patients parmi lesquels 7,4 % ont présenté un ETEV au cours du suivi. Les patients ayant présenté un ETEV avaient une activité du FVIII plasmatique significativement plus élevée que les patients qui n'ont pas présenté de thrombose au cours du suivi (223 % vs 177%).

#### *g- Autres marqueurs liés à la coagulation*

D'autres marqueurs ont été dosés chez des sujets cancéreux avec des taux supérieurs à ceux des sujets indemnes de cancer comme le complexe thrombine anti thrombine (TAT), ou le complexe plasmine-alpha 2-antiplasmine (PAP) (*Seitz et al., 1993*).

Tableau 2 : Biomarqueurs candidats dans la prédiction du risque thrombotique chez les patients atteints de cancer

Biomarqueur candidat	Valeur seuil proposée
Plaquettes	> 350 000 /mm <sup>3</sup>
Leucocytes	> 11 000 /mm <sup>3</sup>
D-Dimères	>1,44 mg/mL
P-sélectine soluble	> 53,1 ng/mL
F1+ 2 prothrombine	> 358 pmol/L
FVIII	> 232 %
VEGF	?
Facteur tissulaire	expression antigénique, MP circulantes, taux d'antigène ou activité ?
VWF	?
ADAMTS13	?

### 3) Intérêt d'un score de risque

Malgré les différents niveaux d'évidence de la propension de la maladie cancéreuse à créer un état pro-thrombotique, les recommandations des sociétés d'oncologie ne proposent d'envisager une thromboprophylaxie que lors des hospitalisations ou des interventions chirurgicales des patients cancéreux. Celle-ci n'est pas recommandée dans la prise en charge des patients ambulatoires, malgré la persistance du risque thrombotique au-delà de la durée de l'immobilisation (*Khorana et al., 2009*). Le traitement anticoagulant préventif a pourtant largement prouvé son intérêt en prévention des épisodes thrombo-emboliques chez les patients hospitalisés pour une pathologie médicale aiguë (Lyman, 2009). Cependant, il peut s'accompagner d'accidents hémorragiques dans 0,7 à 5 % des cas en fonction des définitions et du temps de suivi, et impose des contraintes (injections sous-cutanées quotidiennes) (*Lyman, 2009*).

Dans ce contexte, plusieurs équipes ont proposé des scores d'évaluation du risque d'ETEVE chez les patients atteints de cancer, intégrant des paramètres cliniques et paracliniques. Ces scores ont pour objectif de distinguer les patients à haut et à faible risque, afin de sélectionner les patients les plus susceptibles de bénéficier d'une thromboprophylaxie.

Le premier score a été proposé par Khorana à partir d'une cohorte de patients ambulatoires recevant une chimiothérapie (*Khorana et al., 2008*). Ce score clinico-biologique dépend du site du cancer, de l'indice de masse corporelle, de la numération plaquettaire, du taux d'hémoglobine (ou de l'utilisation de facteurs stimulant l'érythropoïèse) et du nombre de leucocytes (*Tableau 3*).

*Tableau 3 : Score de Khorana : modèle prédictif de thrombose associée à la chimiothérapie. (d'après Khorana et al., 2008)*

Caractéristiques	Score
<b>Site du cancer</b>	
Très haut risque (pancréas, estomac)	2
Haut risque (poumon, vessie, testicule, lymphome, gynécologiques)	1
<b>Indice de masse corporelle &gt; 35 kg/m<sup>2</sup></b>	1
<b>Plaquettes pré-chimiothérapie &gt; 350 G/L</b>	1
<b>Hémoglobine &lt; 10 g/dL ou utilisation d'érythropoïétine</b>	1
<b>Leucocytes pré-chimiothérapie &gt; 11 G/L</b>	1

Le score de Khorana permet une catégorisation de la probabilité de survenue d'une thrombose veineuse associée à la chimiothérapie. Risque faible : score = 0 ; 0,8 et 0,3 % (taux d'ETEV dans les cohortes de développement et de validation, respectivement) ; Risque intermédiaire : score = 1 ou 2 ; 1,8 et 2 % ; Risque élevé : score  $\geq$  3 ; 7,1 et 6,7 %.

Ce score a ensuite été validé par une étude prospective observationnelle (Cohorte CATS) (Ay et al., 2010) : la probabilité cumulée de risque d'ETEV à 6 mois est de 17,7 % pour les scores  $\geq$  3, de 9,6 % pour un score égal à 2, de 3,8 % pour un score égal à 1, et de 1,5 % pour un score égal à 0. Dans la même étude, deux items biologiques supplémentaires ont été testés : la sP-sel et les D-dimères. Avec le score de Khorana modifié intégrant ces 2 paramètres, le risque thromboembolique veineux à 6 mois est de 35 % pour les scores  $\geq$  5, de 10,3 % pour un score égal à 3 et de 1 % pour un score égal à 0, avec un rapport de risque de 25,9 (8,0 – 84,6) pour le score le plus élevé par rapport au plus faible.

Ces travaux montrent qu'il est possible d'affiner les scores de risque avec de nouveaux marqueurs biologiques. Parmi les biomarqueurs candidats, les investigateurs de l'étude CATS ont montré que l'augmentation de l'activité du FVIII, ainsi que celle des fragments 1 et 2 de la thrombine (F1+2) étaient significativement associées à la survenue d'un ETEV (Ay et al., 2009; Vormittag et al., 2009). Néanmoins, ces paramètres n'ont pas été évalués dans des scores de risque.

Plusieurs études ont été menées avec des résultats contradictoires sur l'utilisation du facteur tissulaire pour la prédiction des thromboses chez des patients atteints de cancer (Khorana, 2012).



## IV) Rôles du VWF et d'ADAMTS13

### 1) VWF

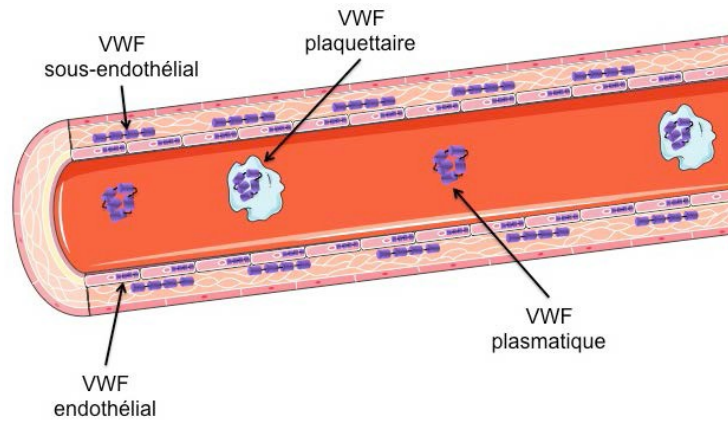
#### a- Synthèse

Le VWF est exclusivement produit par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes (*Sporn et al., 1985; Wagner, 1990*). Dans les mégacaryocytes, l'ensemble du VWF synthétisé est stocké dans les granules alpha des plaquettes et soumis à une sécrétion régulée (*Cramer et al., 1985*). Le VWF plaquettaire n'est donc sécrété qu'après une stimulation par un agoniste tel que l'adénosine diphosphate (ADP), le collagène, la thrombine ou le thromboxane A2 (*Koutts et al., 1978; McGrath et al., 2010*).

Après synthèse dans les cellules endothéliales, la majorité des molécules de VWF est assemblée dans des granules de stockage spécifiques, les corps de Weibel-Palade (*Valentijn KM 2011*). Lorsqu'il est adressé vers les organelles de stockage, le VWF agit comme un chaperon pour diriger d'autres protéines vers les corps de Weibel-Palade. Plus de dix autres protéines sont colocalisées avec le VWF au sein des corps de Weibel-Palade, notamment la P-sel, l'interleukine 8 (IL 8), l'angiopoïétine 2 et l'ostéoprotégérine (*Bryckaert et al., 2015; Rondaij et al., 2006; Valentijn et al., 2011*). Les corps de Weibel-Palade forment ainsi un réservoir de différents médiateurs qui peuvent être déployés en réponse à des signaux spécifiques, permettant à l'endothélium vasculaire de participer aux mécanismes d'hémostase, d'inflammation, d'angiogénèse et de tonus vasculaire (*Figure 4*).

Le VWF humain est codé par un gène d'environ 178 kb contenant 52 exons et situé sur le chromosome 12 (*Ginsburg et al., 1985; Mancuso et al., 1989*). L'ARNm produit est traduit en un précurseur, le pré-pro-VWF de 2813 acides aminés (aa) (*Bonthron et al., 1986*). Ce précurseur est composé d'un signal peptide de 22 aa (aa 1-22 ; exon 2-3), d'un propeptide de 741 aa (aussi appelé antigène II du VWF, aa 23-763 ; exons 3-18) et d'une sous-unité mature de 2050 aa (aa 764-2813 ; exons 19-52) (*Goodeve et al., 2001; Verweij et al., 1985*).

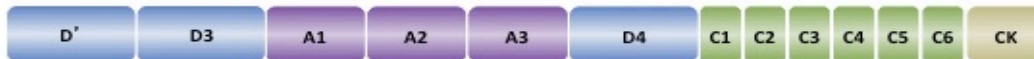
Figure 4 : Représentation des diverses localisations du VWF au niveau du vaisseau



*b- Structure*

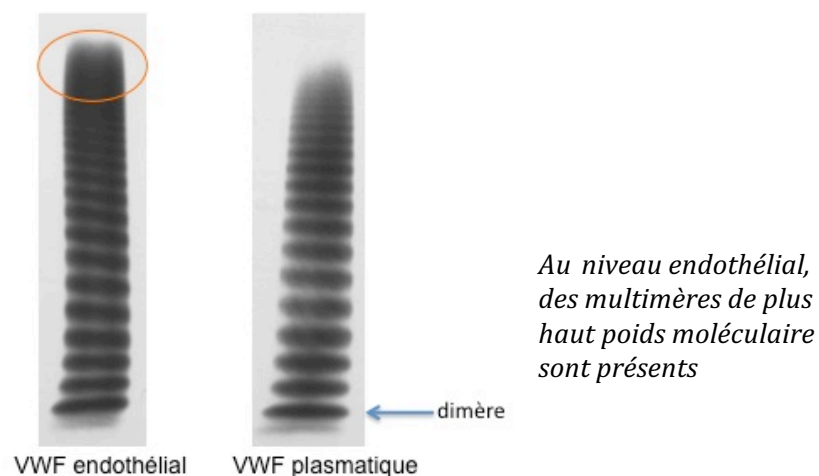
La structure primaire du pré-pro-VWF comporte 5 types de domaines répétés organisés dans l'ordre suivant : SP-D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (Zhou et al., 2012) (Figure 5). La masse moléculaire du VWF mature est d'environ 250 kDa dont 20 % sont représentés par les dérivés glycosylés (12 N-glycosylations et 10 O-glycosylations) qui complètent la structure de la sous-unité (Canis et al., 2010; Wagner, 1990, p. 198).

Figure 5 : Représentation de la sous-unité de VWF avec les différents domaines d'homologie structurale



La forme mature du VWF existe sous des tailles très variables, allant d'un dimère de 500 kDa à de grands polymères de plus de 20 000 kDa (plus de 40 sous-unités) qui sont visibles après électrophorèse du plasma sur un gel d'électrophorèse en SDS (Sporn et al., 1987, p. 198). Le profil multimérique du VWF plasmatique est différent de celui du VWF stocké dans les plaquettes et les cellules endothéliales (Figure 6). En effet, le VWF stocké contient des multimères de très haut poids moléculaire (THPM-VWF), qui sont les formes biologiquement les plus actives (Ewenstein et al., 1987). Il a été montré que les THPM-VWF se lient au collagène et aux plaquettes activées avec une affinité 100 fois plus grande que les monomères (Furlan et al., 1996).

Figure 6 : Multimérisation du VWF

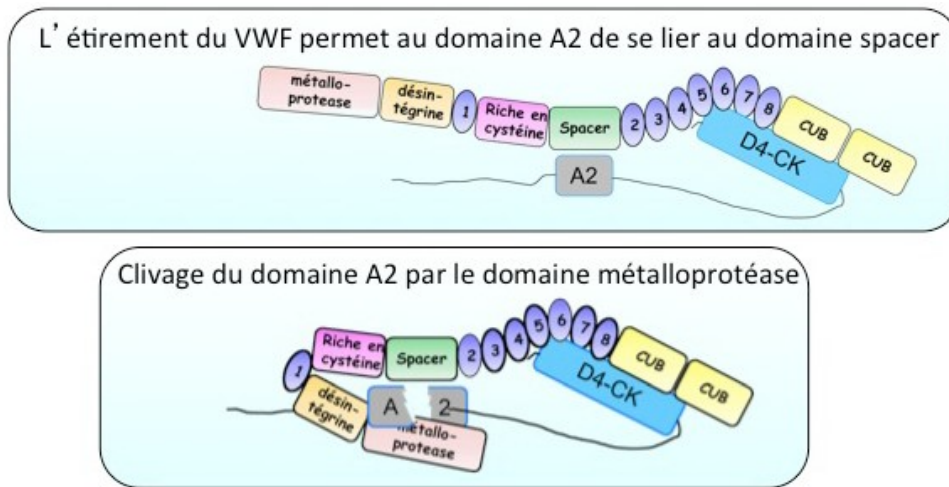


### c- Régulation de la taille des multimères de VWF

Les multimères de très haut poids moléculaire (> 40 sous-unités) présents dans les cellules endothéliales ne sont pas retrouvés dans le plasma, suggérant qu'il existe un ou plusieurs mécanismes qui permettent la régulation de la taille des multimères.

Le mécanisme principal de cette régulation résulte de la protéolyse spécifique par une métalloprotéase appelée ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type-1 repeats 13) (Levy *et al.*, 2001). ADAMTS 13 clive le VWF au niveau d'une séquence précise dans le domaine A2, entre la tyrosine 1605 et la méthionine 1606 (Dent *et al.*, 1991; Dong *et al.*, 2002). Ce site de clivage n'est normalement pas exposé dans le VWF circulant qui est sous forme globulaire mais devient accessible si la structure du VWF est étirée, sous l'effet de forces de cisaillement élevées, ou pendant la sécrétion des THPM-VWF à partir des cellules endothéliales (Figure 7).

Figure 7 : Séquence d'évènements conduisant au clivage du VWF par ADAMTS13



En dehors d'ADAMTS13, des mécanismes alternatifs de clivage des multimères de VWF ont été décrits, tels qu'une protéolyse par la thrombospondine 1 (Xie et al., 2001). Il semble toutefois que la thrombospondine 1 contribue à la régulation des multimères dérivés des plaquettes mais pas à la réduction de taille des multimères de très haut poids moléculaire sécrétés par les cellules endothéliales (Pimanda et al., 2004). Un clivage par la plasmine (Tersteeg et al., 2014) ou par des enzymes leucocytaires (Raife et al., 2009) a également été décrit.

#### d- Fonctions hémostatiques du VWF

Le VWF joue deux rôles-clés dans l'hémostase. Premièrement, il promeut l'adhésion des plaquettes et leur agrégation au sous endothélium exposé en cas de brèche vasculaire, dans des conditions de forces de cisaillement élevées (Reininger, 2008) (Figure 8). Deuxièmement, le VWF agit comme un transporteur du FVIII de la coagulation dans le plasma, le protégeant d'une clairance rapide (Ruggeri, 2001; Vlot et al., 1998).

En cas de lésion de l'endothélium, les collagènes sous-endothéliaux sont exposés au flux sanguin et deviennent accessibles pour le VWF qui se lie aux collagènes fibrillaires de type I et III par l'intermédiaire de son domaine A3 ((Girma et al., 1986; Kalafatis et al., 1987; Romijn et al., 2001). Sous l'effet du flux, le VWF qui circule sous forme globulaire va adopter une forme étirée active dans laquelle le domaine A1 devient accessible, ce qui permet son interaction avec son récepteur plaquettaire, la glycoprotéine Ib (GPIb) (Lenting et al., 2010; Siedlecki et al., 1996). L'interaction entre le VWF et la GPIb plaquettaire initie une

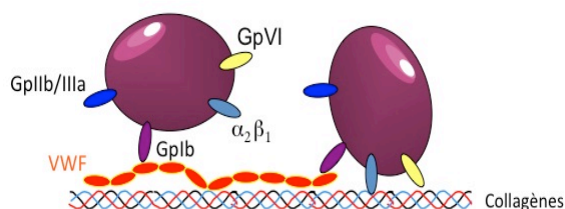
cascade de signalisation qui conduit à l'activation plaquettaire et à l'exposition à la surface plaquettaire de l'intégrine GPIIb/IIIa (ou  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) (Savage et al., 1998). Cette intégrine spécifiquement exprimée sur les plaquettes est le récepteur plaquettaire le plus représenté avec 80 000 copies par plaquette au repos ; elle se lie au domaine C1 du VWF en impliquant une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) (Bennett, 2005; Plow et al., 2000; Titani et al., 1986) (Figure 8).

Figure 8 : Rôle du VWF dans les différentes étapes de la formation du thrombus plaquettaire.

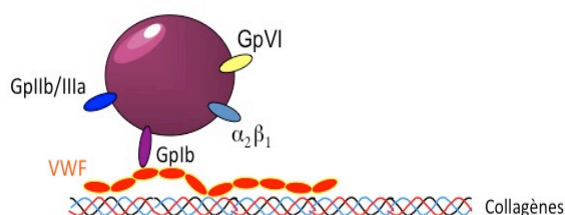
Étape 1: Le VWF se lie aux constituants du sous-endothélium (collagènes, laminine) en cas de blessure vasculaire



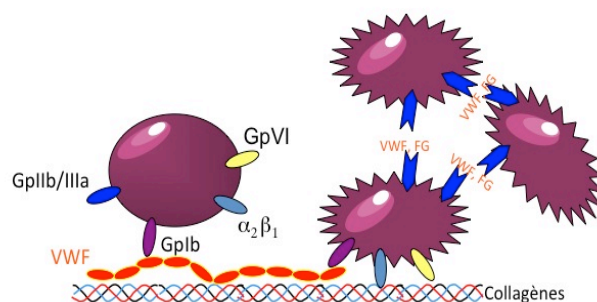
Étape 3: Adhésion ferme des plaquettes par l'intermédiaire de leurs récepteurs au collagène, la GpVI et l'intégrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1



Étape 2: Les plaquettes ralentissent et transloquent sur le VWF par l'intermédiaire de leur récepteur, la glycoprotéine (Gp) Ib $\alpha$ . Adhésion plaquettaire réversible



Étape 4: Activation de l'intégrine GpIIb/IIIa. Agrégation plaquettaire via le VWF, fibrinogène...



### e- Rôle du VWF dans la thrombose veineuse

Le rôle du VWF dans la thrombose veineuse a historiquement été considéré comme indirect, et lié à sa fonction de protéine de transport du FVIII, mais une étude épidémiologique a identifié le VWF comme un facteur de risque indépendant de thrombose veineuse (Tsai et al., 2002). Par ailleurs, d'autres arguments en faveur d'un rôle plus direct du VWF dans la thrombose veineuse sont apparus. Il a par exemple été décrit que certains polymorphismes du VWF sont plus fréquemment associés à la

survenue de thrombose veineuse (*Smith et al., 2011*). Les modèles animaux ont également permis de montrer que l'injection d'un anticorps anti-VWF réduit la taille des thrombus veineux et le nombre d'embolies pulmonaires dans un modèle de maladie thromboembolique chez le lapin (*Takahashi et al., 2009*). Dans un modèle murin, le VWF est indispensable à l'initiation de la formation du thrombus veineux en situation de stase veineuse ou de sténose (*Brill et al., 2011*). Ce modèle a d'ailleurs permis de montrer que le rôle du VWF ne passe pas par son rôle de transport du FVIII, mais par la GPIb plaquettaire et par un autre récepteur non encore identifié (*Brill et al., 2011*).

Les mécanismes précis par lesquels le VWF est impliqué dans la thrombose veineuse demeurent inexpliqués, mais des études récentes suggèrent un lien avec les NETs (Neutrophil Extracellular Traps), du fait de leur rôle prothrombotique et de leur colocalisation avec le VWF (*Brill et al., 2012; Bryckaert et al., 2015; Denis and Lenting, 2012; Martinod and Wagner, 2014*). Les NETs sont des réseaux extracellulaires qui naissent des neutrophiles et qui sont constitués d'ADN et d'histones citrullinés. Ils sont impliqués dans la défense anti-microbienne et sont formés après une lésion vasculaire. Ils jouent également un rôle dans la formation du thrombus via leur interaction avec les plaquettes. L'hypothèse est que des protéines d'adhésion comme le VWF pourraient favoriser l'adhésion entre les NETs et les plaquettes, en favorisant le recrutement plaquettaire (*Bryckaert et al., 2015; Martinod and Wagner, 2014*).

## **2) VWF et cancer**

### *a- Inflammation liée au cancer*

Les cellules cancéreuses cherchent à se développer au sein de l'hôte, alors que les cellules de l'hôte cherchent à éliminer les cellules malignes. Ce sont notamment les cellules de l'immunité et de l'hémostase qui remplissent cette mission. Cela a pour conséquence une activation des différents systèmes prothrombotiques comme nous l'avons décrit auparavant.

L'inflammation liée au cancer est un processus essentiel dans la maladie cancéreuse impliquant de nombreux acteurs aux différents stades de la maladie. Il a d'abord été montré que des phénomènes inflammatoires extrinsèques (infectieux, physiques, toxiques) participent au développement du cancer et dans certains cas initient la maladie cancéreuse (*Balkwill and Mantovani, 2001; Candido and Hagemann, 2013*). Depuis, les propriétés pro-inflammatoires des cellules cancéreuses ont été observées dans de

nombreux types cellulaires. Les cellules néoplasiques surexpriment souvent de nombreux médiateurs pro- inflammatoires comprenant des protéases, des cytokines et des chimiokines. Les cellules et médiateurs de l'inflammation font partie du micro environnement tumoral (*Balkwill and Mantovani, 2001; Candido and Hagemann, 2013*).

En conditions inflammatoires, que celles-ci soient liées à un processus cancéreux ou non, les cellules endothéliales vont être stimulées et ainsi sécréter le contenu des corps de Weibel-Palade dont le VWF et la P-sel. Il a ainsi été montré *in vitro*, que des cellules tumorales de cancer du côlon humain sont capables d'induire l'augmentation de la sécrétion de VWF par les cellules endothéliales (*Morganti et al., 1996*).

En clinique, le VWF est d'ailleurs souvent considéré comme un marqueur de l'inflammation du fait de l'augmentation mesurée de ses taux plasmatiques. Mais le VWF n'est pas qu'un marqueur et une fois sécrété, il va lui-même jouer un rôle actif pour entretenir la réponse inflammatoire. Son rôle est à la fois indirect puisqu'il permet l'expression de la P-sel, récepteur majeur impliqué dans le recrutement leucocytaire, à la surface de l'endothélium (*Denis et al., 2001*) et aussi direct par une interaction avec les leucocytes (*Pendu et al., 2006; Petri et al., 2010*). Néanmoins, la plupart de ces observations ont été faites uniquement dans des modèles animaux (*Denis et al., 2001; Lenting et al., 2012; Methia et al., 2001; Noubade et al., 2008; Zhao et al., 2009*).

#### *b- VWF dans la thrombose liée au cancer*

Les taux circulants de VWF sont augmentés dans la maladie cancéreuse, ce qui constitue un facteur de risque thrombotique (*cf. supra*) (*Böhm et al., 2003; Gadducci et al., 1994; Hatzipantelis et al., 2011; Mannucci et al., 2003; Oleksowicz et al., 1999; Paczuski et al., 1999; Schellerer et al., 2011; Wang et al., 2005; Yigit et al., 2008; Zietek et al., 1996*).

D'un point de vue mécanistique, le VWF est un candidat idéal pour promouvoir les interactions entre les plaquettes et les cellules tumorales. En effet, sa structure multimérique qui multiplie les sites d'interaction et l'identification à la surface de cellules tumorales de récepteurs identiques à ses récepteurs plaquettaires (GPIb, ou les intégrines  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_3$ ) lui confère la capacité de lier ces différents types cellulaires (*Floyd et al., 1992; Franchini et al., 2013; Nierodzik et al., 1995; Terraube et al., 2006*). Récemment, une étude a ainsi permis de montrer une participation directe du VWF dans la formation du thrombus veineux plaquettaire au sein d'une tumeur maligne (*Bauer et al., 2015*).

### *c- Rôle dans la progression tumorale*

Du fait de l'augmentation des taux de VWF dans la maladie cancéreuse, plusieurs études ont cherché à étudier un lien entre le VWF et les cellules tumorales. Outre la capacité des cellules tumorales à induire une augmentation de la sécrétion de VWF par les cellules endothéliales (*Morganti et al., 1996*), il a aussi été montré que le VWF peut promouvoir l'adhésion des cellules tumorales aux cellules endothéliales (*Morganti et al., 2000*). De façon intéressante, cette interaction est inhibée par la ticlopidine, une molécule pharmaceutique ayant un effet antiagrégant plaquettaire, alors que le modèle implique l'absence de plaquettes (*Morganti et al., 2000*). Cette étude n'a toutefois pas permis de préciser si le VWF augmentait réellement l'adhésion des cellules tumorales sur les cellules endothéliales ou s'il induisait plutôt une prolifération des cellules tumorales.

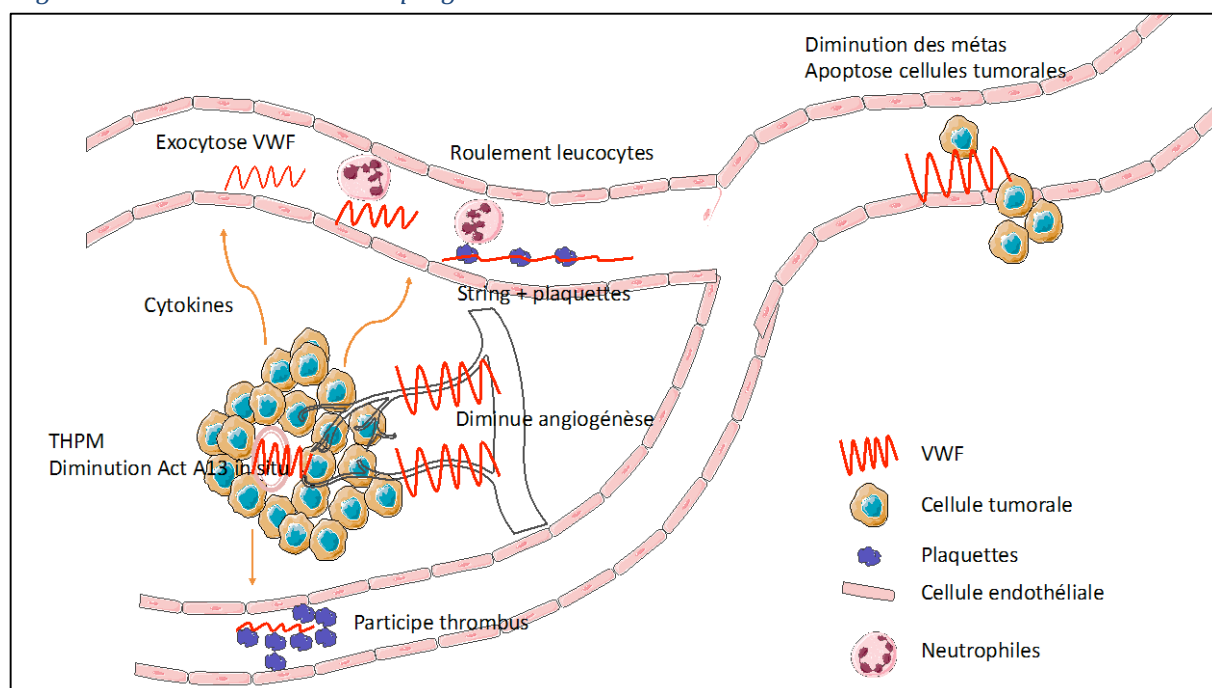
*In vivo*, les études sur le rôle du VWF dans la dissémination des métastases sont parfois contradictoires. Une ancienne étude avait en effet montré une diminution du nombre de métastases pulmonaires développées *in vivo* après inhibition du VWF par un anticorps spécifique indépendamment du compte plaquettaire (*Karpatkin et al., 1988*). Ces résultats semblaient suggérer un rôle du VWF dans l'interaction plaquettes-cellules tumorales nécessaire à la dissémination métastatique (*Mezouar et al., 2016; Nash et al., 2002*). Plus récemment, une étude réalisée avec des souris déficientes en VWF a au contraire montré un rôle protecteur du VWF contre la dissémination métastatique dans un modèle de mélanome et un modèle de carcinome pulmonaire (*Terraube et al., 2006*). Des études complémentaires ont exclu la participation du VWF à la croissance tumorale *in vitro* mais ont pu montrer que le VWF induisait une apoptose des cellules tumorales (*Mochizuki et al., 2012; Terraube et al., 2007*). De manière très élégante, l'équipe de Mochizuki a aussi démontré que certaines cellules tumorales avaient d'ailleurs développé des mécanismes de défense vis-à-vis du VWF dont l'un consiste à surexprimer une métalloprotéase capable de cliver le VWF, ADAM28 (*Mochizuki et al., 2012*).

Enfin, le VWF semble également exercer un effet sur la régulation de l'angiogénèse. Un déficit en VWF stimule les processus angiogéniques *in vitro* et *in vivo* (*Franchini et al., 2013; Lenting et al., 2012; Starke et al., 2011*). Le mécanisme moléculaire évoqué est une régulation négative du récepteur au VEGF, VEGFR 2, passant par différentes voies de signalisation (*Figure 9*).



Chez l'homme, les liens entre VWF et cancer n'ont pour l'instant pas été démontrés. Récemment, une étude rétrospective italienne a interrogé des centres de traitement des patients atteints de maladie de Willebrand. Ces patients ont donc un déficit qualitatif ou quantitatif en VWF. Les 18 centres qui ont répondu ont fourni des informations sur 92 patients ayant présenté 106 cancers sur une période de 33 ans. Il s'agit de cancers d'organes solides et hématologiques (Franchini et al., 2016).

Figure 9 : Rôles du VWF dans la progression tumorale



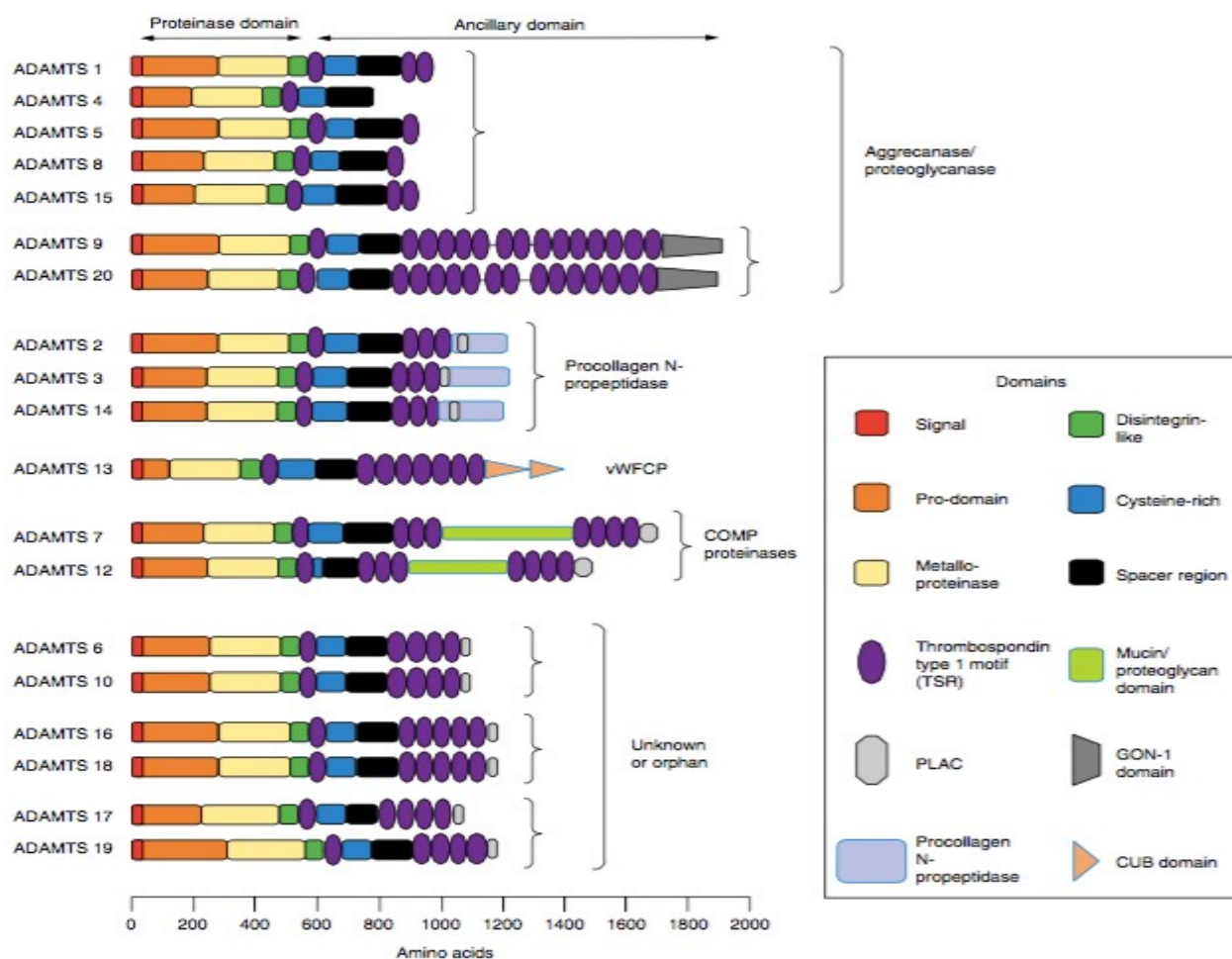
### 3) ADAMTS 13

#### a- Généralités sur la famille des métalloprotéases ADAMTS

Les protéines ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) sont une famille d'enzymes extracellulaires qui partagent une structure commune. Elles jouent des rôles divers notamment dans la morphogénèse tissulaire, la patho-physiologie du remodelage, l'inflammation ou la biologie vasculaire (Kelwick et al., 2015). Elles possèdent toutes un peptide signal suivi d'un pro-peptide, un domaine métalloprotéinase, un domaine désintégrine-like, un motif central de répétition de séquence de thrombospondine type 1, un domaine riche en cystéine et un domaine spacer. Comme les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et les ADAMs (A Disintegrin

And Metalloproteinases), les ADAMTSs appartiennent à la super famille des metzincine protéases. En effet, le site actif de ces enzymes est dépendant de la présence de l'ion zinc et comprend un résidu méthionine (Gomis-Rüth, 2009). Les 19 membres de la famille des ADAMTS humaines peuvent être rassemblés en plusieurs « classes » en fonction de l'organisation de leurs domaines et leurs fonctions connues (Kelwick et al., 2015) (Figure 10).

Figure 10 : Les différents membres de la famille ADAMTS et leurs structures, d'après Kelwick R 2015 (Kelwick et al., 2015)

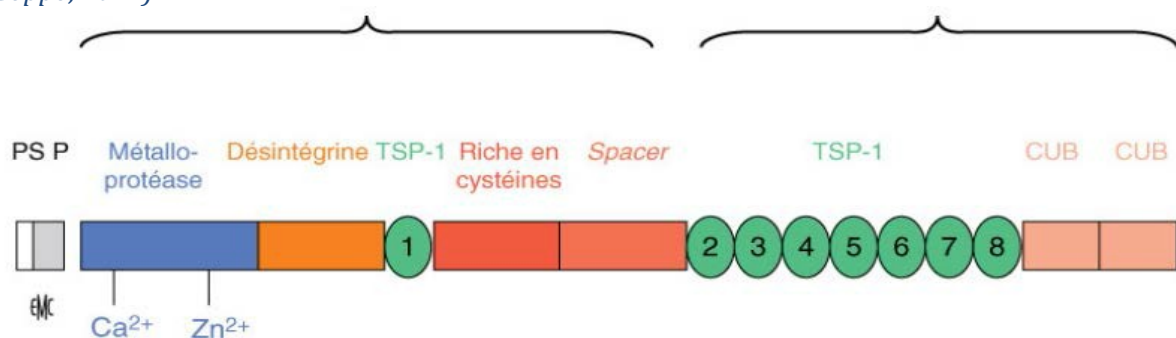


On distingue ainsi les aggrecanases ou protéoglycanases (ADAMTS-1, 4, 5, 8, 9, 15 et 20), les procollagène N-propeptidases (ADAMTS-2, 3 et 14), les enzymes de clivage de la matrice oligomérique du cartilage (ADAMTS-7 et 12), la protéinase du VWF (ADAMTS-13) et un groupe d'enzymes orphelines (ADAMTS-6, 10, 16, 17, 18 et 19).

### b- ADAMTS13 synthèse et structure

ADAMTS13 est une protéase qui clive spécifiquement le VWF. Il s'agit d'une métalloprotéase circulante codée par un gène de 37 kb situé sur le chromosome 9q34 (Soejima et al., 2001). La protéine fait 1427 aa. En N-terminal, le peptide signal précède un pro-peptide de 41 résidus. La protéine mature comprend les différents domaines suivants de N à C terminal : un domaine métalloprotéase reprolysine-like, un domaine désintégrine-like, un domaine de répétition de thrombospondine-1 (TSP1), un domaine caractéristique riche en cystéine, un domaine spacer, 7 domaines TSP1 supplémentaires, puis 2 domaines CUB (Figure 11). Le domaine riche en cystéine comprend une séquence RGDS qui peut se lier à des intégrines sur des plaquettes ou d'autres types cellulaires. Les domaines CUB sont uniques à ADAMTS13 au sein de la famille des ADAMTSs (Kelwick et al., 2015; Turner et al., 2006). La protéine active commence au résidu 75 et a une masse calculée de 145 kDa alors que la protéine purifiée à partir de plasma humain a une masse apparente d'environ 190 kDa. Cette différence s'explique par la présence de glycosylations (Zheng et al., 2001). ADAMTS13 comprend au moins 6 O-fucosylations qui interviennent dans sa sécrétion (Ricketts et al., 2007). L'activité protéasique de cette enzyme requiert la présence d'ions divalents ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) (Furlan et al., 1996; Tsai, 1996, p. 199), mais ne nécessite pas le clivage du propeptide (Majerus et al., 2003).

Figure 11 : Structure de la protéase ADAMT13, d'après Veyradier et al. EMC. 2011(Veyradier and Coppo, 2011)



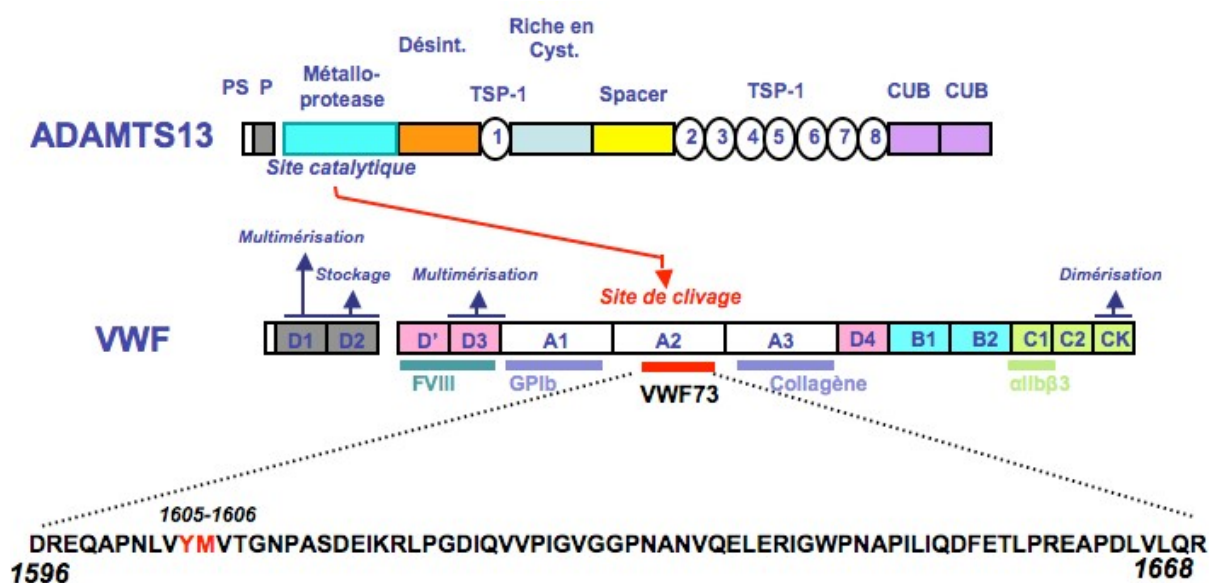
ADAMTS13 est principalement synthétisée par les cellules stellaires hépatiques (Uemura et al., 2005; Zhou et al., 2005) mais est également retrouvée dans d'autres cellules comme les cellules endothéliales (Turner et al., 2006), les mégacaryocytes ou les plaquettes (Liu et al., 2005; Suzuki et al., 2004). Elle est sécrétée dans le plasma sous forme d'une

enzyme active d'environ 200 kDa. Sa concentration plasmatique est de l'ordre de 1µg/ml (Veyradier and Coppo, 2011; Zander et al., 2015). Sa demi-vie dans le plasma, comprise entre 2 et 3 jours, est inhabituellement longue pour une protéase ce qui suggère l'existence, en plus de sa forme soluble plasmatique, d'une forme liée à un récepteur cellulaire et/ou à un transporteur plasmatique qui n'est pas encore identifié (Furlan et al., 1999; Veyradier and Coppo, 2011). Le domaine catalytique est responsable du clivage du VWF mais ce sont les domaines non catalytiques qui assurent la spécificité de liaison au substrat (Gao et al., 2012; Zander et al., 2015).

### c- Fonctions ADAMTS13

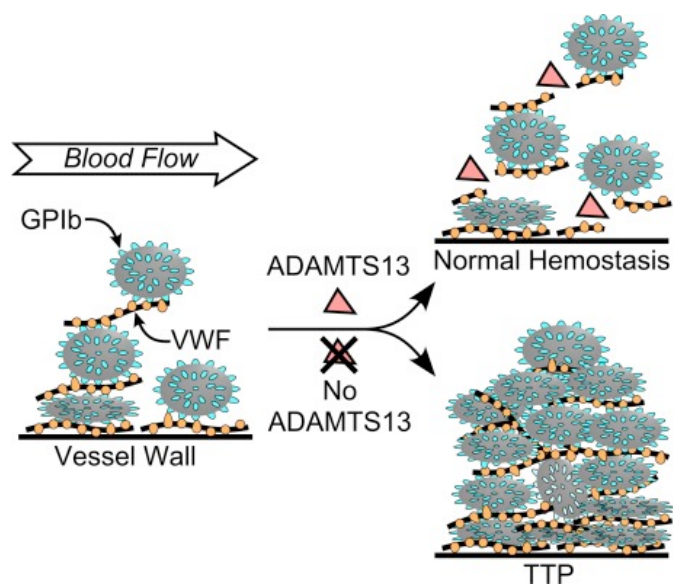
La seule fonction d'ADAMTS13 connue à ce jour est de cliver spécifiquement les multimères plasmatiques du VWF afin d'en limiter la taille et ainsi leur pouvoir adhésif vis-à-vis des plaquettes. ADAMTS13 clive les multimères de VWF spécifiquement entre les résidus Tyr1605 et Met1606 au sein du domaine A2, convertissant des multimères de haut poids moléculaire en multimères plus petits, qui sont des formes moins actives (Dent et al., 1991; Dong et al., 2002) (Figure 12). Ce clivage spécifique génère des fragments de 176 et 140 kDa, qui sont responsables de l'aspect en triplet visible sur les gels de migration de VWF plasmatique (Dent et al., 1991).

Figure 12 : Structure d'ADAMTS13 et site de clivage sur le VWF



La régulation de l'activité d'ADAMTS13 sur le VWF fait intervenir des propriétés intrinsèques au VWF qui dépendent directement des conditions hémodynamiques, comme mentionné auparavant. En effet, la modélisation du domaine A2 du VWF suggère que le pont peptidique Tyr 1605-Met1606, qui constitue le site spécifique de clivage par ADAMTS13, est cryptique au sein de la molécule de VWF native. La protéase ADAMTS13 est donc constitutionnellement active et son activité protéasique n'est pas contrôlée par des inhibiteurs naturels mais par des modifications conformationnelles de son substrat (*Crawley et al., 2009*).

Ainsi, seul le dépliement du VWF induit soit par les forces de cisaillement élevées du flux sanguin dans les micro-vaisseaux *in vivo*, soit par des agents dénaturants (urée, hydrochlorure de guanidine), ou son immobilisation sur une surface plastique *in vitro*, permet l'exposition de ce pont peptidique et le rend donc accessible au clivage par ADAMTS13 (*Majerus et al., 2005, p. 200; Tsai et al., 1994; Veyradier and Coppo, 2011*). La régulation de la taille des multimères de VWF est un processus physiologique très important puisque le déficit en activité ADAMTS13 conduit à un processus thrombotique sévère, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) (*Levy et al., 2001*). Le PTT est caractérisé par la présence anormale dans le plasma de multimères de VWF de très haut poids moléculaire responsables de la formation spontanée de thrombus dans la microcirculation qui entraîne l'ischémie des tissus concernés (*Sadler et al., 2004*) (*Figure 13*).



*Figure 13 : Principe du purpura thrombotique thrombocytopénique, d'après Sadler, Blood 2008*

*TTP : Thrombocytopenic thrombotic purpura*

Les explorations biologiques d'ADAMTS13 reposent sur des dosages quantitatifs par mesure de l'antigène et des dosages qualitatifs de l'activité enzymatique. Plusieurs méthodes de dosage de l'activité ont été développées, ce sont toutes des méthodes spécialisées, difficiles à réaliser en routine, passées de la recherche à certains laboratoires experts. Le principe de mesure de l'activité enzymatique passe par la dégradation d'un substrat exogène par l'ADAMTS13 du plasma testé (*Kokame et al., 2005; Veyradier and Girma, 2004*). Le substrat est soit un VWF natif (full length) obtenu par purification à partir d'un plasma humain ou recombinant, soit de courtes séquences peptidiques synthétiques comprenant le site de clivage. Les produits de dégradation sont mesurés par électrophorèse, par des méthodes immunologiques, ou encore par agrégation plaquettaire. Les normes de l'activité d'ADAMTS13 sont comprises entre 50 % et 150 % exprimées par rapport à l'activité d'un plasma normal. Les taux antigéniques obtenus par différents tests sont compris entre 700 et 1400 ng /mL.

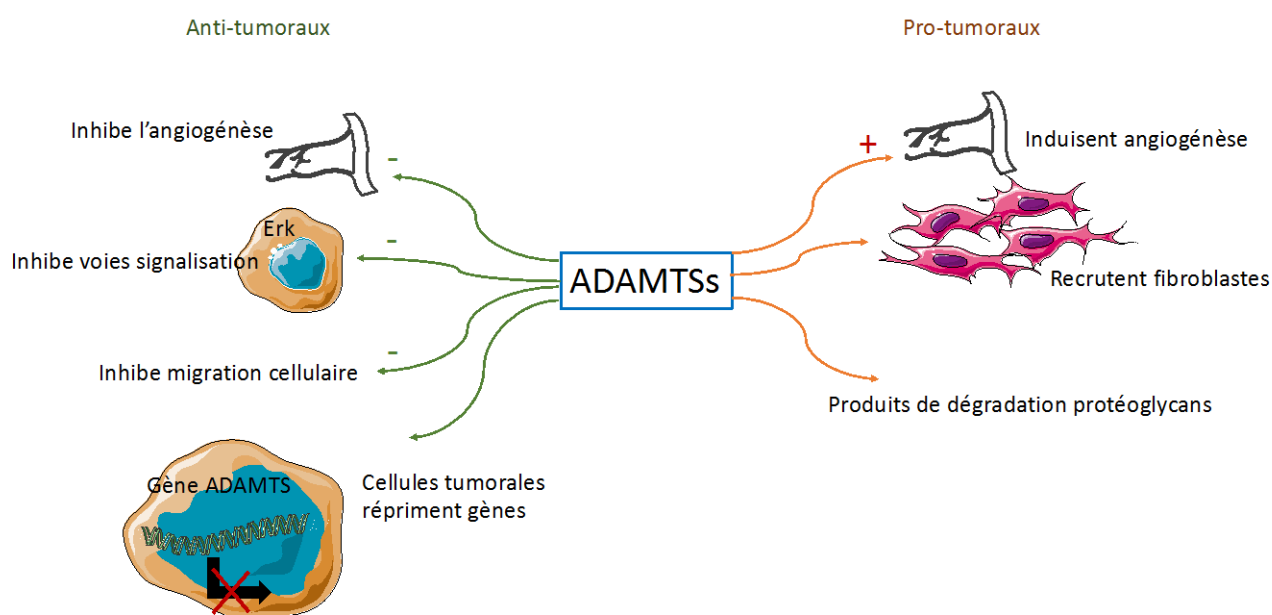
#### *d- Métalloprotéases et cancer*

Plusieurs membres de la famille des ADAMTS ont été décrits comme exerçant des effets négatifs ou positifs sur la tumorigenèse et la dissémination métastatique, par des mécanismes dépendants de leur fonction métallo-protéinase ou non (*Figure 14*).

Ainsi, les ADAMTS peuvent avoir un effet anti-tumoral par une action angio-inhibitrice. Par exemple, ADAMTS-1 exerce un effet angio-inhibiteur car il restreint la prolifération des cellules endothéliales. Des effets angio-inhibiteurs sont décrits pour d'autres ADAMTS: comme ADAMTS-2, ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-8, ADAMTS-9, ou encore ADAMTS-12. En fonction des enzymes, cet effet passe soit par leur activité catalytique soit est relié aux motifs TSP-1. Certaines ADAMTS exercent leur action antitumorale en modulant des voies de signalisation liées au cancer. Les effets anti-tumoraux des ADAMTS sont d'ailleurs illustrés par le fait que plusieurs gènes d'ADAMTS sont épigénétiquement éteints dans des tumeurs de différentes origines (*Cal and López-Otín, 2015*). A l'inverse, les ADAMTS peuvent aussi exercer des effets pro-tumoraux et l'exemple le mieux décrit est ADAMTS-1 qui est surexprimée dans certains cancers et semble associée à la progression tumorale et l'invasion ganglionnaire ou métastatique (*Lu et al., 2009; Masui et al., 2001*). Contrairement à son effet angio-inhibiteur lié au clivage de TSP-1, l'activité enzymatique de ADAMTS-1 est nécessaire pour favoriser l'angiogénèse et les métastases pulmonaires dans des modèles de carcinomes (*Liu et al., 2006*). Ces effets

pro-tumoraux passent par différents mécanismes comme le clivage par la protéase de composants de la matrice extracellulaire (protéoglycans), ou le recrutement de fibroblastes dans l'environnement tumoral. D'autres métalloprotéases comme ADAMTS-4, ADAMTS-5, ADAMTS-12, ADAMTS-2 ou encore ADAMTS-18 jouent un rôle positif dans la progression de différentes lignées de cellules tumorales (Cal and López-Otín, 2015).

Figure 14 : Rôles positifs et négatifs des ADAMTS dans la progression tumorale



#### e- ADAMTS13 et cancer

Les conditions physiologiques qui semblent influencer les taux ADAMTS13 sont les âges extrêmes de la vie ainsi que la grossesse (Mannucci et al., 2001; Sadler, 2008). Ces conditions ont en commun une augmentation physiologique des taux de VWF et il apparaît donc que l'activité circulante d'ADAMTS13 varie en sens inverse du taux de VWF plasmatique (Mannucci et al., 2001; Veyradier and Coppo, 2011).

Comme nous l'avons décrit auparavant, la maladie cancéreuse partage avec ces conditions une augmentation des taux de VWF plasmatique. Par ailleurs, des cas de microangiopathies thrombotiques s'apparentant au PTT ont été décrits chez les patients atteints de cancer, accompagnés d'un déficit partiel en activité protéasique d'ADAMTS13

(Blot et al., 2002; Koo et al., 2002; Werner et al., 2007). En effet, dans environ 10 % des cas, des tableaux cliniques de PTT peuvent également s'accompagner d'une activité d'ADAMTS13 subnormale. Le plus souvent, ces PTT surviennent dans un contexte de cancer, de pathologie liée au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ou de greffe (Veyradier and Coppo, 2011; Zheng and Sadler, 2008).

Dans ces conditions, plusieurs équipes se sont intéressées à la mesure de l'activité d'ADAMTS13 chez des patients atteints de cancer s'interrogeant sur la régulation du substrat par l'enzyme. L'activité d'ADAMTS13 est globalement plutôt diminuée chez ces patients (Böhm et al., 2003; Koo et al., 2002; Mannucci et al., 2003; Oleksowicz et al., 1999). Une corrélation entre la progression de la maladie et la baisse d'activité protéasique est parfois observée (Oleksowicz et al., 1999). Cependant, et même dans le contexte d'une micro angiopathie thrombotique liée à la maladie cancéreuse, l'activité plasmatique d'ADAMTS13 est rarement effondrée comme elle peut l'être dans le PTT. Des phénomènes de régulation in situ dans le microenvironnement tumoral peuvent rendre compte d'une activité d'ADAMTS13 localement éteinte (Bauer et al., 2015).

## **B/ Inflammation et recrutement leucocytaire**

### **1) Généralités**

L'inflammation est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. Dans le cadre de la défense immunitaire qui vise à discriminer le « soi » du « non soi » et à éliminer les agents pathogènes, l'inflammation s'intègre dans les phénomènes d'immunité innée. En effet, on distingue l'immunité innée ou naturelle de l'immunité adaptative ou spécifique. L'immunité innée est immédiate et ne dépend pas d'une exposition préalable à l'agression, elle est donc plus rapide mais transitoire et moins spécifique. L'immunité adaptative est retardée mais spécifique de l'agent pathogène, et plus pérenne (Essakalli et al., 2009). La réponse inflammatoire fait donc suite à la présence de pathogènes infectieux (bactéries, virus, parasites ou champignons) mais aussi à des agressions physiques (température, radiations ionisantes ou chimiques (composés acides ou basiques, toxines bactériennes). Elle peut être provoquée par une réaction immunitaire secondaire à la réintroduction dans l'organisme d'un antigène (allergie).



Elle est enfin souvent la conséquence d'une nécrose tissulaire, elle-même secondaire à de nombreuses causes, par exemple une ischémie par occlusion artérielle.

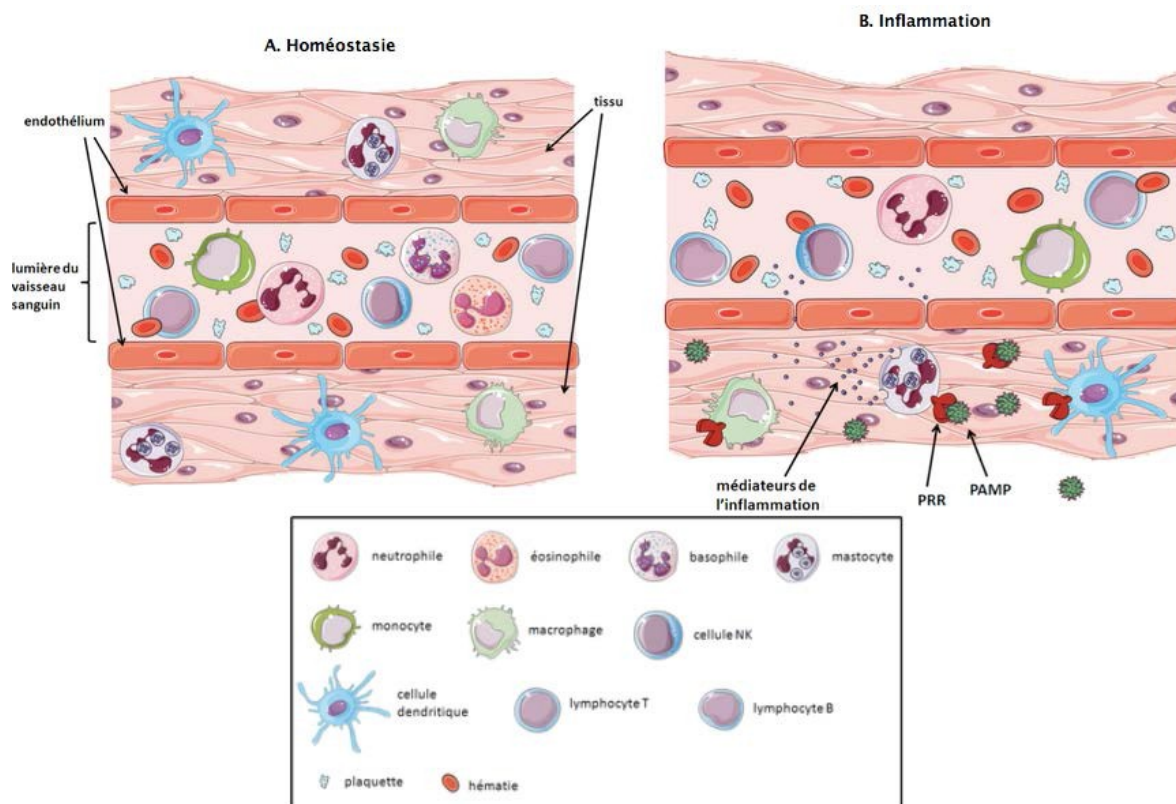
### **1) Cellules et médiateurs de l'inflammation**

Les principales cellules impliquées dans l'inflammation sont les cellules phagocytaires ou phagocytes (polynucléaires -principalement neutrophiles- et monocytes-macrophages), les mastocytes et les polynucléaires basophiles, les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales. A l'état basal, les cellules immunitaires résidentes dans les tissus (cellules dendritiques, macrophages, mastocytes) sont quiescentes. Les cellules immunitaires circulantes dans le sang, les leucocytes, assurent leur rôle de patrouille, prêtes à intervenir sur signal : neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes, cellules NK (natural killer), lymphocytes B et T (*Figure 15 A*).

Au cours du processus inflammatoire, les cellules résidentes du tissu concerné sont les premières à reconnaître les éléments pathogènes, à s'activer et à libérer des médiateurs chimiques qui vont permettre le recrutement des cellules circulantes au foyer de l'inflammation (*Figure 15 B*).

Les récepteurs de l'immunité innée sont dénommés « pattern recognition receptors » (PRR). Ils reconnaissent à la fois des structures communes à des groupes de pathogènes : les « pathogen-associated molecular pattern » (PAMP), mais également des signaux endogènes de danger émis par des cellules mortes ou en train de mourir appelés « Danger-associated molecular patterns ». Parmi ces PRR, on trouve les « toll-like receptors », récepteurs de l'immunité innée mais qui jouent aussi un rôle dans l'immunité adaptative (*Coutinho and Poltorack, 2003; Gardiner and Mills, 2016; Janeway, 2013*).

Figure 15 : Participation des cellules immunitaires résidentes et circulantes à la réaction inflammatoire innée.



**A-** Les cellules immunitaires résidentes des tissus sont les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Les cellules de l'immunité qui patrouillent dans l'organisme via le sang sont les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes, les cellules NK et les lymphocytes T et B. **B-** Lors d'une infection, la présence de pathogène est détectée par ces cellules via leurs PRR, récepteurs reconnaissant les PAMP, qui sont des motifs particuliers aux agents infectieux. Les cellules immunitaires ainsi activées libèrent des médiateurs de l'inflammation dans le milieu extracellulaire, dont les effets combinés vont permettre le recrutement de cellules circulantes, l'élimination du pathogène et la réparation de la lésion. D'après Mayol K, Cavalié F, Davoust-Nataf N. Ecole Normale Supérieure

Les mastocytes et les polynucléaires basophiles comportent des granulations qui contiennent des médiateurs chimiques de l'inflammation, en particulier l'histamine. Les cellules phagocytaires ou phagocytes comprennent les polynucléaires neutrophiles et les cellules du système monocyte-macrophage (incluant les histiocytes résidents, c'est à dire les macrophages des tissus comme les cellules alvéolaires du poumon ou les cellules de Küpffer du foie) et les cellules dendritiques. La cellule dendritique peut dériver du monocyte ou être d'origine lymphoïde. Elle joue le rôle de cellule phagocytaire et de cellule présentatrice d'antigène, ce qui lui confère une place centrale dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative. De nombreux médiateurs interviennent dans le déclenchement et la poursuite de l'inflammation, ou sa diffusion à partir du foyer initial.

Nous en détaillerons ici quelques exemples sans être exhaustif.

**Les cytokines** sont des petites protéines sécrétées par les cellules en réponse à divers stimuli. Au niveau de la réponse immunitaire, elles permettent la communication entre les cellules immunes et orientent la réponse en fonction de la nature du signal détecté. Elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires sur la cellule qui les produit (effet autocrine), sur des cellules proches (effet paracrine), et sur des cellules situées à distance (effet endocrine). Certaines cytokines sont pro-inflammatoires (interleukine (IL)-1, IL-6 et tumor necrosis factor ou TNF-alpha) ; d'autres au contraire sont anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, et IL-13) (*Cavaillon, 2001; Dinarello, 1997*). Le TNF $\alpha$  est produit par les macrophages, les cellules dendritiques résidentes et les mastocytes qui le stockent dans leurs granules. Le TNF $\alpha$  stimule l'expression de molécules d'adhérence et la production de chimiokines (*voir ci-après*) par les cellules endothéliales permettant le recrutement des leucocytes sanguins (neutrophiles, éosinophiles, monocytes ou les NK) vers le foyer inflammatoire (*Bradley, 2008; Driscoll et al., 1997; Pober, 1987*). Il active également les systèmes microbicides des phagocytes et est mitogène pour les lymphocytes T et B (pour la mise en place de la réponse adaptative si la réponse innée n'est pas suffisante à la résolution de l'inflammation). Enfin, le TNF $\alpha$  active la production de facteurs de croissance, qui seront indispensables à la réparation du tissu endommagé (*Shinozaki M 2009*).

L'IL-1 est sécrétée par de nombreuses cellules après la reconnaissance de PAMP : les leucocytes, mais aussi les cellules endothéliales, les fibroblastes, présents dans tous les tissus. L'IL-1 provoque des effets locaux et des effets systémiques permettant à l'organisme de combattre la maladie. Comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 stimule l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire favorisant ainsi la migration des leucocytes circulants vers le site enflammé. Un de ses rôles le plus important est l'induction de la fièvre. L'IL-1 agit directement sur les centres de l'hypothalamus qui contrôlent la température corporelle. L'augmentation de la température du corps donne un avantage à l'organisme sur le pathogène : les lymphocytes se divisent plus vite, et le système immunitaire adaptatif est donc mobilisé plus rapidement alors que certains pathogènes ne se divisent pas ou moins bien à des températures élevées. L'IL-1 induit aussi une diminution de l'appétit et favorise un certain type de sommeil (*Dinarello, 1997; Kasza, 2013; Sims and Smith, 2010*).

L'IL-6 est produite par les phagocytes (macrophages et cellules dendritiques) et les

cellules endothéliales en cas d'inflammation. Elle induit localement l'activation des phagocytes et la modification de l'endothélium. Elle favorise le recrutement de monocytes sanguins vers les tissus et la production de protéines de la phase aiguë par les hépatocytes (Hirano, 1998; Hurst et al., 2001; Rose-John et al., 2007, p.).

**Les chimiokines** sont des cytokines impliquées dans la migration cellulaire. Elles sont sécrétées par de nombreuses cellules sentinelles après stimulation par des signaux de dangers. Elles forment alors un gradient, et dirigent ainsi la migration des populations leucocytaires requises vers le tissu enflammé (Massena et al., 2010). On répartit les chimiokines en deux classes, en fonction de la distance séparant deux résidus cystéines conservés : les chimiokines  $\alpha$  qui ont une séquence CXC (cystéine-résidu aléatoire-cystéine) et les chimiokines  $\beta$  qui ont une séquence CC (cystéine-cystéine) (Proudfoot, 2002; Sadik et al., 2011). La plupart des chimiokines interagissent avec plusieurs récepteurs, et chaque récepteur peut reconnaître plusieurs chimiokines. Chaque population leucocytaire exprime un groupe défini de récepteurs, ce qui permet aux différents types de cellules immunitaires de répondre spécifiquement à certaines chimiokines seulement. Les chimiokines peuvent circuler dans le sang ou adhérer à la surface des protéoglycanes à héparane sulfate (heparin sulfate proteoglycans) présents à la surface de l'endothélium (Luan et al., 2001; Massena et al., 2010; Zhang et al., 2001).

## 2) Cascade de recrutement leucocytaire

Le recrutement leucocytaire aux sites inflammatoires est un processus clé de la réponse inflammatoire quelle qu'en soit l'origine. Le recrutement des neutrophiles, mais aussi la recirculation des lymphocytes ou le trafic des monocytes nécessitent leur adhésion et leur transmigration à travers la paroi endothéliale. La cascade classique de recrutement comporte plusieurs grandes étapes : la capture et le roulement médié par les sélectines, l'activation par les chimiokines, l'arrêt dépendant des intégrines, l'adhésion, la reptation (crawling) et enfin la transmigration para ou transcellulaire (Ley et al., 2007) (Figure 16). Il s'agit donc d'un processus multi-étapes qui est initié par le roulement des leucocytes le long de la paroi vasculaire. La capture et le roulement sont médiés par les sélectines, une famille de lectines membranaires dépendantes de la présence de calcium exprimées sur la paroi vasculaire (Ley et al., 2007; Moore, 1998). En effet, la P-sélectine (P-sel, CD62P) et la E-sélectine (E-sel, CD62E), présentes à la surface de l'endothélium activé, interagissent

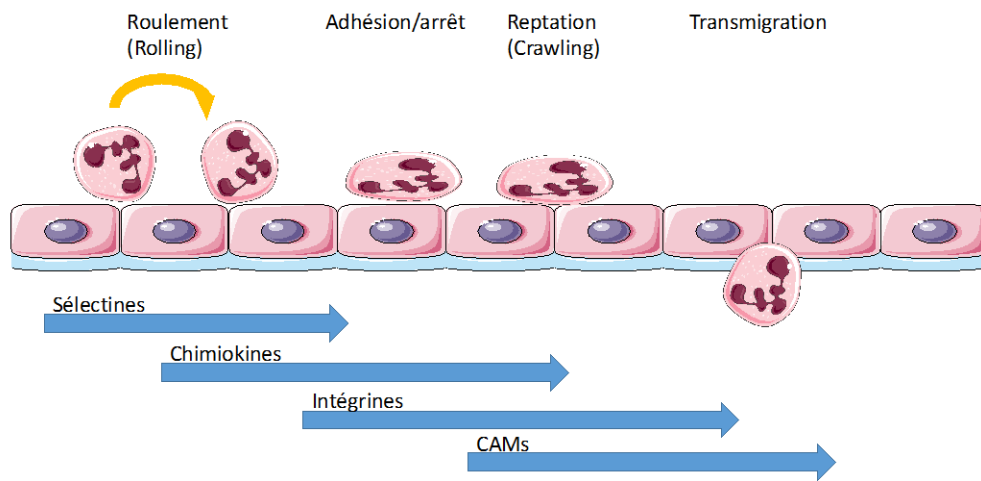
avec les leucocytes (*Kansas, 1996; Kolaczkowska and Kubes, 2013; McEver and Cummings, 1997*). Un autre membre de la famille des sélectines, la L-sélectine (L-sel, CD62L), présente à la fois à la surface des leucocytes et de l'endothélium, jouerait aussi un rôle dans la capture des leucocytes (*Zarbock and Ley, 2009*). La capture des neutrophiles s'effectue lorsque que P-sel et E-sel endothéliales se lient au P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) présent de façon constitutive sur le neutrophile (*Zarbock et al., 2011*). La liaison de PSGL-1 à L-sel promeut des interactions leucocytes-leucocytes qui permettent à des leucocytes ou des fragments de leucocytes adhérents de faciliter la capture secondaire de leucocytes circulants (*Ley et al., 2007*). Ce mécanisme permet également à des leucocytes qui n'expriment pas de ligands pour P-sel ou E-sel d'atteindre les sites de l'inflammation (*Ley et al., 2007*). L'endothélium vasculaire a donc un rôle actif dans le roulement des leucocytes puisque ce sont les cellules endothéliales qui expriment P-sel et E-sel (*Ley et al., 2007*). Ce rôle actif est encore accentué par l'expression des chimiokines qui vont renforcer les contacts leucocytes-paroi endothéliale. Ces interactions leucocytes-chimiokines provoquent l'activation de voies de signalisation couplées aux protéines G et conduisent à l'activation du leucocyte (*Futosi et al., 2013*). Cette activation cellulaire provoque l'augmentation simultanée de l'affinité et de l'avidité d'une autre classe de récepteurs impliquée dans le recrutement des leucocytes : les intégrines.

Les intégrines sont des récepteurs membranaires hétérodimériques présents sur toutes les cellules de l'organisme (*Herter and Zarbock, 2013*). Initialement, les intégrines leucocytaires ont une conformation de faible affinité pour leurs ligands mais l'activation du leucocyte va induire un changement de conformation et une augmentation importante de leur affinité (*Hogg et al., 2011; Kolaczkowska and Kubes, 2013; Lefort and Ley, 2012*), permettant le ralentissement du roulement sur l'endothélium (*Ley et al., 2007*). Ainsi, l'adhésion du leucocyte après le ralentissement du roulement fait intervenir la liaison des intégrines à des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales comme ICAM1 et VCAM1 (*Campbell et al., 1998*). Suite à son arrêt, le leucocyte augmente ses interactions intégrines-ligands afin de consolider son adhésion et résister à la pression hémodynamique. Cette adhésion ferme régule aussi d'autres fonctions cellulaires chez le neutrophile, dont la dégranulation, la motilité, la phagocytose et l'apoptose (*Luo et al., 2007; Zarbock and Ley, 2009*). Après son adhésion à l'endothélium, le leucocyte va se déplacer sur l'endothélium avec un mouvement de reptation (crawling),

dépendant de l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  (ou macrophage-1 antigen, Mac-1) et de la molécule d'adhésion ICAM-1 (CD54) (Phillipson et al, 2006; Schenkel et al, 2004). Ce déplacement lui permet de rejoindre un site de transmigration qui peut être distant du site d'arrêt (Kolaczkowska and Kubes, 2013; Ley et al, 2007). La présence d'un gradient chimiotactique peut contribuer à diriger le leucocyte sur la surface vasculaire (Massena et al, 2010; Phillipson et al, 2009).

Une fois le site de transmigration rejoint, deux types de transmigration leucocytaire ont été observés. Ils correspondent à la façon dont le leucocyte traverse l'endothélium : la voie paracellulaire et la voie transcellulaire (Kolaczkowska and Kubes, 2013; Zarbock and Ley, 2009). Dans tous les cas, le leucocyte doit composer avec le franchissement de 3 barrières : les cellules endothéliales, la membrane basale et les péricytes. La migration des leucocytes à travers les cellules endothéliales peut être rapide (< 2-5 min) mais la pénétration de la membrane basale est plus longue (> 5-15 min) (Ley et al, 2007).

Figure 16 : Etapes du recrutement leucocytaire



La première étape du recrutement leucocytaire est le roulement de la cellule circulante sur les cellules endothéliales, elle est suivie d'une adhésion puis d'une reptation pour rejoindre le site de la transmigration où le leucocyte traverse la barrière endothéliale pour rejoindre les tissus. Ces différentes étapes font intervenir un certain nombre de molécules : sélectines, chimiokines, intégrines et molécules d'adhésion cellulaire (CAM : cell adhesion molecule).

### 3) Modèles in vivo

Le processus inflammatoire est dynamique et fait appel à des cellules circulantes en mouvement. Depuis plusieurs décennies, son étude passe donc par l'observation microscopique dynamique et notamment la microscopie intravitale. Le modèle animal est étudié vivant anesthésié, le tissu ou l'organe d'intérêt étant exposé sous le microscope. Le roulement de cellules sanguines sur la surface endothéliale a pu être observé dès le 19<sup>ème</sup> siècle ; des études quantitatives sont possibles depuis le début des années 1970 (*Atherton and Born, 1972; Frenette et al., 1995; Leick et al., 2014*).

Un modèle de microscopie intravitale sur les veinules de mésentère murin a été mis au point pour étudier le rôle des sélectines dans le roulement des cellules sanguines sur la paroi endothéliale (*Frenette et al., 1995; Mayadas et al., 1993*). Les leucocytes peuvent être visualisés en contraste de phase ou après un marquage fluorescent. L'endothélium peut être activé par un agent exogène à action locale.

Un autre modèle de microscopie intra-vitale permet de visualiser les vaisseaux intramusculaires du crémaster de souris et d'appliquer des agents pro ou anti-inflammatoires. Dans le modèle de crémaster, la capture primaire des leucocytes sur les vaisseaux est principalement médiée par l'interaction PSGL-1 leucocytaire/ P-sel endothéliale et non par la L-sel leucocytaire sur le PSGL-1 endothélial (*Carlow et al., 2009; Eriksson, 2008*). Les nouvelles méthodologies disponibles plus récemment comme la microscopie intra- vitale biphotonique ou la microscopie confocale suggèrent que les interactions dans certains organes diffèrent du paradigme habituel de la cascade de recrutement leucocytaire (*Leick et al., 2014; Marques et al., 2015*).

Dans le foie par exemple, les leucocytes sanguins circulants interagissent avec l'endothélium au niveau des sinusoides plutôt qu'à celui des veinules post-capillaires. Les interactions de roulement ne sont pas retrouvées dans tous les modèles, la transmigration dépend plus de molécules d'adhésion comme ICAM-1 que des sélectines. Enfin, dans un modèle de recrutement des neutrophiles induit par le lipopolysaccharide (LPS), les interactions d'adhésion sont médiées par CD44 sur la face leucocytaire et des glycosaminoglycanes sur la face endothéliale (*Leick et al., 2014*). D'autres particularités ont été observées dans les capillaires pulmonaires ou les microvaisseaux glomérulaires.

## II) PSGL-1 et P-sélectine

### 1) PSGL-1

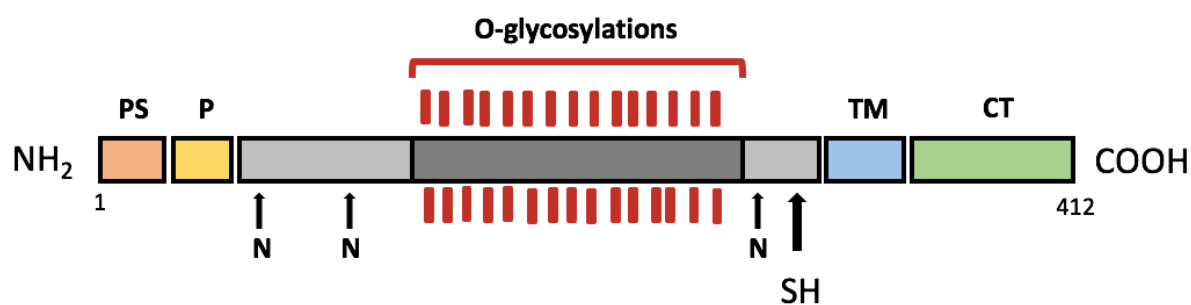
#### *a- Structure – Expression*

PSGL-1 (P-sélectine glycoprotéine ligand 1), identifié en 1992, est une glycoprotéine membranaire, présente notamment à la surface des leucocytes et dont la fonction principale est de lier la P-sel (*Moore et al., 1992*). Il s'agit d'un homodimère lié par un pont disulfure dont la masse moléculaire est d'environ 120 kDa. Sa liaison à la P-sel est spécifique, dépendante du calcium, inhibée par des anticorps monoclonaux anti P-sel ou un pré-traitement par une sialidase (*Moore et al., 1994; Moore, 1998*). L'analyse biochimique de cette protéine montre qu'elle est hautement sialylée c'est-à-dire porteuse de nombreux sucres de la famille des acides sialiques. Elle porte en effet au moins un N-glycan ou plus, plusieurs oligosaccharides O-sialylés et le tétrasaccharide sialyl-Le<sup>x</sup> (*Moore et al., 1992, 1994; Moore, 1998*).

L'ADNc de PSGL-1 a été cloné en 1993 : il code pour une protéine transmembranaire de type I de 402 aa avec un domaine extracellulaire de 308 aa, un domaine transmembranaire hydrophobe de 24 aa, et un domaine intracellulaire de 70 aa (*Sako et al., 1993*). L'extrémité extracellulaire N-terminale de la protéine comprend un domaine peptide signal hydrophobe de 18 aa suivi d'une séquence propeptide des résidus 19 à 41 (*Figure 17*). Le propeptide est clivé dans certains types cellulaires comme les neutrophiles, les cellules COS (lignée de cellules fibroblastiques dérivés du tissu rénal simien) et préservé dans d'autres lignées (cellules CHO, chinese hamster ovary par exemple) (*Li et al., 1996; Vachino et al., 1995*). PSGL-1 est fonctionnel quel que soit le sort du propeptide. Le domaine extracellulaire de la protéine possède 73 sites potentiels de O-glycosylations sur 60 thréonines et 13 sérines, trois sites consensuels de N-glycosylations et un seul résidu cystéine en position 309 dans le domaine extracellulaire, susceptible de favoriser la dimérisation (*Figure 17*) (*Moore, 1998*). Le gène qui code pour PSGL-1 chez l'homme est situé sur le chromosome 12q24 (*Veldman et al., 1995*). Chez la souris, PSGL-1 est codé par le chromosome 5 : il présente une organisation en domaines similaire à la protéine humaine ; la région extracellulaire est celle qui diffère le plus entre les deux espèces (*Yang et al., 1996*).



Figure 17 : Domaines structuraux de PSGL-1



PS=peptide signal ; P = propeptide ; N = sites de N- glycosylations ; TM = domaine transmembranaire ; CT = domaine cytosolique.

### Localisation tissulaire

Initialement, l'expression de PSGL-1 a été retrouvée au niveau des lignées myéloïdes et lymphoïdes c'est à dire sur toutes les cellules hématopoïétiques circulantes sauf les érythrocytes et les plaquettes (Moore, 1998). Cependant, cette expression est régulée négativement dans les lymphocytes après leur entrée dans les organes lymphoïdes secondaires (Carlow et al., 2009; Laszik et al., 1996). Plus récemment, une étude a finalement retrouvé l'expression de PSGL-1 à la surface des plaquettes, à un taux 25 à 100 fois moins important qu'à la surface des leucocytes. Le PSGL-1 plaquettaire participe ainsi au roulement des plaquettes sur l'endothélium vasculaire et ainsi à certains phénomènes hémostatiques (Frenette et al., 2000). PSGL-1 n'est pas détectable dans les cellules parenchymateuses des tissus. En revanche, il est présent dans les cellules hématopoïétiques de nombreux organes comme les macrophages résidents au niveau du foie, du poumon, de l'intestin et de l'épiderme. Enfin, alors qu'il était admis que PSGL-1 n'est pas exprimé sur l'endothélium, son expression a été retrouvée sur l'endothélium veineux de l'intestin grêle et des ganglions lymphatiques du mésentère (Rivera-Nieves et al., 2006). Il y fonctionnerait alors comme un des ligands de la L-sel, collectivement connus sous le nom d'adressine des ganglions périphériques (« peripheral node addressin ») au cours de la domiciliation (homing) des leucocytes vers les ganglions lymphatiques (Rosen, 2004). Le PSGL-1 est également exprimé sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale où il médie l'adhésion des monocytes dans des conditions de flux. Dans cette situation, ses capacités de liaison sont dépendantes de la stimulation des cellules endothéliales par des stimuli inflammatoires (TNF ) qui induisent sa glycosylation (Carlow et al., 2009; da Costa Martins et al., 2007). Ainsi, dans

des conditions d'activation endothéliale, la L-sel pourrait permettre le roulement et la capture primaire des leucocytes via le PSGL-1 endothélial (*Carlow et al., 2009; da Costa Martins et al., 2007*). La distribution tissulaire de PSGL-1 diffère chez la souris. En effet, des transcrits de PSGL-1 sont retrouvés dans les tissus hématopoïétiques incluant le sang, la moelle, le thymus et la rate mais également dans des tissus non hématopoïétiques comme le cœur, le rein, le foie, les ovaires, l'estomac, le cerveau ou le tissu adipeux (*Yang et al., 1996*).

#### *Topographie sub-cellulaire*

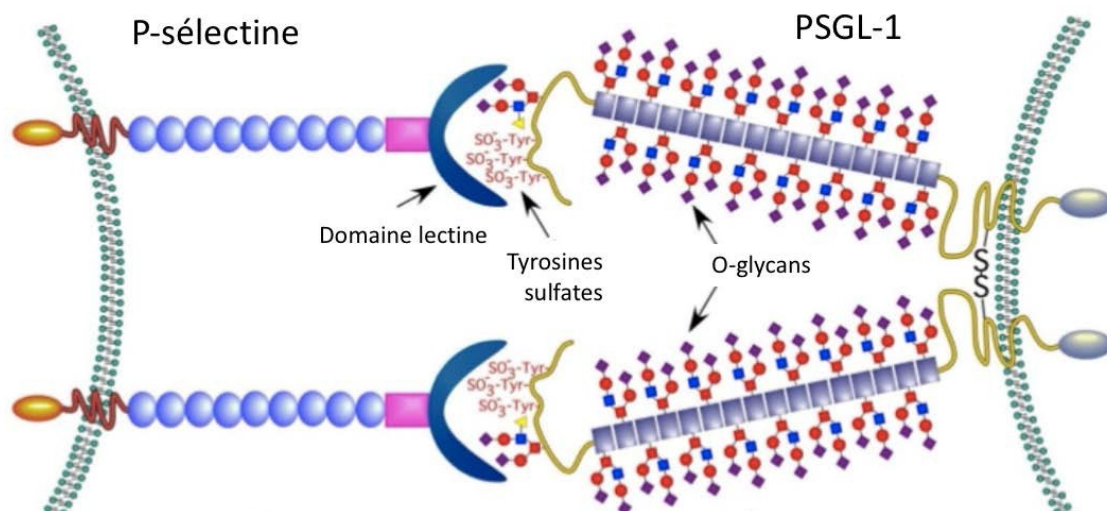
La répartition cellulaire de l'expression de PSGL-1 sur les leucocytes a été étudiée par microscopie électronique. Le PSGL-1, comme la L-sel et l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , est préférentiellement localisé sur les pointes des microvillosités de la membrane plasmique sur les leucocytes au repos (*Berlin et al., 1995; Bruehl et al., 1996; Moore et al., 1995*). Cette observation a été confirmée pour de nombreux types de leucocytes incluant les neutrophiles, lymphocytes, monocytes, et éosinophiles. Les microvillosités sont les points de contacts initiaux entre les leucocytes circulants et l'endothélium vasculaire (*Beesley et al., 1979*). La répartition topographique de PSGL-1 est donc cruciale pour l'adhésion optimale des leucocytes en conditions de flux (*von Andrian et al., 1995*). Le niveau d'expression de PSGL-1 sur les neutrophiles n'est pas modifié après activation et ne modifie pas la capacité de liaison des neutrophiles à P-sel en phase liquide (*Bruehl et al., 1997; Fuhlbrigge et al., 1996; Lorant et al., 1995*). Cependant, cette activation entraîne une redistribution des récepteurs membranaires PSGL-1 et P-sel qui dépend de la présence d'un cytosquelette fonctionnel (*Bruehl et al., 1997; Doré et al., 1996; Lorant et al., 1995*). La redistribution de PSGL-1 à la surface des neutrophiles activés diminue l'adhésion à P-sel et peut donc faciliter la migration transendothéliale (*Moore, 1998*).

En ce qui concerne les tissus pathologiques, les cellules cancéreuses peuvent présenter à leur surface des ligands des sélectines impliqués dans les interactions avec les plaquettes, les leucocytes et l'endothélium. Ces ligands participent ainsi à la diffusion tumorale mais n'ont pas été identifiées comme étant exactement PSGL-1 même s'ils partagent des caractéristiques moléculaires avec ce dernier (*Heidemann et al., 2014; Hoos et al., 2014; Raes et al., 2007*). Certaines cellules cancéreuses sont néanmoins capables d'émettre des MPs portant PSGL-1, ce qui pourrait laisser penser qu'elles l'expriment à leur surface

(Thomas et al., 2009).

Bien que PSGL-1 soit exprimé par tous les leucocytes, ceux-ci ne lient pas tous la P-sel. En effet, seule une faible proportion de LT (Lymphocytes T), NK et lymphocytes B lient la P-sel (de Bruijne-Admiraal et al., 1992; Moore et al., 1992; Vachino et al., 1995). Dans le cas des lymphocytes, la liaison à la P-sel fait suite à l'activation de ces cellules et passe par des modifications post-traductionnelles du PSGL-1 qui sont indispensables pour la reconnaissance de la P-sel (Moore, 1998). C'est d'ailleurs le cas de tous les ligands des sélectines qui nécessitent des modifications par des enzymes spécifiques transportant des motifs sucrés (fucosyltransferase et sialyltransferase) (Ellies et al., 2002; Ley et al., 2007; Malý et al., 1996). L'interaction optimale entre PSGL-1/P-sel fait intervenir plusieurs déterminants structuraux: un motif de reconnaissance minimal, le sialyl Lewis X (sLe<sup>x</sup>) et la présence de trois tyrosines sulfatées en position 46, 48 et 51 (domaine extracellulaire du PSGL-1). Le tétra saccharide Lewis X consiste en un acide sialique lié en  $\alpha$ 2-3 au galactose lui-même lié en  $\beta$ 1-4 au N-acétylglucosamine qui supporte également un fucosilé en  $\alpha$ 1-3, l'ensemble attaché à un O-glycan. (Moore et al., 1992; Sako et al., 1993). La P-sel se lie en position N-terminale du PSGL-1 à proximité des tyrosines sulfatées (Moore, 1998, 2003). (Figure 18)

Figure 18 : Interaction entre la P-sel et PSGL-1



La P-sel reconnaît grâce à son domaine lectine, la partie N-terminale du PSGL-1, représenté ici comme un homodimère relié par un pont disulfure. Les multiples sites de O-glycans du PSGL-1 peuvent porter des résidus sialylés. La présence des 3 tyrosines sulfatées en est cruciale pour la liaison.

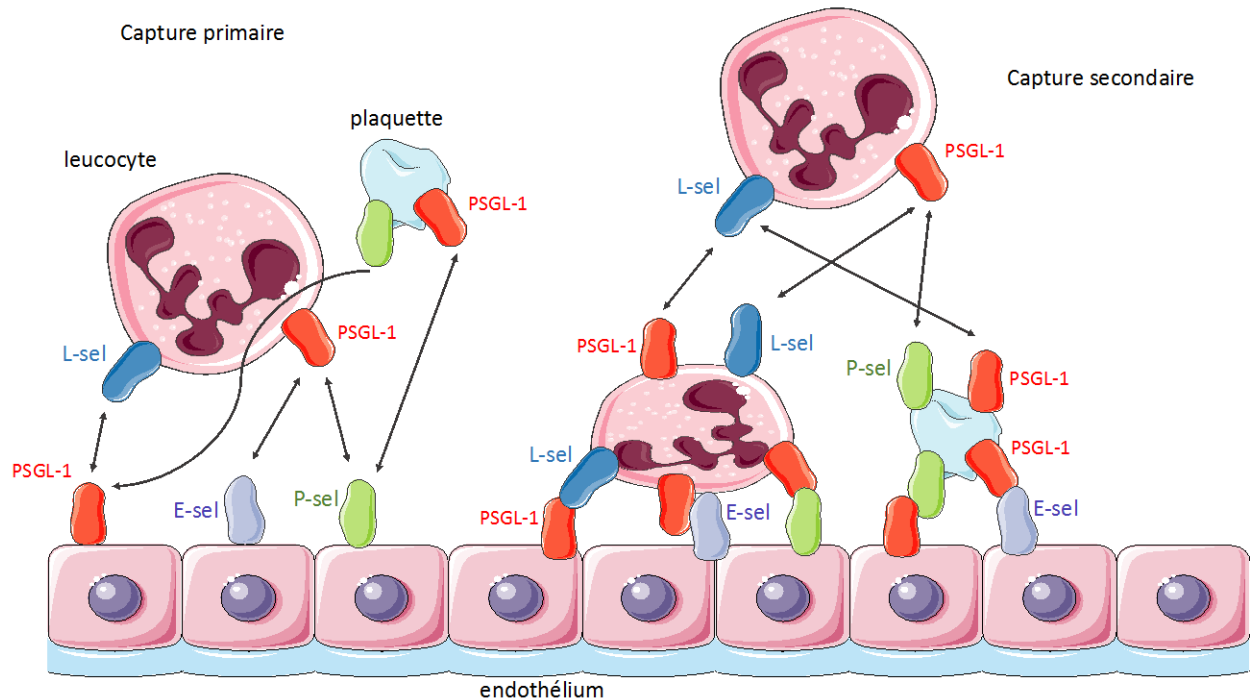
### *b- Fonctions*

Le PSGL-1 est un ligand physiologique de la P-sel : des anticorps monoclonaux anti PSGL-1 bloquant son interaction avec la P-sel inhibent l'accrochage des neutrophiles sur des cellules exprimant la P-sel, dans une gamme de conditions de force de cisaillement physiologique (Moore *et al.*, 1995). *In vivo*, le rolling des neutrophiles dans la microcirculation passe par le PSGL-1 (Norman *et al.*, 1995). C'est également le cas des éosinophiles et des lymphocytes T (Moore, 1998).

Le PSGL-1 est également un des neuf ligands connus de la L-sélectine (L-sel) qui est exprimée à la surface des leucocytes. La L-sélectine (CD62L) est un récepteur de la domiciliation des lymphocytes exprimé constitutivement sur les leucocytes pour les cellules endothéliales des veinules des tissus lymphatiques (Chen and Geng, 2006). L'interaction entre le PSGL-1 et la L-sel participe au roulement secondaire des neutrophiles circulants sur les neutrophiles immobilisés ou les fragments de leucocytes liés à l'endothélium dans des conditions de flux (Carlow *et al.*, 2009; Moore, 1998). Les sites de liaison pour les P et L-sel sur le PSGL-1 se chevauchent mais ne sont pas identiques (Moore, 1998). Le roulement secondaire (ou capture secondaire) est défini par le roulement de leucocytes circulants sur des cellules déjà attachées à l'endothélium. Il peut être médié par une interaction entre le PSGL-1 leucocytaire et la P-sel de plaquettes adhérentes ou la L-sel de leucocytes adhérents mais aussi entre la L-sel leucocytaire et le PSGL-1 de plaquettes ou de leucocytes arrêtés sur l'endothélium (Carlow *et al.*, 2009) (Figure 19).

Enfin, PSGL-1 est également un ligand pour la E-sélectine (E-sel). La E-sélectine (CD62E) est un récepteur transitoire inductible par des cytokines sur endothélium pour lier neutrophiles, monocytes, lymphocytes T mémoire, éosinophiles ou basophiles (Chen and Geng, 2006). Outre le PSGL-1, les neutrophiles portent aussi d'autres ligands de la E-sel : le E-sel ligand-1 (ESL-1), et CD44, tous identifiés *in vitro* (Hidalgo *et al.*, 2007). Il semble que PSGL-1 initie l'accrochage des leucocytes, ESL-1 supporte leur accrochage et le roulement lent /l'arrêt, CD44 contrôle la vitesse de roulement et entraîne la redistribution cellulaire de L-Sel et PSGL-1 (Hidalgo *et al.*, 2007).

Figure 19 : Interactions PSGL-1 et sélectines dans le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire.



La capture primaire des leucocytes ou des plaquettes passe par des interactions directes entre la cellule circulante et les cellules endothéliales. La capture secondaire représente la liaison des cellules circulantes sur des ligands exposés par des cellules sanguines déjà arrêtées et adhérentes à l'endothélium.

De par le rôle de PSGL-1 décrit plus haut dans le roulement des leucocytes, étape clé du recrutement leucocytaire aux sites inflammatoires, cette protéine a un rôle majeur dans l'immunité innée.

La régulation de ses fonctions de liaison par des modifications de glycosylation activables lui confère également un rôle dans l'immunité adaptative.

En dehors de son rôle dans le trafic des leucocytes matures, PSGL-1 joue également un rôle dans la domiciliation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle. Il permet en effet leur interaction avec les sélectines de l'endothélium des sinusoides médullaires, majoritairement E-sel (Carlow et al., 2009; Hidalgo et al., 2002; Katayama et al., 2003). Le PSGL-1 participe également à la domiciliation des plasmocytes B et des lymphocytes mémoire CD8+ vers la moelle osseuse via son interaction avec la E-sel de la microvascularisation médullaire (Carlow et al., 2009). Il participe enfin de manière plus

ou moins cruciale à la domiciliation des progéniteurs de LT vers le thymus, de cellules matures vers le thymus, de LT vers les organes lymphoïdes secondaires (Carlow et al., 2009). L'interaction PSGL-1/P-sel intervient également dans les processus d'hémostase, ce que nous détaillerons un peu après.

## 2) P-sélectine

### a- Structure – Expression

La famille de molécules d'adhésion des sélectines comprend une sous-famille unique de lectines animales dépendantes du calcium qui médient les interactions adhésives entre leucocytes et plaquettes ou entre cellules cancéreuses ou plaquettes.

La P-sel est exprimée sur la membrane plasmique des cellules endothéliales et des plaquettes activées, activation conduisant à l'exocytose de cette molécule (Furie et al., 2001). La P-sel humaine est codée par un gène de 50kb, contenant 17 exons, situé sur le chromosome 1 (Chen and Geng, 2006; Johnston et al., 1990). Elle existe sous une forme transmembranaire et une forme soluble dans les deux types cellulaires. L'organisation structurelle de la P-sélectine comprend, de l'extrémité N à C terminale, un domaine lectine de 120 aa dépendant du calcium, un domaine EGF (epidermal growth factor), 8 ou 9 motifs régulateurs, un domaine transmembranaire et enfin une queue cytosolique (Figure 20). La forme transmembranaire fait 140 kDa, la forme soluble est obtenue par épissage alternatif. Les deux formes sont capables de lier les leucocytes. Ceci suggère la possibilité d'une action coordonnée *in vivo* (Chen and Geng, 2006).

Figure 20 : Structure schématique de la P-sélectine



En N terminal, le domaine EGF fait suite à un domaine lectine. Puis la structure comprend 8 à 9 répétitions de domaines régulateurs, un domaine transmembranaire (TM) et une queue cytosolique.

## *b- Fonctions*

### *Molécule d'adhésion dans l'immunité*

La P-sel stockée dans les granules alpha des plaquettes et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales est rapidement mobilisée à la surface cellulaire en cas d'activation. La P-sel se lie à PSGL-1 pour promouvoir l'attachement et le roulement des leucocytes sur l'endothélium activé et l'agrégation des plaquettes activées sur les leucocytes.

### *Rôle dans l'hémostase*

La P-sel joue également un rôle dans l'hémostase et la thrombose en médiant l'agrégation hétérotypique des plaquettes sur l'endothélium activé ou les leucocytes adhérents, mais aussi l'agrégation homotypique des plaquettes activées et le transfert de microparticules contenant du FT et PSGL-1.

Après la découverte de la P-sel en tant que molécule d'adhésion au début des années 80, son rôle dans la thrombose a été décrit pour la première fois en 1992. En effet dans un modèle de thrombose chez le primate, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti P-sel inhibe l'accumulation des leucocytes dans le thrombus et diminue ainsi le dépôt de fibrine (*Palabrica et al., 1992*). Ces résultats, confirmés par d'autres études chez l'animal, indiquent que la présence des leucocytes dans le thrombus est médiée par P-sel et qu'ils participent à l'accumulation de fibrine au sein du thrombus (*Darbousset et al., 2014; Gross et al., 2005; Toombs et al., 1995; Wakefield et al., 1996*). La P-sel est également responsable de l'augmentation d'expression du FT par les monocytes (*Furie and Furie, 2004*). Bien que ces observations soient avérées, d'un point de vue cinétique elles ne peuvent expliquer le mécanisme par lequel l'interaction P-sel/PSGL-1 participe à la formation et l'amplification du thrombus. En effet, les différences d'expression de FT et de génération de fibrine entre des souris sauvages ou déficientes en P-sel apparaissent très précocement, avant même le recrutement leucocytaire (*Vandendries et al., 2004*). Par ailleurs, la synthèse de novo de FT par les monocytes est un processus plutôt long *in vitro* (quelques heures) (*Furie and Furie, 2004*). L'hypothèse actuellement acceptée est qu'il existe un pool de FT circulant mobilisable, capable de s'accumuler dans le thrombus en formation et que des microparticules émises par les leucocytes portent simultanément le FT et PSGL-1 (*Furie and Furie, 2004; Vandendries et al., 2004*). Cette proximité « physique » entre PSGL-1 et FT permet de rendre compte du rôle de l'interaction PSGL-1/P-sel dans la croissance du thrombus. De plus, les

microparticules portant la phosphatidylsérine membranaire peuvent agir comme une surface catalytique pour les complexes ténase et prothrombinase, accélérant ainsi la coagulation (*Furie and Furie, 2004; Vandendries et al., 2004*).

Plusieurs études ont montré l'intérêt de l'antagonisation de l'axe P-sel/PSGL-1 dans la résolution du thrombus. Une méta-analyse a donc comparé l'efficacité d'inhibiteurs de cette voie par rapport à des HBPM (héparine de bas poids moléculaire) dans le traitement de la thrombose veineuse profonde. L'inhibition de l'interaction P-sel/PSGL-1 semble équivalente aux HBPM en réduisant le thrombus sans augmenter le risque hémorragique (*Ramacciotti et al., 2010*). L'interaction P-sel/PSGL-1 intervient dans la formation des agrégats leucocytes-plaquettes qui pourraient avoir un rôle pathogène dans la thrombose artérielle et l'athérosclérose (*Cerletti et al., 2012; Ozaki et al., 2014*). Le déficit en PSGL-1 est protecteur dans un modèle de thrombo-embolisme murin par injection de collagène-épinéphrine (*Miszti-Blasius et al., 2011*). Il est également protecteur contre l'effet pro-thrombotique de certaines cytokines (IL $\beta$ ) dans un autre modèle murin de thrombose artérielle par lésion photochimique (*Wang et al., 2015*).

Enfin, les interactions des cellules cancéreuses avec la P-sel endothéliale participent à leur dissémination métastatique. L'interaction des plaquettes avec les cellules cancéreuses assure la présence de facteurs de croissance locaux qui augmentent la prolifération cellulaire (*Chen and Geng, 2006*).

### **3) Inhibiteurs de la liaison PSGL-1 / P-sélectine**

Le rôle crucial de l'interaction PSGL-1/P-sélectine dans différents processus physiologiques a conduit à la mise au point de différentes molécules à visée thérapeutique, ciblant cette interaction. Les anticorps bloquants anti PSGL-1 ou anti P-sélectine ont été testés dans des modèles animaux de maladie de Crohn ou de drépanocytose mais ils sont chers à produire et ont une demi-vie limitée (*Krishnamurthy et al., 2015*). De plus, le développement par les patients d'anticorps dirigés contre la thérapie monoclonale, finit par en limiter l'efficacité, notamment en cas de traitement répété ou à long terme (*Baert et al., 2003*).

Les petites molécules inhibitrices conçues à partir de modifications du sialyl Lewis X ont également montré des limites tant sur le plan de l'efficacité que de la toxicité. Par exemple, GMI-1070, un inhibiteur des sélectines s'est révélé efficace dans le traitement de la



drépanocytose mais sa faible activité anti P-sel nécessite des perfusions quotidiennes de dose importante de protéine (Chang et al., 2010). De la même façon, PSI-697 n'inhibe que faiblement l'agrégation entre plaquettes et monocytes humains, en raison d'un Kd faible (Japp et al., 2013). Enfin, le glycomimétique bimosiamose (TBC1269), un inhibiteur pan-sélectine testé chez les asthmatiques, inhibe la P-sel avec un IC<sub>50</sub> de 70 µM mais la E et la L-sel avec IC<sub>50</sub> > 500 µM (Beeh et al., 2006). La plupart des inhibiteurs existants de la P-sel ont été conçus à partir de la structure en sucre, notamment la présence du sLe<sup>x</sup> mais ne réussissent pas à prendre en compte le rôle crucial des tyrosines sulfates (Chang et al., 2010; Huang et al., 2010; Kranich et al., 2007; Krishnamurthy et al., 2015; Moore, 2003).

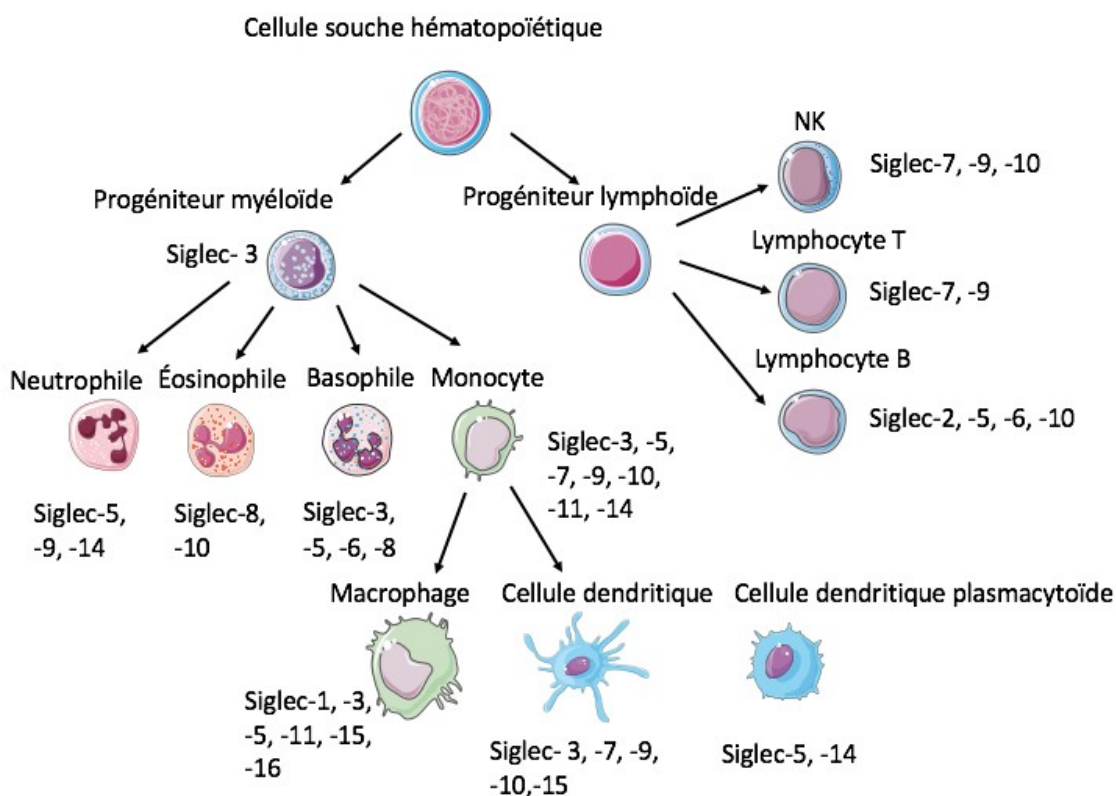
Plus récemment et de manière plus prometteuse, une équipe a conçu un glycopeptide qui imite le PSGL-1 en respectant des éléments de sa structure glycosylée (O-glycan) et en remplaçant les tyrosines sulfates par des analogues sulfonates : GSnP-6. Ce peptide a une affinité pour la P-sel de l'ordre du nanomolaire, il inhibe la liaison de la P-sel et de la L-sel à PSGL-1, le roulement des leucocytes *in vitro* et exerce des effets anti-inflammatoires *in vivo* (Krishnamurthy et al., 2015).

### III) Siglecs

#### 1) Description générale de la famille des Siglecs

Les Siglecs (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins) sont des récepteurs endocytiques de la surface cellulaire appartenant à la super-famille des immunoglobulines. Ils lient spécifiquement les acides sialiques sur les groupements sucrés souvent situés en position terminale à la surface cellulaire ou sur des composés glucoconjugués sécrétés (Crocker, 2005; Crocker et al., 2012). Les gènes codant pour les Siglecs humains sont situés pour la plupart sur le chromosome 19q, sauf pour le Siglec-1 (sialoadhésine) situé sur le chromosome 20p (Crocker, 2002). La famille des Siglecs humains comprend 14 membres distincts avec des profils d'expression différents, mais le plus souvent restreint aux cellules de la lignée hématopoïétique (Crocker et al., 2012) (Figure 21).

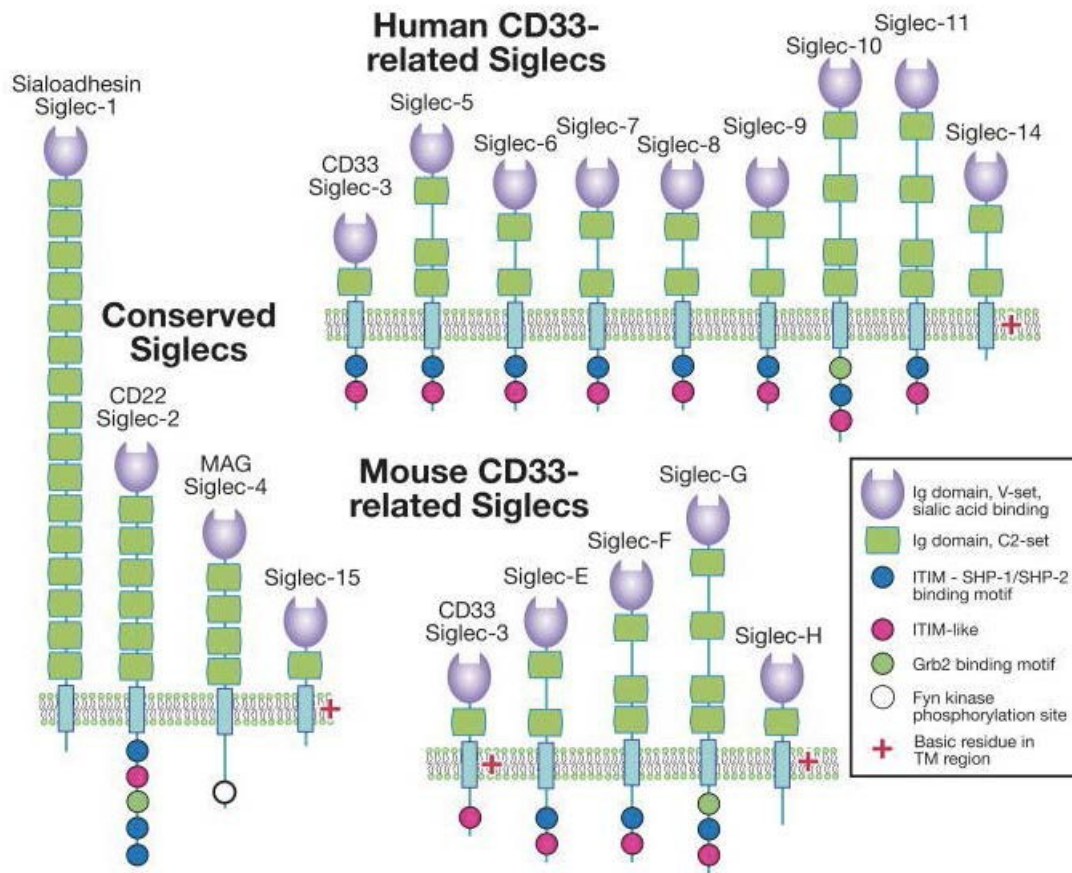
Figure 21: Profil d'expression des Siglecs dans la lignée hématopoïétique.



Les rares Siglecs qui ne s'expriment pas dans la lignée hématopoïétique n'apparaissent donc pas sur ce schéma (Siglec-4, système nerveux). D'après Crocker 2012 (Crocker et al., 2012)

Ces récepteurs sont composés d'une région V-set immunoglobulin-like liant les acides sialiques en N-terminal, suivi d'un nombre variable de domaines C2-set, reliés par un domaine transmembranaire simple passage à une queue cytosolique (Crocker et al., 2012) (Figure 22).

Figure 22 : Structures des différents membres de la famille des Siglecs.



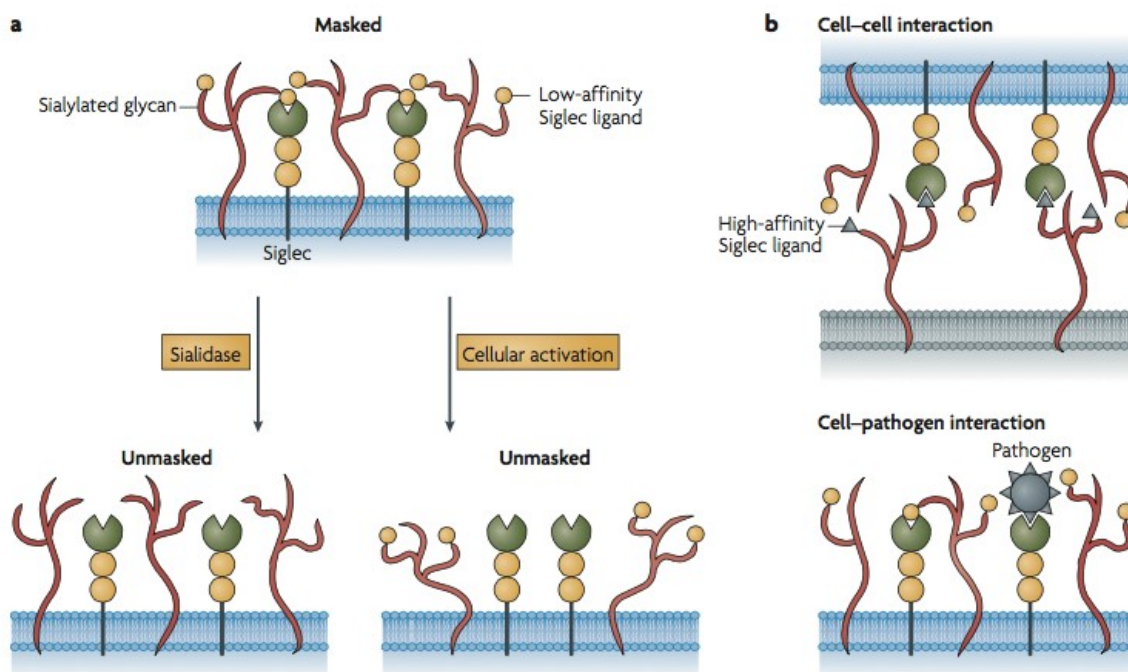
Les domaines V-set et C2-set sont retrouvés dans l'ensemble des récepteurs. Le nombre de domaines C2-set est variable, les motifs intracellulaires également (d'après Varki 2009).

Le domaine V-set contient un résidu Arginine conservé entre les différents Siglecs et les espèces, qui est impliqué dans la liaison aux groupes sucrés des acides sialiques (Varki and Angata, 2006). Pour autant, chaque Siglec a un profil préférentiel de liaison pour des sous-types spécifiques d'acides sialiques, et également pour des types spécifiques de liaison avec les sucres. Ces préférences de liaison sont liées à leurs fonctions biologiques (Crocker, 2002). Comme la plupart des lectines, l'affinité des Siglecs pour leurs ligands sialylés est faible (constantes d'association variant habituellement du micromolaire au millimolaire). La multimérisation des Siglecs peut avoir lieu au sein de la membrane cellulaire sous forme de clusters ce qui augmente leur avidité pour les glycanes (Varki and Crocker, 2009).

Les répétitions des domaines C2-set ont pour rôle de placer le site de liaison à distance optimale de la membrane cellulaire. La concentration locale en acide sialique à la surface

des cellules de l'immunité est élevée. Par ailleurs, les séquences d'acides sialiques reconnues par les Siglecs sont nombreuses à la surface des cellules mammifères. En conséquence, les sites de liaison des Siglecs sont souvent engagés dans des interactions avec des structures voisines de la membrane de la même cellule, en cis. Ces interactions masquent la possibilité de liaisons de cellule à cellule (en trans), ce qui joue probablement un rôle dans la modulation de l'activité biologique des Siglecs. Même lorsque des interactions en cis masquent les sites de liaison des Siglecs, des interactions en trans peuvent avoir lieu lors de la rencontre avec une autre cellule ou un pathogène exprimant un ligand de plus haute affinité qui entrent en compétition avec l'interaction en cis (Crocker et al., 2007; Razi and Varki, 1998) (Figure 23).

Figure 23 : Interactions des Siglecs en cis ou en trans.



En a) la plupart des sites de liaison Siglecs sont masqués par des interactions en cis avec des partenaires voisins de la membrane cellulaire. Après exposition à une sialidase qui clive les liaisons en cis ou après une activation cellulaire, les sites de liaison des Siglecs deviennent disponibles pour des ligands en trans. En b) des interactions de cellule à cellule peuvent toujours avoir lieu lorsque les Siglecs rencontrent un pathogène ou une autre cellule dont les ligands sont d'une affinité supérieure aux liaisons en cis (d'après Crocker et al., 2007)

A partir de leurs similarités de séquence et de leur conservation à travers l'évolution, deux sous-groupes de Siglecs ont été identifiés. Le premier groupe comprend la sialoadhésine (Sn) ou Siglec-1, CD22 ou Siglec-2, MAG (myelin-associated glycoprotein) ou Siglec-4, et Siglec-15. Ce groupe est appelé les CD22-related Siglecs, ils sont hautement conservés

chez les mammifères. Le second groupe désigne les CD33-related Siglecs, qui ont une évolution rapide à travers les espèces. Il comprend CD33 ou Siglec-3, et les siglecs-5, -6, -7, -8, -9, 10, -11, -14 et -16 chez l'humain ; les Siglecs-E, -F, -G et -H chez la souris (*Cao and Crocker, 2011*).

## **2) Expression, ligands et fonctions des CD33 related Siglecs**

Le groupe des CD33 related Siglecs joue des rôles importants dans la modulation des fonctions leucocytaires en inhibant l'activation cellulaire et la prolifération, en induisant l'apoptose, en modulant la sécrétion de cytokines et en médiant l'endocytose (*Crocker et al., 2012*).

Siglec-3 ou CD33 a été identifié en 1983 comme un marqueur précoce des progéniteurs myéloïdes humains (*Andrews et al., 1983; Varki and Crocker, 2009*). Lors de la différenciation, CD33 n'est conservé que sur les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les mastocytes et les basophiles. CD33 exprime une préférence de liaison vers les glycanes sialylés en  $\alpha 2-6$  par rapport aux  $\alpha 2-3$  (*Freeman et al., 1995; Varki and Crocker, 2009*). C'est le premier des CD33 related Siglecs à avoir été identifié comme un récepteur inhibiteur. Comme pour d'autres récepteurs de la même famille, son activité de liaison peut être masquée par des interactions avec des ligands en cis (*Freeman et al., 1995; Varki and Crocker, 2009*). Des anticorps dirigés contre CD33 inhibent la prolifération de cellules normales ou leucémiques, suggérant un rôle de CD33 dans la régulation de l'hématopoïèse (*Varki and Crocker, 2009; Vitale et al., 1999*). CD33 joue aussi un rôle dans le processus de réponse inflammatoire puisqu'il inhibe la production de certaines cytokines (*Lajaunias et al., 2005*). Enfin, les propriétés endocytiques de CD33 sont utilisées en thérapeutique : un anticorps monoclonal anti-CD33 (Gemtuzumab) couplé à un antibiotique toxique, est utilisé dans le traitement de la leucémie aiguë myéloïde.

Siglec-5 : sera traité dans paragraphe dédié.

Siglec-6 a d'abord été identifié comme une nouvelle protéine liant la leptine et comme une protéine placentaire (OB-BP1 ou Obesity binding protein 1). C'est une protéine fortement exprimée dans le placenta sur les cytotrophoblastes, les syncytiotrophoblastes, les

lymphocytes B et les mastocytes (*Florian et al., 2006; Patel et al., 1999; Varki and Crocker, 2009; Yokoi et al., 2006*). Siglec-6 lie préférentiellement la structure sucrée Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ -(Sialyl-Tn). Siglec-6 exerce un effet inhibiteur délétère dans la réponse immunitaire des lymphocytes B contre l'infection persistante au virus VIH (*Kardava et al., 2011*). Siglec-6 n'a pas d'orthologue évident chez les rongeurs mais est présent chez les grands primates.

Siglec-7, -8 et -9 : Ces trois Siglecs partagent un haut degré de similarité de séquence et ont évolué à partir de la duplication du gène d'un siglec ancestral à 3 domaines (*Varki and Crocker, 2009*).

Siglec 7, originellement connu sous le nom de p75/AIRM1 (adhesion inhibitory receptor molecule 1), a été cloné en 1999. Il est prédominant sur les cellules NK mais est aussi retrouvé sur les monocytes, les cellules dendritiques, et un petit sous-groupe de lymphocytes T CD8+ (*Angata and Varki, 2000; Bax et al., 2011; Falco et al., 1999; Nicoll et al., 1999*). Cette protéine exprime une préférence de liaison inhabituelle pour les acides sialiques en  $\alpha$ 2-8. La surface des lymphocytes NK est décorée de ligands sialylés  $\alpha$ 2-8, suggérant que ces ligands endogènes pourraient interagir en cis avec Siglec-7 et masquer son site de liaison (*Avril et al., 2006*). Siglec-7 est également capable d'interagir avec des pathogènes bactériens recouverts d'acides sialiques comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Campylobacter jejuni*, effectuant ainsi un rôle dans les interactions hôte-pathogène (*Bax et al., 2011; Khatua et al., 2010*).

Siglec-8, qui a d'abord été appelé SAF-2, a été découvert en 2000. Il est exprimé fortement sur les éosinophiles et un peu moins sur les mastocytes et basophiles (*Floyd et al., 2000; Kikly et al., 2000*). Il lie préférentiellement le glycan 6'-sulfo-sialyl Lewis X (*Hudson et al., 2009*). Sur les éosinophiles, des anticorps qui lient le Siglec-8 ou des anticorps anti Siglec-8 présents dans les préparations d'Ig intra veineuses, induisent l'apoptose (*Nutku et al., 2003, 2005; von Gunten et al., 2007*). Cela pourrait expliquer l'efficacité des préparations d'Ig intra-veineuses dans des pathologies humaines impliquant les éosinophiles comme l'asthme sévère, l'urticaire chronique ou le syndrome de Churg et Strauss (*Landwehr et al., 1998; O'Donnell et al., 1998; Tsurikisawa et al., 2004*).

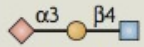
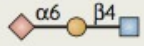
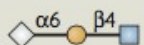

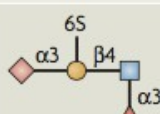
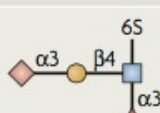
Siglec-9, également connu sous le nom de CD329, a été identifié en 2007. Il présente environ 80 % d'homologie de séquence d'acide aminé avec Siglec-7 et est principalement exprimé sur les neutrophiles, les monocytes et en moindre quantité sur certains

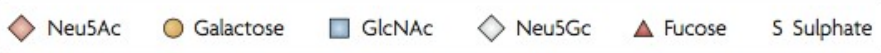
lymphocytes NK, B ou T (*Angata and Varki, 2000; Zhang et al., 2000*). Comme pour les éosinophiles avec les anti-Siglec-8, les anticorps monoclonaux anti-Siglec-9 ou des anticorps anti Siglec-9 présents dans les préparations d'Ig intra veineuses induisent une apoptose des neutrophiles (*von Gunten et al., 2005, 2006*). Cela pourrait expliquer la neutropénie parfois observée avec ces traitements (*von Gunten et al., 2006*). En plus de l'effet pro-apoptotique, la liaison de Siglec-9 en présence de « granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor » conduit à une forme de mort cellulaire non- apoptotique indépendante de la caspase (*Varki and Crocker, 2009*). Certains pathogènes sialilés comme les streptocoques du groupe B ou *Pseudomonas aeruginosa* peuvent lier le Siglec-9 à la surface des neutrophiles, cela participe à la survie bactérienne et l'invasion immunitaire (*Carlin et al., 2009; Khatua et al., 2010, 2012*).

Malgré leurs homologies de séquence, l'analyse des spécificités de liaison entre Siglec-7, -8 et -9 révèle des différences marquantes. En effet, Siglec-8 lie préférentiellement un unique ligand qui est le 6'-sulfo-SLe<sup>x</sup>, alors que Siglec-9 préfère une structure proche le 6-sulfo-SLe<sup>x</sup>, et Siglec-7 est capable de lier les 2 formes (*Varki and Crocker, 2009*).

La forme murine la plus proche des Siglec-7, -8 et -9 est Siglec-E qui se trouve dans la même branche de l'évolution et partage 70 % de similarité de séquence avec les 3 protéines. Siglec-E partage une combinaison de caractéristiques retrouvées pour Siglec-7 et 9, notamment le profil cellulaire d'expression et les préférences de liaison. Il n'y a pas d'orthologue murin vrai pour Siglec-8 mais Siglec-F est également exprimé par les éosinophiles et a les mêmes préférences de liaison (*Varki and Crocker, 2009*).

Tableau 4 : Profil de liaison des différents Siglecs.

	Human					Mouse		
	CD22	Siglec-7	Siglec-8	Siglec-9	Siglec-10	CD22	Siglec-E	Siglec-F
	0	+	+	+	+	0	++	++
	+++	+	+	+	++	+	++	+/-
	+++	+	+	+	+++	+++	+	0
	0	+++	+	0	0	0	++	0
	ND	++	+++	0	0	0	++	+++
	ND	+	0	+++	0	0	+	0



Les acides sialiques font référence à une famille de sucres qui dérivent majoritairement de l'acide N-acétylneuraminic (Neu5Ac). Bien qu'il existe naturellement plus de 50 formes d'acides sialiques, les mammifères expriment majoritairement l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) et l'acide 5,(7)9-N,O-diacétylneuraminique (Neu5,(7)9Ac). Les acides sialiques sont habituellement situés aux extrémités exposées non réductrices des chaînes d'oligosaccharides et transférés en utilisant des liaisons en  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 ou  $\alpha$ 2-8 sur les sucres préterminaux par des sialyltransférases. (d'après (Crocker et al., 2007))

**Siglec-10 et -11** : Siglec-10, également désigné par SLG2 (Siglec-like gene 2), découvert en 2001, est exprimé faiblement sur plusieurs cellules du système immunitaire incluant les monocytes, les éosinophiles, les cellules dendritiques et certains lymphocytes (Li et al., 2001; Munday et al., 2001; Varki and Crocker, 2009; Whitney et al., 2001; Yousef et al., 2001). Il peut lier des conjugués sialilés en  $\alpha$ 2-6 et  $\alpha$ 2-3 et peut être masqué par des interactions en cis à la surface cellulaire (Li et al., 2001; Munday et al., 2001; Whitney et al., 2001). Siglec-10 a été identifié comme le ligand de VAP-1 (vascular adhesion protein-1), une glycoprotéine exprimée sur l'endothélium au cours de l'inflammation et impliquée dans le trafic des leucocytes vers les sites inflammés (Kivi et al., 2009). Cette interaction semble médier l'adhésion des lymphocytes à l'endothélium et conduit à l'augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène qui modifie le microenvironnement inflammatoire (Kivi et al., 2009). Siglec-10 est également exprimé dans certains tissus cancéreux où il est associé à une dysfonction des cellules NK (Zhang et al., 2015). Siglec-10 est le seul CD33-related siglec avec un orthologue murin clairement établi : Siglec-G.



Siglec-11, identifié en 2002, a un profil d'expression unique sur les macrophages tissulaires comme les cellules de Kupffer et les cellules microgliales cérébrales mais n'est pas retrouvé dans les leucocytes sanguins circulants (*Angata et al., 2002*). Siglec-11 se lie spécifiquement mais faiblement à des acides sialiques  $\alpha 2-8$  (*Angata et al., 2002*). L'expression microgliale de Siglec-11 semble unique à l'humain (*Varki and Crocker, 2009*). Chez la souris, Siglec-11 exprimé de façon ectopique dans la microglie interagit avec une molécule d'adhésion cellulaire neuronale polysialilée (PSA-NCAM) sur les neurones (*Wang and Neumann, 2010*).

Siglec-14 : sera traité dans le paragraphe dédié avec Siglec-5.

Siglec-16, identifié en 2008, était initialement considéré comme un pseudogène car une délétion de quatre paires de bases interrompt le cadre de lecture (*Cao et al., 2008*). Cependant, l'équipe de Cao et al. a découvert que 50 % de la population du Royaume-Uni possède un allèle fonctionnel sans cette délétion, permettant l'expression de Siglec-16 sur les macrophages tissulaires, le cerveau et le poumon, et des cellules cancéreuses d'œsophage (*Cao et al., 2008*).

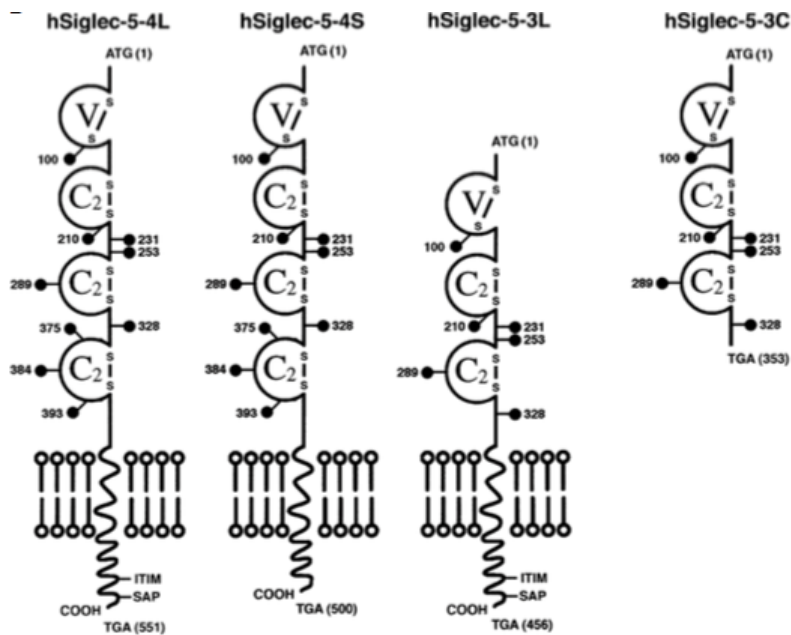
Tableau 5 : Les différents Siglecs, leurs profils d'expression et leurs effets cellulaires

	Autre nom	Famille	Profil d'expression	Fonctions	Orthologue murin
Siglec-1	Sialoadhésine ou CD169	CD22-related	Macrophages	Reconnaissance pathogènes	Siglec-1
Siglec-2	CD22	CD22-related	Lymphocytes B	Signalisation via BCR Immunomodulation négative	Siglec-2
Siglec-3	CD33	CD33-related	Progéniteurs myéloïdes Macrophages Monocytes Cellules dendritiques Mastocytes et basophiles	Régulation de l'hématopoïèse Réponse inflammatoire	Siglec-3
Siglec-4	MAG	CD22-related	Oligodendrocytes	Stabilisation myéline	Siglec-4
Siglec-5	CD170	CD33-related	Neutrophiles Monocytes Basophiles Macrophages	Reconnaissance pathogènes Activité antimicrobienne	
Siglec-6	OB-BP1	CD33-related	Placenta	Liaison leptine	Non
Siglec-7	p75/AIRM1	CD33-related	Cellules NK	Diminution de la cytotoxicité des NK Interactions hôte-pathogène Mort cellulaire non apoptotique	Siglec E
Siglec-8	SAF-2	CD33-related	Eosinophiles		Siglec E
Siglec-9	CD329	CD33-related	Neutrophiles		Siglec E
Siglec-10	SLG2	CD33-related	Monocytes Eosinophiles Cellules dendritiques Certains lymphocytes	Ligand VAP1 Adhésion des lymphocytes à l'endothélium	Siglec G
Siglec-11			Macrophages tissulaires	Ligand molécule adhésion neuronale, Physiologie ovarienne	
Siglec-14		CD33-related	Neutrophiles Monocytes	Ligand protéine bactérienne Hsp70	
Siglec-15		CD22-related	Macrophages Cellules dendritiques	Surveillance tumorale, Physiologie osseuse	Siglec-15
Siglec-16		CD33-related	Macrophages tissulaires	99 % homologie avec Siglec 11	

### 3) Siglec-5

Siglec-5 ou CD170, cloné en 1998, est exprimé sous la forme d'un homodimère lié par un pont disulfure d'environ 140 kDa à la surface des neutrophiles, monocytes, basophiles, macrophages et de sous-type de lymphocytes B (Connolly et al., 2002; Cornish et al., 1998; Ghannadan et al., 2002). Siglec-5 semble le seul membre des Siglecs humains (avec son contre-récepteur Siglec-14) à être exprimé sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes, un type cellulaire spécifique responsable de la production rapide d'interférons de type I dans les suites d'une infection virale (Lock et al., 2004; Varki and Crocker, 2009). Quatre isoformes de Siglec-5 ont été identifiées : ils possèdent 3 ou 4 domaines extracellulaires liés à un domaine cytoplasmique long ou court, une forme est soluble (hSiglec5-4L, hSiglec5-4S, hSiglec5-3L, hSiglec5-3C (Connolly et al., 2002) (Figure 24).

Figure 24 : Les différentes isoformes de Siglec-5



Il présente des possibilités de liaison variées, en effet il est capable de lier les acides sialiques en  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 et  $\alpha$ 2-8 indiquant des possibilités d'interactions larges vers des protéines ou des lipides glucoconjugués (Varki and Crocker, 2009). Le site de liaison de Siglec-5 peut-être masqué par des interactions en cis. Cependant, l'activation des

neutrophiles coïncide avec le démasquage des sites de Siglec-5 (*Razi and Varki, 1998*). Contrairement à CD33, Siglec-5 n'est pas retrouvé sur les progéniteurs hématopoïétiques mais apparaît au cours de la différenciation myéloïde.

Siglec-5 est impliqué dans la reconnaissance de pathogènes sialylés comme la bactérie *Neisseria meningitidis* (*Jones et al., 2003*). Sur les neutrophiles, Siglec-5 augmente l'activité oxydative, promouvant l'activité anti microbienne de ces phagocytes (*Erickson-Miller et al., 2003; Hampton and Orrenius, 1998*). A l'inverse, les streptocoques du groupe B sont capables d'utiliser Siglec-5 comme un outil pour empêcher la phagocytose leucocytaire, l'activité oxydative, et la production des pièges extracellulaires. Cette propriété favorise la survie bactérienne et l'invasion du système l'immunité innée (*Carlin et al., 2009*). Une protéine de surface des streptocoques du groupe B interagit de façon indépendante des acides sialiques avec Siglec-5 (*Nordström et al., 2011*). Siglec-5 participe également à la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages à travers la liaison des sucres, ce qui suggère un rôle dans la clairance des molécules sialilées endogènes (*Rapoport et al., 2005*). Comme d'autres membres de la famille des Siglecs, Siglec-5 exerce un rôle inhibiteur avec le recrutement de phosphatases par son motif ITIM.

Par ailleurs, Siglec-5 est capable de lier des protéines de l'hémostase comme le VWF et le FVIII, cette interaction dépend de la présence d'acides sialiques pour le VWF mais pas pour le FVIII (*Pegon et al., 2012*).

Du fait de leur profil de liaison similaire et de leur motif de signalisation antagoniste, plusieurs auteurs ont suggéré que Siglec-5 et Siglec-14 fonctionnent comme une paire de récepteurs permettant une régulation de la signalisation induite.

Siglec-14 a été découvert en 2006 et présente en effet une grande homologie de séquence avec Siglec-5 (99% d'homologie dans les 2 premiers domaines Ig-like) et partage avec lui ses préférences de liaison pour certaines structures sucrées (*Angata et al., 2006; Crocker et al., 2012; Varki and Crocker, 2009*). Le profil d'expression de Siglec-14 se rapproche aussi de celui de Siglec-5 puisqu'ils sont tous les deux exprimés sur les granulocytes et les monocytes ; Siglec-5 est en plus exprimé sur les lymphocytes B (*Yamanaka et al., 2009*). Du fait de polymorphismes génétiques, certains humains ont un allèle Siglec-14 nul qui conduit à l'absence de la protéine (*Yamanaka et al., 2009*). En dehors de ces caractéristiques structurelles et évolutives, des études fonctionnelles tendent

également à confirmer la dualité de ces 2 récepteurs. En effet, une protéine de pathogènes bactériens (streptocoques du groupe B) est capable d'interagir à la fois avec Siglec-5 et Siglec-14 (Ali et al., 2014; Carlin et al., 2009). Les polymorphismes de ces deux récepteurs et notamment la présence d'un allèle nul pour Siglec-14 modifient la réponse des neutrophiles aux protéines bactériennes. Cette équipe a également montré de manière inattendue la présence de Siglec-5 et -14 sur des cellules épithéliales amniotiques qui semble spécifique de l'humain (Ali et al., 2014). De plus, la protéine chaperone endogène Hsp70 (heat shock protein70) est également capable de se lier au domaine V-set des deux siglecs. La stimulation par Hsp70 de cellules de lignées monocytaires surexprimant Siglec-5 entraîne une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires. A l'inverse, la stimulation passant par Siglec-14 est pro-inflammatoire (Fong et al., 2015).

Les deux récepteurs fonctionnent donc comme une paire. Une des hypothèses évolutives est que le Siglec-14 est apparu comme un récepteur activateur pour neutraliser des pathogènes qui exploitent les propriétés immunosuppressives de Siglec-5 ; mais l'analyse génétique n'est pas complètement en faveur de ce scénario (Fong et al., 2015).

Il faut noter que beaucoup des anticorps disponibles ont des réactions croisées entre Siglec-5 et -14.

#### **4) Rôles dans l'immunomodulation**

Comme nous l'avons vu, la liaison des Siglecs aux acides sialiques est influencée par le type d'acide sialique, son mode de liaison aux sucres pré-terminaux, la structure du sucre sous-jacent et d'autres modifications comme la sulfation. Lorsque des ligands oligosaccharides sialylés sont attachés sur des protéines ou des lipides, les glycoprotéines ou les glycolipides obtenus deviennent des contre-récepteurs pour les Siglecs ou d'autres protéines liant les glycans (Crocker and Feizi, 1996).

De nombreux microorganismes ont gagné dans leur évolution la capacité de synthétiser ou capturer les acides sialiques de leur hôte pour l'incorporer à leur propre glucoconjugués. Il s'agit notamment de bactéries comme par exemple *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, les streptocoques du groupe B, *Campylobacter jejuni* (Vimr and Lichtensteiger, 2002, p. 2). La sialylation des glucoconjugués de ces pathogènes semble cruciale pour leur survie dans l'hôte mammifère, servant probablement de

molécules d'imitation des cellules de l'hôte pour éviter les attaques du système immunitaire (Vimr et al., 2004). On suppose également que les charges négatives des acides sialiques peuvent servir à réduire les interactions du pathogène avec l'hôte par répulsion électrostatique (Crocker et al., 2007). Plus tard, l'attention s'est tournée sur la possibilité que les acides sialiques des pathogènes puissent être importants pour promouvoir l'infection ou médier l'immunité innée à travers leur liaison aux Siglecs (Crocker et al., 2007). En effet, le virus porcin (« porcine reproductive and respiratory syndrome ») est un virus sialylé enveloppé qui infecte les macrophages alvéolaires du cochon grâce aux acides sialiques et la sialoadhésine (Crocker et al., 2007; Delputte et al., 2007; Vanderheijden et al., 2003). La sialoadhésine et certains CD33-related Siglecs peuvent interagir avec les acides sialiques sur *N. meningitidis*, *C. jejuni*, les streptocoques du groupe B, ou encore *Trypanosoma cruzi* (Avril et al., 2006; Carlin et al., 2007; Jones et al., 2003; Monteiro et al., 2005). L'internalisation médiée par Siglec de ces pathogènes pourrait être bénéfique à l'hôte en permettant la destruction du pathogène et la présentation d'antigène. Mais de l'autre côté, ces pathogènes sialylés pourraient médier l'activation leucocytaire à travers les motifs ITIM des Siglecs, ce qui pourrait être bénéfique au pathogène en amortissant la réponse inflammatoire et immunitaire (Crocker et al., 2007).

La sialoadhésine (Siglec-1) est un modulateur de la réponse immune. Elle est constitutivement exprimée à la surface des macrophages, participe à leurs fonctions pro-inflammatoires et est régulée positivement en situation d'inflammation. En effet, dans la glomerulonéphrite proliférative son niveau d'expression est corrélé à la gravité de la maladie (Ikezumi et al., 2005, 2006) et chez des patients VIH avec une charge virale élevée, le gène de la Sn est induit sur les monocytes circulants (Pulliam et al., 2004). Par ailleurs, elle participe à la modulation de la fonction des lymphocytes T pendant les réponses immunes (Crocker et al., 2007; Ip et al., 2007; Jiang et al., 2006; Kobsar et al., 2006).

CD22 (Siglec-2) est un régulateur connu de la signalisation, l'homéostasie et la survie des lymphocytes B (Crocker et al., 2007). Ces fonctions passent par des interactions avec le récepteur des lymphocytes B (BCR, B cell receptor) qui va recruter une signalisation intracellulaire inhibitrice passant par des motifs ITIM et le recrutement de phosphatases. Mais la signalisation de CD22 peut également conduire au recrutement d'effecteurs positifs de l'activation cellulaire (Crocker et al., 2007). CD22 conduit donc à l'activation

alternative de différentes voies de signalisation qui contribuent à la régulation de l'activation des lymphocytes B. La modulation des interactions entre CD22 et BCR en cis à la surface cellulaire fait intervenir des mouvements de ces protéines au sein de la membrane qui se réorganise en rafts qui sont des microdomaines de la membrane cellulaire (*Crocker et al., 2007*).

Les CD33-related Siglecs, exprimés sur différentes cellules de la lignée hématopoïétique, ont pour fonction de réguler la croissance et la survie cellulaire, soit par inhibition de la prolifération soit par induction de l'apoptose (*Crocker et al., 2007*).

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**





Les liens réciproques entre la maladie cancéreuse et la maladie thrombotique sont connus depuis de nombreuses années. Certains éléments de la réponse inflammatoire participent également à ces mécanismes. L'identification des acteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans ces processus complexes ne cesse de progresser même si le rôle précis de chacun n'est pas encore toujours connu avec précision.

Dans la première partie de mon travail, j'ai étudié les facteurs prédictifs de la survenue des thromboses chez des patients atteints de cancer. En effet, cette population présente notamment la particularité d'être exposée à un risque d'événements thrombo-emboliques veineux (ETEVE) accru par rapport à la population générale, parallèlement à un risque hémorragique plus important en cas de traitement antithrombotique. L'identification des patients à très haut risque d'ETEVE au sein des patients atteints de cancer représente ainsi un réel enjeu, pour la mise en place d'un traitement antithrombotique à visée prophylactique, comme en témoigne l'élaboration de scores clinico-biologiques utilisant différents biomarqueurs.

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail ont été de rechercher de nouveaux marqueurs biologiques susceptibles d'améliorer les performances des scores existants et d'explorer leur rôle dans la physiopathologie de la thrombose en contexte néoplasique. J'ai choisi d'étudier le couple constitué par le facteur Willebrand (VWF) et ADAMTS13. En effet, le VWF est une protéine de l'hémostase dont le rôle est prépondérant dans la thrombose en conditions de forces de cisaillements élevées. Son taux circulant augmente dans la plupart des situations inflammatoires, dont le cancer. Il possède un rôle protecteur vis-à-vis de la maladie cancéreuse en induisant l'apoptose des cellules tumorales. ADAMTS13 est la métalloprotéase spécifique de clivage du facteur VWF, qui régule son activité hémostatique. L'activité de cette protéase est diminuée dans certains contextes pathologiques favorisant la survenue de thromboses comme le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). Cette protéine appartient à une famille de métalloprotéases (ADAMTSs) qui possèdent un rôle important dans le microenvironnement tumoral.

Dans la seconde partie de mon travail, mon objectif a été de caractériser des cibles moléculaires permettant la modulation de la réponse inflammatoire. Les interactions entre les cellules sanguines circulantes et l'endothélium vasculaire représentent un élément majeur dans les processus d'inflammation (notamment durant le recrutement

leucocytaire), de thrombose et de dissémination métastatique. A l'échelle moléculaire, le support de ces interactions est constitué par la liaison entre des molécules d'adhésion et leurs récepteurs situés de part et d'autre : cellules circulantes *versus* endothélium fixe. Le recrutement leucocytaire est un phénomène physiologique, qui peut avoir des effets délétères dans certains contextes pathologiques comme les maladies inflammatoires chroniques ou l'athérosclérose.

Nous avons choisi de caractériser les interactions potentielles entre le PSGL-1 et les Siglecs. En effet, le PSGL-1 est un récepteur sialilé, qui médie principalement les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales. Son rôle est crucial dans le recrutement leucocytaire. D'autre part, les Siglecs sont des récepteurs qui peuvent se lier aux acides sialiques et qui sont impliqués dans l'immunomodulation. A la vue de cette nature très sialilée du PSGL-1 et de cette fonction des Siglecs à lier les acides sialiques, il nous a semblé important de connaître les liens entre ces deux acteurs de l'inflammation et si liens il y avait quelles en seraient les conséquences physiopathologiques.

## **RESULTATS**



**ARTICLE 1 :**

**ADAMTS-13 and von Willebrand factor predict venous thromboembolism in patients with cancer**

Pépin M, Kleinjan A, Hajage D, Büller HR, Di Nisio M, Kamphuisen PW, Salomon L, Veyradier A, Stepanian A, Mahé I

*J Thromb Haemost.* 2016 Feb;14(2):306-15



La maladie cancéreuse prédispose à la survenue d'événements thromboemboliques veineux (ETEVE) (thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire). Ces événements peuvent avoir des conséquences graves pour les patients, pouvant aller jusqu'au décès. Un traitement anticoagulant à dose préventive (thromboprophylaxie) permet de réduire leur risque de survenue, mais expose à un risque hémorragique. Il faut donc identifier les patients atteints des cancers les plus à risque de thrombose pour cibler ceux qui tireront le plus de bénéfice d'une thromboprophylaxie.

Plusieurs publications ont cherché à stratifier ce risque en établissant des scores, comme le score de Khorana (*Khorana et al., 2008*). Ces scores reprennent des caractéristiques cliniques du patient ainsi que des dosages biologiques, utilisés comme biomarqueurs. Les résultats du calcul de ces scores ne sont pas toujours applicables à l'ensemble des patients atteints de cancer qui représentent un groupe hétérogène de patients. Mais les scores existants peuvent être améliorés en y ajoutant de nouveaux biomarqueurs.

Le facteur Willebrand (VWF) est bien connu pour son rôle dans l'hémostase primaire dans les vaisseaux où les forces de cisaillement sont élevées comme les artérioles. Son rôle dans la formation du thrombus veineux commence à être décrit de manière plus récente. ADAMTS13 est la protéase régulant la taille des multimères du VWF et par conséquent son activité biologique. La diminution de son activité peut favoriser la thrombose. Des études de petits effectifs ont retrouvé une diminution du taux d'activité de la protéase ADAMTS13 chez des patients atteints de cancer.

Nous nous sommes donc interrogés sur différents points :

- Le dosage plasmatique du VWF est-il un biomarqueur candidat à la prédiction d'un ETEVE chez les patients atteints de cancer ?
- Quel est le profil antigénique et fonctionnel d'ADAMTS13 chez les patients atteints de cancer ?
- Ces deux biomarqueurs peuvent-ils améliorer les scores de prédiction du risque thrombotique veineux chez les patients atteints de cancer ?

Ce travail a été rendu possible grâce à la synergie existant entre d'une part l'hôpital Louis Mourier de Colombes et d'autre part l'Unité Inserm 1176. L'hôpital Louis Mourier de Colombes participait à une étude internationale incluant des patients atteints de cancer avant tout ETEVE puis avec un suivi de 6 mois, comprenant le recueil de la survenue d'un ETEVE ; l'Unité Inserm 1176 disposait de toute l'expertise pour réaliser la mesure de



l'activité d'ADAMTS13 par fluorimétrie en utilisant un peptide de synthèse, le FRET573. Nous avons donc proposé une étude ancillaire cas-témoins. Les « cas » sont les patients atteints de cancer qui ont présenté un ETEV, les « témoins » ceux qui en sont restés indemnes. Dans cette étude cas-témoins, nous avons observé des taux de VWF plus élevés chez les patients atteints de cancer qui ont présenté un ETEV par rapport à ceux qui n'en ont pas présenté. L'activité d'ADAMTS13 n'est quant à elle pas statistiquement différente entre les deux groupes. Nous avons déterminé des valeurs-seuils qui permettent une sensibilité d'au moins 50 % et une spécificité maximale.

En ajoutant nos biomarqueurs dans ces conditions aux scores déjà existants, seul le taux d'activité d'ADAMTS13 s'est révélé capable d'en améliorer les capacités prédictives malgré les faibles différences observées sur sa moyenne.

Notre étude nous a également permis de constater que le score de Khorana était un mauvais prédicteur des ETEV dans certaines populations de patients atteints de cancer. Dans notre travail, le taux VWF évolue de manière corrélée avec le stade de la maladie.

La faible diminution d'activité d'ADAMTS13 que nous avons observée ne rend pas compte de l'augmentation du taux de VWF, mais les cellules tumorales peuvent influencer localement le microenvironnement tumoral et éteindre l'activité de la protéase (*Bauer et al., 2015*).

Ces résultats nous permettent de discuter la place du VWF dans la thrombose veineuse et la thrombose médiée par le cancer. De manière intéressante, une métalloprotéase surexprimée dans certains cancers, ADAM28, est capable de lier et de cliver le VWF, réduisant son activité pro-apoptotique sur les cellules tumorales. L'étude de cette protéase dans la thrombose et la dissémination métastatique médiée par VWF est donc une piste à suivre. Nous avons donc essayé par la suite de développer des outils d'étude d'ADAM28.

## ORIGINAL ARTICLE

# ADAMTS-13 and von Willebrand factor predict venous thromboembolism in patients with cancer

M. PÉPIN,\*† A. KLEINJAN,‡ D. HAJAGE,§¶ H. R. BÜLLER,‡ M. DI NISIO,‡\*\* P. W. KAMPHUISEN,†† L. SALOMON,‡‡ A. VEYRADIER,§§¶¶\*\*\* A. STEPANIAN§§\*\*\* and I. MAHÉ\*¶¶\*\*\*

\*Service de Médecine Interne, Hôpital Louis Mourier (AP-HP), Colombes; †Unité 1176, INSERM, Le Kremlin-Bicêtre, France; ‡Department of Vascular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; §Département d'Epidémiologie et Recherche Clinique, URC Paris-Nord, Hôpital Bichat-Claude Bernard (AP-HP); ¶INSERM, CIC 1425-EC, UMR1123, Paris, France; \*\*Department of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, University G. D'Annunzio, Chieti, Italy; ††Department of Vascular Medicine, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands; ‡‡Département de Recherche, Centre Ophtalmologique Rothschild; §§Service d'Hématologie biologique, Hôpital Lariboisière (AP-HP); ¶¶Universitaire Paris Diderot, EA 7334 REMES Sorbonne Paris Cité; and \*\*\*Université Paris Diderot, Institut Universitaire d'Hématologie, EA3518, Paris, France

**To cite this article:** Pépin M, Kleinjan A, Hajage D, Büller HR, Di Nisio M, Kamphuisen PW, Salomon L, Veyradier A, Stepanian A, Mahé I. ADAMTS-13 and von Willebrand factor predict venous thromboembolism in patients with cancer. *J Thromb Haemost* 2016; **14**: 306–15.

## Essentials

- Cancer patients are at high risk of venous thromboembolism (VTE).
- In this study, cases and controls were cancer patients who did or did not develop VTE.
- von Willebrand factor (VWF) levels were higher if compared with controls and correlated with cancer stage.
- VWF and ADAMTS-13 are associated with the occurrence of VTE in cancer.

**Summary.** *Background:* Patients with cancer are at high risk of venous thromboembolism (VTE). ADAMTS-13 regulates von Willebrand factor (VWF) activity, which plays a role in the development of cancer and in VTE. *Objectives:* The aim of this study was to search for an association between the levels of VWF and ADAMTS-13 and VTE in patients with cancer and to compare current scoring systems for prediction of VTE before and after addition of these parameters. *Patients/Methods:* In a case–control study, in which patients with recently diagnosed cancer were followed-up for 6 months, we compared 20 patients who developed VTE (cases) and 140 patients with cancer without VTE (controls), matched for

sex, age, and type and stage of cancer. We measured VWF, ADAMTS-13 (activity and antigen), P-selectin, D-dimer and F1 + 2 levels at baseline, and calculated both the Khorana score and the Khorana score expanded after addition of P-selectin and D-dimer levels. *Results:* VWF levels were significantly higher in cases when compared with controls ( $326 \pm 185\%$  vs.  $242 \pm 158\%$ ) and correlated with advanced stage of cancer: localized, 185 [142; 222]; locally advanced, 240 [146; 257]; metastatic, 267 [153; 324] (mean [interquartile range]). The addition of two biomarkers, ADAMTS-13 activity and F1 + 2 levels, to the Khorana score improved receiver operating curves. *Conclusions:* von Willebrand factor and ADAMTS-13 are associated with the occurrence of VTE in patients with cancer. Moreover, addition of ADAMTS-13 and F1 + 2 levels to the Khorana score considerably increases the predictive value for VTE.

**Keywords:** ADAMTS-13 protein, human; cancer; thrombosis; von Willebrand factor; P-selectin; D-dimer.

Correspondence: Isabelle Mahé, Hôpital Louis Mourier – Service de Médecine Interne, 178 rue des Renouillers, 92701 Colombes Cedex, France.

Tel.: +33 1 47 60 67 05; fax: +33 1 47 60 64 91.

E-mail: isabelle.mahe@aphp.fr

Received 4 January 2015

Manuscript handled by: J.-B. Hansen

Final decision: F. R. Rosendaal, 16 October 2015

## Introduction

The relationship between cancer and venous thromboembolism (VTE), including deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary embolism (PE), is well established. Cancer is one of the most important acquired risk factors for VTE and increases the risk of symptomatic VTE by 4- to 7-fold, when compared with the general population. In patients with cancer, VTE is also the second leading cause of death [1–3]. The risk of thromboembolic events is dependent on factors such as cancer type, clinical setting,

comorbid conditions and therapeutic procedures [4]. For instance, in the USA the incidence of VTE in ambulatory patients varies from 8.2% to 19.2% depending on the type of cancer [5].

Thromboprophylaxis may be effective in preventing VTE in patients with cancer, but this treatment is associated with a substantial risk of bleeding as compared with VTE patients without cancer [6,7], making the selection of high-risk patients and the exclusion of low-risk patients equally important for assessing the benefit-to-risk ratio of thromboprophylaxis [8]. Such selection was possible after analysis of risk factors for VTE [9–11] and led Khorana and colleagues to develop and validate an easy to use clinical prediction score [12]. Several biomarkers, such as soluble P-selectin (sP-sel), factor (F) VIII, D-dimer or prothrombin fragment 1 + 2 (F1 + 2), are also associated with the risk of VTE in patients with cancer [13–15]. Among them, D-dimer and sP-sel were incorporated into the Khorana score in the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS); the subsequent expanded score increased the predictive value of the Khorana score [16].

von Willebrand factor (VWF) is a multimeric protein that promotes platelet adhesion and aggregation in high shear stress conditions [17]. Besides this well-known role of VWF, clinical studies have shown an association between VWF and VTE [18,19]; these results were strengthened by studies in animal models or with histological data [20,21]. In addition, VWF plays a role in the development of cancer [22,23]; several studies have also demonstrated increased plasma VWF levels in cancer [24]. ADAMTS-13 (a desintegrin-like and metalloprotease thrombospondin type 1 motif) specifically cleaves VWF multimers and regulates its platelet-tethering function [17,25]. A severely deficient ADAMTS-13 activity (less than 10 IU mL<sup>-1</sup>) is observed in most patients with thrombotic thrombocytopenic purpura, a thrombotic microangiopathy characterized by VWF-mediated platelet thrombi disseminated in the microcirculation, which is responsible for end-organ ischemia [26]. Thrombotic microangiopathy can also occur in association with cancer, with a pathophysiological mechanism involving ADAMTS-13 deficiency [27]; the thrombotic microangiopathy is induced by the chemotherapy or the cancer itself [28]. Interestingly, previous studies specifically investigating ADAMTS-13 in cancer suggest that ADAMTS-13 activity levels are decreased in patients with cancer when compared with patients without cancer [29,30]; they are also decreased in patients with disseminated compared with localized cancers [31,32].

Considering these data, the aim of this study was to search for an association between VWF and ADAMTS-13 levels and the occurrence of VTE in patients with cancer, and to investigate whether these parameters improve the predictive value of the Khorana score and the expanded Vienna CATS score for VTE.

## Material and methods

### Patients

This analysis was derived from an ongoing multi-center international prospective cohort study (Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; VU Medical Center, the Slotervaart hospital, Amsterdam, the Netherlands; Hospital SS.ma Annunziata, Chieti, Italy; Hôpital Louis Mourier, Colombes, France; The National Cancer Institute, Mexico City, Mexico) in patients with recently diagnosed cancer, which investigates the predictive value of parameters for the occurrence of VTE in patients with cancer. In the ongoing prospective cohort study, consecutive ambulatory patients with histologically confirmed diagnosis of solid organ cancer stage III or IV were included. Inclusion criteria comprised: age over 18 years; and recently diagnosed cancer (breast, lung, esophagus, stomach, pancreas, colon, ovarian, rectum, bladder and prostate) or tumor progression after a remission period. Chemotherapy was initiated within 3 months before inclusion and up to 1 week after inclusion. Patients receiving therapeutic anticoagulant treatment and patients using adjuvant chemotherapy (chemotherapy after surgery) were excluded from this study. Clinical data, biological standard data and medical histories of the patients were collected at inclusion in the different participating centers. Approval by the local ethics committee at all participating hospitals was obtained and the study was executed in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each patient before enrollment and blood sampling.

Venous thromboembolic events were diagnosed by CT scan (PE) or Doppler ultrasound (DVT). We performed CT scan or Doppler ultrasound in two circumstances: (i) when the patients had PE or DVT symptoms; and (ii) when staging the cancer. In the first case, the PE or DVT was subsequently categorized as 'symptomatic'. In the second case, when the PE was incidental, the PE was categorized as 'asymptomatic'. In this latter case, images were systematically reviewed by an experienced thoracic radiologist to confirm the diagnosis (intraluminal perfusion defect). Indeed, CT-scan acquisition and injection are different for PE diagnosis and cancer follow-up, mainly with regard to the slice reconstruction thicknesses and the protocol for injection of the contrast medium. Follow-up was assessed after contact with patients at each site after 3 and 6 months to collect data concerning the presence and site of symptomatic or unsuspected VTE. In the case of VTE, patients were treated with anticoagulant treatment according to local practise.

The present ancillary study is a nested case-control study in which all subjects constitute a subsample of the prospective study. At the time of study design, the prospective cohort consisted of 443 patients with a mean age of 61 years. In total, 23 developed VTE after a mean

time of 2.1 months (5.2%). In the present study, we included 20 cases and 140 controls (see ‘Sample size’). The cases are defined as patients who presented with VTE during 6 months follow-up. Each case was matched with seven cancer patients who did not develop VTE during 6 months follow-up (defined as controls) for sex, age ( $\pm 3$  years), and type and stage of cancer.

#### Prediction scores

For each patient, we calculated the Khorana score from Khorana *et al.* [12] and the expanded Vienna CATS score after adding D-dimer and P-selectin (P-sel) with cut-off values (D-dimer  $> 1.44 \mu\text{g mL}^{-1}$  and soluble P-sel  $> 53.1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) as described in Ay *et al.* [16]. Patients were assigned to three risk categories for VTE according to the scoring systems: low risk = 0, intermediate risk = 1–2, high risk  $\geq 3$  [12,16]. The cut-off value for F1 + 2 levels was  $> 358 \text{ pM}$ , after Ay *et al.* [15].

Thresholds for ADAMTS-13 and VWF were determined using receiver operating curve (ROC) analysis, choosing the values associated with the highest specificity and a sensitivity  $\geq 0.5$ . Subsequent cut-off values used in the scores were: ADAMTS-13 activity  $> 87\%$ ; ADAMTS-13 antigen  $> 571 \text{ ng mL}^{-1}$ ; VWF antigen  $> 290 \text{ IU mL}^{-1}$ .

#### Blood sampling

Venous blood was collected from all subjects at the time of enrollment into 1 : 10 final volume of 3.8% sodium citrate. Platelet-poor plasma was obtained by centrifugation at  $1550 \times g$  for 20 min at  $20^\circ\text{C}$ , and samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until testing.

#### Laboratory assays

ADAMTS-13 activity was measured using the method of Kokame *et al.* [33] with commercial recombinant FRETS-VWF73 peptide (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) according to the manufacturer’s instructions.

ELISA methods were used to assess protein antigen (Ag) levels: ADAMTS-13 (Immubind ADAMTS-13 ELISA; American Diagnostica Inc., Stanford, CA, USA), VWF (Asserachrom<sup>®</sup> vWF:Ag; STAGO, Asnières-sur-Seine, France), F1 + 2 (Enzygnost monoclonal; Dade Behring, Marburg, Germany) and soluble P-sel (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). D-dimer was measured with Innovance (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany).

#### Statistical analysis

Demographic data and medical characteristics are described at baseline. Subject data at inclusion are presented separately according to case/control status. Qualitative values are reported as frequencies and percentages

and quantitative values as mean  $\pm$  standard deviation and interquartiles. Distributions of biological parameters (ADAMTS-13 activity, ADAMTS-13 antigen, VWF antigen and F1 + 2) were checked (graphically and with the normality test of Shapiro–Wilk) and those with a log-normal distribution were subsequently transformed before any analysis to improve normality (i.e. log transformation for VWF antigen and F1 + 2).

The logistic regression model was used in both univariate and multivariate comparisons of cases and controls. As the study design was matched (with a ratio of case : matched controls of 1 : 7), the model parameters were estimated using conditional maximum likelihood. These estimates were used to calculate odds ratios (ORs) with corresponding 95% confidence intervals. The hypothesis that a regression parameter is zero was tested using a likelihood ratio test.

Comparison of biological parameters in each category of scoring systems (low, intermediate and high-risk categories for VTE according Khorana score and Vienna CATS score) and cancer stage (localized, locally advanced or metastatic) was performed using the Kruskal–Wallis rank sum test. Performances of biological parameters for the prediction of a VTE during the 6 months of follow-up were assessed using a ROC analysis and the xbeta score from the logistic regression model.

Dichotomized biological parameters were also tested as to whether they would add predictive information to existing scoring systems. To perform this analysis, we used a method derived from Bleeker *et al.* [34]. Briefly, a logistic regression model was performed including scoring system prediction  $p_i$ . This scoring system predicted VTE probability as reported in Khorana *et al.* [12] as an offset variable; that is, with a parameter estimate constrained to 1. This analysis allows estimation of the regression coefficient  $\beta$  of a variable  $X_i$  taking into account *a priori* known components of the scoring system by including  $p_i$  in the linear predictor during fitting:  $\log(P(Y_i = 1)/P(Y_i = 0)) = \alpha + \beta X_i + \log(p_i/(1 - p_i))$ . Because the parameter of the offset variable is equal to 1, the predictive value of the scoring system is not re-estimated in the model.

Correlations between biological parameters were studied using Spearman’s correlation coefficient. All analyses were performed using R version 2.15.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

#### Sample size

Based on data from Mannucci *et al.* [30], our sample size was calculated with the following assumptions: mean difference of 15% of ADAMTS13 levels between cases and controls, standard error of 23%, type I error rate of 5% (bilateral formulation), and a power of 80%. This resulted in a calculated sample size of 20 patients with cancer and VTE and 140 patients with cancer without VTE (one case for seven controls).

## Results

### Patients characteristics and thromboembolic events

Table 1 shows the characteristics of the study population. In the overall population, the mean age was  $61.9 \pm 9.7$  years and 68.1% were men ( $n = 109$ ).

Overall, the 20 patients developed VTE after a median period of  $2.2 \pm 1.2$  months. VTE was symptomatic in 55% of the cases. Forty per cent of patients ( $n = 8$ ) had a diagnosis of PE (symptomatic in four). DVT was observed in 25% ( $n = 5$ ) of patients and was always symptomatic. One patient had both DVT and PE.

Abdominal DVT occurred in 15% of patients ( $n = 3$ ; symptomatic in one patient) and asymptomatic upper extremity DVT in 10% ( $n = 2$ ). Eighty per cent of patients were treated with anticoagulation after the diagnosis.

Table 1 shows the distribution of the cancer types between the patients with and without VTE. When compared with patients without VTE, VTE patients less frequently had hypertension ( $P = 0.02$ ). VTE risk factors were not different between cases and controls. Of the laboratory biomarkers, D-dimer levels were significantly higher in cancer patients who developed VTE ( $P < 0.001$ ). No differences were found for the other factors.

We assessed the Khorana score and the Vienna CATS score in our patients (Table 2). Using the Khorana score, the distribution of risk groups was not significantly different between patients with and without VTE. VTE patients were mostly (63.1%) classified in the intermediate risk group, while 10.5% had a high score. The Vienna CATS score seemed more fitted to our study population because 53% of VTE patients were categorized as high risk. However, this latter proportion appears still not discriminating, when taking into account the proportion of controls with a high-risk score (35.2% and  $P = 0.3$ ).

### VWF and ADAMTS-13

Table 3 shows ADAMTS-13 and VWF levels in both cases and controls. ADAMTS-13 (activity or antigen) levels were in the normal range (50–150% and 400–1200 ng mL<sup>-1</sup>, respectively) and not significantly different between cases and controls ( $P = 0.2$  and  $P = 0.6$ , respectively), and also after adjustment for VWF levels. In contrast, VWF levels were increased in all subjects when compared with the normal range (50–150 IU mL<sup>-1</sup>) and VTE patients had higher levels ( $326 \pm 185$  IU mL<sup>-1</sup>) when compared with cancer patients without VTE ( $242 \pm 158$  IU mL<sup>-1</sup>) ( $P = 0.02$ ). This difference remained significant ( $P = 0.02$ ) after adjustment for ADAMTS-13 levels (activity or antigen).

As expected, ADAMTS-13 activity was correlated with ADAMTS-13 antigen ( $r = 0.75$  Pearson, 95% confidence

**Table 1** Baseline clinical and biological characteristics of the study patients

Characteristics	Cases ( $n = 20$ )	Controls ( $n = 140$ )
Age, years	$62.7 \pm 9.9$ (55.8–70.2)	$60.9 \pm 9.7$ (54–68)
Sex		
Female	8 (40)	43 (30.7)
Male	12 (60)	97 (69.3)
Site of cancer		
Pancreas	8 (40)	56 (40)
Gastrointestinal	5 (25)	35 (25)
Lung	3 (15)	20 (14.3)
Esophagus	2 (10)	14 (10)
Stomach	1 (5)	7 (5)
Ovary	1 (5)	7 (5)
Prostate	0 (0)	1 (0.7)
Classification of tumor		
Localized	1 (5)	5 (10.8)
Locally advanced	6 (30)	31 (22.3)
Metastatic	13 (65)	93 (66.9)
Death during follow-up	7 (35)	28 (20)
Clinical characteristics		
Cardiovascular disease	1 (5)	15 (10.9)
Diabetes	1 (5)	21 (15.2)
Smoking	5 (31.3)	39 (37.1)
Hypertension	1 (5)	35 (25.4)
Previous VTE	0 (0)	4 (2.9)
Surgery in the last 3 months	6 (30)	42 (30)
BMI, kg m <sup>-2</sup>	$24.4 \pm 3.3$ (22.9–26.1)	$24.6 \pm 4.1$ (21.9–26.4)
Time between diagnosis and inclusion, years	$1.3 \pm 2.0$ (0.2–1.9)	$1.5 \pm 2.3$ (0.2–2.1)
EPO treatment	1 (5)	7 (5)
Radiotherapy	2 (10)	30 (21.4)
Angiogenesis inhibitor treatment	3 (15)	14 (10.1)
Laboratory parameters		
Hemoglobin, g dL <sup>-1</sup>	$12.8 \pm 2.1$ (11.8–14.4)	$12.9 \pm 1.9$ (11.6–14.2)
Leukocyte count, 10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup>	$8.4 \pm 3.1$ (6.7–9.8)	$8.3 \pm 3.1$ (6–10)
Platelet count, 10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup>	$317 \pm 117$ (261–364)	$296 \pm 128$ (213–347)
D-dimer, µg mL <sup>-1</sup>	$5.0 \pm 6.6$ (0.67–7.9)	$1.6 \pm 2.2$ (0.47–1.83)
sP-sel, ng mL <sup>-1</sup>	$48 \pm 23$ (28–55)	$41 \pm 26$ (28–45)
F1 + 2, pM	$439 \pm 223$ (277–559)	$425 \pm 781$ (176–385)

BMI, body mass index; EPO, erythropoietin; F1 + 2, prothrombin fragment 1 + 2; sP-sel, soluble P-selectin; VTE, venous thromboembolism. Values are absolute numbers of subjects (percentages in brackets) for discontinuous variables, or mean  $\pm$  standard deviation (interquartile range) for continuous variables.

interval [CI] 0.68–0.81) but not with VWF ( $r = -0.06$ , 95% CI  $-0.21$  to 0.09). Neither ADAMTS-13 activity nor ADAMTS-13 antigen were correlated with sP-sel or F1 + 2, but both were weakly correlated with D-dimer ( $r = -0.17$ , 95% CI  $-0.32$  to  $-0.02$ , and  $r = -0.16$ , 95% CI  $-0.31$  to  $-0.009$ , respectively).

VWF levels were weakly correlated with D-dimer ( $r = 0.28$ , 95% CI 0.13–0.42), F1 + 2 ( $r = 0.19$ , 95% CI

**Table 2** Distribution of study patients into risk categories defined by the Khorana score [12] and the Vienna CATS score [16]

Risk category	Cases (n = 20)	Controls (n = 140)	OR [95% CI]	P*
<b>Khorana score</b>				
Low	5 (26.3)	23 (18.0)	1	0.7
Intermediate	12 (63.1)	92 (71.3)	0.4 [0.04; 3.7]	
High	2 (10.5)	14 (10.9)	0.4 [0.02; 6.4]	
<b>Vienna CATS score</b>				
Low	1 (5.9)	13 (10.4)	1	0.3
Intermediate	7 (41.1)	68 (54.4)	0.7 [0.1; 5.6]	
High	9 (53.0)	44 (35.2)	1.8 [0.2; 19]	

Some variation in numbers owing to missing data. Values are absolute numbers of subjects (percentages in brackets). In both scoring systems, low risk is defined by a score of 0, intermediate risk by a score of 1 or 2, and high risk by a score  $\geq 3$ . \*Likelihood ratio test (conditional logistic regression). OR [95% CI], odds ratio [95% confidence interval].

0.03–0.34) and sP-sel ( $r = 0.28$ , 95% CI 0.13–0.41) in the total population and in the control group ( $r = 0.31$ , 95% CI 0.15–0.45,  $r = 0.23$ , 95% CI 0.06–0.38, and  $r = 0.30$ , 95% CI 0.14–0.45, respectively), but not in the case group.

Table 4 shows ADAMTS-13, VWF and F1 + 2 levels according to cancer stage at time of inclusion (Table 4A) and according to risk groups for VTE predicted by the Khorana or the Vienna CATS scores (Table 4B). Interestingly, with increasing cancer stage both VWF and F1 + 2 levels significantly increased ( $P = 0.03$  and  $P = 0.005$ , respectively), whereas ADAMTS-13 activity levels seemed to decrease ( $P = 0.06$ ). The same association was found with the Khorana and Vienna CATS scores.

#### Effect of modifying risk scores for prediction of VTE

Subjects with VWF levels  $> 290$  IU mL<sup>-1</sup> had a significantly increased risk of VTE (odds ratio [OR] 4.3, 95% CI 1.6–11.7,  $P = 0.004$ ). In univariate analysis, the Khorana score was significantly improved after addition of F1 + 2 levels (OR 5.7, 95% CI 1.9–19.6) and the Vienna CATS score was significantly improved after addition of VWF or F1 + 2 levels (OR 4.3, 95% CI 1.6–11.8, and OR 3.2, 95% CI 1.0–11.3, respectively). Table 5 shows

the OR associated with VWF, ADAMTS-13 or F1 + 2 levels for prediction of VTE status in the multivariate analysis, including the Khorana or the Vienna CATS prediction as an offset term. The addition of ADAMTS-13 activity and F1 + 2 levels improved strongly both the Khorana (OR 5.0, 95% CI 1.2–23.5,  $P = 0.03$ , and OR 6.8, 95% CI 2.0–25.9,  $P = 0.002$ , respectively) and the Vienna CATS scores (OR 5.8, 95% CI 1.4–28.2,  $P = 0.02$ , and OR 4, 95% CI 1.2–5.5,  $P = 0.03$ , respectively).

Figure 1 shows ROC plots for the Khorana score, the Vienna CATS score and the latter score after addition of ADAMTS-13 activity and F1 + 2 levels in our study population, with significantly increased areas under the curve (AUC) (0.49 [95% CI 0.34–0.65], 0.56 [95% CI 0.39–0.72] and 0.71 [95% CI 0.56–0.85], respectively).

## Discussion

In this case–control study of 160 cancer patients, we demonstrate for the first time an association between VWF and ADAMTS-13 activity levels and the risk of developing VTE in patients with cancer. VWF levels were significantly higher in patients with cancer who upon prospective follow-up developed VTE within 6 months, when compared with patients who did not develop VTE, after adjustment for age, and type and stage of cancer. VWF levels were significantly higher in more advanced cancer and were positively associated with the Vienna CATS score, whereas ADAMTS-13 activity levels were inversely correlated. More precisely, patients with VWF levels  $> 290$  IU mL<sup>-1</sup> had a significantly increased risk of VTE (OR 4.3, 95% CI 1.6–11.7,  $P = 0.004$ ). Interestingly, the addition of ADAMTS-13 activity and F1 + 2 levels improved both the Khorana and the Vienna CATS scores' ROC curves for the prediction of future VTE, with AUC increasing from 0.49 (95% CI 0.34–0.65) and 0.56 (95% CI 0.39–0.72) to 0.71 (95% CI 0.56–0.85) in the latter case.

In our study, VTE was symptomatic in 55% of the cases. Although undetected incidental VTE could potentially lead to an underestimation of the overall VTE burden in the study population, it is unlikely that these incidental thromboses would affect our findings as a

**Table 3** ADAMTS-13 and von Willebrand factor levels in the study patients

	Cases (n = 20)	Controls (n = 140)	OR [95% CI]	P*
VWF antigen, IU mL <sup>-1</sup>	326 ± 185 (203–346)	242 ± 158 (147–269)	2.7 [1.1; 6.5]	0.02
ADAMTS-13 activity, %	87 ± 19 (75–97)	81 ± 19 (67–93)	1.0 [0.9; 1.1]	0.2
ADAMTS-13 antigen, ng mL <sup>-1</sup>	579 ± 108 (511–636)	564 ± 137 (471–634)	1.0 [0.9; 1.1]	0.6
ADAMTS-13 activity/VWF	0.36 ± 0.23 (0.22–0.49)	0.44 ± 0.25 (0.28–0.57)	0.5 [0.2; 1.1]	0.09
ADAMTS-13 activity/antigen	0.15 ± 0.03 (0.13–0.17)	0.15 ± 0.03 (0.13–0.16)	4.8 [0.2; 133]	0.4

OR [95% CI], odds ratio [95% confidence interval]; VWF, von Willebrand factor. Results are expressed as mean ± standard deviation (interquartile range). \*Likelihood ratio test (conditional logistic regression).

**Table 4** ADAMTS-13, von Willebrand factor and F1 + 2 levels according to cancer stage (A) and to the Khorana and the Vienna CATS scores (B)

(A)								
Parameter	Cancer stage			<i>P</i> *				
	Localized ( <i>n</i> = 16)	Locally advanced ( <i>n</i> = 37)	Metastatic ( <i>n</i> = 106)					
ADAMTS-13 activity, %	88 ± 16	86 ± 19	80 ± 19					
VWF antigen, IU mL <sup>-1</sup>	185 ± 50	240 ± 198	267 ± 160					
ADAMTS-13 antigen, ng mL <sup>-1</sup>	583 ± 99	572 ± 126	562 ± 141					
F1 + 2, pM	209 ± 79	342 ± 327	489 ± 881					

(B)								
Parameter	Khorana score			<i>P</i> *	Vienna CATS score			<i>P</i> *
	Low ( <i>n</i> = 28)	Intermediate ( <i>n</i> = 104)	High ( <i>n</i> = 16)		Low ( <i>n</i> = 14)	Intermediate ( <i>n</i> = 75)	High ( <i>n</i> = 53)	
ADAMTS-13 activity, %	86 ± 20	82 ± 19	79 ± 18	0.4	89 ± 23	83 ± 19	78 ± 17	0.08
VWF antigen, IU mL <sup>-1</sup>	240 ± 170	232 ± 115	324 ± 232	0.3	188 ± 70	224 ± 133	290 ± 165	0.009
ADAMTS-13 antigen, ng mL <sup>-1</sup>	592 ± 126	558 ± 137	557 ± 139	0.5	589 ± 148	581 ± 133	519 ± 129	0.1
F1 + 2, pM	289 ± 149	336 ± 238	355 ± 200	0.6	207 ± 79	286 ± 171	460 ± 278	< 10 <sup>-4</sup>

F1 + 2, prothrombin fragment 1 + 2; VWF, von Willebrand factor. Results are expressed as mean ± standard deviation. \*Kruskal–Wallis rank sum test.

**Table 5** Effect of adding ADAMTS-13, von Willebrand factor and F1 + 2 levels to the Khorana and the Vienna CATS scores in multivariate analysis

Parameter	Khorana score	Vienna CATS score
VWF antigen, IU mL <sup>-1</sup>	3.1 [0.9–11.0]	1.9 [0.5–7.2]
ADAMTS-13 activity, %	5.0* [1.2–23.5]	5.8* [1.4–28.2]
ADAMTS-13 antigen, ng mL <sup>-1</sup>	0.5 [0.1–2.0]	0.5 [0.1–2.1]
F1 + 2, pM	6.8* [2.0–25.9]	4* [1.2–15.5]

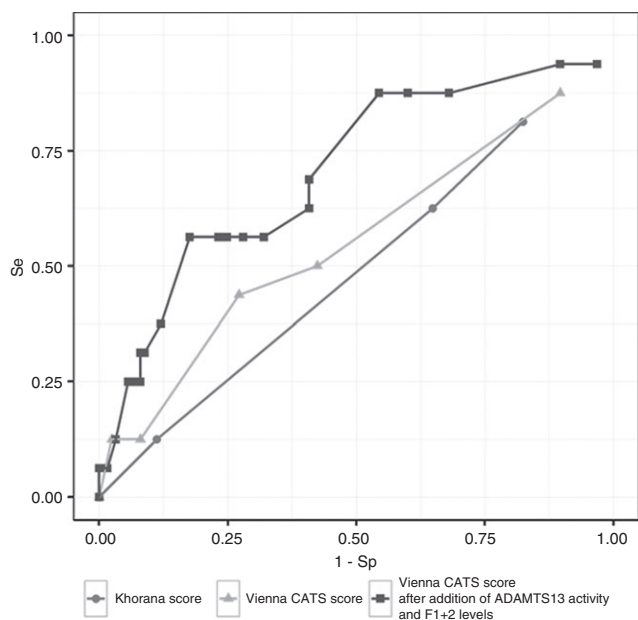
F1 + 2, prothrombin fragment 1 + 2; VWF, von Willebrand factor. Results are expressed as odds ratios [95% confidence interval]. Reference for odds ratio is score value without these four new parameters. \**P* < 0.05, likelihood ratio test. The parameters have been introduced into both the Khorana and the Vienna CATS scores as categorical variables. Patient scores were calculated with addition of 1 point to the Khorana or the Vienna CATS score, with the following thresholds: ADAMTS-13 activity > 87%; ADAMTS-13 antigen > 571 ng mL<sup>-1</sup>; VWF antigen > 290 IU mL<sup>-1</sup>; F1 + 2 > 358 pM.

similar distribution may be expected in the cases and control patients who were matched for the type of cancer and had the same duration of follow-up.

The Khorana score incorporates five items, including site of cancer, platelet count, hemoglobin and/or use of erythropoiesis-stimulating agents, leukocyte count and body mass index [12]. This score was developed and validated in outpatients commencing a new chemotherapy regimen from a multicenter prospective observational study. The Khorana score has been further validated in other studies, including populations different from the original cohort [35], and may be useful for identifying ambulatory patients requiring prophylaxis [36]. In our

population, there was a bias in the rates of VTE (12.5% in the total population) caused by the specific design (one patient with cancer who developed VTE was matched with seven patients with cancer without VTE), which makes the comparison with other populations impossible. Nevertheless, in our population the Khorana score did not discriminate between patients with and without VTE. This result could be due to enrollment of tumor types different from those in the original cohort or to the close matching of the patients with and without VTE. In the current study, the association of biomarkers with the Khorana or the Vienna CATS scores was analyzed in risk categories, as both scores were categorized and validated as low, intermediate and high-risk groups.

Several biomarkers are associated with the risk of VTE in patients with cancer. For example, sP-sel levels were higher in patients with cancer who developed VTE than in those without VTE and the probability of developing VTE 6 months after study inclusion was 11.9% in patients with elevated sP-sel levels vs. 3.7% in those with lower levels [13]. In the same work the authors also observed that D-dimer and F1 + 2, two markers that indicate global coagulation activation and fibrinolysis, displayed significantly higher levels in patients with cancer who had VTE than in those who did not develop VTE [15]. The cumulative probability of developing VTE after 6 months was highest in patients with both elevated D-dimer and F1 + 2 (15.2%) when compared with patients with non-elevated D-dimer and F1 + 2. The Vienna CATS expanded score comprises sP-sel and D-dimer levels in addition to the Khorana score items [16]. Using this score, the cumulative probability of VTE after



**Fig. 1.** Summary receiver operating curve plots. Dots: Khorana score with area under curve (AUC) of 0.49 (95% CI 0.34–0.65). Triangles: Vienna CATS scores with AUC of 0.56 (95% CI 0.39–0.72). Squares: Vienna CATS score after addition of ADAMTS-13 activity and F1 + 2 levels, with AUC of 0.71 (95% CI 0.56–0.85).

6 months in patients with the highest score was 35.0% vs. only 1.0% in patients with a score of 0. In our study, prediction of VTE was better with the Vienna CATS score than with the Khorana score. In our model, which included ADAMTS-13 activity and F1 + 2, prediction of the risk of VTE was considerably improved. Among all markers in our study, VWF antigen is currently a widely available parameter; F1 + 2 antigen is not widely available but quite easy to measure with an enzyme-linked immunosorbent assay. Currently, tests to measure ADAMTS-13 activity are not widely available, mostly because of their lack of standardization. Although this could reduce the clinical utility of the study findings, easy-to-use commercial kits are now available [37–39], which show excellent correlation with ADAMTS-13 activity using reference methods in some cases [39].

Compared with healthy subjects, increased plasma levels of VWF have been reported in patients with acute lymphoblastic leukemia [40], colorectal cancer [41–44], ovarian cancer [45,46], hepatocellular cancer [47], brain cancer [29] and bladder cancer [48], and heterogeneous cancer groups [30,31]. Some of these studies also reported higher levels of VWF in patients with a more advanced stage of cancer [29,30,41–45,47,48] or shorter survival [43,46]. The precise causal link between increased VWF levels and cancer is difficult to establish because VWF is an acute phase inflammatory and an endothelial lesion marker. However, in an experimental metastasis model, Terraube *et al.* have shown that VWF plays a protective role against tumor cell dissemination *in vivo* [22]. The

underlying mechanism has been recently demonstrated: ADAM28 is a metalloprotease that cleaves and inactivates proapoptotic VWF in carcinoma cells and enhances metastasis [23]. Increased VWF plasma levels have also been observed in VTE [49–54]. These results can be related to the recent study of Brill *et al.* showing a role of VWF in DVT *in vivo* [20].

Our study is the first one to report VWF levels in cancer patients with VTE. Increased levels of VWF were also associated with cancer stage and with a high-risk category for VTE as predicted with the Vienna CATS score. In univariate analysis, addition of VWF levels (threshold values  $> 290 \text{ IU mL}^{-1}$ ) improved only the Vienna CATS score (OR 4.3, 95% CI 1.6–11.8,  $P = 0.004$ ) and was not correlated with F1 + 2 levels. Interestingly, VWF levels did not improve the scores in multivariate analysis, maybe due to a confounding parameter. In our analysis, the thresholds for VWF and ADAMTS-13 activity were associated with the highest specificity and a good sensitivity ( $\geq 0.5$ ). As they are specific to our population, these cut-off values should be validated in an independent population and/or prospective cohort.

In our study, the patients displayed normal values of ADAMTS-13 activity. Previous findings showed ADAMTS-13 levels slightly decreased in patients with cancer when compared with a healthy control group [29,30]. These results could be due to technical variations in ADAMTS-13 activity measurement. At variance with the latter studies, we used a fluorimetric assay based on the digestion of a VWF peptide, the results of which are not modified by the patient's VWF concentration [33]. In techniques using full-length VWF, the results may possibly be underestimated if the patients VWF levels are high, as they usually are in patients with cancer. In our study, ADAMTS-13 activity levels showed a tendency to be decreased when the cancer was more disseminated ( $P = 0.06$ ), in agreement with previous studies [30–32]. These differences could also be due to technical differences in ADAMTS-13 activity measurement or to the type of tumors investigated. As ADAMTS-13 and VWF levels are not correlated, this slight decrease in ADAMTS-13 activity levels in disseminated cancers may result from impaired synthesis of the protein in the liver or from endothelial dysfunction subsequent to liver metastasis or chemotherapy, rather than consumption by increased VWF substrate. On the other hand, many members of the ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) and ADAMTS family proteases are overexpressed and participate in the pathology of cancers [55]. Indeed, in a prospective study Ikeda *et al.* found that a higher ADAMTS-13 activity level was a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease [56]. The authors suggested that ADAMTS-13 levels could be used as potential markers of hepatic stellate and hypothesized that increased levels result from hepatitis activity or a wound healing response [56]. At the



present time, further studies are still needed to define the potential role of ADAMTS-13 in the development of cancer.

In conclusion, high VWF levels are independently associated with the occurrence of VTE in patients with cancer and correlated with cancer dissemination and a high-risk category as predicted by current scoring systems. Moreover, introduction of ADAMTS-13 activity and F1 + 2 levels considerably increases the predictive value of these scoring systems for VTE. Despite major progress in identification of new risk factors for cancer-associated VTE, predicting VTE in an individual patient with cancer still represents a great challenge. Our study demonstrates that investigation of hemostasis biomarkers contributes to distinguishing between patients with different VTE-risk categories, which is an essential step towards targeted thromboprophylaxis in patients with cancer. Future prospective studies, with a larger number of patients, are necessary to confirm our results and determine if VWF and ADAMTS-13 can be used as predictive markers of VTE in stage III/IV cancer patients. Our results also highlight a role of the VWF/ADAMTS-13 balance in the pathophysiology of VTE in cancer.

#### Addendum

M. Pépin performed the assays and interpreted the results. A. Kleinjan recruited the patients and performed the assays. D. Hajage performed the statistical analysis and interpreted the data. H.R. Büller and M. Di Nisio recruited the patients. P. W. Kamphuisen recruited the patients and wrote the manuscript. L. Salomon designed the study and performed the statistical analysis. A. Veyradier contributed reagents and interpreted the data. A. Stepanian and I. Mahé designed the study, recruited the patients, interpreted the data and wrote the manuscript. All authors critically revised and approved the final draft.

#### Acknowledgements

This work was supported by grant CRC 12 092 (Contrat de Recherche Clinique 2012) from Assistance Publique – Hôpitaux de Paris and a grant from the Groupe Franco-phone Thrombose et Cancer (GFTC: J.-P. Algayres, O. Bensaoula, F. Cajfinger, L. Crescence, L. Deville, C. Dubois, H. Faivre, D. Farge, C. Frere, A. Hij, M. Jamelet, P.-A. Jarrot, Z. Marjanovic, I. Mahé, L. Panicot-Dubois, L. Plantureux, H. Rafii and S. Villiers). The authors thank all of the patients who participated in this study. They also thank D. de Prost for intellectual input into the conception of the study and M. Lamotte for expert technical assistance, as well as S. Hennou, M. Pinson, H. Helfer and C. Mekouba Etongo (Hôpital Louis Mourier, Service de Médecine Interne) for their contribution to the recruitment of participants.

#### Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

#### References

- 1 Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 632–4.
- 2 Kessler CM. The link between cancer and venous thromboembolism: a review. *Am J Clin Oncol* 2009; **32**: S3–7.
- 3 Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer* 2010; **102**: S2–9.
- 4 Khorana AA, Connolly GC. Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 4839–47.
- 5 Khorana AA, Dalal M, Lin J, Connolly GC. Incidence and predictors of venous thromboembolism (VTE) among ambulatory high-risk cancer patients undergoing chemotherapy in the United States. *Cancer* 2013; **119**: 648–55.
- 6 Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, Bernardi E, Simioni P, Girolami B, Marchiori A, Sabbion P, Prins MH, Noventa F, Girolami A. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 2002; **100**: 3484–8.
- 7 Kuderer NM, Khorana AA, Lyman GH, Francis CW. A meta-analysis and systematic review of the efficacy and safety of anticoagulants as cancer treatment: impact on survival and bleeding complications. *Cancer* 2007; **110**: 1149–61.
- 8 Khorana AA. Targeted prophylaxis in cancer: the evidence accumulates. *Intern Emerg Med* 2013; **8**: 187–9.
- 9 Mandalà M, Barni S, Prins M, Labianca R, Tondini C, Russo L, Milesi A, Cremonesi M, Zaccanelli M, Regonesi C, Moro C, Falanga A. Acquired and inherited risk factors for developing venous thromboembolism in cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a prospective trial. *Ann Oncol* 2010; **21**: 871–6.
- 10 Kröger K, Weiland D, Ose C, Neumann N, Weiss S, Hirsch C, Urbanski K, Seeber S, Scheulen ME. Risk factors for venous thromboembolic events in cancer patients. *Ann Oncol* 2006; **17**: 297–303.
- 11 Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Lyman GH. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* 2005; **104**: 2822–9.
- 12 Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood* 2008; **111**: 4902–7.
- 13 Ay C, Simanek R, Vormittag R, Dunkler D, Alguel G, Koder S, Kornek G, Marosi C, Wagner O, Zielinski C, Pabinger I. High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood* 2008; **112**: 2703–8.
- 14 Vormittag R, Simanek R, Ay C, Dunkler D, Quehenberger P, Marosi C, Zielinski C, Pabinger I. High factor VIII levels independently predict venous thromboembolism in cancer patients: the cancer and thrombosis study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 2176–81.
- 15 Ay C, Vormittag R, Dunkler D, Simanek R, Chiriac AL, Drach J, Quehenberger P, Wagner O, Zielinski C, Pabinger I. D-dimer and prothrombin fragment 1 + 2 predict venous thromboembolism in patients with cancer: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 4124–9.
- 16 Ay C, Dunkler D, Marosi C, Chiriac A-L, Vormittag R, Simanek R, Quehenberger P, Zielinski C, Pabinger I. Prediction of

- venous thromboembolism in cancer patients. *Blood* 2010; **116**: 5377–82.
- 17 Sadler JE. New concepts in von Willebrand disease. *Annu Rev Med* 2005; **56**: 173–91.
  - 18 Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995; **345**: 152–5.
  - 19 Smith NL, Rice KM, Bovili EG, Cushman M, Bis JC, McKnight B, Lumley T, Glazer NL, van Hylckama Vlieg A, Tang W, Dehghan A, Strachan DP, O'Donnell CJ, Rotter JJ, Heckbert SR, Psaty BM, Rosendaal FR. The risk of incident venous thrombosis genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood* 2011; **117**: 6007–11.
  - 20 Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Köllnberger M, Wakefield TW, Lämmle B, Massberg S, Wagner DD. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 2011; **117**: 1400–7.
  - 21 Takahashi M, Yamashita A, Moriguchi-Goto S, Marutsuka K, Sato Y, Yamamoto H, Koshimoto C, Asada Y. Critical role of von Willebrand factor and platelet interaction in venous thromboembolism. *Histol Histopathol* 2009; **24**: 1391–8.
  - 22 Terraube V, Pendu R, Baruch D, Gebbink MF, Meyer D, Lenting PJ, Denis CV. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 519–26.
  - 23 Mochizuki S, Soejima K, Shimoda M, Abe H, Sasaki A, Okano HJ, Okano H, Okada Y. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst* 2012; **104**: 906–22.
  - 24 Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C, Lippi G. von Willebrand factor and cancer: a renewed interest. *Thromb Res* 2013; **131**: 290–2.
  - 25 Sadler JE. von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 1702–9.
  - 26 Coppo P, Veyradier A. Thrombotic microangiopathies: towards a pathophysiology-based classification. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009; **9**: 36–50.
  - 27 Oberic L, Buffet M, Schwarzingler M, Veyradier A, Clabault K, Malot S, Schleinitz N, Valla D, Galicier L, Bengrine-Lefèvre L, Gorin NC, Coppo P; Reference Center for the Management of Thrombotic Microangiopathies. Cancer awareness in atypical thrombotic microangiopathies. *Oncologist* 2009; **14**: 769–79.
  - 28 Regierer AC, Kuehnhardt D, Schulz CO, Flath B, Jehn CF, Scholz CW, Possinger K, Eucker J. Breast cancer-associated thrombotic microangiopathy. *Breast Care (Basel)* 2011; **6**: 441–5.
  - 29 Böhm M, Gerlach R, Beecken W-D, Scheuer T, Stier-Brück I, Scharrer I. ADAMTS-13 activity in patients with brain and prostate tumors is mildly reduced, but not correlated to stage of malignancy and metastasis. *Thromb Res* 2003; **111**: 33–7.
  - 30 Mannucci PM, Karimi M, Mosalaei A, Canciani MT, Peyvandi F. Patients with localized and disseminated tumors have reduced but measurable levels of ADAMTS-13 (von Willebrand factor cleaving protease). *Haematologica* 2003; **88**: 454–8.
  - 31 Oleksowicz L, Bhagwati N, DeLeon-Fernandez M. Deficient activity of von Willebrand's factor-cleaving protease in patients with disseminated malignancies. *Cancer Res* 1999; **59**: 2244–50.
  - 32 Koo B-H, Oh D, Chung SY, Kim NK, Park S, Jang Y, Chung KH. Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease activity in the plasma of malignant patients. *Thromb Res* 2002; **105**: 471–6.
  - 33 Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005; **129**: 93–100.
  - 34 Bleeker SE, Moll HA, Steyerberg EW, Donders AR, Derksen-Lubsen G, Grobbee DE, Moons KG. External validation is necessary in prediction research: a clinical example. *J Clin Epidemiol* 2003; **56**: 826–32.
  - 35 Khorana AA. Risk assessment for cancer-associated thrombosis: what is the best approach? *Thromb Res* 2012; **129**: S10–5.
  - 36 Khorana AA. Venous thromboembolism prevention in cancer outpatients. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; **11**: 1431–8.
  - 37 Mackie I, Langley K, Chitolie A, Liesner R, Scully M, Machin S, Peyvandi F. Discrepancies between ADAMTS13 activity assays in patients with thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost* 2013; **109**: 488–96.
  - 38 Joly B, Stepanian A, Hajage D, Thouzeau S, Capdenat S, Coppo P, Veyradier A. Evaluation of a chromogenic commercial assay using VWF-73 peptide for ADAMTS13 activity measurement. *Thromb Res* 2014; **134**: 1074–80.
  - 39 Thouzeau S, Capdenat S, Stépanian A, Coppo P, Veyradier A. Evaluation of a commercial assay for ADAMTS13 activity measurement. *Thromb Haemost* 2013; **110**: 852–3.
  - 40 Hatzipantelis ES, Athanassiou-Metaxa M, Gombakis N, Tzimouli V, Taparkou A, Sidi-Fragandrea V, Garipidou V, Papageorgiou T, Kleta D, Kolioukas DE, Athanasiadou-Piperopoulou F. Thrombomodulin and von Willebrand factor: relation to endothelial dysfunction and disease outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haemol* 2011; **125**: 130–5.
  - 41 Damin DC, Rosito MA, Gus P, Roisemberg I, Bandinelli E, Schwartzmann G. Von Willebrand factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2002; **17**: 42–5.
  - 42 Gil-Bazo I, Catalán Goni V, Alonso Gutiérrez A, Rodríguez Rodríguez J, Páramo Fernández JA, de la Cámara Gómez J, Hernández Lizoain JL, García-Foncillas López J. Impact of surgery and chemotherapy on von Willebrand factor and vascular endothelial growth factor levels in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 2005; **7**: 150–5. Erratum in: *Clin Transl Oncol* 2005; **7**: 271.
  - 43 Wang WS, Lin JK, Lin TC, Chiou TJ, Liu JH, Yen CC, Chen PM. Plasma von Willebrand factor level as a prognostic indicator of patients with metastatic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; **11**: 2166–70.
  - 44 Schellerer VS, Mueller-Berg L, Merkel S, Zimmermann R, Weiss DR, Schlabrakowski A, Naschberger E, Stürzl M, Hohenberger W, Croner RS. The clinical value of von Willebrand factor in colorectal carcinomas. *Am J Transl Res* 2011; **3**: 445–53.
  - 45 Gadducci A, Baicchi U, Marrai R, Del Bravo B, Fosella PV, Facchini V. Pretreatment plasma levels of fibrinopeptide-A (FPA), D-dimer (DD), and von Willebrand factor (VWF) in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1993; **53**: 352–6.
  - 46 Koh SC, Khalil R, Lim FK, Ilancheran A, Choolani M. The association between fibrinogen, von Willebrand Factor, antithrombin III, and D-dimer levels and survival outcome by 36 months from ovarian cancer. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006; **12**: 3–8.
  - 47 Liu Y, Wang X, Li S, Hu H, Zhang D, Hu P, Yang Y, Ren H. The role of von Willebrand factor as a biomarker of tumor development in hepatitis B virus-associated human hepatocellular carcinoma: a quantitative proteomic based study. *J Proteomics* 2014; **106**: 99–112.
  - 48 Zietek Z, Iwan-Zietek I, Paczulski R, Kotschy M, von Wolski Z. Willebrand factor antigen in blood plasma of patients with urinary bladder carcinoma. *Thromb Res* 1996; **83**: 399–402.
  - 49 Matsumoto M, Uchiyama T, Kobayashi N, Maekawa T. Plasma levels of von Willebrand factor and plasminogen activator in patients with arterial thromboembolism—with special reference to their correlation to the increased catabolism of both

- fibrinogen and platelets. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1989; **52**: 1105–14.
- 50 Bombeli T, Jutzi M, De Conno E, Seifert B, Fehr J. In patients with deep-vein thrombosis elevated levels of factor VIII correlate only with von Willebrand factor but not other endothelial cell-derived coagulation and fibrinolysis proteins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; **13**: 577–81.
- 51 Migliacci R, Becattini C, Pesavento R, Davi G, Vedovati MC, Guglielmini G, Falcinelli E, Ciabattini G, Dalla Valle F, Prandoni P, Agnelli G, Gresele P. Endothelial dysfunction in patients with spontaneous venous thromboembolism. *Haematologica* 2007; **92**: 812–8.
- 52 Teixeira Mello TB, Machado TF, Montavão SA, Ozello MC, Annichino-Bizzacchi JM. Assessing the coagulation factor levels, inherited thrombophilia, and ABO blood group on the risk for venous thrombosis among Brazilians. *Clin Appl Thromb Hemost* 2009; **15**: 408–14.
- 53 Mazetto BM, Orsi FL, Barnabé A, De Paula EV, Flores-Nascimento MC, Annichino-Bizzacchi JM. Increased ADAMTS13 activity in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 2012; **130**: 889–93.
- 54 Payne AB, Miller CH, Hooper WC, Lally C, Austin HD. High factor VIII, von Willebrand factor, and fibrinogen levels and risk of venous thromboembolism in blacks and whites. *Ethn Dis* 2014; **24**: 169–74.
- 55 Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* 2007; **98**: 621–8.
- 56 Ikeda H, Tateishi R, Enooku K, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ono T, Koike K, Yatomi Y. Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; **20**: 2204–11.

**ARTICLE 2 :**

**Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity**

Marion Pepin, Soraya Mezouar, Julie Pegon, Vincent Muczynski, Frédéric Adam, Elsa P. Bianchini, Amine Bazaa, Valerie Proulle, Alain Rupin, Jerome Paysant, Laurence Panicot-Dubois, Olivier D. Christophe, Christophe Dubois, Peter J. Lenting, Cécile V. Denis

*Scientific Reports*, Sci Rep. 2016 Nov 28; 6: 37953



L'équipe de l'unité 1176 s'était déjà intéressée à la famille des Siglecs au cours de la thèse d'une étudiante m'ayant précédée, Julie Pégon. En effet, cette famille d'immunorécepteurs exprimés à la surface leucocytaire avait retenu l'attention du fait de sa capacité à lier différents types de ligands par leurs résidus sucrés (glycoprotéines ou glycolipides).

Le Siglec-5 avait ainsi pu être identifié comme un ligand du facteur VIII de la coagulation et du facteur Willebrand, par une interaction indépendante des acides sialiques (*Pegon et al., 2012*). Toujours au sein de l'équipe, les mécanismes inflammatoires et les liens entre coagulation et inflammation constituent un axe d'étude régulièrement revisité. Si l'on considère les déterminants moléculaires indispensables à l'interaction entre la P-sélectine (P-sel) et son ligand le PSGL-1 pour promouvoir le roulement leucocytaire, un détail saute rapidement aux yeux, à savoir la structure hautement sialilée du PSGL-1. L'idée de tester l'existence d'une interaction entre le PSGL-1 et les Siglecs s'est donc imposée assez rapidement.

Une expérience préliminaire réalisée avant que le projet ne me soit confié avait d'ailleurs montré que le Siglec-5 sous sa forme monomérique semblait effectivement capable de lier le PSGL-1 même si l'affinité paraissait faible.

De mon côté, mon projet initial sur les liens existant entre la protéase ADAM28 et le VWF s'étant révélé extrêmement compliqué du fait de l'absence totale d'outils biologiques sur ADAM28 et de notre observation que l'unique test commercial destiné à doser cette protéase était non fonctionnel, la décision a été prise de ré-orienter mon travail sur Siglec-5 et inflammation.

Dans un premier temps, par analogie à l'augmentation d'avidité des interactions sélectines-ligand après dimérisation ou oligomérisation d'une ou des deux partenaires, nous avons construit une protéine chimérique heptamérique en associant l'ectodomaine du Siglec-5 à une partie de la chaîne alpha de la protéine C4b-binding protein (C4BP).

Les premiers résultats obtenus montraient que l'expression de cette protéine était possible dans un modèle cellulaire de transfection stable en quantité suffisante pour une purification de qualité.


L'obtention de ces divers outils biologiques m'a donc permis de poursuivre dans la voie de l'exploration de la liaison entre PSGL-1 et Siglec-5. Les objectifs de cette étude étaient la caractérisation de la liaison *in vitro* entre PSGL-1 et Siglec-5 et l'étude des conséquences fonctionnelles de cette interaction sur les cellules sanguines circulantes *ex vivo* et *in vivo*.

Au final, nos résultats ont donc permis d'établir la capacité de liaison entre Siglec-5 et PSGL-1. Il s'agit ici de la première description de cette interaction. Il est à noter que nos résultats ne nous permettent pas d'explicitier les modalités précises de cette interaction *in vivo*. Cependant, la proximité géographique de PSGL-1 et Siglec-5 à la surface leucocytaire nous permet d'envisager des interactions en cis au sein de la membrane plasmique. Ces interactions pourraient avoir un rôle dans la régulation de l'activité de chacune des protéines en « masquant » leur site de liaison.

Nous avons également montré que des formes solubles de Siglec-5 exercent un effet inhibiteur sur le roulement des leucocytes mononucléés ou polynucléés *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, cet effet sur le roulement des leucocytes s'accompagne d'un retentissement sur les étapes suivantes de la cascade de recrutement leucocytaire comme l'adhésion ou la transmigration. Nos observations nous permettent de conclure que l'effet anti-inflammatoire que nous avons observé passe par l'inhibition de l'interaction PSGL-1/P-sel mais il semble également qu'une interférence avec d'autres ligands sialilés soit aussi une possibilité.

L'amélioration de la caractérisation de l'interaction PSGL-1/ Siglec-5 soluble tant sur le plan moléculaire que fonctionnel pourrait permettre d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques dans de nombreuses pathologies ou situations pathologiques.

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity

Received: 10 August 2016  
Accepted: 01 November 2016  
Published: 28 November 2016

Marion Pepin<sup>1</sup>, Soraya Mezouar<sup>2</sup>, Julie Pegon<sup>1</sup>, Vincent Muczynski<sup>1</sup>, Frédéric Adam<sup>1</sup>, Elsa P. Bianchini<sup>1</sup>, Amine Bazaa<sup>1</sup>, Valerie Proulle<sup>1,3</sup>, Alain Rupin<sup>4</sup>, Jerome Paysant<sup>5</sup>, Laurence Panicot-Dubois<sup>2</sup>, Olivier D. Christophe<sup>1</sup>, Christophe Dubois<sup>2</sup>, Peter J. Lenting<sup>1</sup> & Cécile V. Denis<sup>1</sup>

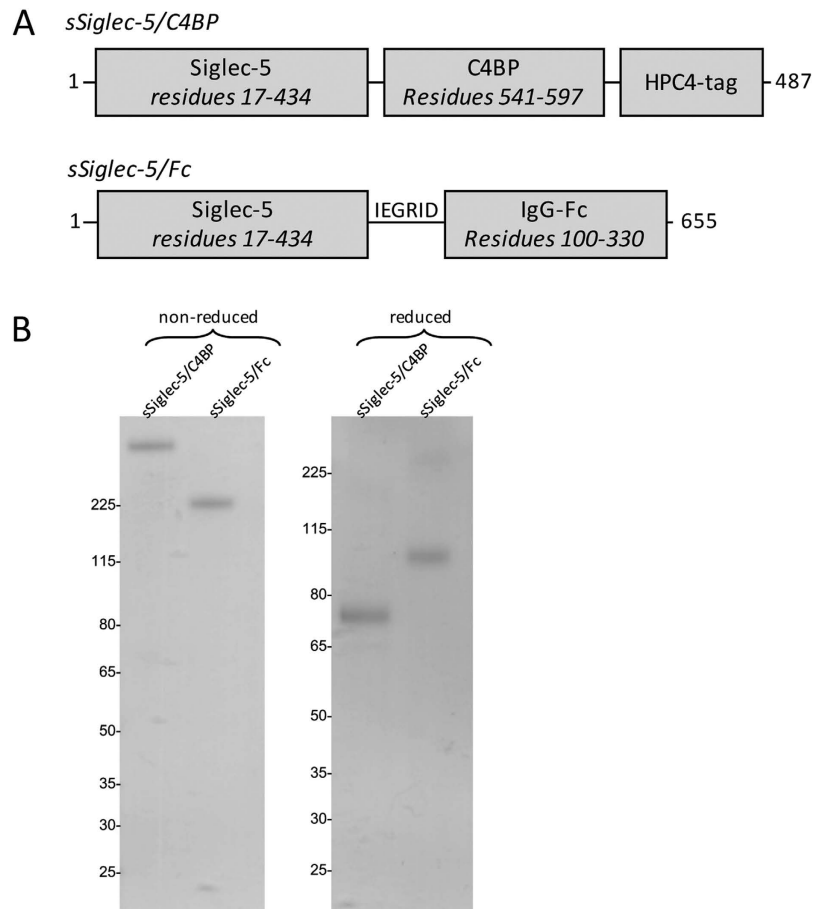
Interactions between endothelial selectins and the leukocyte counter-receptor PSGL1 mediates leukocyte recruitment to inflammation sites. PSGL1 is highly sialylated, making it a potential ligand for Siglec-5, a leukocyte-receptor that recognizes sialic acid structures. Binding assays using soluble Siglec-5 variants (sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc) revealed a dose- and calcium-dependent binding to PSGL1. Pre-treatment of PSGL1 with sialidase reduced Siglec-5 binding by  $79 \pm 4\%$ . In confocal immune-fluorescence assays, we observed that 50% of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) simultaneously express PSGL1 and Siglec-5. Duolink-proximity ligation analysis demonstrated that PSGL1 and Siglec-5 are in close proximity ( $<40$  nm) in  $31 \pm 4\%$  of PBMCs. *In vitro* perfusion assays revealed that leukocyte-rolling over E- and P-selectin was inhibited by sSiglec-5/Fc or sSiglec-5/C4BP, while adhesion onto VCAM1 was unaffected. When applied to healthy mice (0.8 mg/kg), sSiglec-5/C4BP significantly reduced the number of rolling leukocytes under basal conditions ( $10.9 \pm 3.7$  versus  $23.5 \pm 9.3$  leukocytes/field/min for sSiglec-5/C4BP-treated and control mice, respectively;  $p = 0.0093$ ). Moreover, leukocyte recruitment was inhibited over a 5-h observation period in an *in vivo* model of TNF $\alpha$ -induced inflammation following injection sSiglec-5/C4BP (0.8 mg/kg). Our data identify PSGL1 as a ligand for Siglec-5, and soluble Siglec-5 variants appear efficient in blocking PSGL1-mediated leukocyte rolling and the inflammatory response in general.

The inflammatory response involves a series of events that leads to the recruitment of circulating leukocytes to extravascular sites of inflammation<sup>1</sup>. Many molecular actors have been identified that contribute to this process, including the leukocyte-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL1)<sup>2,3</sup>. This single-membrane receptor controls rolling of leukocytes on P- and E-selectin-expressing endothelial cells<sup>4,5</sup>. Indeed, PSGL1-deficiency is associated with delayed leukocyte recruitment in an experimental peritonitis model as well as with reduced leukocyte rolling *in vivo*<sup>6</sup>. The extracellular domain of PSGL1 is heavily glycosylated<sup>5</sup> and the presence of sialic acids at the tip of the glycans is crucial to its interaction with P-selectin<sup>2</sup>.

The presence of the sialylated glycans on PSGL1 also makes this protein a potential ligand for a family of sialic-acid recognizing receptors: Siglecs or sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins. This family consists of 14 different members, each of them with its own specificity for the various sialic acid structures and conformations<sup>7</sup>. Two different subfamilies may be distinguished: CD22-related and CD33-related Siglecs. The CD22-related subfamily is composed of 4 members, including the archetype of this family, Sialoadhesin or Siglec-1, and these Siglecs are relatively well conserved between species. The human CD33-related subfamily consists of 10 different members, which are poorly conserved between species<sup>8</sup>. Siglecs are selectively expressed in cells of haematopoietic origin, such as neutrophils, B cells and monocytes, with each Siglec having its own expression pattern<sup>8</sup>.

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR\_S 1176, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France. <sup>2</sup>Aix Marseille Université, Inserm UMR\_S 1076, (VRCM) Vascular Research Center of Marseille, 13385 Marseille, France. <sup>3</sup>Department of Biological Hematology, CHU Bicetre, Hopitaux Universitaires Paris Sud, AP-HP, Paris, France. <sup>4</sup>Institut de Recherche International Servier, Recherche Translationnelle et Clinique Oncologie, 92150, Suresnes, France. <sup>5</sup>Institut de Recherches Servier, Unité de Recherche et de Découverte Cardiovasculaire, 92150, Suresnes, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.J.L. (email: peter.lenting@inserm.fr)





**Figure 1. Soluble variants of Siglec-5.** *Panel A:* Domain structures of sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc which are used within this study. *Panel B:* Analysis of purified sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc via SDS-Page and Coomassie-staining under non-reduced and reduced conditions.

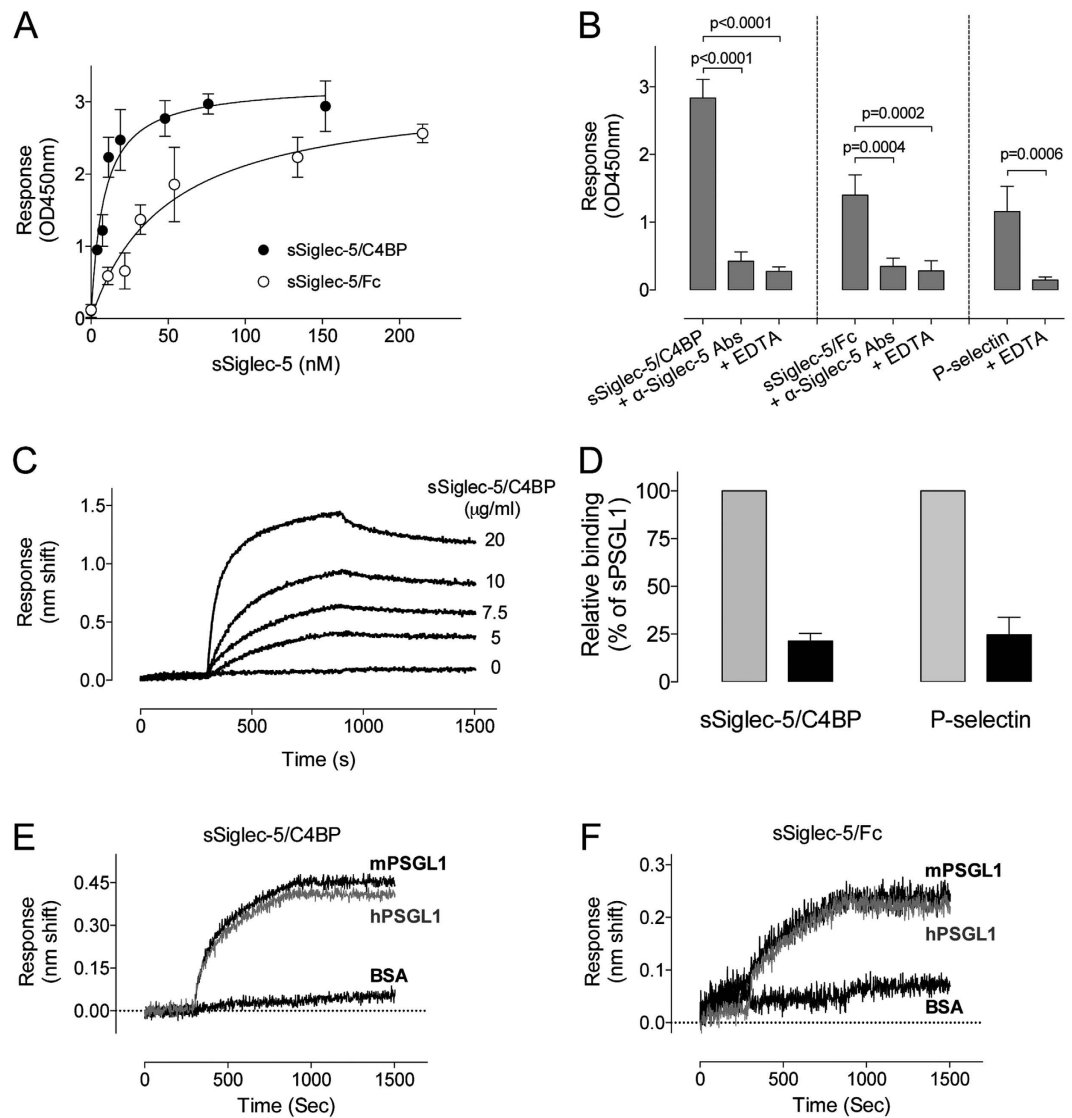
Among the Siglecs, Siglec-5 recognizes a remarkably wide spectrum of sialic acid structures, including  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 and  $\alpha$ 2-8 linkage conformations, as well as the two most common mammalian sialic acid variants (N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid)<sup>9</sup>. The protein structure of Siglec-5 distinguishes 4 extracellular immunoglobulin-like domains, a single transmembrane domain and a cytoplasmic tail<sup>10</sup>. It should be noted that different splice variants of Siglec-5 can be produced, including a soluble isoform<sup>11</sup>. In all variants, the N-terminal V-set domain contains the sialic acid binding domain<sup>11,12</sup>. The reported physiological role of Siglec-5 seems to be diverse and relates to cell-cell interactions, signaling, recognition of pathogens and endocytosis of ligands<sup>7,10,13–17</sup>.

Being intrigued by the notion that PSGL-1 and Siglec-5 are both expressed in many leukocytes, combined with the presence of sialic acid structures on PSGL1, we investigated the hypothesis that PSGL1 could serve as a ligand for Siglec-5. Our data suggest that PSGL1 and Siglec-5 co-localize at the surface of leukocytes, and that recombinant PSGL1 binds in a calcium-dependent manner to soluble Siglec-5. Furthermore, soluble Siglec-5 interferes with the rolling of leukocytes on P-selectin *in vitro*. Finally, soluble Siglec-5 reduces basal rolling of leukocytes *in vivo* and prevents the recruitment of leukocytes to sites of inflammation.

## Results

**Soluble Siglec-5 variants.** To investigate whether Siglec-5 recognizes the ectodomain of PSGL1, two different Siglec-5 constructs of different cellular origin were used to explore their interaction with soluble PSGL1/Fc (sPSGL1/Fc): a commercially available dimeric soluble Siglec-5/Fc fusion protein (sSiglec-5/Fc) and a novel heptameric Siglec-5/C4BP fusion protein (sSiglec-5/C4BP; Fig. 1A). This latter protein consists of the Siglec-5 ectodomain fused to a 57-amino acid motif that mediates heptamerisation of the C4BP protein (residues 541–597)<sup>18</sup>. Indeed, purified sSiglec-5/C4BP migrates as a single-chain protein of approximately 525 kDa under non-reduced conditions. The apparent molecular weight of sSiglec-5/C4BP was estimated to be one-seventh of this value under reduced conditions (75 kDa; Fig. 1B), corresponding to the molecular weight of the 487-amino acid polypeptide, which harbors 8 sites for N-linked glycosylation.

**Interaction between the ectodomains of PSGL1 and Siglec-5.** Binding of Siglec-5 variants (0–215 nM) to immobilized sPSGL1/Fc (0.25  $\mu$ g/well) was first tested in an immunosorbent assay, with bound



**Figure 2. Interaction between ectodomains of Siglec-5 and PSGL1.** *Panel A:* sSiglec-5/C4BP (closed circles) and sSiglec-5/Fc (open circles) were incubated with immobilized sPSGL1/Fc. Plotted is the response (OD450nm) versus sSiglec-5 concentration. Data represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments. *Panel B:* sSiglec-5/C4BP (10  $\mu$ g/ml), sSiglec-5/Fc (10  $\mu$ g/ml) or P-selectin (10  $\mu$ g/ml) were pre-incubated with EDTA or polyclonal anti-Siglec-5 antibodies prior to the addition of sPSGL1/Fc-coated wells. Plotted is the response (OD450) for each of the preparations. P-values were determined in a 1-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test. *Panel C:* Interaction between sPSGL1 and sSiglec-5/C4BP was examined using BLI-analysis. sPSGL1/Fc was immobilized onto amine-reactive biosensors and incubated with various concentrations of sSiglec-5/C4BP. A representative sensorgram of three independent experiments is plotted, showing the response (nm shift) versus time. *Panel D:* sPSGL1/Fc immobilized onto amine-reactive biosensors was incubated in the absence (grey bars) or presence (black bars) of sialidase (0.1 U/ml) before exposure to sSiglec-5/C4BP or P-selectin (both 10  $\mu$ g/ml). Plotted is the residual response (expressed as percentage of response in the absence of sialidase, which was arbitrarily set at 100%) for both sSiglec-5/C4BP and P-selectin. *Panels E & F:* human or murine sPSGL1/Fc (hPSGL1 and mPSGL1) and BSA were immobilized onto amine-reactive biosensors and incubated with sSiglec-5/C4BP or sSiglec-5/Fc (7.5  $\mu$ g/ml). Representative sensorgrams of two independent experiments is plotted, showing the response (nm shift) versus time.

Siglec-5 protein being probed using biotin-labeled polyclonal anti-Siglec-5 antibodies. Both sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc displayed saturable and dose-dependent binding to immobilized sPSGL1/Fc (Fig. 2A). Half-maximal binding was calculated to be  $8 \pm 1$  nM and  $49 \pm 11$  nM for sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc, respectively. Binding appeared to be specific, as the interaction of sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc was inhibited in the presence of polyclonal anti-Siglec-5 antibodies as well as in the presence of EDTA (Fig. 2B). A similar EDTA-dependence was also observed for the binding of P-selectin to immobilized sPSGL1/Fc (Fig. 2B). Binding was further investigated via BLI-analysis using Octet-QK equipment. Again, sSiglec-5/C4BP displayed a dose-dependent binding (Fig. 2C). Specificity was tested by pre-incubating immobilized sPSGL-1/Fc with sialidase prior to incubation

with sSiglec-5/C4BP. Sialidase-treatment of sPSGL1/Fc reduced binding of sSiglec-5/C4BP and P-selectin by  $79 \pm 4\%$  and  $75 \pm 9\%$ , respectively (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ; Fig. 2D). Since *in vivo* experiments were included in this study, we further verified that sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc can interact with murine PSGL1 as well. As depicted in Fig. 2E and F, both soluble Siglec-5 variants were similar in binding to human and murine sPSGL1/Fc. Taken together, our data indicate that the extracellular region of PSGL1 is able to associate with the extracellular region of Siglec-5 in a calcium-ion and sialic acid-dependent manner.

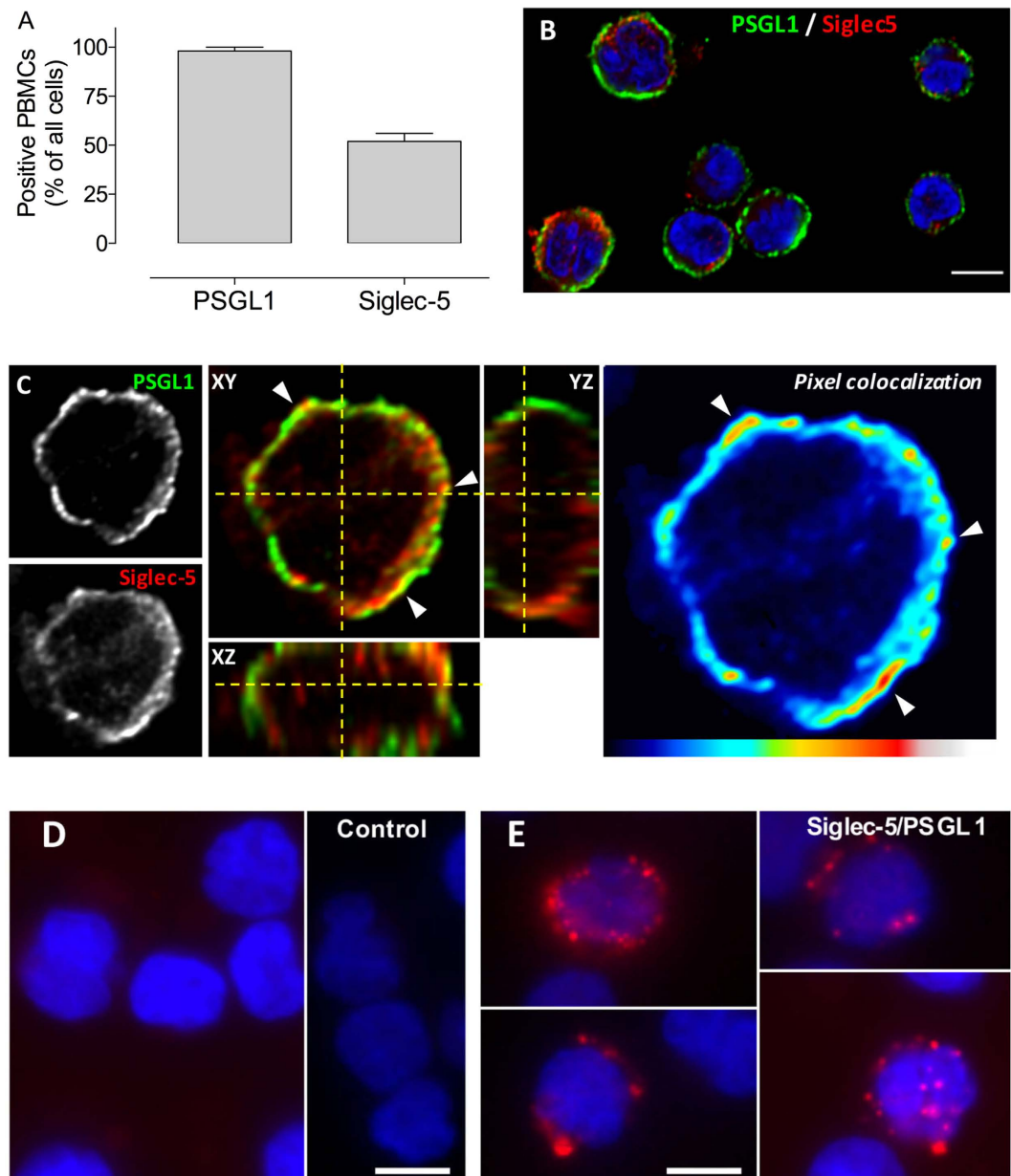
**PSGL1 and Siglec-5 are in close proximity at the leukocyte surface.** We next explored the possibility that the naturally expressed proteins could also interact at the cell surface. When analyzing the expression of PSGL1 and Siglec-5 on freshly isolated PBMCs, we observed that  $98 \pm 2\%$  ( $n = 3$  PBMC isolations) of the cells stained positive for PSGL1 and  $52 \pm 4\%$  for Siglec-5 (Fig. 3A–B), suggesting that about 50% of the cells express both PSGL1 and Siglec-5. We then analyzed co-localization between PSGL1 and Siglec-5 via double immunofluorescence staining. Signals for PSGL1 on Siglec-5-expressing cells indeed displayed some overlap with the signals for Siglec-5 (Fig. 3C). To confirm that both proteins truly associate at the cell surface, Duolink-PLA analysis was performed. This approach generates red fluorescent spots if proteins are located in a radius of 40 nm. No fluorescent spots were formed when either primary antibody was omitted from the assay (Fig. 3D). In contrast, distinct red spots were detected in about 30% of the cells when anti-PSGL1 and anti-Siglec-5 antibodies were used simultaneously (Fig. 3E). These data show that PSGL1 and Siglec-5 may interact also at the surface of PBMCs, indicating that binding is not restricted to the recombinant derivatives of these proteins.

**Soluble sSiglec-5/Fc reduces rolling of THP1-cells over E- and P-selectin *in vitro*.** Considering that sSiglec-5 variants are able to interact with PSGL1, we explored the possibility that sSiglec-5 could be used to interfere with PSGL1 mediated leukocyte rolling. First, we compared rolling of THP1-cells that were pre-incubated in the absence or presence of sialidase (0.1 U/ml). The number of THP1-cells rolling over immobilized P-selectin was reduced by  $>98\%$  for sialidase-treated THP1-cells compared to non-treated cells (Fig. 4A), confirming that P-selectin mediated rolling requires the presence of sialic acids. In a next series of experiments, the effect of a single concentration of dimeric sSiglec-5/Fc on the adhesion and/or rolling of THP1-cells on various receptors was tested using a microfluidic perfusion system (shear stress:  $0.5 \text{ dyn/cm}^2$ ). As a control, sSiglec-7/Fc was used, which recognizes a different array of sialic acid conformations compared to sSiglec-5/Fc<sup>9</sup>. In the presence of sSiglec-5/Fc or sSiglec-7/Fc ( $10 \mu\text{g/ml}$ ), the number of cells adhering to VCAM1 was unaffected (Fig. 4B). In contrast, rolling on E-selectin or P-selectin-coated coverslips was reduced by  $72 \pm 14\%$  ( $n = 3$ ;  $p = 0.0015$ ) and  $52 \pm 12\%$  ( $n = 5$ ;  $p = 0.0084$ ), respectively, in the presence of sSiglec-5/Fc, but not in the presence of sSiglec-7/Fc (Fig. 4C & D). We subsequently compared sSiglec-5/Fc to anti-PSGL1 antibodies. Both the anti-PSGL1-antibodies and sSiglec-5/Fc reduced rolling of THP1-cells over P-selectin in a dose-dependent manner (Fig. 4E). Moreover, both anti-PSGL1-antibodies and sSiglec-5/Fc were equally efficient in reducing rolling of THP1-cells at concentrations of 10 and  $20 \mu\text{g/ml}$ . However, no further decrease in rolling was observed at  $50 \mu\text{g/ml}$  anti-PSGL1-antibodies ( $50 \pm 10\%$  maximal inhibition), whereas rolling was reduced by  $81 \pm 10\%$  in the presence of  $50 \mu\text{g/ml}$  sSiglec-5/Fc ( $p = 0.0024$  compared to anti-PSGL1 antibodies). Examples of image-sequences depicting rolling of THP1-cells over P-selectin in the absence or presence of sSiglec-5/Fc are shown in Fig. 4F and G. Our data suggest that sSiglec-5/Fc is able to specifically interfere with rolling of leukocytes over P-selectin.

**Soluble sSiglec-5 variants reduce rolling of PBMCs and PMNs over P-selectin *in vitro*.** To investigate if soluble Siglec-5 variants also modify rolling of primary leukocytes over P-selectin, perfusion experiments using freshly isolated PBMCs and PMNs were performed. Rolling of PBMCs over P-selectin was reduced by  $55 \pm 11\%$  ( $p = 0.0049$ ;  $n = 3$ ) in the presence of sSiglec-5/Fc, while unaffected by the presence of sSiglec-7/Fc (Fig. 5A). As for PMNs, both sSiglec-5/Fc and sSiglec-5/C4BP significantly reduced rolling of these cells over P-selectin. Rolling was reduced by  $26 \pm 16\%$  ( $p = 0.0020$ ;  $n = 4$ ) and  $41 \pm 7\%$  ( $p = 0.0437$ ;  $n = 5$ ), respectively (Fig. 5B). Thus, sSiglec-5 also interferes with the rolling of PBMCs and PMNs over P-selectin.

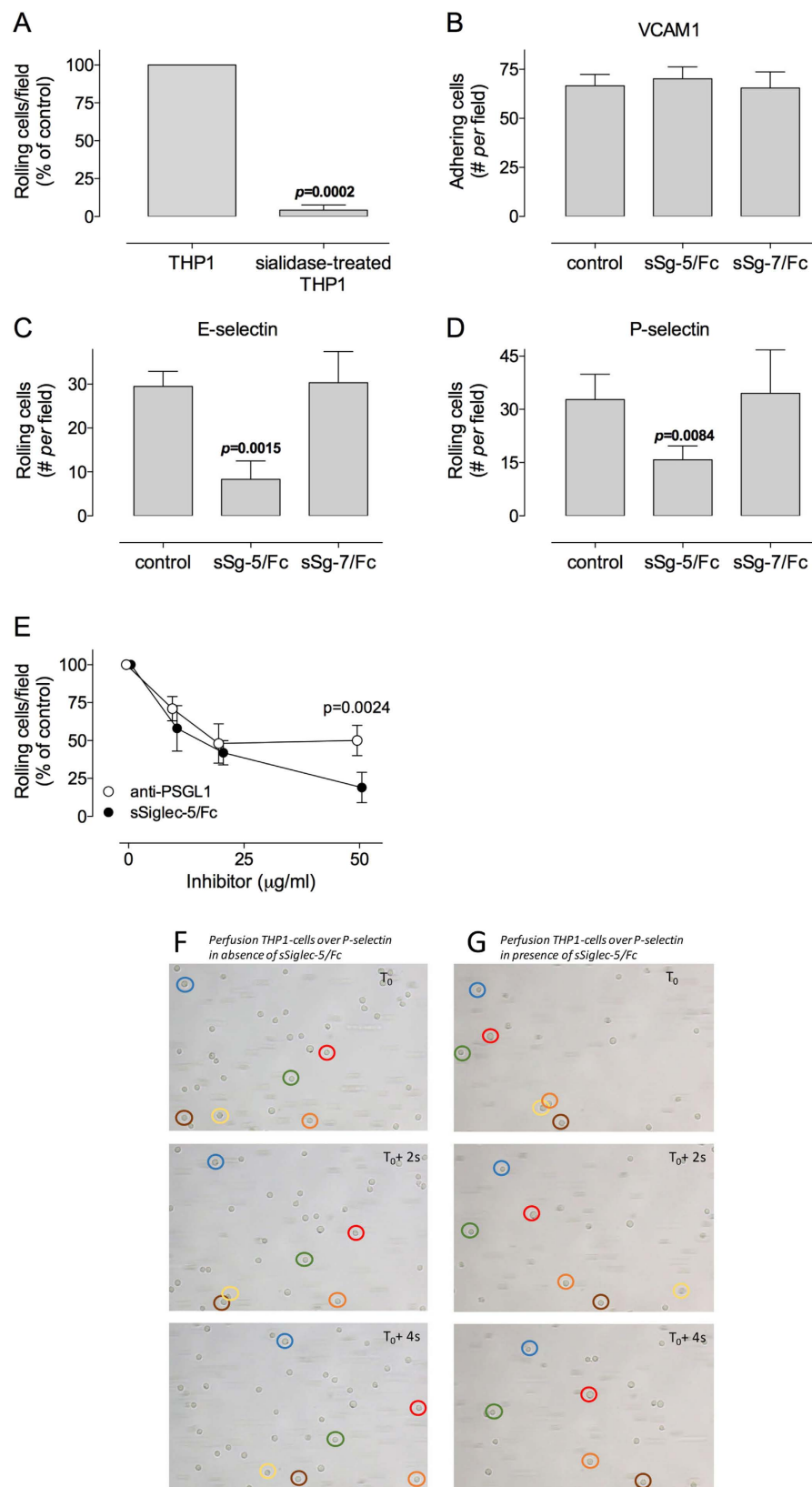
**sSiglec-5/C4BP reduces basal leukocyte rolling *in vivo*.** To investigate whether sSiglec-5 affects leukocyte rolling *in vivo*, we first studied the effect of infusion of sSiglec-5/C4BP infusion on basal leukocyte rolling in mice. To this end, mice (13–18 g; 3–5 weeks of age) received a single bolus of vehicle or sSiglec-5/C4BP ( $0.8 \text{ mg/kg}$ ). After preparation of the mesenteric venules ( $25\text{--}35 \mu\text{m}$ ), leukocyte rolling was monitored for 10 min in two separate vessels in 8–9 separate mice. The number of rolling leukocytes under basal conditions was significantly lower in sSiglec-5/C4BP-treated mice compared to vehicle-treated mice ( $10.9 \pm 3.7$  versus  $23.5 \pm 9.3$  rolling leukocytes/field/min, respectively;  $p = 0.0093$ ; Fig. 6A). Moreover, the number of adhering leukocytes (defined as adhering for  $>30\text{s}$ ) was also reduced significantly in Siglec-5/C4BP-treated mice compared to vehicle treated mice ( $4.1 \pm 2.2$  versus  $8.0 \pm 2.4$  adhering leukocytes/field, respectively;  $p = 0.0053$ ; Fig. 6B). These data suggest that sSiglec-5/C4BP has the potential to modulate leukocyte rolling and subsequent adhesion *in vivo*.

**sSiglec-5/C4BP prevents leukocyte recruitment in a TNF $\alpha$ -induced model of sterile inflammation.** We next addressed the question whether sSiglec-5/C4BP could modulate leukocyte recruitment in a sterile model of inflammation. To this end, mice were given vehicle or a single bolus of sSiglec-5/C4BP ( $0.8 \text{ mg/kg}$ ). Subsequently, the cremaster of male mice was prepared and a TNF $\alpha$ -releasing gel was placed on the cremaster muscle. Recruitment, rolling and adhesion of Syto59-labeled leukocytes was monitored over a 5-h period using intravital spinning-disk real-time confocal microscopy of the cremaster vasculature. This approach allowed the separate quantification of leukocyte recruitment in the vessels and in the surrounding tissues. In vehicle-treated mice, placement of the TNF $\alpha$ -gel resulted in a near immediate increase in leukocyte accumulation in the vessel wall, which lasted over a prolonged period of time (Fig. 7A). In addition, a marked infiltration of leukocytes into the tissue was observed starting 2 h after TNF $\alpha$ -stimulation, while fewer leukocytes extravasated upon



**Figure 3. Immunostaining of PSGL1 and Siglec-5 on human PBMCs.** *Panel A:* Purified human PBMCs were stained for PSGL1 and Siglec-5, and the number of positive cells was counted. Presented is the percentage positive cells of three independent experiments (mean  $\pm$  SD; n = 30-60 cells *per* experiment). *Panel B:* Confocal microscopy image of a representative staining of PBMCs for PSGL1 (green) and Siglec-5 (red). Objective 40x. Bar represent 5 micron. *Panel C:* Confocal microscopy analysis of a representative cell co-expressing PSGL1 (green) and Siglec-5 (red). Cell stack was reconstituted in orthoview to visualize co-localization of two signals. Arrows indicate areas of colocalization. Z-depth is 0.5  $\mu$ m, objective 63x. The pixel co-localisation heatmap was built using *Co-localization Threshold*-plugin Fiji Software. *Panels D-E:* Widefield microscopy images of a Duolink-PLA assay for PSGL1 and Siglec-5 incubated in the absence (*panel D*) or presence (*panel E*) of primary antibodies. Objective 40x. Bars represent 5 micron. For images in *panels B-D-E*, nuclei were counterstained with DAPI (blue).

sSiglec-5/C4BP treatment (Fig. 7A). We then quantified the fluorescent signal that was produced under both conditions over the 5-h period (integrated fluorescence intensity: IFI for 4 mice/condition and 4 vessels segments/mouse analyzed), and three values were compared: the IFI of the full microscopic field (Fig. 7B), the IFI of the vessels (Fig. 7C) or the IFI of the surrounding tissue (Fig. 7D). For each of these analyses, the total IFS over the 5-h period was significantly reduced for mice treated with sSiglec-5/C4BP compared to vehicle treated mice. These data point to a powerful anti-inflammatory potential of sSiglec-5/C4BP.



**Figure 4.** *In vitro* perfusion of THP1-cells. **Panel A:** THP1-cells were incubated with in the absence or presence of sialidase prior to perfusion over P-selectin-coated biochips. The number of rolling cells/microscopic field were determined and arbitrarily set at 100% for non-desialylated THP1-cells. P-value was determined in a two-tailed unpaired t-test. **Panel B:** THP1-cells were incubated in the absence or presence of soluble Siglec-5/Fc (sSg-5/Fc) or Siglec-7/Fc (sSg-7/Fc) prior to perfusion over VCAM1-coated biochips. Plotted is the number of adhering cells/microscopic field. **Panels C & D:** THP1-cells were incubated in the absence or presence of

soluble Siglec-5/Fc (sSg-5/Fc; 10  $\mu\text{g/ml}$ ) or Siglec-7/Fc (sSg-7/Fc; 10  $\mu\text{g/ml}$ ) prior to perfusion over E-selectin or P-selectin-coated biochips. Plotted is the number of rolling cells/microscopic field. P-values were determined in a 1-way ANOVA followed by Dunnett's test. *Panel D*: THP1-cells were incubated in the absence or presence of sSiglec-5/Fc or anti-PSGL1 antibodies prior to perfusion over P-selectin-coated biochips. Plotted is the number of rolling cells/microscopic field, with this number being set as 100% in the absence of sSiglec-5/Fc or anti-PSGL1 antibodies. P-value was calculated via multiple t-tests according to the Holm-Sidak method. *Panels F & G*: representative image-sequence over a 4-sec period of THP1-cells rolling over P-selectin in the absence (panel F) or presence (panel G) of sSiglec-5/Fc. For each image-sequence, six cells have been highlighted to visualize their movements over time. For panels A–E: data represent mean  $\pm$  SD of 3–5 perfusions. For each perfusion, a minimum of 3 fields were analyzed. All perfusions were performed at 0.5  $\text{dyn/cm}^2$ .

## Discussion

Siglecs are widely expressed in immune cells of hematopoietic origin, and it seems conceivable that they participate in the immune response. Siglec-5 is a well-characterized member of this family, and its expression pattern among leukocytes has been reported in detail. Flow cytometric analysis revealed that Siglec-5 is present on neutrophils, monocytes, and B-cells, but not on T-cells<sup>10,19</sup>. This study focused on the potential association between Siglec-5 and PSGL1. The latter protein is crucial for the initial recruitment of immune cells to the endothelial cells that line the vasculature, and its function relies on the presence of sialic acids covering its glycan structures<sup>2</sup>. The presence of these sialic acids makes PSGL1 a potential ligand for Siglecs. In the present study, we show that recombinant variants of PSGL1 and Siglec-5 interact in a calcium-ion and sialic acid-dependent manner. This interaction also occurs at the surface of circulating leukocytes that co-express PSGL1 and Siglec-5, given the co-localization we observed when analyzing PBMCs. Finally, soluble Siglec-5 interferes with interactions between PSGL1 and P-selectin *in vitro*, and displays strong anti-inflammatory activity *in vivo*.

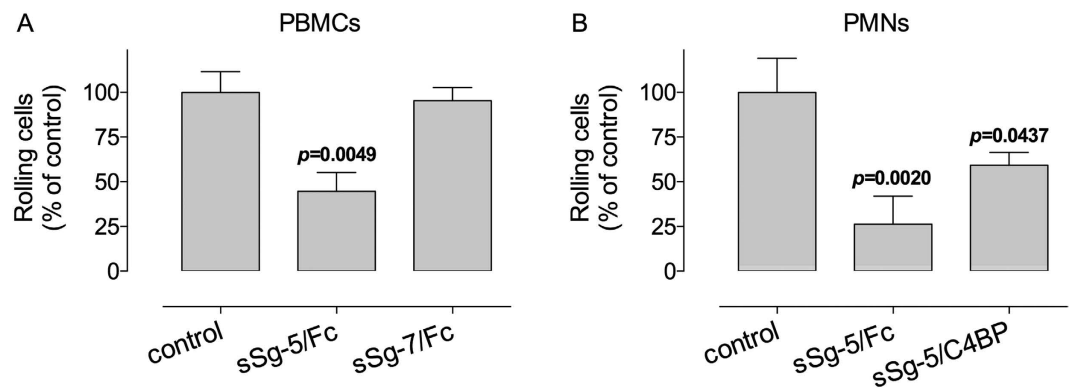
When analyzing PBMCs, we observed that about 50% of the cells express both Siglec-5 and PSGL1. This 50% corresponds to the potential Siglec-5-positive fraction (monocytes and B-cells) that is present in Ficoll-purified PBMCs<sup>19,20</sup>. Most likely, the Siglec-5 negative population corresponds to T-cells. Two distinct approaches were used to determine co-localization of both proteins at the cellular surface: classic immune-staining (Fig. 3C) and Duolink-PLA analysis (Fig. 3E). This latter approach generates red fluorescent spots if proteins are located within a range of 40 nm, a range compatible with a true co-localization of proteins.

In another set of experiments, we have tried to confirm the interaction between Siglec-5 and PSGL1 at the cell-surface via co-immunoprecipitation experiments. However, numerous attempts remained unsuccessful, and control experiments using purified proteins revealed that the denaturing conditions needed to free PSGL1 and/or Siglec-5 from the cellular membrane resulted in dissociation of the PSGL1/Siglec-5 complex. The technical limitations therefore prevented us to confirm the interaction of both proteins via this experimental approach.

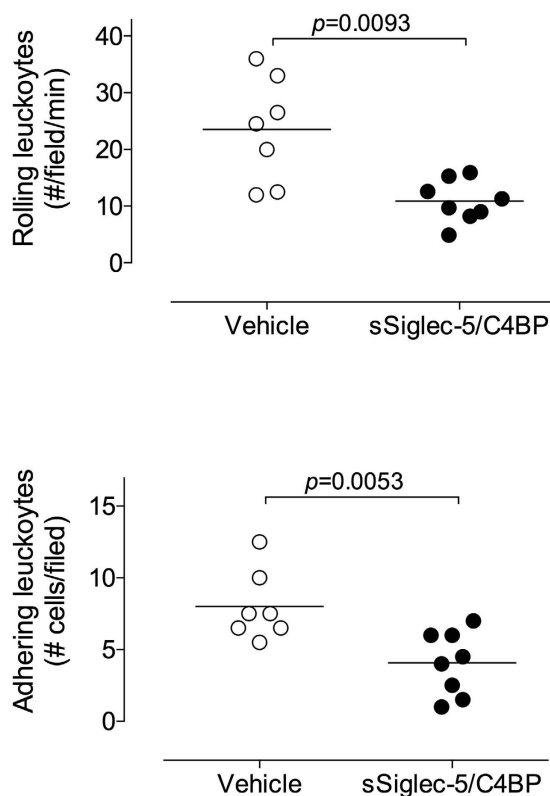
Despite the technical limitations of the immuno-precipitation, the notion that the ectodomains of PSGL1 and Siglec-5 interact was clearly demonstrated when using recombinant purified proteins. These experiments readily revealed a dose-dependent, saturable and specific interaction between both proteins (Fig. 2). Control experiments using inhibitory antibodies, EDTA and de-sialylated sPSGL1/Fc confirmed the specificity of the interaction (Fig. 2). The observation that de-sialylated sPSGL1/Fc displayed a strongly reduced binding to sSiglec-5/C4BP indicates that the interaction relies to a large extent on the sialic acids present on sPSGL1/Fc. This is in agreement with the majority of the ligands described for Siglec-5 in particular and the Siglec-family in general. However, it is important to mention that not all Siglec-5 ligands are bound in a sialic acid-dependent manner. For instance, Group B-streptococcus-protein and coagulation factor VIII have both been reported to interact with Siglec-5 without the need for sialic acids<sup>16,21</sup>. Our data do not exclude the possibility that the interaction between PSGL1 and Siglec-5 is of a mixed nature, involving both sialic acid-dependent and -independent types of interactions.

In the present study, we have not explored the physiological consequences of PSGL1 and Siglec-5 interacting at the cell-surface, as this will be part of a separate study. However, it is tempting to speculate on two issues in this regard. First, Siglecs, including Siglec-5, are generally known to associate with sialic acid-containing receptors at the cell-surface of under resting conditions, while unmasking these receptors upon cell stimulation<sup>22</sup>. It is possible that part of the PSGL1 molecules is associated with Siglec-5 under resting conditions, thereby masking the sialic acids of the PSGL1 glycans. Potentially this may prevent excessive premature leukocyte rolling. Upon leukocyte stimulation, Siglec-5 would then release PSGL1 to enhance PSGL1-mediated rolling. Second, it has been reported that leukocytes may produce soluble Siglec-5 variants<sup>11</sup>. Further, Biedermann and colleagues have found that plasma contains about 75 ng/ml of soluble Siglec-5, and amount that can increased 3–4 fold under pathological conditions<sup>23</sup>. It can not be excluded that increased levels of soluble Siglec-5 may modulate leukocyte rolling under these conditions.

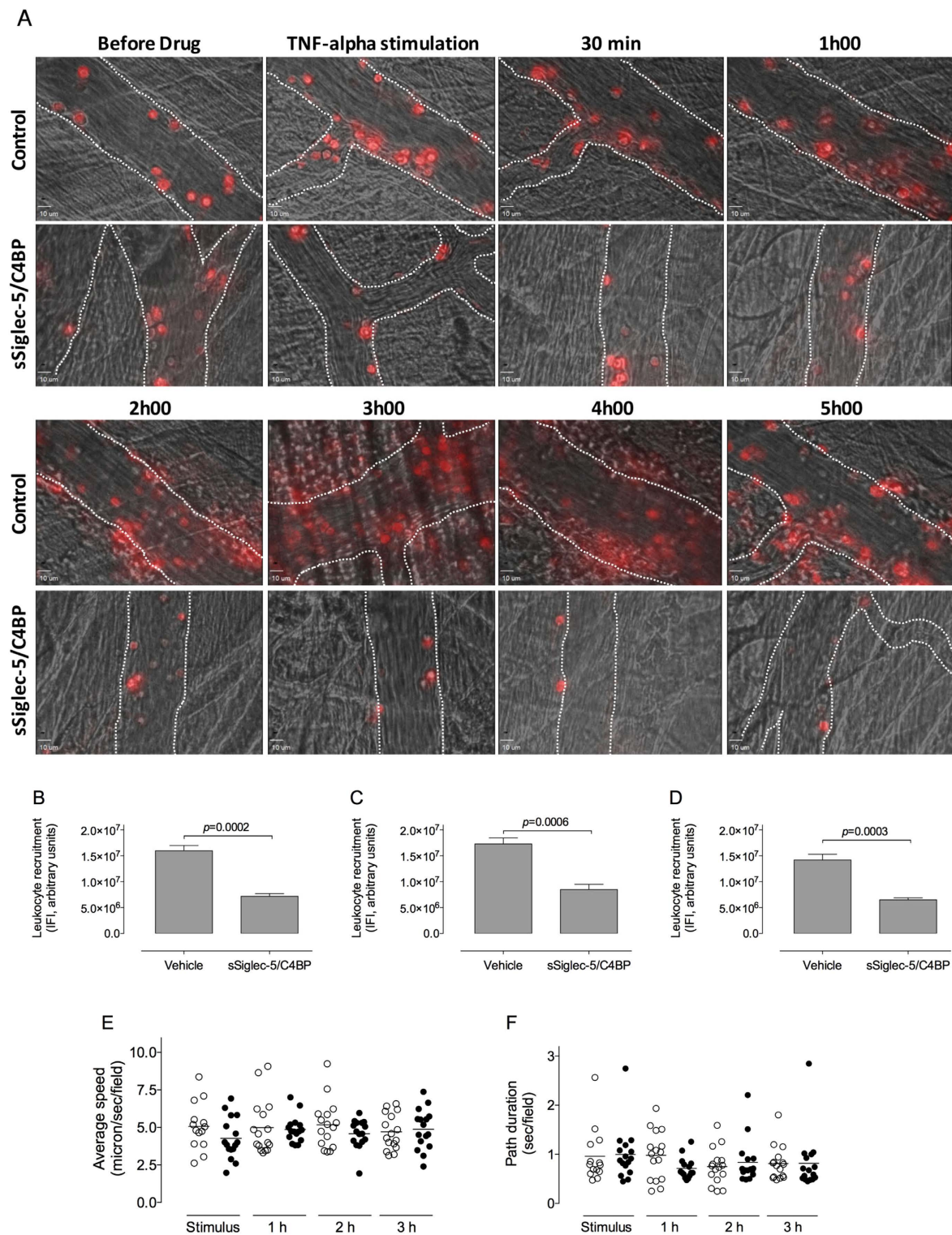
Instead of addressing the physiological consequences, we directed our investigations to explore the potential of soluble Siglec-5 variants to interfere with PSGL1-dependent leukocyte rolling. In preliminary experiments, we used a monomeric soluble Siglec-5 variant, which we have described previously<sup>16</sup>. Although interacting with PSGL1 (data not shown), it did so rather inefficiently. Indeed, glycan-protein interactions are often of relatively low affinity and increasing valency via clustering often improves the interaction efficiency<sup>24–26</sup>. To overcome this limitation, two variants were used in this study: a dimeric sSiglec-5/Fc variant and a heptameric sSiglec-5/C4BP variant. The heptameric variant was designed based on a report by Libyh and coworkers, who described a scFv anti-Rh(D) antibody fused to the 57-amino acid peptide motif of C4BP that mediates heptamerization of the protein<sup>18</sup>. Indeed, upon expression in HEK293-cells, the sSiglec-5/C4BP was efficiently secreted as a single multivalent protein (Fig. 1). For both sSiglec-5/Fc and sSiglec-5/C4BP, we were able to detect efficient binding to PSGL1 *in vitro* (Fig. 2).



**Figure 5. *In vitro* perfusion of primary leukocytes.** *Panel A:* Freshly isolated PBMCs were incubated with in the absence or presence of soluble Siglec-5/Fc (sSg-5/Fc; 10  $\mu$ g/ml) or Siglec-7/Fc (sSg-7/Fc; 10  $\mu$ g/ml) prior to perfusion over P-selectin-coated biochips. Perfusion was performed at 2 dyn/cm<sup>2</sup>. *Panel B:* Freshly isolated PMNs were incubated with in the absence or presence of soluble Siglec-5/Fc (sSg-5/Fc; 10  $\mu$ g/ml) or sSiglec-5/C4BP (sSg-5/C4BP; 10  $\mu$ g/ml) prior to perfusion over P-selectin-coated biochips. Perfusion was performed at 0.5 dyn/cm<sup>2</sup>. For both panels, the number of rolling cells/microscopic field were determined and arbitrarily set at 100% for the control in the absence of Siglecs. Data represent mean  $\pm$  SD of 3–4 perfusions. For each perfusion, a minimum of 3 fields were analyzed. P-values were determined in a 1-way ANOVA followed by Dunnett's test.



**Figure 6. Basal leukocyte rolling *in vivo*.** Leukocyte rolling in mesenteric venules (25–35 micron) was recorded via video-microscopy for 10 min. Videos were then analyzed for the number of rolling leukocytes (*panel A*) and the number of adhering leukocytes (defined as leukocytes adherent for at least 30 sec; *panel B*). *Panel A:* Each data point represents the average number of rolling cells/field/min for each mouse. For each mouse, 2–3 vessel segments were analyzed. *Panel B:* Each point represents the cumulative number of adherent cells per field over the 10 min observation period. For each mouse, 2 vessel segments were analyzed. Mice received either vehicle (open circles) or sSiglec-5/C4BP (0.8 mg/kg via injection in the lateral tail vein; closed circles). P-values were determined via a Mann-Whitney test.



**Figure 7. Involvement of sSiglec-5/C4BP in the kinetics of leukocyte recruitment during a sterile inflammation in mice.** Leukocytes were labeled with fluorescent dye Syto59. **Panel A:** Representative images depicting the course of leukocyte recruitment during a sterile inflammation over time in control mice or mice treated with sSiglec-5/C4BP (0.8 mg/kg via injection in the lateral tail vein). **Panels B-C-D:** The total Integral Fluorescent Intensity (IFI) over the 5-h observation period was quantified in control mice or in mice treated with Siglec-5. Data represent the IFI of the full microscopic field (panel B), the IFI of the vessels (panel C) or the IFI of the surrounding tissue (panel D). Plotted are mean  $\pm$  SEM from 4 mice *per* group and 4 vessels *per* mouse ( $n = 16$ ). P-values were determined using a two-tailed unpaired t-test. **Panels E & F:** the average rolling velocity (panel E) and path duration (panel F) were determined for each vessel segment of each mouse included in the study at 4 different time-points during the observation period. Each data point represents the mean of 3–4 cells.



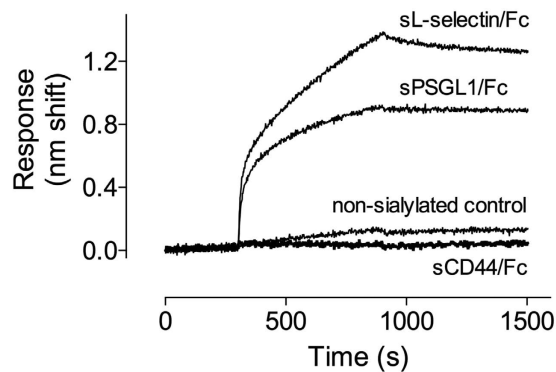
*In vitro* perfusion studies using human THP1-cells revealed that adhesion to VCAM1 was unaffected by sSiglec-5/Fc at a dose of 20 µg/ml (Fig. 4). The notion that THP1-cells were able to adhere to VCAM1 was perhaps surprising. However, the shear rates used in these particular experiments were relatively low (0.5 dyn/cm<sup>2</sup>). Moreover, resting THP1-cells express the VCAM1-ligand  $\alpha 4/\beta 1$ , and previous studies have shown that part of these  $\alpha 4/\beta 1$  molecules is in its activated conformation<sup>27</sup>. We anticipate that the presence of  $\alpha 4/\beta 1$  in its active conformation in combination with the low shear is compatible with the direct adhesion of the THP1-cells to VCAM1.

In contrast to the adhesion to VCAM1, rolling on E- and P-selectin was reduced by about 2-fold in the presence of a similar dose of sSiglec-5/Fc (Fig. 4). This effect seemed specific for Siglec-5, as another member of the Siglec-family, Siglec-7, was unable to reduce rolling of THP1-cells on both selectins. Furthermore, sSiglec-5/Fc-mediated inhibition was dose-dependent and to a large extent similar to that of anti-PSGL1 antibodies (Fig. 4). However, at higher doses (50 µg/ml), sSiglec-5/Fc was more efficient than anti-PSGL1 antibodies in reducing THP1-cell rolling. One possibility is that at these concentrations, sSiglec-5/Fc also interferes with the adhesion of another P-selectin ligand. A potential candidate is ESL-1, which is expressed on THP1-cells and it binds to P-selectin in a glycan-dependent manner<sup>28,29</sup>. The specificity of sSiglec-5/Fc was not limited to THP1-cells, but this soluble protein also reduced rolling of primary leukocytes, both PBMCs and PMNs (Fig. 5). Furthermore, not only sSiglec-5/Fc but also its heptameric variant sSiglec-5/C4BP reduced rolling of PMNs *in vitro* (Fig. 5). Of note, a shear stress of 0.5 dyn/cm<sup>2</sup> was used in most of the perfusion assays. Although relatively weak compared to the shear stress present in post-capillary venules (minimum 2.8 dyn/cm<sup>2</sup>, with an average of 15 dyn/cm<sup>2</sup>), 0.5 dyn/cm<sup>2</sup> has been used in other studies concerning the rolling of leukocytes over P-selectin as well<sup>30,31</sup>. Lawrence and coworkers have reported that 0.5 dyn/cm<sup>2</sup> represents the actual lower threshold to enhance rolling on P-selectin<sup>31</sup>. Nevertheless, to ensure that sSiglec-5 is also effective at higher shear stress, perfusion experiments using PBMCs were performed at 2 dyn/cm<sup>2</sup> and also under these conditions rolling was reduced in the presence of sSiglec-5/Fc (Fig. 5A). Thus, it seems likely that sSiglec-5/Fc is indeed able to interfere with P-selectin/PSGL1 interactions.

To test its *in vivo* potential to modulate leukocyte behavior, we initially examined leukocyte rolling under basal conditions using a single dose of sSiglec-5/C4BP. In each of the 8 mice that received sSiglec-5/C4BP, the number of rolling leukocytes was significantly reduced compared to control mice (Fig. 6). We considered the possibility that the effect of sSiglec-5/C4BP would fade out during the examination period. However, similar differences between sSiglec-5/C4BP-receiving and control mice were observed in vessels examined at the start and at the end of a session, which routinely be separated by 20–40 minutes. It should be noted that the reduced rolling is less pronounced than observed in the *in vitro* experiments. This could be due to sSiglec-5/C4BP interacting with other sialylated proteins present in the vascular system, and higher doses of sSiglec-5/C4BP could be used to bypass this restriction. We also considered the option to use a murine variant of Siglec-5 to this end, as it may provide higher specificity for murine ligands. However, human Siglec-5 is not well conserved between species, and no appropriate murine counterpart is available<sup>32</sup>. Interestingly, we also observed that sSiglec-5/C4BP reduced the number of adherent cells (Fig. 6B). PSGL1-dependent rolling over P-selectin is known to induce the Syk-mediated signaling pathway, resulting in activation of LFA-1<sup>33</sup>. This allows LFA-1 to interact with its counter-receptor ICAM-1, thereby facilitating firm adhesion of the leukocytes. By blocking PSGL1/P-selectin interactions, sSiglec-5 may prevent the activation of LFA-1, and consequently reduce firm adhesion.

The therapeutic potential of sSiglec-5/C4BP was examined in a sterile model of inflammation, in which the inflammatory response is triggered by contact with a TNF $\alpha$ -containing gel. Real-time video monitoring over a 5-h period allowed us to visualize and quantify the full process of leukocyte recruitment and extravasation. The exteriorization of cremaster muscle for 5 h may potentially induce inflammation. However, similar to models described by others<sup>34–36</sup>, the cremaster muscle is superfused with thermocontrolled bicarbonate-buffer solution, which efficiently suppresses the development of a spontaneous inflammatory response. Indeed, while validating this model, no inflammation was observed when the cremaster muscle was exposed to a control gel (agarose/PBS) during at least 5 h. Therefore, the inflammatory response observed is selectively due to the presence of TNF $\alpha$  in the gel. A second potential point of concern is that blood flow may decrease during the 5-h anesthesia. Although not quantified using a blood flow-probe, we could observe blood flow in real-time in the intra-vital setting. We did not observe marked differences in blood flow over time in the mice that were included in the data analysis. We further chose to use the TNF $\alpha$ /agarose gel rather than to inject TNF $\alpha$  intra-scrotum (i.s.). The main reason to do so, is that following i.s. injection, it takes approximately 4 h before the effects of TNF $\alpha$  become visible<sup>37,38</sup>. By applying the TNF $\alpha$ /agarose gel, also the early steps in the inflammatory response can be monitored<sup>34</sup>.

As compared to vehicle-treated mice, the recruitment of leukocytes was strongly reduced in mice that received sSiglec-5/C4BP (Fig. 7), confirming that this protein may interfere with the interaction between PSGL1 and selectins. It was surprising, however, that the effect of sSiglec-5/C4BP persisted over the full 5-h observation period. Indeed, deficiency of PSGL1 in mice is associated with a reduced leukocyte recruitment at the early stage (2 h) of the inflammatory process, but was only minimally abnormal at the later timepoints<sup>6</sup>. In contrast, mice that have a double deficiency of P- and E-selectin have a severe impairment of leukocyte recruitment over a prolonged period of time<sup>39,40</sup>. The results we obtain with sSiglec-5/C4BP mimic to some extent the combined deficiency of P- and E-selectin, with a defect over a prolonged timescale. This suggests that the effects of sSiglec-5/C4BP are not limited to P-selectin/PSGL1 interactions, but have a wider impact. This seems compatible with the observation that sSiglec-5/Fc also interfered with the rolling of THP1-cells over E-selectin (Fig. 4C). Moreover, sSiglec-5/Fc reduced leukocyte rolling on P-selectin to a larger extent compared to anti-PSGL1 antibodies (Fig. 4E). Apparently, Siglec-5 is able to interact with a wider range of sialic acid-containing proteins involved in the inflammatory response. One possible option in this regard is that sSiglec-5/C4BP interferes with the adhesion mediated by the L-selectin axis, given that sL-selectin/Fc displayed efficient binding to sSiglec-5/C4BP in preliminary experiments (Fig. 8). L-selectin is a sialylated protein, and human L-selectin has been described as a ligand for E-selectin but not P-selectin<sup>41</sup>. Interestingly, de-sialylation of L-selectin coincides with a loss of binding to



**Figure 8. Interaction between sSiglec-5/C4BP and different adhesion proteins.** Interaction between sSiglec-5/C4BP and sPSGL1/Fc, sL-selectin/Fc and sCD44/Fc was examined using BLI-analysis. sSiglec-5/Fc (10 µg/ml) was immobilized onto amine-reactive biosensors and incubated with a single concentration (10 µg/ml) of sPSGL1/Fc, sL-selectin/Fc and sCD44/Fc. A non-sialylated bacterial protein was used as negative control. A representative sensorgram (of three independent measurements) is plotted, showing the response (nm shift) versus time.

E-selectin<sup>41</sup>. It is possible therefore that sSiglec-5 binding may interfere with the L-selectin/E-selectin interaction. In parallel, sSiglec-5 binding to PSGL1 may prevent the association between PSGL1 and L-selectin as well. In contrast, no interaction between sSiglec-5/C4BP and the E-selectin ligand CD44 could be detected.

Irrespective of its precise mode of function, our *in vivo* data suggest a potent anti-inflammatory action by sSiglec-5/C4BP. In recent years, many pathological processes have been described to be dependent on the PSGL1/P-selectin pathway, including atherosclerosis<sup>42</sup>, venous thrombosis<sup>43</sup>, acute lung injury<sup>44</sup>, tumor metastasis<sup>45</sup>, and viral infections<sup>46,47</sup>. It would therefore be of interest to further explore the potential beneficial effects of sSiglec-5/C4BP in other pathological conditions.

## Material and Methods

**Ethics statement.** *Mice.* Housing and experiments of mice were done in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. Animal experiments were approved by the local ethical committees of Paris-Sud (Comité d'éthique en experimentation animale n° 26) and Aix-Marseille University (Comité d'éthique en experimentation animale n° 14) under numbers 201507271259485 and 43-17102012, respectively.

*Human subjects.* Blood was obtained from healthy volunteers via the local blood donor service of the University Hospital Bicetre (CHU-Bicetre), approval of which was provided by the Institutional Review Board of CHU-Bicetre. All participants gave informed consent for the sampling of blood for scientific purposes *per* the Declaration of Helsinki. Experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

**Proteins.** Recombinant soluble Siglec-5 fused to human Fc (sSiglec-5/Fc; cat# 1072-SL, produced in mouse myeloma cell-line NS0), human and murine soluble recombinant PSGL1 fused to human Fc (sPSGL1/Fc; cat# 3345-PS & cat# 7407-PS), recombinant P-selectin (P-selectin; cat# ADP3), VCAM1 (cat# ADP5), soluble recombinant human L-selectin fused to human Fc (sL-selectin/Fc; cat# 728-LS), soluble recombinant human CD44 fused to human Fc (sCD44/Fc; cat# 3660-CD), polyclonal goat-anti Siglec-5 antibodies (cat# AF1072 & BAF1072), and monoclonal mouse anti-Siglec 5 antibody (cat# MAB10721) were all obtained from R&D Systems (Lille, France). Monoclonal mouse anti-PSGL1-antibody (cat# 556052) was from BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Monoclonal mouse anti-P-selectin-antibody (cat# 14-0628) was from eBioscience (Paris, France). Peroxidase-labeled polyclonal goat-anti-mouse IgG (cat# P0447) was from Dako (Les Ulis, France). Cy3-labeled donkey anti-goat-antibodies (cat# ab6949) were from Abcam (Paris, France). AlexaFluor488-labeled donkey anti-mouse-antibodies (cat# A-21202) were from ThermoFisher Scientific (Illkirch, France). A fusion protein consisting of the Siglec-5 ectodomain (residues 17–434), residues 541–597 from C4b-binding protein (C4BP) and the epitope recognized by antibody HPC4 (designated sSiglec-5/C4BP; Fig. 1) was produced in HEK293-cells and purified via HPC4-mediated immune-affinity chromatography similarly as described<sup>16</sup>. Both purified sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc were homogeneous as assessed via SDS-PAGE and Coomassie-staining (Fig. 1; see also Supplementary Fig. S1). Bovine serum albumin (BSA) and sialidase were from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

**Peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells.** Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and polymorphonuclear cells (PMNs) were freshly isolated from blood obtained from healthy volunteers by Ficoll-Plaque density centrifugation. Eventual contaminating erythrocytes were removed by incubation with ice-cold lysis buffer (0.155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 7.4 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA, pH7.4). Cells were resuspended in Hank's buffered salt solution (Gibco Life Technologies, Saint Aubin, France).

**Immunostaining.** Purified PBMCs were fixed in solution with paraformaldehyde (4%) and dried on glass coverslips. Cells were re-hydrated with phosphate-buffered saline (PBS) and further permeabilized via incubation with PBS supplemented with 0.05% Tween-20 (PBS-T) and Triton X-100 (0.1%) for 10 min at room temperature. Coverslips were blocked with PBS-T containing 5% BSA for 30 min at room temperature. Cells were incubated with primary antibodies (polyclonal anti-Siglec-5 and monoclonal anti-PSGL1 antibodies). Bound antibodies were probed with Cy3-labeled donkey anti-goat antibodies and AlexaFluor488-labeled donkey anti-mouse antibodies, respectively. Nuclei were counterstained with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) and coverslips were mounted in ProlongGold antifade reagent (ThermoFisher Scientific).

For Duolink experiments to detect close proximity between PSGL1 and Siglec-5, a similar double immunostaining was performed with the secondary antibodies replaced by secondary PLA-probes from the Duolink kit (Sigma Aldrich). The remainder of the protocol was conducted according to the manufacturer's recommendations and the orange (555 nm wavelength) detection kit was used. Hybridization between the two PLA plus and minus probes leading to fluorescent signal only occurs when the distance between the two antigens is less than 40 nm.

**Microscopic analysis.** Widefield microscopy images were acquired on an AxioImager A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and an Eclipse E600 (Nikon, Japan). Confocal microscopy analysis images were acquired on a LSM700 (Carl Zeiss) and cell stacks were further deconvolved using Huygens software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands). Images were analyzed using ImageJ software.

**Immunosorbent assays.** sPSGL1/Fc (0.25  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) was adsorbed to microtiter wells in 50 mM  $\text{NaCO}_3$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  (pH9.6) overnight at 4 °C. Unoccupied sites were blocked in Tris-buffered saline with 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% Tween-20, and 3% BSA for 2 h at 37 °C. Wells were incubated with various concentrations of sSiglec-5/C4BP or sSiglec-5/Fc (0–4  $\mu\text{M}$ ). Bound sSiglec-5 was probed using biotin-labeled polyclonal goat anti-Siglec-5 antibodies and peroxidase-labeled streptavidin and detected via hydrolysis of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, ThermoFisher Scientific). Optical density (OD) was measured at 450 nm, and OD-values were corrected for OD-values obtained for the binding of sSiglec-5 to non-coated wells, which represented <10% of the OD-values. In control experiments, immobilized sPSGL1/Fc was incubated with sSiglec-5 (0.6  $\mu\text{M}$ ) in the presence of polyclonal anti-Siglec-5 antibodies (6  $\mu\text{M}$ ) or EDTA (5 mM). In other experiments, immobilized sPSGL1/Fc was incubated with P-selectin in the absence or presence of EDTA (5 mM). Bound P-selectin was probed using a monoclonal mouse anti-P-selectin antibody and detected using peroxidase-labeled polyclonal goat-anti mouse IgG antibodies.

**Biolayer interferometry analysis.** In complementary experiments, binding of sPSGL1/Fc to immobilized sSiglec-5/C4BP was determined via biolayer-interferometry (BLI)-analysis using Octet-QK equipment. First, sPSGL1/Fc (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was immobilized onto amine-coupling biosensors and unoccupied sites were quenched via incubation with ethanolamine. sPSGL1/Fc-coated biosensors were incubated with various concentrations of sSiglec-5/C4BP (0–20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in octet-buffer (20 mM Hepes, 50 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH7.0) and association was monitored for 10 min. Subsequently, sensors were transferred to wells containing octet-buffer for 10 min in order to allow dissociation of the complex. In another set of experiments, immobilized sPSGL1 was pre-incubated with sialidase (0.01 U/ml) before incubation with sSiglec-5/C4BP or P-selectin (both 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). In complementary binding experiments, sSiglec-5/C4BP (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was immobilized onto amine-coupling biosensors and incubated with sPSGL1/Fc, sL-selectin/Fc, sCD44/Fc (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). A non-sialylated bacterial protein was used as negative control.

**In vitro perfusion assays.** *In vitro* perfusions were performed using a camera-equipped Venaflux-Microfluidic platform, allowing real-time video-monitoring. Perfusions were performed using THP1 cells (which express both PSGL1 and Siglec-5<sup>10,48</sup>) or primary leukocytes. Perfusions were performed using the VenaFlux-perfusion system (Cellix Ltd, Dublin, Ireland) or an in-house developed perfusion system<sup>49</sup>. Biochips were coated with E-selectin, P-selectin or VCAM1 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and exposed to PSGL1-expressing cells, which were perfused at a shear of 0.5  $\text{dyn}/\text{cm}^2$  or 2  $\text{dyn}/\text{cm}^2$ . Where indicated, perfusions were performed in the presence of competing proteins (10–50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Perfusions over BSA- or polyvinylpyrrolidone blocked biochips were used as a control, revealing that rolling and adhesion was less than 5% compared to E-selectin, P-selectin or VCAM1-coated biochips, respectively. Three images of different fields taken at approximately 100s after initiation of the perfusion were used for analysis in all cases.

**Basal leukocyte rolling *in vivo*.** Female wild-type C57Bl/6 mice (aged 3–4 weeks) received a single intravenous injection of sSiglec-5/C4BP (0.8 mg/kg) or vehicle in the tail vein. Infusion of sSiglec-5/C4BP had no effect on blood counts, as assessed in 12 mice given vehicle (n = 6) or sSiglec-5/C4BP (n = 6). Leukocyte-counts were  $2.8 \pm 0.8 \times 10^3$  and  $2.8 \pm 0.5 \times 10^3$  cells/ $\mu\text{l}$ , respectively. Also red blood counts ( $7.5 \pm 0.4 \times 10^6$  and  $7.0 \pm 1.1 \times 10^6$  cells/ $\mu\text{l}$ ) and platelet counts ( $920 \pm 290 \times 10^3$  and  $833 \pm 189 \times 10^3$  platelets/ $\mu\text{l}$ ) were similar for both groups. The mesenteric vessels of ketamine/xylazine-anesthetized mice were exteriorized (a procedure that takes routinely about 15 min) and exposed venules (25–35 micron) were recorded via video-microscopy for 10 min. Per mouse, 2–3 vessels were monitored. Video-images were then analyzed in a blinded fashion for the number of rolling leukocytes and for the number of adhering leukocytes (defined as adhering for >30 sec).

**Preparation of TNF $\alpha$ -containing gel.** Agarose (0.4 g) was diluted in 10 ml of distilled water and heated in a microwave until agarose dissolution was observed (routinely: 1.5 min at 800 W). A volume of 10 ml 2xPBS was warmed and mixed with the agarose-solution to reach a final agarose concentration of 2%. Recombinant murine TNF $\alpha$  (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France) was added to 90  $\mu\text{l}$  of the agarose-solution to a final concentration of 0.32 nM. The gel was kept at 4 °C until use.

**In vivo model for TNF $\alpha$ -induced inflammation.** Ketamine/xylazine/atropine anesthetized male wild-type C57Bl/6 mice (aged 5 weeks) were cannulated in the jugular vein, and the trachea was intubated to facilitate spontaneous respiration by the mouse. After the scrotum was incised, the testicle and surrounding cremaster muscle were exteriorized. Routinely, this procedure lasts about 20 min. Mice were given the fluorescent dye Syto59 to label leukocytes, and subsequently sSiglec-5/C4BP was applied (0.8 mg/kg) via a single injection through a cannula placed in the jugular vein. Syto59 was used for the staining of neutrophils for two reasons. First, to facilitate the quantitative analysis of leukocyte recruitment and extravasation of 4 vessel segments *per* mouse in parallel. Second, by analyzing the fluorescent signal it is possible to distinguish between leukocytes present in the blood vessel and extravasated leukocytes. By using brightfield illumination, it would be difficult to monitor leukocyte movements in the extravascular space over a 5-h period.

Ten minutes after injection of the protein, a 1-mm<sup>3</sup> piece of TNF $\alpha$ -containing 2% agarose gel was deposited on a preselected avascular area of the cremaster. Microvessels were observed using an Olympus BX61 WI microscope with a 40 $\times$  NA water immersion objective. Digital images were captured using a Cooke Sensicam CCD camera in 640  $\times$  480-pixel format using an intravital optical system with spinning disk confocal microscopy. All experiments were performed using at least 3 mice, and at least 4 venules of 20–40 micron were selected for analysis in each mouse. The fluorescence intensity, corresponding to the leukocyte recruitment in the vessel or in the tissue, was determined with the software Slidebook 5.5 (Intelligent Imaging Innovations, Göttingen, Germany).

**Statistics.** Single comparisons were performed using two-tailed unpaired t-test or the Mann-Whitney test. Multiple comparisons were performed using 1-way ANOVA followed by Dunnett's test or Tukey's test. Differences were considered significant at *p*-values below 0.05.

## References

- Muller, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* **82**, 521–533 (2002).
- Moore, K. L. *et al.* Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* **118**, 445–456 (1992).
- Sako, D. *et al.* Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* **75**, 1179–1186 (1993).
- Moore, K. L. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* **128**, 661–671 (1995).
- Zarbock, A., Ley, K., McEver, R. P. & Hidalgo, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* **118**, 6743–6751 (2011).
- Yang, J. *et al.* Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* **190**, 1769–1782 (1999).
- Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, S. H. & Crocker, P. R. Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* **209**, 199–207 (2004).
- Jandus, C., Simon, H. U. & von Gunten, S. Targeting siglecs—a novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy. *Biochem Pharmacol* **82**, 323–332 (2011).
- Brinkman-Van der Linden, E. C. & Varki, A. New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem* **275**, 8625–8632 (2000).
- Cornish, A. L. *et al.* Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. *Blood* **92**, 2123–2132 (1998).
- Connolly, N. P., Jones, M. & Watt, S. M. Human Siglec-5: tissue distribution, novel isoforms and domain specificities for sialic acid-dependent ligand interactions. *Br J Haematol* **119**, 221–238 (2002).
- Zhuravleva, M. A., Trandum, K. & Sun, P. D. Structural implications of Siglec-5-mediated sialoglycan recognition. *J Mol Biol* **375**, 437–447 (2008).
- Erickson-Miller, C. L. *et al.* Characterization of Siglec-5 (CD170) expression and functional activity of anti-Siglec-5 antibodies on human phagocytes. *Exp Hematol* **31**, 382–388 (2003).
- Avril, T., Freeman, S. D., Attrill, H., Clarke, R. G. & Crocker, P. R. Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation. *J Biol Chem* **280**, 19843–19851 (2005).
- Jones, C., Virji, M. & Crocker, P. R. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol Microbiol* **49**, 1213–1225 (2003).
- Pegon, J. N. *et al.* Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* **97**, 1855–1863 (2012).
- Rapoport, E. M., Sapot'ko, Y. B., Pazynina, G. V., Bojenko, V. K. & Bovin, N. V. Sialoside-binding macrophage lectins in phagocytosis of apoptotic bodies. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 330–338 (2005).
- Libyh, M. T. *et al.* A recombinant human scFv anti-Rh(D) antibody with multiple valences using a C-terminal fragment of C4-binding protein. *Blood* **90**, 3978–3983 (1997).
- Corkum, C. P. *et al.* Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and standard density gradient. *BMC Immunol* **16**, 48 (2015).
- Llinas, L. *et al.* Expression profiles of novel cell surface molecules on B-cell subsets and plasma cells as analyzed by flow cytometry. *Immunol Lett* **134**, 113–121 (2011).
- Carlin, A. F. *et al.* Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J Exp Med* **206**, 1691–1699 (2009).
- Crocker, P. R., Paulson, J. C. & Varki, A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**, 255–266 (2007).
- Biedermann, B., Gil, D., Bowen, D. T. & Crocker, P. R. Analysis of the CD33-related siglec family reveals that Siglec-9 is an endocytic receptor expressed on subsets of acute myeloid leukemia cells and absent from normal hematopoietic progenitors. *Leuk Res* **31**, 211–220 (2007).
- Varki, A. Natural ligands for CD33-related Siglecs? *Glycobiology* **19**, 810–812 (2009).
- Dam, T. K. & Brewer, C. F. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. *Biochemistry* **47**, 8470–8476 (2008).
- Crocker, P. R. & Varki, A. Siglecs in the immune system. *Immunology* **103**, 137–145 (2001).
- Ferreira, A. M., Isaacs, H., Hayflick, J. S., Rogers, K. A. & Sandig, M. The p110delta isoform of PI3K differentially regulates beta1 and beta2 integrin-mediated monocyte adhesion and spreading and modulates diapedesis. *Microcirculation* **13**, 439–456 (2006).
- Yamamoto, H. *et al.* E-selectin ligand-1 (ESL-1) is a novel adiponectin binding protein on cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* **470**, 425–430 (2016).

29. Zollner, O. & Vestweber, D. The E-selectin ligand-1 is selectively activated in Chinese hamster ovary cells by the alpha(1,3)-fucosyltransferases IV and VII. *J Biol Chem* **271**, 33002–33008 (1996).
30. Xia, L. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest* **109**, 939–950 (2002).
31. Lawrence, M. B., Kansas, G. S., Kunkel, E. J. & Ley, K. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L, P, E). *J Cell Biol* **136**, 717–727 (1997).
32. Macauley, M. S., Crocker, P. R. & Paulson, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* **14**, 653–666 (2014).
33. Miner, J. J. *et al.* Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood* **112**, 2035–2045 (2008).
34. Cara, D. C., Kaur, J., Forster, M., McCafferty, D. M. & Kubes, P. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis *in vivo*. *J Immunol* **167**, 6552–6558 (2001).
35. Darbousset, R. *et al.* Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* **120**, 2133–2143 (2012).
36. Darbousset, R. *et al.* P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* **124**, 2575–2585 (2014).
37. Sarraj, M. A. *et al.* Fetal testis dysgenesis and compromised Leydig cell function in Tgfr3 (beta glycan) knockout mice. *Biol Reprod* **82**, 153–162 (2010).
38. Yago, T. *et al.* Blocking neutrophil integrin activation prevents ischemia-reperfusion injury. *J Exp Med* **212**, 1267–1281 (2015).
39. Frenette, P. S., Mayadas, T. N., Rayburn, H., Hynes, R. O. & Wagner, D. D. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* **84**, 563–574 (1996).
40. Maly, P. *et al.* The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* **86**, 643–653 (1996).
41. Zollner, O. *et al.* L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin. *J Cell Biol* **136**, 707–716 (1997).
42. Dong, Z. M., Brown, A. A. & Wagner, D. D. Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* **101**, 2290–2295 (2000).
43. von Bruhl, M. L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo*. *J Exp Med* **209**, 819–835 (2012).
44. Mulligan, M. S. *et al.* Neutrophil-dependent acute lung injury. Requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest* **90**, 1600–1607 (1992).
45. Laubli, H. & Borsig, L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* **20**, 169–177 (2010).
46. Lin, H. Y. *et al.* Caveolar endocytosis is required for human PSGL-1-mediated enterovirus 71 infection. *J Virol* **87**, 9064–9076 (2013).
47. Gaunitz, S., Liu, J., Nilsson, A., Karlsson, N. & Holgersson, J. Avian influenza H5 hemagglutinin binds with high avidity to sialic acid on different O-linked core structures on mucin-type fusion proteins. *Glycoconj J* **31**, 145–159 (2014).
48. van Genderen, H., Wielders, S. J., Lindhout, T. & Reutelingsperger, C. P. Rolling and adhesion of apoptotic monocytes is impaired by loss of functional cell surface-expressed P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Thromb Haemost* **4**, 1611–1617 (2006).
49. Pendu, R. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood* **108**, 3746–3752 (2006).

## Acknowledgements

The study was financially supported by a PhD-research grant from Insitut Servier & Association Nationale de la Recherche Technique (Contrat CIFRE) to JPe, and an Inserm-Poste d'Accueil-grant (# ASC13101LSA) to MP.

## Author Contributions

M.P., S.M., J. Pe., V.M., A.B., F.A. and E.P.B. performed experiments; V.P. provided valuable reagents; A.R., J. Pa., L.P.-D., O.D.C., C.D., P.J.L. & C.V.D. supervised the study and analyzed data; O.D.C., P.J.L., C.V.D. conceived the study. P.J.L. wrote the manuscript; All authors contributed to the editing of the draft manuscript and approved the final version.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** J. Pa and A. R. are employees of Servier; they do not hold stocks or stock-options of this company. All other authors declare no conflict of interest.

**How to cite this article:** Pepin, M. *et al.* Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity. *Sci. Rep.* **6**, 37953; doi: 10.1038/srep37953 (2016).

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

## Supplementary information

### **Soluble Siglec-5 associates to PSGL-1 and displays anti-inflammatory activity**

Marion Pepin<sup>1</sup>, Soraya Mezouar<sup>2</sup>, Julie Pegon<sup>1</sup>, Vincent Muczynski<sup>1</sup>, Frédéric Adam<sup>1</sup>, Elsa P. Bianchini<sup>1</sup>, Amine Bazaa<sup>1</sup>, Valerie Proulle<sup>1,3</sup>, Alain Rupin<sup>4</sup>, Jerome Paysant<sup>5</sup>, Laurence Panicot-Dubois<sup>2</sup>, Olivier D. Christophe<sup>1</sup>, Christophe Dubois<sup>2</sup>, Peter J. Lenting<sup>1</sup>, Cécile V. Denis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR\_S 1176, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>2</sup>Aix Marseille Université, Inserm UMR\_S 1076, (VRCM) Vascular Research Center of Marseille, 13385 Marseille, France

<sup>3</sup>Department of Biological Hematology, CHU Bicetre, Hopitaux Universitaires Paris Sud, AP-HP, Paris, France

<sup>4</sup>Institut de Recherche International Servier, Recherche Translationnelle et Clinique Oncologie, 92150, Suresnes, France

<sup>5</sup>Institut de Recherches Servier, Unité de Recherche et de Découverte Cardiovasculaire, 92150, Suresnes, France

#### Correspondence

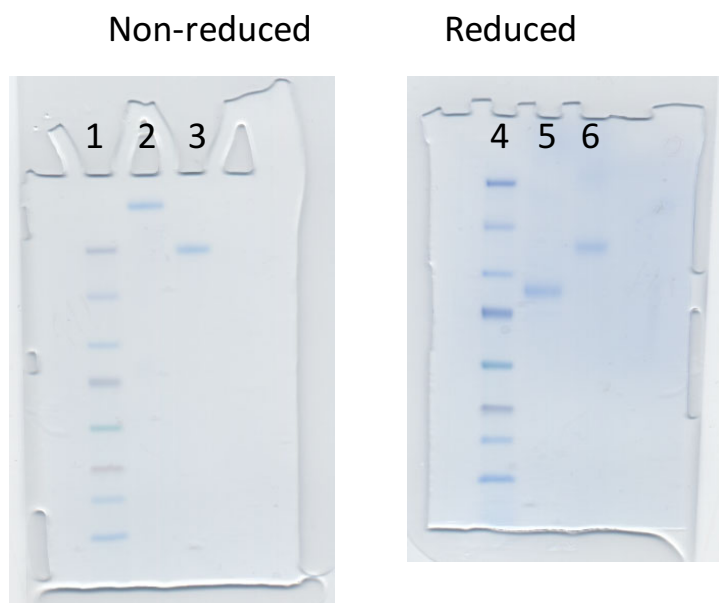
Dr. P.J. Lenting

Inserm U1176, 80 rue du General Leclerc, 94270 Le Kremlin-Bicetre, France

Tel: +331 49 59 56 51; Fax: +331 46 71 94 72

Email: peter.lenting@inserm.fr

**Supplementary Figure 1:**



**Legend to Fig. S1:** Analysis of purified sSiglec-5/C4BP and sSiglec-5/Fc via SDS-Page and Coomassie-staining under non-reduced and reduced conditions. Images represent whole gels before cropping and conversion into black & white images (as how they are presented in Fig. 1). Lanes 1 & 4: molecular weight markers; lanes 2 & 5: sSiglec-5/C4BP; lanes 3 & 6: sSiglec-5/Fc.

## **DISCUSSION**





## A/ Cancer et thrombose

Les événements thromboemboliques veineux tels que thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire, représentent la seconde cause de décès chez les patients atteints de cancer. Une thromboprophylaxie permet de réduire ce risque, mais comporte un risque hémorragique. L'identification des patients atteints de cancer les plus à risque d'EDEV est essentielle afin d'optimiser le rapport bénéfice/risque d'une thromboprophylaxie.

Dans ce travail, nous avons étudié des paramètres biologiques qui pourraient avoir un rôle prédictif des thromboses dans le cancer, et apporté un éclairage nouveau sur les mécanismes physiopathologiques de ce processus.

Nous avons élaboré une étude cas-témoins incluant 160 patients atteints de cancer évolué. Nos résultats montrent que les taux de VWF sont significativement plus élevés chez les patients qui feront un EDEV dans les 6 mois après le prélèvement, par rapport aux patients atteints de cancer de même site, de même stade et de même âge et qui ne feront pas d'EDEV durant le même temps. En revanche, les taux de l'activité de sa protéase ADAMTS13 ne sont pas significativement différents entre ces 2 groupes de patients. Néanmoins, ce dernier paramètre permet d'améliorer les capacités prédictives des scores existants.

### *Amélioration d'un score prédictif*

Lorsque nous appliquons le score de Khorana aux patients de notre étude lors de leur inclusion, la prédiction obtenue est médiocre. Nous avons en effet établi une courbe ROC (« Receiver operating characteristic ») qui permet d'évaluer la sensibilité d'un test par rapport à sa spécificité et donc ses capacités discriminantes. L'aire sous la courbe ROC est proche de 0,5 dans notre population, ce qui signifie que la prédiction du score de Khorana ne dépasse pas le hasard. Une hypothèse pour expliquer ce résultat est la différence entre les critères d'inclusion dans l'étude de Khorana *et al.* (Cancer quel que soit le stade ou le type, hémopathies incluses, initiation de chimiothérapie) et dans l'étude de Ay *et al.* qui valide elle-même les classes de risque du score de Khorana (diagnostic récent de cancer, de progression ou récurrence, pas de traitement récent) par rapport à ceux de notre étude

(cancer évolué ou récurrence après rémission, initiation de chimiothérapie) (Ay *et al.*, 2010; Khorana *et al.*, 2008).

Il faut également noter que les probabilités observées en fonction du score de risque, ne sont pas les mêmes entre les cohortes de Khorana *et al.* et celle de Ay *et al.* En effet, le groupe à risque faible passe d'une probabilité d'ETEV de 0,6 % à 1,5 % entre les deux études ; le groupe à risque intermédiaire de 1,9 % à 6,7 % ; et le groupe à risque élevé de 6,9 % à 17,7 %. Ces données posent la question de la reproductibilité du score mais peuvent être en partie expliquées par des différences de temps de suivi entre les études. Nous ne pouvons pas calculer la probabilité de cette façon dans notre étude cas-témoins. Mais nous observons que la grande majorité (63 %) de nos « cas » ayant présenté un ETEV, aurait été classé *a priori* dans le groupe de risque intermédiaire, et seulement 10 % dans le groupe à risque élevé, donc peu de patients auraient bénéficié de la thromboprophylaxie sur la base du seul score de Khorana.

Différents marqueurs biologiques candidats ont été testés dans des études précédentes, reflètent d'une activation de la coagulation (F1+2 et DDi), d'une activation endothéliale (P-sélectine soluble et FVIII) et significativement associés aux événements thrombotiques. Parmi ces biomarqueurs, les DDi et la sP-sel ont été associés au score de Khorana et permettent d'établir un score « amélioré », que nous appelons ici le score « Vienna CATS » (Ay *et al.*, 2009, 2010; Vormittag *et al.*, 2009). Le score Vienna CATS aurait été un peu plus discriminant dans notre population, classant 53 % des cas dans le groupe à haut risque, mais également 35 % des patients qui n'ont pas présenté d'ETEV. Ce score a donc des performances supérieures au score de Khorana dans notre population, mais sous-estime toujours la probabilité des événements : 47 % des cas restent classés dans un groupe à risque faible ou intermédiaire.

Les différents paramètres liés au schéma d'une étude, comme le choix du critère de jugement, la nature du suivi prospectif ou rétrospectif, la définition de l'événement (inclusion des thromboses asymptomatiques ou non) et son recueil (systématique, comité d'adjudication clinique externe) peuvent faire varier les taux d'ETEV observés (Khorana, 2012). Dans notre cas, les patients inclus ont une probabilité élevée d'événements thrombotiques sur leur profil clinique. En effet, il s'agit de patients à des stades avancés

de la maladie cancéreuse, le plus souvent sans espoir de traitement curatif (exclusion des chimiothérapies adjuvantes). Ils reçoivent une chimiothérapie et potentiellement d'autres thérapeutiques (facteurs de croissance érythropoïétique et granulocytaire, radiothérapie, chirurgie) qui augmentent le risque individuel de thrombose. Ceci peut expliquer en partie les différences observées.

Dans notre étude, l'ajout des variables activité d'ADAMTS13 et F1+2 améliore significativement les capacités prédictives des scores. Il faut cependant préciser que l'aire sous la courbe ROC augmente mécaniquement pour chaque variable supplémentaire, et que ces paramètres ne sont pas mesurés en routine. Le VWF a tendance à améliorer également le score de Khorana simple lorsqu'il est ajouté isolément, son dosage est plus facilement accessible et pourrait potentiellement faire partie de la discussion individuelle pour des cas particuliers, en tant que marqueur de risque thrombotique.

L'ajout de nouveaux paramètres biologiques à des scores destinés à un usage clinique a d'autres limites. En pratique, nous ne savons pas si les scores existants sont connus des cliniciens qui pourraient en avoir le besoin, et encore moins s'ils les utilisent. En France, le score de Khorana n'apparaît pas dans les recommandations de bonnes pratiques et les débats continuent sur l'utilisation de la thromboprophylaxie en médecine ambulatoire. Le choix est souvent laissé au clinicien sur la base de son évaluation globale.

L'ajout de variables dans un score a donc toutes les chances d'améliorer sa précision. Mais l'augmentation du nombre de paramètres peut diminuer la lisibilité dudit score ou encore occulter d'autres paramètres fondamentaux « évidents » qu'il aurait fallu considérer.

L'inclusion dans notre étude, de patients *a priori* asymptomatiques lors du diagnostic d'ETEVI a fait l'objet de discussions. Il n'est pas rare, dans le cadre de la maladie cancéreuse, de faire le diagnostic d'une embolie pulmonaire non suspectée, au cours des examens de suivi du cancer (scanner thoracique avec injection). Le patient ne s'est pas plaint de signes fonctionnels avant l'examen, c'est pourquoi on parle de thrombose asymptomatique. Mais en reprenant l'interrogatoire *a posteriori*, on retrouve le plus souvent des symptômes communément associés à l'EP dont le patient n'a pas parlé (O'Connell et al., 2006). Ces embolies pulmonaires non suspectées ont le même profil évolutif que les embolies suspectées en pré-scanner, les patients doivent donc recevoir de

la même façon un traitement anticoagulant à dose curative (*Delluc et al., 2014; Sahut D'Izarn et al., 2012*). De plus, dans notre population, les patients « contrôles » (sans ETEV) ont le même type de cancer que les cas et donc le même suivi, sans diagnostic incident d'ETEV. Nous pensons donc que les ETEV « asymptomatiques » ont toute leur place dans l'étude. Cette population de patients asymptomatiques remet plutôt en question le caractère prédictif des tests biologiques réalisés. En effet, les patients inclus dans l'étude princeps sont tous porteurs de cancer et indemnes de thrombose sur des critères cliniques. La moitié des diagnostics d'ETEV sont effectués chez des patients asymptomatiques, à une médiane de 2 mois après l'inclusion. Une partie des patients étaient-ils déjà porteurs d'une thrombose « asymptomatique » dès l'inclusion ? Dans ce cas, nos biomarqueurs seraient diagnostics et non prédictifs.

#### *ADAMTS13 dans la thrombose liée au cancer*

Dans notre étude, les patients présentent en moyenne des valeurs d'activité d'ADAMTS13 normales, ce qui diffère des données de la littérature. En effet, 4 études menées sur de plus petits effectifs ont mis en évidence une diminution de l'activité de la protéase ADAMTS13 dans le cancer (environ 60 % de la normale), a fortiori dans les formes disséminées (taux compris entre 4 et 50 % selon les études) (*Böhm et al., 2003; Koo et al., 2002; Mannucci et al., 2003; Oleksowicz et al., 1999*). Pour expliquer cette discordance, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. D'une part, dans ces études les techniques de mesure de l'activité d'ADAMTS13 sont basées sur l'utilisation d'un substrat constitué de VWF entier (techniques dites « full length »). Or, avec ces techniques il existe un risque connu de sous-évaluation due à une interférence avec le VWF endogène du patient si les taux plasmatiques sont supérieurs à 300 UI/dl. Dans ces études, les taux de VWF sont sensiblement supérieurs chez les patients atteints de cancer et plus élevés dans les formes disséminées, dépassant régulièrement 250 % (*Böhm et al., 2003; Mannucci et al., 2003; Oleksowicz et al., 1999*). La technique choisie dans notre étude utilise un peptide de synthèse spécifique et permet de s'affranchir de cette difficulté. D'autre part, les études précédemment publiées ont été menées sur de petits effectifs ( $\leq 50$  patients atteints de cancer) avec un recrutement à la fois hétérogène et très spécialisé. Par exemple, *Böhm et*

al. ont inclus des patients atteints de tumeurs cérébrales malignes ou bénignes de façon conjointe avec des patients atteints cancer de la prostate. Une autre de ces études mélange des patients adultes et pédiatriques, et encore une autre, des maladies hématologiques avec des cancers d'organes solides (Böhm et al., 2003; Koo et al., 2002; Mannucci et al., 2003). Enfin, une étude plus récente a montré que l'activité d'ADAMTS13 peut-être localement éteinte, *in situ* dans le microenvironnement tumoral. Le dosage plasmatique peut donc révéler des valeurs normales alors que l'activité de la protéase est potentiellement modifiée en péri-tumoral (Bauer et al., 2015). Cette diminution d'activité de l'enzyme ne peut néanmoins pas rendre compte de la totalité de l'augmentation du taux de son substrat, le VWF.

#### *VWF dans la thrombose veineuse médiée par le cancer*

Dans notre étude, les taux de VWF mesurés à l'inclusion sont élevés, et significativement supérieurs chez les patients qui présentent une thrombose dans les 6 mois suivants. Une élévation des taux de VWF a déjà été observée dans d'autres études chez des patients atteints de cancer, parfois même associée à un stade évolué de la maladie et à un mauvais pronostic (Böhm et al., 2003; Mannucci et al., 2003; Oleksowicz et al., 1999; Wang et al., 2005). Néanmoins, ces études concernent souvent un seul type de cancer, et il existe des données contradictoires montrant des taux de VWF inférieurs à la normale chez des patients atteints de cancer broncho-pulmonaire (Martini et al., 2005).

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les taux du VWF et de sa protéase ADAMTS13. L'augmentation rapide des taux de VWF entraîne théoriquement une diminution de l'activité d'ADAMTS13 par consommation (Mannucci et al., 2004; Reiter et al., 2003), mais cet effet n'est pas systématiquement retrouvé dans des situations d'augmentation chronique du VWF, ou de façon plus générale dans la plupart des situations pathologiques dans lesquelles ADAMTS13 a été étudié (choc septique, infarctus du myocarde, ischémie cérébrale, syndrome des anti-phospholipides) (Stepanian et al., 2011). Des études ont suggéré l'implication du VWF dans la thrombose veineuse, mais son rôle précis dans la thrombose liée au cancer n'est pas encore établi (Denis and Lenting, 2012). Les mécanismes d'hypercoagulabilité liés spécifiquement à la tumeur peuvent être divisés

en 2 groupes : ceux liés à la synthèse par la cellule tumorale de molécules procoagulantes ou altérant la fibrinolyse (facteur tissulaire, PAI-1, etc.), et d'autre part ceux liés à l'interaction de la cellule tumorale avec les autres cellules (cellules endothéliales, plaquettes, monocytes-macrophages,...) (*Rickles and Falanga, 2001*). Quel qu'en soit le mécanisme, les cellules tumorales sont capables d'induire l'augmentation de la sécrétion de VWF par les cellules endothéliales (*Morganti et al, 1996*). Le VWF relargué en excès peut ainsi contribuer à la situation "pro-thrombotique" du patient cancéreux. Il peut notamment être utilisé comme support à l'agrégation de plaquettes et favoriser la TCIPA (« tumor cell induced platelets agregation »). Le VWF pourrait également être impliqué dans le roulement des leucocytes qui participe au phénotype pro-thrombotique par analogie avec ce qui se passe dans des conditions de forces de cisaillement élevées. En effet, les fibres de VWF peuvent se couvrir de plaquettes et servir de support au roulement des leucocytes sur la P-sel plaquettaire (*Bernardo et al., 2005*). Enfin, le VWF pourrait médier l'adhésion entre les NETs et les plaquettes, favorisant ainsi le recrutement plaquettaire (*Bryckaert et al., 2015; Martinod and Wagner, 2014*). (Figure 25)

#### *VWF dans la dissémination métastatique*

Bien que le schéma de notre étude ne nous permette pas d'en tirer de conclusion, nous avons remarqué un lien entre le taux de VWF et le degré de dissémination de la maladie cancéreuse.

Le processus de dissémination métastatique est complexe et nécessite l'interaction des cellules tumorales avec les plaquettes, *via* des protéines d'adhésion comme le VWF (*Nash et al., 2002*). D'un autre côté, dans un modèle murin, des souris déficientes en VWF présentent une dissémination des cellules cancéreuses plus importante par rapport aux souris non déficientes. Dans ce modèle, le VWF favorise l'apoptose des cellules tumorales (*Mochizuki et al., 2012; Terraube et al., 2006*).

Les cellules tumorales détournent à leur profit le système de l'hémostase que ce soit au niveau cellulaire ou moléculaire. Elles sont capables de se « cacher » du système immunitaire en se couvrant de plaquettes qui vont également participer à leur adhésion à l'endothélium (*Nash et al., 2002*). Sur le plan moléculaire, elles profitent de molécules

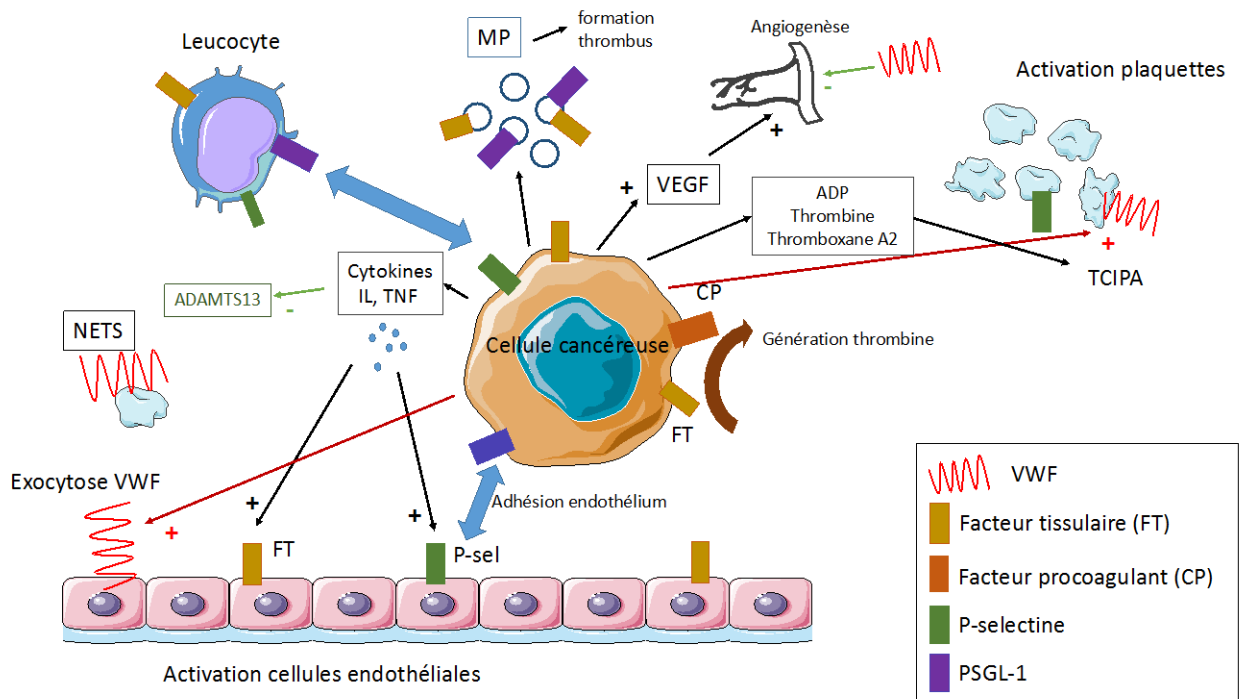
d'adhésion comme le VWF pour accroître leur potentiel de dissémination. On peut imaginer que la croissance tumorale augmente l'état d'hypercoagulabilité, qui à son tour augmente le potentiel de dissémination métastatique de la tumeur.

D'autres données suggèrent un lien entre la dissémination métastatique, les protéases de la famille des métalloprotéases zinc-dépendantes (dont font partie les protéines ADAMs et ADAMTSs) et le VWF. L'expression des métalloprotéases ADAMs a été associée au processus protéolytique de la matrice extracellulaire. ADAMs et ADAMTSs semblent intervenir dans les voies de signalisation du microenvironnement tumoral (*Cal and López-Otín, 2015; Murphy, 2008*). Parmi celles-ci, ADAM28 retient particulièrement notre intérêt car une équipe a montré qu'elle se lie au VWF et le dégrade (*Mochizuki et al., 2012*). De plus, les lignées cellulaires à fort potentiel d'évolution métastatique expriment des taux élevés d'ADAM28 et sont résistantes à l'apoptose induite par le VWF. Il serait donc pertinent d'essayer de caractériser la liaison entre ADAM28 et VWF et le rôle d'ADAM28 dans la thrombose et la dissémination métastatique.

En conclusion, nos résultats montrent que les taux d'ADAMTS13 et du VWF chez des patients atteints de cancer évolué pourraient contribuer à identifier les sujets à très haut risque de thrombose, et donc potentiellement à améliorer la prise en charge préventive de ces patients. Bien entendu, cette donnée nécessite d'être validée de manière prospective. Nos résultats suggèrent également l'implication du VWF et de sa protéase dans la physiopathologie des thromboses veineuses, et une relation entre les taux de VWF et la dissémination de la maladie. En effet, la thrombose survient plus souvent au cours des cancers évolués (i.e. disséminés), mais elle est à la fois le marqueur de l'agressivité tumorale et d'une réponse protectrice organisée par l'organisme, et pourrait être envisagée comme une des causes de la dissémination elle-même. Le rôle du couple VWF/ADAMTS13 et plus largement de la famille des métalloprotéases mériterait d'être approfondi dans le processus de dissémination métastatique des cellules tumorales.



Figure 25 : Place du VWF dans la thrombose médiée par le processus néoplasique



## B/ Inflammation

Le recrutement des leucocytes au site d'une réaction inflammatoire requiert une première étape qui est le roulement des leucocytes sur l'endothélium vasculaire. Ce roulement est médié en grande partie par l'interaction du PSGL-1 sur la face leucocytaire avec la P-sélectine (P-sel) sur la face endothéliale. Cette liaison dépend de la présence sur le PSGL-1 du sialyl Lewis X (sLe<sup>x</sup>), un acide sialique particulier. D'autre part, les Siglecs sont des récepteurs aux acides sialiques qui sont exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques comme les leucocytes. Le Siglec-5 (Sg-5) qui est un membre de cette famille exprimé à la surface des neutrophiles, monocytes et lymphocytes B, a été décrit comme étant capable de lier des sucres situés à la surface de pathogènes bactériens (*Jones et al., 2003*) ou de certaines protéines de l'hémostase (*Pegon et al., 2012*). De plus, le Sg-5 participe également à la modulation de la réponse inflammatoire, phénomène primordial pour éviter les dégâts d'une réaction trop soutenue ou prolongée

(Braunersreuther and Mach, 2006). L'hypothèse de départ qui a sous-tendu mon travail était que le PSGL-1 et le Sg-5 pouvaient interagir en raison de la structure hautement sialilée du PSGL-1.

Dans cette deuxième partie de ma thèse, nous avons donc étudié la liaison entre le PSGL-1 et le Sg-5 et ses conséquences potentielles sur le mécanisme de roulement des leucocytes par des expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons utilisé deux constructions de Sg-5 soluble : une construction dimérique Sg-5 avec un tag Fc (sSg-5/Fc) et une construction heptamérique que nous avons produit (sSg-5/C4BP). Cette construction comprend le domaine extracellulaire de Sg-5, les résidus C terminaux de la chaîne alpha de la C4b-binding protein (C4BP) et un tag HPC4. La protéine C4BP est une protéine volumineuse impliquée dans l'immunité innée et la voie du complément. Elle est composée de 7 chaînes alpha identiques et d'une chaîne bêta (Ermert and Blom, 2016). En accrochant les acides aminés C-terminaux de la chaîne alpha au domaine extracellulaire de Sg-5, on obtient une protéine heptamérique, composée de 7 branches identiques exposant un ectodomaine de Sg5 au niveau de chaque branche. Proportionnellement, le nombre d'acides aminés issus de la protéine C4BP et leur position au sein de la construction heptamérique nous ont amené à penser qu'ils n'interviendraient pas dans la fonction de celle-ci. Cependant, la production d'une construction contrôle à partir des chaînes alpha sans le domaine de Sg-5 aurait pu être considérée. Le choix d'utiliser cette protéine heptamérique dans plusieurs expérimentations repose sur les résultats préliminaires obtenus avec un Sg-5 monomérique, expériences qui avaient révélé une affinité de liaison assez faible pour le PSGL-1. Il n'est pas rare que les liaisons glycan-protéines soient de faible affinité mais le regroupement des lectines en grappe (clusters) augmente généralement leur affinité pour leur ligand (Crocker and Varki, 2001; Varki and Crocker, 2009). De la même façon, la dimérisation voire l'oligomérisation de la P-sélectine favorise sa liaison avec le PSGL-1 (Chen and Geng, 2006).

### *Liaison entre Siglec-5 et PSGL-1*

En système purifié, nous avons pu établir de façon claire l'existence d'une liaison entre du PSGL-1-Fc et le Sg-5 que celui-ci soit sous forme dimérique ou heptamérique et ceci dans deux systèmes différents, en plaque et par interférométrie. Cette liaison est spécifique car dépendante de la dose de protéine mise en relation et inhibée par un anticorps dirigé contre le Sg-5. Du fait de la structure des protéines recombinantes qui ont été utilisées et qui comprend les domaines extracellulaires de ces récepteurs associés à un tag, nous avons pu conclure que l'interaction a lieu entre les ectodomains. Par contre, nous ne disposons pas d'éléments supplémentaires qui nous permettraient d'identifier plus précisément les domaines engagés. Nous avons également observé que la désialylation du PSGL-1 par une sialidase diminuait fortement la liaison entre le PSGL-1 et le Sg-5 que ce soit en plaque ou en interférométrie. Les acides sialiques sont donc un déterminant structurel important de cette interaction même si nous ne pouvons pas exclure qu'une partie de la liaison fasse intervenir des régions protéiques plutôt que les acides sialiques. En effet, il faut signaler que certains Siglecs peuvent lier leur ligand d'une manière indépendante de la présence d'acides sialiques (*Pegon et al., 2012*). A ce stade de notre étude, rien ne permet de confirmer ou d'infirmer que nous sommes nous aussi en présence d'une liaison mixte. La seule chose que nous pouvons affirmer est que cette liaison implique le domaine V-set du Siglec car il s'agit du domaine de reconnaissance des acides sialiques. Par ailleurs, toujours dans le cadre de la caractérisation de la liaison Sg-5 / PSGL-1, nous avons observé que l'interaction était inhibée en présence d'un chélateur des ions divalents comme le calcium. Ce résultat nous permet d'établir une analogie supplémentaire avec la liaison P-sélectine / PSGL-1 qui dépend de la présence de calcium. Nous avons donc veillé dans la suite des expérimentations à la présence de calcium.

Lors de nos expériences de confirmation de la liaison du Sg-5 au PSGL-1 par l'interférométrie avec l'appareil Octet biolayer, nous avons constaté que quelle que soit la protéine immobilisée ou celle apportée en solution, de nouveau nous retrouvions une liaison spécifique et dépendante de la concentration. De manière intéressante, nous avons aussi remarqué que le pH des solutions influençait cette interaction. La liaison de nos protéines est optimale dans des conditions de pH plutôt acides ce qui évoque l'implication

de certains résidus basiques, comme l'histidine et la participation de forces électrostatiques dans cette interaction.

#### *PSGL-1 et Siglec-5 sont proches à la surface des leucocytes*

Nos expériences sur cellules ont permis de montrer que le PSGL-1 et le Sg-5 sont retrouvés à proximité l'un de l'autre à la surface de leucocytes mononucléés isolés à partir de sang humain. Cette proximité est observée à la fois avec le recouvrement du signal en marquage simple mais également en duolink où la présence de spots rouges implique une proximité de moins de 40 nm. Cette proximité pose la question d'une interaction fonctionnelle au sein de la membrane. La membrane plasmique est en effet une unité dynamique avec une organisation en microdomaines appelés « radeaux » (rafts), dans lesquels les molécules de signalisation s'organisent en « grappe » (cluster) pour favoriser les échanges. Les Siglecs ont la capacité d'interagir en cis avec des partenaires voisins de la membrane plasmique. Ces interactions ont pour effet de masquer les sites de liaison des Siglecs et donc de réguler leur activité biologique. A ce stade, nous ne disposons pas d'éléments pour dire que de tels mécanismes sont à l'œuvre entre PSGL-1 et Sg-5 et si PSGL-1 pourrait éventuellement jouer un rôle dans la modulation de l'activation de Sg-5. Nous avons d'ailleurs cherché à mettre en évidence l'existence d'une interaction fonctionnelle au sein de la membrane plasmique par la réalisation d'une co-immunoprécipitation. Après de nombreux essais, cette liaison fonctionnelle n'a pas pu être confirmée. Il est toutefois probable que les conditions dénaturantes utilisées pour détacher les récepteurs de la membrane altèrent la liaison entre le PSGL-1 et le Sg-5, rendant impossible la détection d'un complexe éventuel. Si nous n'avons pas étudié le rôle du PSGL-1 sur l'activité biologique de Sg-5, la suite de ce travail s'est par contre attachée à étudier un rôle du Sg-5 dans la diminution du roulement par neutralisation du PSGL-1.

#### *Le Siglec-5 soluble diminue le roulement des leucocytes in vitro*

Pour nos expériences *in vitro*, nous avons utilisé les cellules THP-1, une lignée monocyttaire régulièrement utilisée dans la littérature. Nous avons constaté que le roulement de ces cellules sur la P-sel était fortement diminué en présence de sSg-5/Fc (diminution de plus de 50%). Cet effet a également été observé sur la E-sélectine mais pas

sur VCAM qui est un ligand des intégrines. Une inhibition similaire a aussi pu être reproduite en présence d'un anticorps anti-PSGL-1. Ces résultats suggèrent donc que c'est bien l'interaction PSGL-1/sélectine qui est inhibée par la présence de Sg-5 soluble.

Cependant, à des concentrations élevées, le sSg-5/Fc (50 µg/mL) s'est révélé être un inhibiteur plus puissant du roulement des cellules THP-1 que l'anticorps anti-PSGL-1, suggérant que le Sg-5 peut certainement interférer avec d'autres ligands. Il est à noter que même si le taux de cisaillement utilisé dans nos expériences, est faible (0,5 dyn/cm<sup>2</sup>), il a été validé dans d'autres modèles d'étude du roulement leucocytaire (*Lawrence et al., 1997; Xia et al., 2002*). Toutefois, nous avons aussi réalisé un certain nombre d'expériences à un taux de cisaillement de 2 dyn/cm<sup>2</sup> et des résultats similaires ont été obtenus. Bien que les cellules THP-1 soient largement utilisées, cela reste une lignée avec les limites inhérentes à de tels outils biologiques et il était donc important de confirmer nos résultats avec des leucocytes purifiés à partir de sang humain. Nous avons observé que la présence de Sg-5 soluble (sSg-5/Fc ou sSg-5/C4BP) diminuait significativement le roulement des leucocytes mononucléés ou polynucléés sur une matrice de P-sélectine mais dans une proportion moindre que pour les THP-1 (entre 25 et 40 % d'inhibition). Il est tout à fait possible que le processus de purification des leucocytes joue un rôle dans l'atténuation de la réponse même si les techniques établies comme la purification sur Ficoll sont connues pour assurer un taux satisfaisant de cellules viables (*Corkum et al., 2015*). A la vue de ces résultats, il nous a donc semblé important de tester la fonctionnalité du Sg-5 dans des modèles *in vivo*.

#### *Le sSiglec-5/C4BP diminue le roulement basal et le recrutement leucocytaire in vivo*

Le modèle choisi pour l'étude du roulement basal des leucocytes est un modèle de microscopie intravitale qui permet d'observer les veinules du mésentère chez la souris. Du fait de l'extériorisation des anses digestives, ce modèle induit inévitablement un certain degré d'activation de l'endothélium vasculaire. Dans notre étude, nous avons donc observé un roulement leucocytaire basal élevé de plus de 20 leucocytes par min dans des veinules de 25 à 35 µm de diamètre. Ce nombre est deux fois plus élevé que celui rapporté par *Mayadas et al.* qui a originalement décrit ce modèle, reflétant soit une activation plus

importante de nos vaisseaux, soit des différences inhérentes aux souris utilisées (*Mayadas et al., 1993*). Le paramètre lié à l'expérimentateur est également important et afin de minimiser cet aspect, j'ai réalisé toutes les expériences moi-même, m'assurant de respecter des délais très similaires entre le début de la chirurgie et les mesures de roulement des leucocytes. Lorsque le sSg-5/C4BP a été injecté, une inhibition significative du roulement leucocytaire a pu être observé, atteignant seulement 10 leucocytes par minute.

Au-delà de son effet sur le roulement leucocytaire, nous avons pu observer que le nombre de leucocytes adhérents sur l'endothélium était également réduit par l'injection de sSg-5/C4BP. L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que le Sg-5 soluble exerce un effet négatif sur le roulement des leucocytes ayant pour conséquence une diminution de l'adhésion et donc potentiellement du recrutement leucocytaire. Les résultats obtenus *in vitro* nous conduisent à évoquer un rôle inhibiteur de l'interaction PSGL-1/sélectines, même si *in vivo*, les déterminants de cet effet sont probablement multiples.

Dans un second modèle d'inflammation stérile au TNF-alpha, nous avons pu observer le recrutement leucocytaire à partir de la phase précoce mais aussi jusqu'à des phases plus tardives de la réaction inflammatoire. L'injection de sSg-5/C4BP a conduit à une réduction profonde et durable du recrutement des leucocytes, principalement les neutrophiles dans ce modèle, au niveau sous-endothélial. De plus et à notre surprise, cet effet s'est révélé persister longtemps après l'initiation de la réaction inflammatoire (5h). Ces résultats nous laissent penser que le sSg-5/C4BP a d'autres cibles moléculaires *in vivo* que le PSGL-1. En effet, dans des modèles animaux de déficits en PSGL-1 ou en P-sélectine, le recrutement leucocytaire est très diminué dans les phases précoces mais tend à se normaliser plus tardivement (*Mayadas et al., 1993; Yang et al., 1999*). En revanche, le double KO E-sel et P-sel entraîne une diminution durable du recrutement leucocytaire (*Frenette et al., 1996*). Ce constat est donc concordant avec le fait que le sSg-5/Fc interfère aussi sur le roulement des THP-1 sur E-sel *in vitro*.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois l'existence d'une interaction spécifique entre le PSGL-1 et le Sg-5. Cette liaison est spécifique, dépendante du calcium et de la présence d'acide sialique. L'utilisation d'un Sg-5 heptamérique exerce un effet

anti-inflammatoire puissant *in vitro* et *in vivo* en diminuant le roulement des leucocytes et leur recrutement dans les tissus sous-endothéliaux donc leur transmigration. L'effet anti-inflammatoire de notre protéine recombinante, s'explique probablement aussi par des interactions avec d'autres ligands sialilés, au-delà du PSGL-1.

En prolongement de ce travail, il serait intéressant de chercher à caractériser d'une part les domaines impliqués dans cette liaison tant du côté PSGL-1 que du Sg-5, et d'autre part de caractériser les liaisons de Sg-5 avec les autres ligands sialilés connus pour interférer dans le recrutement leucocytaire (comme la L-sélectine par exemple). Il serait également tentant d'essayer de comprendre ce qui se passe à la surface leucocytaire lorsque PSGL-1 et Sg-5 sont à proximité dans la membrane plasmique, afin de savoir s'ils interagissent ensemble par les liaisons en cis.

Enfin, il faudrait s'intéresser à l'effet de Sg-5 dans d'autres processus physiologiques qui impliquent l'interaction P-sel/PSGL-1 comme la formation du thrombus ou encore la dissémination métastatique.

Il peut exister un intérêt réel en thérapeutique à limiter le recrutement leucocytaire qui peut être délétère dans certaines pathologies comme l'athérosclérose ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin par exemple. Les inhibiteurs de l'interaction P-sel/PSGL-1 ont aussi montré un bénéfice dans le traitement de la drépanocytose, cependant il existe des limites à leur utilisation qui en atténuent l'intérêt (*Krishnamurthy VR 2015 (Krishnamurthy et al., 2015)*). L'exploration des spécificités d'action du Sg-5 *in vitro* et *in vivo* est donc tout à fait justifié et pertinent dans une perspective thérapeutique à moyen terme.

## Conclusion

Tout au long de ce travail, nous avons cherché à améliorer la compréhension de mécanismes impliqués dans des situations hautement fréquentes en clinique. Nous avons cherché à caractériser de nouveaux médiateurs participant aux liens qui existent entre cancer et thrombose, inflammation et cancer, inflammation et thrombose.

Même si nos résultats ne peuvent pas prétendre à des applications cliniques, diagnostiques ou thérapeutiques immédiates, ils ouvrent le champ de nouvelles réflexions et de nouvelles recherches.

En étant un peu optimiste, il est possible d'envisager que le taux de VWF fera un jour partie de la discussion individuelle du risque thrombotique chez un patient atteint de cancer. Et en allant encore plus loin, il est possible d'imaginer que le Siglec-5 puisse faire partie de l'arsenal thérapeutique des pathologies inflammatoires chroniques.

Sans vouloir être finaliste, la recherche a, entre autres objectifs, celui d'améliorer les soins. Après un internat de cardiologie, une thèse d'hémostase qui s'est finalement dirigée vers l'inflammation et la dynamique cellulaire, je vais maintenant exercer la médecine dans une spécialité où toutes ces connaissances se croisent puisqu'il s'agit de la médecine du sujet âgé. La sénescence d'un organisme a ceci de particulier qu'elle expose les sujets à – presque- tous les risques : maladies infectieuses et inflammatoires, maladie cancéreuse, risque thrombotique et hémorragique.





## **BIBLIOGRAPHIE**



- Ali, S.R., Fong, J.J., Carlin, A.F., Busch, T.D., Linden, R., Angata, T., Areschoug, T., Parast, M., Varki, N., Murray, J., Nizet, V., Varki, A., 2014. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. *J. Exp. Med.* 211, 1231–1242. doi:10.1084/jem.20131853
- Andrews, R.G., Torok-Storb, B., Bernstein, I.D., 1983. Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Blood* 62, 124–132.
- Angata, T., Hayakawa, T., Yamanaka, M., Varki, A., Nakamura, M., 2006. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1964–1973. doi:10.1096/fj.06-5800com
- Angata, T., Kerr, S.C., Greaves, D.R., Varki, N.M., Crocker, P.R., Varki, A., 2002. Cloning and characterization of human Siglec-11. A recently evolved signaling molecule that can interact with SHP-1 and SHP-2 and is expressed by tissue macrophages, including brain microglia. *J. Biol. Chem.* 277, 24466–24474. doi:10.1074/jbc.M202833200
- Angata, T., Varki, A., 2000. Siglec-7: a sialic acid-binding lectin of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology* 10, 431–438.
- Atherton, A., Born, G.V., 1972. Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *J. Physiol.* 222, 447–474.
- Auwerda, J.J.A., Sonneveld, P., de Maat, M.P.M., Leebeek, F.W.G., 2007. Prothrombotic coagulation abnormalities in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica* 92, 279–280.
- Avril, T., North, S.J., Haslam, S.M., Willison, H.J., Crocker, P.R., 2006. Probing the cis interactions of the inhibitory receptor Siglec-7 with alpha2,8-disialylated ligands on natural killer cells and other leukocytes using glycan-specific antibodies and by analysis of alpha2,8-sialyltransferase gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 80, 787–796. doi:10.1189/jlb.1005559
- Ay, C., Dunkler, D., Marosi, C., Chiriac, A.-L., Vormittag, R., Simanek, R., Quehenberger, P., Zielinski, C., Pabinger, I., 2010. Prediction of venous thromboembolism in cancer patients. *Blood* 116, 5377–5382. doi:10.1182/blood-2010-02-270116
- Ay, C., Jungbauer, L.V., Sailer, T., Tengler, T., Koder, S., Kaider, A., Panzer, S., Quehenberger, P., Pabinger, I., Mannhalter, C., 2007. High concentrations of soluble P-selectin are associated with risk of venous thromboembolism and the P-selectin Thr715 variant. *Clin. Chem.* 53, 1235–1243. doi:10.1373/clinchem.2006.085068
- Ay, C., Pabinger, I., 2010. Tests predictive of thrombosis in cancer. *Thromb. Res.* 125 Suppl 2, S12-15. doi:10.1016/S0049-3848(10)70005-0
- Ay, C., Simanek, R., Vormittag, R., Dunkler, D., Alguel, G., Koder, S., Kornek, G., Marosi, C.,

- Wagner, O., Zielinski, C., Pabinger, I., 2008. High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood* 112, 2703–2708. doi:10.1182/blood-2008-02-142422
- Ay, C., Vormittag, R., Dunkler, D., Simanek, R., Chiriac, A.-L., Drach, J., Quehenberger, P., Wagner, O., Zielinski, C., Pabinger, I., 2009. D-dimer and prothrombin fragment 1 + 2 predict venous thromboembolism in patients with cancer: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4124–4129. doi:10.1200/JCO.2008.21.7752
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., D' Haens, G., Carbonez, A., Rutgeerts, P., 2003. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 601–608. doi:10.1056/NEJMoa020888
- Balkwill, F., Mantovani, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond. Engl.* 357, 539–545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Battistelli, S., Stefanoni, M., Lorenzi, B., Dell'avanzato, R., Varrone, F., Pascucci, A., Petrioli, R., Vittoria, A., 2008. Coagulation factor levels in non-metastatic colorectal cancer patients. *Int. J. Biol. Markers* 23, 36–41.
- Bauer, A.T., Suckau, J., Frank, K., Desch, A., Goertz, L., Wagner, A.H., Hecker, M., Goerge, T., Umansky, L., Beckhove, P., Utikal, J., Gorzelanny, C., Diaz-Valdes, N., Umansky, V., Schneider, S.W., 2015. von Willebrand factor fibers promote cancer-associated platelet aggregation in malignant melanoma of mice and humans. *Blood* 125, 3153–3163. doi:10.1182/blood-2014-08-595686
- Bax, M., Kuijf, M.L., Heikema, A.P., van Rijs, W., Bruijns, S.C.M., García-Vallejo, J.J., Crocker, P.R., Jacobs, B.C., van Vliet, S.J., van Kooyk, Y., 2011. Campylobacter jejuni lipooligosaccharides modulate dendritic cell-mediated T cell polarization in a sialic acid linkage-dependent manner. *Infect. Immun.* 79, 2681–2689. doi:10.1128/IAI.00009-11
- Beeh, K.M., Beier, J., Meyer, M., Buhl, R., Zahlten, R., Wolff, G., 2006. Bimosiamose, an inhaled small-molecule pan-selectin antagonist, attenuates late asthmatic reactions following allergen challenge in mild asthmatics: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical cross-over-trial. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 19, 233–241. doi:10.1016/j.pupt.2005.07.004
- Beesley, J.E., Pearson, J.D., Hutchings, A., Carleton, J.S., Gordon, J.L., 1979. Granulocyte migration through endothelium in culture. *J. Cell Sci.* 38, 237–248.
- Bekes, E.M., Deryugina, E.I., Kupriyanova, T.A., Zajac, E., Botkjaer, K.A., Andreasen, P.A., Quigley, J.P., 2011. Activation of pro-uPA is critical for initial escape from the primary tumor and hematogenous dissemination of human carcinoma cells. *Neoplasia N. Y. N* 13, 806–821.

- Bennett, J.S., 2005. Structure and function of the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J. Clin. Invest.* 115, 3363–3369. doi:10.1172/JCI26989
- Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L., Butcher, E.C., 1995.  $\alpha$ 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80, 413–422.
- Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Choi, H., Moake, J.L., Dong, J.F., 2005. Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 562–570. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01122.x
- Blann, A.D., Noteboom, W.M., Rosendaal, F.R., 2000. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? *Br. J. Haematol.* 108, 191–193.
- Blom, J.W., Doggen, C.J.M., Osanto, S., Rosendaal, F.R., 2005. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 293, 715–722. doi:10.1001/jama.293.6.715
- Blot, E., Decaudin, D., Veyradier, A., Bardier, A., Zagame, O.-L., Pouillart, P., 2002. Cancer-related thrombotic microangiopathy secondary to Von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Thromb. Res.* 106, 127–130.
- Böhm, M., Gerlach, R., Beecken, W.-D., Scheuer, T., Stier-Brück, I., Scharrer, I., 2003. ADAMTS-13 activity in patients with brain and prostate tumors is mildly reduced, but not correlated to stage of malignancy and metastasis. *Thromb. Res.* 111, 33–37.
- Bonthron, D.T., Handin, R.I., Kaufman, R.J., Wasley, L.C., Orr, E.C., Mitsock, L.M., Ewenstein, B., Loscalzo, J., Ginsburg, D., Orkin, S.H., 1986. Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature* 324, 270–273. doi:10.1038/324270a0
- Bott-Kitslaar, D.M., Saadiq, R.A., McBane, R.D., Loprinzi, C.L., Ashrani, A.A., Ransone, T.R., Wolfgram, A.A., Berentsen, M.M., Wysokinski, W.E., 2016. Efficacy and Safety of Rivaroxaban in Patients with Venous Thromboembolism and Active Malignancy: A Single-Center Registry. *Am. J. Med.* 129, 615–619. doi:10.1016/j.amjmed.2015.12.025
- Bouillard, J., Bouillaud S, 1823. De l'Obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: considérations sur les hydropisies passives en général. *Arch. Générales Médecine* 188–204.
- Bradley, J.R., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214, 149–160. doi:10.1002/path.2287
- Braunersreuther, V., Mach, F., 2006. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 2079–2088. doi:10.1007/s00018-006-6127-2
- Brill, A., Fuchs, T.A., Chauhan, A.K., Yang, J.J., De Meyer, S.F., Köllnberger, M., Wakefield, T.W., Lämmle, B., Massberg, S., Wagner, D.D., 2011. von Willebrand factor-mediated

- platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 117, 1400–1407. doi:10.1182/blood-2010-05-287623
- Brill, A., Fuchs, T.A., Savchenko, A.S., Thomas, G.M., Martinod, K., De Meyer, S.F., Bhandari, A.A., Wagner, D.D., 2012. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* 10, 136–144. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x
- Bruehl, R.E., Moore, K.L., Lorant, D.E., Borregaard, N., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Bainton, D.F., 1997. Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Leukoc. Biol.* 61, 489–499.
- Bruehl, R.E., Springer, T.A., Bainton, D.F., 1996. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 44, 835–844.
- Bryckaert, M., Rosa, J.-P., Denis, C.V., Lenting, P.J., 2015. Of von Willebrand factor and platelets. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 307–326. doi:10.1007/s00018-014-1743-8
- Buller, H.R., van Doormaal, F.F., van Sluis, G.L., Kamphuisen, P.W., 2007. Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations. *J. Thromb. Haemost. JTH* 5 Suppl 1, 246–254. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02497.x
- Caine, G.J., Stonelake, P.S., Lip, G.Y.H., Kehoe, S.T., 2002. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia N. Y. N* 4, 465–473. doi:10.1038/sj.neo.7900263
- Cal, S., López-Otín, C., 2015. ADAMTS proteases and cancer. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 44–46, 77–85. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.013
- Campbell, J.J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M.A., Thompson, D.A., Butcher, E.C., 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381–384.
- Candido, J., Hagemann, T., 2013. Cancer-related inflammation. *J. Clin. Immunol.* 33 Suppl 1, S79–84. doi:10.1007/s10875-012-9847-0
- Canis, K., McKinnon, T. a. J., Nowak, A., Panico, M., Morris, H.R., Laffan, M., Dell, A., 2010. The plasma von Willebrand factor O-glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *J. Thromb. Haemost. JTH* 8, 137–145. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03665.x
- Cao, H., Crocker, P.R., 2011. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology* 132, 18–26. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03368.x
- Cao, H., Lakner, U., de Bono, B., Traherne, J.A., Trowsdale, J., Barrow, A.D., 2008. SIGLEC16 encodes a DAP12-associated receptor expressed in macrophages that evolved from its inhibitory counterpart SIGLEC11 and has functional and non-functional alleles in humans. *Eur. J. Immunol.* 38, 2303–2315. doi:10.1002/eji.200738078
- Carlin, A.F., Lewis, A.L., Varki, A., Nizet, V., 2007. Group B streptococcal capsular sialic

- acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J. Bacteriol.* 189, 1231–1237. doi:10.1128/JB.01155-06
- Carlin, A.F., Uchiyama, S., Chang, Y.-C., Lewis, A.L., Nizet, V., Varki, A., 2009. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. *Blood* 113, 3333–3336. doi:10.1182/blood-2008-11-187302
- Carlow, D.A., Gossens, K., Naus, S., Veerman, K.M., Seo, W., Ziltener, H.J., 2009. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. *Immunol. Rev.* 230, 75–96. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00797.x
- Carrier, M., Lazo-Langner, A., Shivakumar, S., Tagalakakis, V., Zarychanski, R., Solymoss, S., Routhier, N., Douketis, J., Danovitch, K., Lee, A.Y., Le Gal, G., Wells, P.S., Corsi, D.J., Ramsay, T., Coyle, D., Chagnon, I., Kassam, Z., Tao, H., Rodger, M.A., SOME Investigators, 2015. Screening for Occult Cancer in Unprovoked Venous Thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* 373, 697–704. doi:10.1056/NEJMoa1506623
- Cavaillon, J.M., 2001. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 47, 695–702.
- Cerletti, C., Tamburrelli, C., Izzi, B., Gianfagna, F., de Gaetano, G., 2012. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb. Res.* 129, 263–266. doi:10.1016/j.thromres.2011.10.010
- Chang, J., Patton, J.T., Sarkar, A., Ernst, B., Magnani, J.L., Frenette, P.S., 2010. GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell mice. *Blood* 116, 1779–1786. doi:10.1182/blood-2009-12-260513
- Chen, M., Geng, J.-G., 2006. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 54, 75–84. doi:10.1007/s00005-006-0010-6
- Connolly, N.P., Jones, M., Watt, S.M., 2002. Human Siglec-5: tissue distribution, novel isoforms and domain specificities for sialic acid-dependent ligand interactions. *Br. J. Haematol.* 119, 221–238.
- Corkum, C.P., Ings, D.P., Burgess, C., Karwowska, S., Kroll, W., Michalak, T.I., 2015. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. *BMC Immunol.* 16, 48. doi:10.1186/s12865-015-0113-0
- Cornish, A.L., Freeman, S., Forbes, G., Ni, J., Zhang, M., Cepeda, M., Gentz, R., Augustus, M., Carter, K.C., Crocker, P.R., 1998. Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. *Blood* 92, 2123–2132.
- Coutinho, A., Poltorack, A., 2003. Innate immunity: from lymphocyte mitogens to Toll-like receptors and back. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 599–602.
- Cramer, E.M., Meyer, D., le Menn, R., Breton-Gorius, J., 1985. Eccentric localization of von



- Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies. *Blood* 66, 710–713.
- Crawley, J.T.B., de Groot, R., Luken, B.M., 2009. Circulating ADAMTS-13-von Willebrand factor complexes: an enzyme on demand. *J. Thromb. Haemost. JTH* 7, 2085–2087. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03621.x
- Crocker, P.R., 2005. Siglecs in innate immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 431–437. doi:10.1016/j.coph.2005.03.003
- Crocker, P.R., 2002. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 609–615.
- Crocker, P.R., Feizi, T., 1996. Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 679–691.
- Crocker, P.R., McMillan, S.J., Richards, H.E., 2012. CD33-related siglecs as potential modulators of inflammatory responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 102–111. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06449.x
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., Varki, A., 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 255–266. doi:10.1038/nri2056
- Crocker, P.R., Varki, A., 2001. Siglecs in the immune system. *Immunology* 103, 137–145.
- Cushman, M., Folsom, A.R., Wang, L., Aleksic, N., Rosamond, W.D., Tracy, R.P., Heckbert, S.R., 2003. Fibrin fragment D-dimer and the risk of future venous thrombosis. *Blood* 101, 1243–1248. doi:10.1182/blood-2002-05-1416
- da Costa Martins, P., García-Vallejo, J.-J., van Thienen, J.V., Fernandez-Borja, M., van Gils, J.M., Beckers, C., Horrevoets, A.J., Hordijk, P.L., Zwaginga, J.-J., 2007. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1023–1029. doi:10.1161/ATVBAHA.107.140442
- Daly, M.E., Makris, A., Reed, M., Lewis, C.E., 2003. Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment? *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1660–1673.
- Darbousset, R., Mezouar, S., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L., Dubois, C., 2014. Involvement of neutrophils in thrombus formation in living mice. *Pathol. Biol. (Paris)* 62, 1–9. doi:10.1016/j.patbio.2013.11.002
- de Bruijne-Admiraal, L.G., Modderman, P.W., Von dem Borne, A.E., Sonnenberg, A., 1992. P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood* 80, 134–142.
- Delluc, A., Carrier, M., Meyer, G., Le Gal, G., 2014. [Should we treat an incidentally discovered pulmonary embolism?]. *Rev. Med. Interne* 35, 775–778. doi:10.1016/j.revmed.2014.07.007

- Delputte, P.L., Van Breedam, W., Delrue, I., Oetke, C., Crocker, P.R., Nauwynck, H.J., 2007. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J. Virol.* 81, 9546–9550. doi:10.1128/JVI.00569-07
- Demers, M., Wagner, D.D., 2014. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 40, 277–283. doi:10.1055/s-0034-1370765
- Denis, C.V., André, P., Saffaripour, S., Wagner, D.D., 2001. Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4072–4077. doi:10.1073/pnas.061307098
- Denis, C.V., Lenting, P.J., 2012. von Willebrand factor: at the crossroads of bleeding and thrombosis. *Int. J. Hematol.* 95, 353–361. doi:10.1007/s12185-012-1041-x
- Dent, J.A., Galbusera, M., Ruggeri, Z.M., 1991. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J. Clin. Invest.* 88, 774–782. doi:10.1172/JCI115376
- Dinarello, C.A., 1997. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 11, 91–103.
- Dogan, M., Demirkazik, A., Konuk, N., Yalcin, B., Buyukcelik, A., Utkan, G., Tek, I., Akbulut, H., Sencan, O., Icli, F., 2006. The effect of venous thromboembolism on survival of cancer patients and its relationship with serum levels of factor VIII and vascular endothelial growth factor: a prospective matched-paired study. *Int. J. Biol. Markers* 21, 206–210.
- Dong, J., Moake, J.L., Nolasco, L., Bernardo, A., Arceneaux, W., Shrimpton, C.N., Schade, A.J., McIntire, L.V., Fujikawa, K., López, J.A., 2002. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 100, 4033–4039. doi:10.1182/blood-2002-05-1401
- Doré, M., Burns, A.R., Hughes, B.J., Entman, M.L., Smith, C.W., 1996. Chemoattractant-induced changes in surface expression and redistribution of a functional ligand for P-selectin on neutrophils. *Blood* 87, 2029–2037.
- Driscoll, K.E., Carter, J.M., Hassenbein, D.G., Howard, B., 1997. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1159–1164.
- Dunlop, L.C., Skinner, M.P., Bendall, L.J., Favaloro, E.J., Castaldi, P.A., Gorman, J.J., Gamble, J.R., Vadas, M.A., Berndt, M.C., 1992. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J. Exp. Med.* 175, 1147–1150.
- Ellies, L.G., Sperandio, M., Underhill, G.H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J.J., Kansas, G.S., Ley, K., Marth, J.D., 2002. Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood* 100, 3618–3625. doi:10.1182/blood-2002-04-1007

- Elyamany, G., Alzahrani, A.M., Bukhary, E., 2014. Cancer-associated thrombosis: an overview. *Clin. Med. Insights Oncol.* 8, 129–137. doi:10.4137/CMO.S18991
- Erickson-Miller, C.L., Freeman, S.D., Hopson, C.B., D'Alessio, K.J., Fischer, E.I., Kikly, K.K., Abrahamson, J.A., Holmes, S.D., King, A.G., 2003. Characterization of Siglec-5 (CD170) expression and functional activity of anti-Siglec-5 antibodies on human phagocytes. *Exp. Hematol.* 31, 382–388.
- Eriksson, E.E., 2008. No detectable endothelial- or leukocyte-derived L-selectin ligand activity on the endothelium in inflamed cremaster muscle venules. *J. Leukoc. Biol.* 84, 93–103. doi:10.1189/jlb.1107786
- Ermert, D., Blom, A.M., 2016. C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol. Lett.* 169, 82–92. doi:10.1016/j.imlet.2015.11.014
- Essakalli, M., Atouf, O., Bennani, N., Benseffaj, N., Ouadghiri, S., Brick, C., 2009. [Toll-like receptors]. *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 430–438. doi:10.1016/j.patbio.2008.04.003
- Ewenstein, B.M., Warhol, M.J., Handin, R.I., Pober, J.S., 1987. Composition of the von Willebrand factor storage organelle (Weibel-Palade body) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Biol.* 104, 1423–1433.
- Falanga, A., Gordon, S.G., 1985. Isolation and characterization of cancer procoagulant: a cysteine proteinase from malignant tissue. *Biochemistry (Mosc.)* 24, 5558–5567.
- Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., 2013. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J. Thromb. Haemost. JTH* 11, 223–233. doi:10.1111/jth.12075
- Falco, M., Biassoni, R., Bottino, C., Vitale, M., Sivori, S., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A., 1999. Identification and molecular cloning of p75/AIRM1, a novel member of the sialoadhesin family that functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 190, 793–802.
- Florian, S., Sonneck, K., Czerny, M., Hennersdorf, F., Hauswirth, A.W., Bühring, H.-J., Valent, P., 2006. Detection of novel leukocyte differentiation antigens on basophils and mast cells by HLDA8 antibodies. *Allergy* 61, 1054–1062. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01171.x
- Floyd, C.M., Irani, K., Kind, P.D., Kessler, C.M., 1992. von Willebrand factor interacts with malignant hematopoietic cell lines: evidence for the presence of specific binding sites and modification of von Willebrand factor structure and function. *J. Lab. Clin. Med.* 119, 467–476.
- Floyd, H., Ni, J., Cornish, A.L., Zeng, Z., Liu, D., Carter, K.C., Steel, J., Crocker, P.R., 2000. Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily. *J. Biol. Chem.* 275, 861–866.
- Fong, J.J., Sreedhara, K., Deng, L., Varki, N.M., Angata, T., Liu, Q., Nizet, V., Varki, A., 2015. Immunomodulatory activity of extracellular Hsp70 mediated via paired receptors

- Siglec-5 and Siglec-14. *EMBO J.* 34, 2775–2788. doi:10.15252/embj.201591407
- Franchini, M., Di Perna, C., Santoro, C., Castaman, G., Siboni, S.M., Zanon, E., Linari, S., Gresele, P., Pasca, S., Coppola, A., Santoro, R., Napolitano, M., Ranalli, P., Tagliaferri, A., Italian Association of Haemophilia Centres, 2016. Cancers in Patients with von Willebrand Disease: A Survey from the Italian Association of Haemophilia Centres. *Semin. Thromb. Hemost.* 42, 36–41. doi:10.1055/s-0035-1564844
- Franchini, M., Frattini, F., Crestani, S., Bonfanti, C., Lippi, G., 2013. von Willebrand factor and cancer: a renewed interest. *Thromb. Res.* 131, 290–292. doi:10.1016/j.thromres.2013.01.015
- Freeman, S.D., Kelm, S., Barber, E.K., Crocker, P.R., 1995. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood* 85, 2005–2012.
- Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D., Wagner, D.D., 2000. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* 191, 1413–1422.
- Frenette, P.S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., Wagner, D.D., 1995. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7450–7454.
- Frenette, P.S., Mayadas, T.N., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D., 1996. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 84, 563–574.
- Fuhlbrigge, R.C., Alon, R., Puri, K.D., Lowe, J.B., Springer, T.A., 1996. Sialylated, fucosylated ligands for L-selectin expressed on leukocytes mediate tethering and rolling adhesions in physiologic flow conditions. *J. Cell Biol.* 135, 837–848.
- Furie, B., Furie, B.C., 2004. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol. Med.* 10, 171–178. doi:10.1016/j.molmed.2004.02.008
- Furie, B., Furie, B.C., Flaumenhaft, R., 2001. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb. Haemost.* 86, 214–221.
- Furlan, M., Robles, R., Lämmle, B., 1996. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 87, 4223–4234.
- Furlan, M., Robles, R., Morselli, B., Sandoz, P., Lämmle, B., 1999. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* 81, 8–13.
- Futosi, K., Fodor, S., Mócsai, A., 2013. Neutrophil cell surface receptors and their

- intracellular signal transduction pathways. *Int. Immunopharmacol.* 17, 638–650. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.034
- Gadducci, A., Baicchi, U., Marrai, R., Del Bravo, B., Fosella, P.V., Facchini, V., 1994. Pretreatment plasma levels of fibrinopeptide-A (FPA), D-dimer (DD), and von Willebrand factor (vWF) in patients with ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 53, 352–356. doi:10.1006/gyno.1994.1146
- Gao, W., Zhu, J., Westfield, L.A., Tuley, E.A., Anderson, P.J., Sadler, J.E., 2012. Rearranging exosites in noncatalytic domains can redirect the substrate specificity of ADAMTS proteases. *J. Biol. Chem.* 287, 26944–26952. doi:10.1074/jbc.M112.380535
- Gardiner, C.M., Mills, K.H.G., 2016. The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious diseases. *Semin. Immunol.* 28, 343–350. doi:10.1016/j.smim.2016.03.001
- Ghannadan, M., Hauswirth, A.W., Scherthaner, G.-H., Müller, M.R., Klepetko, W., Schatzl, G., Sperr, W.R., Bühring, H.-J., Valent, P., 2002. Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 127, 299–307. doi:57747
- Ginsburg, D., Handin, R.I., Bonthron, D.T., Donlon, T.A., Bruns, G.A., Latt, S.A., Orkin, S.H., 1985. Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 228, 1401–1406.
- Girma, J.P., Kalafatis, M., Piétu, G., Lavergne, J.M., Chopek, M.W., Edgington, T.S., Meyer, D., 1986. Mapping of distinct von Willebrand factor domains interacting with platelet GPIb and GPIIb/IIIa and with collagen using monoclonal antibodies. *Blood* 67, 1356–1366.
- Gomis-Rüth, F.X., 2009. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 284, 15353–15357. doi:10.1074/jbc.R800069200
- Goodeve, A.C., Eikenboom, J.C., Ginsburg, D., Hilbert, L., Mazurier, C., Peake, I.R., Sadler, J.E., Rodeghiero, F., ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor, 2001. A standard nomenclature for von Willebrand factor gene mutations and polymorphisms. On behalf of the ISTH SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* 85, 929–931.
- Gordon, S.G., Benson, B., 1989. Analysis of serum cancer procoagulant activity and its possible use as a tumor marker. *Thromb. Res.* 56, 431–440.
- Gordon, S.G., Mourad, A.M., 1991. The site of activation of factor X by cancer procoagulant. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 2, 735–739.
- Gross, P.L., Furie, B.C., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., Furie, B., 2005. Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J. Leukoc. Biol.* 78, 1318–1326. doi:10.1189/jlb.0405193
- Hampton, M.B., Orrenius, S., 1998. Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. *Toxicol. Lett.* 102–103, 355–358.

- Hanzal, E., Tatra, G., 1993. Prothrombin fragment F 1 + 2 plasma concentrations in patients with gynecologic malignancies. *Gynecol. Oncol.* 49, 373–376.
- Hatzipantelis, E.S., Athanassiou-Metaxa, M., Gombakis, N., Tzimouli, V., Taparkou, A., Sidi-Fragandrea, V., Garipidou, V., Papageorgiou, T., Kleta, D., Koliouskas, D.E., Athanasiadou-Piperopoulou, F., 2011. Thrombomodulin and von Willebrand factor: relation to endothelial dysfunction and disease outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Acta Haematol.* 125, 130–135. doi:10.1159/000322120
- Hawbaker, S., 2012. Venous thromboembolism in the cancer population: pathology, risk, and prevention. *J. Adv. Pract. Oncol.* 3, 23–33.
- Heidemann, F., Schildt, A., Schmid, K., Bruns, O.T., Riecken, K., Jung, C., Ittrich, H., Wicklein, D., Reimer, R., Fehse, B., Heeren, J., Lüers, G., Schumacher, U., Heine, M., 2014. Selectins mediate small cell lung cancer systemic metastasis. *PloS One* 9, e92327. doi:10.1371/journal.pone.0092327
- Heit, J.A., 2008. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 370–372. doi:10.1161/ATVBAHA.108.162545
- Herter, J., Zarbock, A., 2013. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 4451–4457. doi:10.4049/jimmunol.1203179
- Hidalgo, A., Peired, A.J., Wild, M.K., Vestweber, D., Frenette, P.S., 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 26, 477–489. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.011
- Hidalgo, A., Weiss, L.A., Frenette, P.S., 2002. Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally. *J. Clin. Invest.* 110, 559–569. doi:10.1172/JCI14047
- Hirano, T., 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* 16, 249–284. doi:10.3109/08830189809042997
- Hogg, N., Patzak, I., Willenbrock, F., 2011. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 416–426. doi:10.1038/nri2986
- Hoos, A., Protsyuk, D., Borsig, L., 2014. Metastatic growth progression caused by PSGL-1-mediated recruitment of monocytes to metastatic sites. *Cancer Res.* 74, 695–704. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0946
- Huang, A., Moretto, A., Janz, K., Lowe, M., Bedard, P.W., Tam, S., Di, L., Clerin, V., Sushkova, N., Tchernychev, B., Tsao, D.H.H., Keith, J.C., Shaw, G.D., Schaub, R.G., Wang, Q., Kaila, N., 2010. Discovery of 2-[1-(4-chlorophenyl)cyclopropyl]-3-hydroxy-8-(trifluoromethyl)quinoline-4-carboxylic acid (PSI-421), a P-selectin inhibitor with improved pharmacokinetic properties and oral efficacy in models of vascular injury. *J. Med. Chem.* 53, 6003–6017. doi:10.1021/jm9013696
- Hudson, S.A., Bovin, N.V., Schnaar, R.L., Crocker, P.R., Bochner, B.S., 2009. Eosinophil-selective binding and proapoptotic effect in vitro of a synthetic Siglec-8 ligand,

- polymeric 6'-sulfated sialyl Lewis x. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 608–612. doi:10.1124/jpet.109.152439
- Hurst, S.M., Wilkinson, T.S., McLoughlin, R.M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G.M., Topley, N., Jones, S.A., 2001. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14, 705–714.
- Hutten, B.A., Prins, M.H., Gent, M., Ginsberg, J., Tijssen, J.G., Büller, H.R., 2000. Incidence of recurrent thromboembolic and bleeding complications among patients with venous thromboembolism in relation to both malignancy and achieved international normalized ratio: a retrospective analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 3078–3083.
- Ikezumi, Y., Suzuki, T., Hayafuji, S., Okubo, S., Nikolic-Paterson, D.J., Kawachi, H., Shimizu, F., Uchiyama, M., 2005. The sialoadhesin (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 20, 2704–2713. doi:10.1093/ndt/gfi105
- Ikezumi, Y., Suzuki, T., Imai, N., Ueno, M., Narita, I., Kawachi, H., Shimizu, F., Nikolic-Paterson, D.J., Uchiyama, M., 2006. Histological differences in new-onset IgA nephropathy between children and adults. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 21, 3466–3474. doi:10.1093/ndt/gfl455
- INCA, 2016. *Epidémiologie des cancers*.
- Ip, C.W., Kroner, A., Crocker, P.R., Nave, K.-A., Martini, R., 2007. Sialoadhesin deficiency ameliorates myelin degeneration and axonopathic changes in the CNS of PLP overexpressing mice. *Neurobiol. Dis.* 25, 105–111. doi:10.1016/j.nbd.2006.08.023
- Janeway, C.A., 2013. Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold spring harb symp quant biol.* 1989. 54: 1-13. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 4475–4487.
- Japp, A.G., Chelliah, R., Tattersall, L., Lang, N.N., Meng, X., Weisel, K., Katz, A., Burt, D., Fox, K.A.A., Feuerstein, G.Z., Connolly, T.M., Newby, D.E., 2013. Effect of PSI-697, a novel P-selectin inhibitor, on platelet-monocyte aggregate formation in humans. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e006007. doi:10.1161/JAHA.112.006007
- Jensvoll, H., Blix, K., Brækkan, S.K., Hansen, J.-B., 2014. Platelet count measured prior to cancer development is a risk factor for future symptomatic venous thromboembolism: the Tromsø Study. *PloS One* 9, e92011. doi:10.1371/journal.pone.0092011
- Jiang, H.-R., Hwenda, L., Makinen, K., Oetke, C., Crocker, P.R., Forrester, J.V., 2006. Sialoadhesin promotes the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 2258–2264.
- Jiang, W.G., Sanders, A.J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S.K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., Sliva, D., Subbarayan, P.R., Sarkar, M., Honoki, K., Fujii,

- H., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Ye, L., Helderich, W.G., Yang, X., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Azmi, A.S., Keith, W.N., Bilsland, A., Bhakta, D., Halicka, D., Nowsheen, S., Pantano, F., Santini, D., 2015. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin. Cancer Biol.* 35 Suppl, S244-275. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.008
- Johnston, G.I., Bliss, G.A., Newman, P.J., McEver, R.P., 1990. Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 21381–21385.
- Jones, C., Virji, M., Crocker, P.R., 2003. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* 49, 1213–1225.
- Kalafatis, M., Takahashi, Y., Girma, J.P., Meyer, D., 1987. Localization of a collagen-interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues Gly 911 and Glu 1,365. *Blood* 70, 1577–1583.
- Kansas, G.S., 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88, 3259–3287.
- Kardava, L., Moir, S., Wang, W., Ho, J., Buckner, C.M., Posada, J.G., O’Shea, M.A., Roby, G., Chen, J., Sohn, H.W., Chun, T.-W., Pierce, S.K., Fauci, A.S., 2011. Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA downregulation of inhibitory receptors. *J. Clin. Invest.* 121, 2614–2624. doi:10.1172/JCI45685
- Karimi, M., Cohan, N., 2010. Cancer-associated thrombosis. *Open Cardiovasc. Med. J.* 4, 78–82. doi:10.2174/1874192401004020078
- Karpatkin, S., Pearlstein, E., Ambrogio, C., Collier, B.S., 1988. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J. Clin. Invest.* 81, 1012–1019. doi:10.1172/JCI113411
- Kasza, A., 2013. IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. *Cytokine* 62, 22–33. doi:10.1016/j.cyto.2013.02.007
- Katayama, Y., Hidalgo, A., Furie, B.C., Vestweber, D., Furie, B., Frenette, P.S., 2003. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood* 102, 2060–2067. doi:10.1182/blood-2003-04-1212
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N., Edwards, D.R., 2015. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 16, 113. doi:10.1186/s13059-015-0676-3
- Khatua, B., Bhattacharya, K., Mandal, C., 2012. Sialoglycoproteins adsorbed by *Pseudomonas aeruginosa* facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9. *J. Leukoc. Biol.* 91, 641–655. doi:10.1189/jlb.0511260
- Khatua, B., Ghoshal, A., Bhattacharya, K., Mandal, C., Saha, B., Crocker, P.R., Mandal, C.,



2010. Sialic acids acquired by *Pseudomonas aeruginosa* are involved in reduced complement deposition and siglec mediated host-cell recognition. *FEBS Lett.* 584, 555–561. doi:10.1016/j.febslet.2009.11.087
- Khorana, A.A., 2012. Risk assessment for cancer-associated thrombosis: what is the best approach? *Thromb. Res.* 129 Suppl 1, S10-15. doi:10.1016/S0049-3848(12)70009-9
- Khorana, A.A., Francis, C.W., Culakova, E., Lyman, G.H., 2005. Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* 104, 2822–2829. doi:10.1002/cncr.21496
- Khorana, A.A., Kuderer, N.M., Culakova, E., Lyman, G.H., Francis, C.W., 2008. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood* 111, 4902–4907. doi:10.1182/blood-2007-10-116327
- Khorana, A.A., Streiff, M.B., Farge, D., Mandala, M., Debourdeau, P., Cajfinger, F., Marty, M., Falanga, A., Lyman, G.H., 2009. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in cancer: a consensus statement of major guidelines panels and call to action. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4919–4926. doi:10.1200/JCO.2009.22.3214
- Kikly, K.K., Bochner, B.S., Freeman, S.D., Tan, K.B., Gallagher, K.T., D'alessio, K.J., Holmes, S.D., Abrahamson, J.A., Erickson-Miller, C.L., Murdock, P.R., Tachimoto, H., Schleimer, R.P., White, J.R., 2000. Identification of SAF-2, a novel siglec expressed on eosinophils, mast cells, and basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 1093–1100.
- Kivi, E., Elima, K., Aalto, K., Nymalm, Y., Auvinen, K., Koivunen, E., Otto, D.M., Crocker, P.R., Salminen, T.A., Salmi, M., Jalkanen, S., 2009. Human Siglec-10 can bind to vascular adhesion protein-1 and serves as its substrate. *Blood* 114, 5385–5392. doi:10.1182/blood-2009-04-219253
- Kobsar, I., Oetke, C., Kroner, A., Wessig, C., Crocker, P., Martini, R., 2006. Attenuated demyelination in the absence of the macrophage-restricted adhesion molecule sialoadhesin (Siglec-1) in mice heterozygously deficient in P0. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 685–691. doi:10.1016/j.mcn.2005.12.007
- Kohli, M., Fink, L.M., Spencer, H.J., Zent, C.S., 2002. Advanced prostate cancer activates coagulation: a controlled study of activation markers of coagulation in ambulatory patients with localized and advanced prostate cancer. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 13, 1–5.
- Kokame, K., Nobe, Y., Kokubo, Y., Okayama, A., Miyata, T., 2005. FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J. Haematol.* 129, 93–100. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05420.x
- Kolaczkowska, E., Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175. doi:10.1038/nri3399
- Koo, B.-H., Oh, D., Chung, S.Y., Kim, N.K., Park, S., Jang, Y., Chung, K.-H., 2002. Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease activity in the plasma of malignant patients.

Thromb. Res. 105, 471–476.

- Koutts, J., Walsh, P.N., Plow, E.F., Fenton, J.W., Bouma, B.N., Zimmerman, T.S., 1978. Active release of human platelet factor VIII-related antigen by adenosine diphosphate, collagen, and thrombin. *J. Clin. Invest.* 62, 1255–1263. doi:10.1172/JCI109246
- Kranich, R., Busemann, A.S., Bock, D., Schroeter-Maas, S., Beyer, D., Heinemann, B., Meyer, M., Schierhorn, K., Zahlten, R., Wolff, G., Aydt, E.M., 2007. Rational design of novel, potent small molecule pan-selectin antagonists. *J. Med. Chem.* 50, 1101–1115. doi:10.1021/jm060536g
- Krishnamurthy, V.R., Sardar, M.Y.R., Ying, Y., Song, X., Haller, C., Dai, E., Wang, X., Hanjaya-Putra, D., Sun, L., Morikis, V., Simon, S.I., Woods, R.J., Cummings, R.D., Chaikof, E.L., 2015. Glycopeptide analogues of PSGL-1 inhibit P-selectin in vitro and in vivo. *Nat. Commun.* 6, 6387. doi:10.1038/ncomms7387
- Lajaunias, F., Dayer, J.-M., Chizzolini, C., 2005. Constitutive repressor activity of CD33 on human monocytes requires sialic acid recognition and phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling. *Eur. J. Immunol.* 35, 243–251. doi:10.1002/eji.200425273
- Landwehr, L.P., Jeppson, J.D., Katlan, M.G., Esterl, B., McCormick, D., Hamilos, D.L., Gelfand, E.W., 1998. Benefits of high-dose i.v. immunoglobulin in patients with severe steroid-dependent asthma. *Chest* 114, 1349–1356.
- Laszik, Z., Jansen, P.J., Cummings, R.D., Tedder, T.F., McEver, R.P., Moore, K.L., 1996. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 88, 3010–3021.
- Lawrence, M.B., Kansas, G.S., Kunkel, E.J., Ley, K., 1997. Threshold Levels of Fluid Shear Promote Leukocyte Adhesion through Selectins (CD62L,P,E). *J. Cell Biol.* 136, 717.
- Lefort, C.T., Ley, K., 2012. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front. Immunol.* 3, 157. doi:10.3389/fimmu.2012.00157
- Leick, M., Azcutia, V., Newton, G., Lusinskas, F.W., 2014. Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell Tissue Res.* 355, 647–656. doi:10.1007/s00441-014-1809-9
- Lenting, P.J., Casari, C., Christophe, O.D., Denis, C.V., 2012. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J. Thromb. Haemost. JTH* 10, 2428–2437. doi:10.1111/jth.12008
- Lenting, P.J., Pegon, J.N., Christophe, O.D., Denis, C.V., 2010. Factor VIII and von Willebrand factor--too sweet for their own good. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 16 Suppl 5, 194–199. doi:10.1111/j.1365-2516.2010.02320.x
- Levy, G.G., Nichols, W.C., Lian, E.C., Foroud, T., McClintick, J.N., McGee, B.M., Yang, A.Y., Siemieniak, D.R., Stark, K.R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S.B., Chandrasekaran, V.,

- Stabler, S.P., Sabio, H., Bouhassira, E.E., Upshaw, J.D., Ginsburg, D., Tsai, H.M., 2001. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 413, 488–494. doi:10.1038/35097008
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689. doi:10.1038/nri2156
- Li, F., Wilkins, P.P., Crawley, S., Weinstein, J., Cummings, R.D., McEver, R.P., 1996. Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J. Biol. Chem.* 271, 3255–3264.
- Li, N., Zhang, W., Wan, T., Zhang, J., Chen, T., Yu, Y., Wang, J., Cao, X., 2001. Cloning and characterization of Siglec-10, a novel sialic acid binding member of the Ig superfamily, from human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 276, 28106–28112. doi:10.1074/jbc.M100467200
- Lippi, G., Franchini, M., Targher, G., Favalaro, E.J., 2008. Help me, Doctor! My D-dimer is raised. *Ann. Med.* 40, 594–605. doi:10.1080/07853890802161015
- Liu, L., Choi, H., Bernardo, A., Bergeron, A.L., Nolasco, L., Ruan, C., Moake, J.L., Dong, J.-F., 2005. Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 2536–2544. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01561.x
- Liu, Y.-J., Xu, Y., Yu, Q., 2006. Full-length ADAMTS-1 and the ADAMTS-1 fragments display pro- and antimetastatic activity, respectively. *Oncogene* 25, 2452–2467. doi:10.1038/sj.onc.1209287
- Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, S.H., Crocker, P.R., 2004. Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 209, 199–207. doi:10.1016/j.imbio.2004.04.007
- Lorant, D.E., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., 1995. Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. *J. Clin. Invest.* 96, 171–182. doi:10.1172/JCI118018
- Lu, X., Wang, Q., Hu, G., Van Poznak, C., Fleisher, M., Reiss, M., Massagué, J., Kang, Y., 2009. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev.* 23, 1882–1894. doi:10.1101/gad.1824809
- Luan, J., Furuta, Y., Du, J., Richmond, A., 2001. Developmental expression of two CXC chemokines, MIP-2 and KC, and their receptors. *Cytokine* 14, 253–263. doi:10.1006/cyto.2001.0882
- Luo, B.-H., Carman, C.V., Springer, T.A., 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 619–647. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618

- Lyman, G.H., 2009. Thromboprophylaxis with low-molecular-weight heparin in medical patients with cancer. *Cancer* 115, 5637–5650. doi:10.1002/cncr.24665
- Majerus, E.M., Anderson, P.J., Sadler, J.E., 2005. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 280, 21773–21778. doi:10.1074/jbc.M502529200
- Majerus, E.M., Zheng, X., Tuley, E.A., Sadler, J.E., 2003. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J. Biol. Chem.* 278, 46643–46648. doi:10.1074/jbc.M309872200
- Malý, P., Thall, A., Petryniak, B., Rogers, C.E., Smith, P.L., Marks, R.M., Kelly, R.J., Gersten, K.M., Cheng, G., Saunders, T.L., Camper, S.A., Camphausen, R.T., Sullivan, F.X., Isogai, Y., Hindsgaul, O., von Andrian, U.H., Lowe, J.B., 1996. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 86, 643–653.
- Mancuso, D.J., Tuley, E.A., Westfield, L.A., Worrall, N.K., Shelton-Inloes, B.B., Sorace, J.M., Alevy, Y.G., Sadler, J.E., 1989. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 264, 19514–19527.
- Mandalà, M., Falanga, A., Roila, F., ESMO Guidelines Working Group, 2010. Venous thromboembolism in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for the management. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 21 Suppl 5, v274-276. doi:10.1093/annonc/mdq199
- Mannucci, P.M., Canciani, M.T., Forza, I., Lussana, F., Lattuada, A., Rossi, E., 2001. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 98, 2730–2735.
- Mannucci, P.M., Capoferri, C., Canciani, M.T., 2004. Plasma levels of von Willebrand factor regulate ADAMTS-13, its major cleaving protease. *Br. J. Haematol.* 126, 213–218. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05009.x
- Mannucci, P.M., Karimi, M., Mosalaei, A., Canciani, M.T., Peyvandi, F., 2003. Patients with localized and disseminated tumors have reduced but measurable levels of ADAMTS-13 (von Willebrand factor cleaving protease). *Haematologica* 88, 454–458.
- Marques, P.E., Oliveira, A.G., Chang, L., Paula-Neto, H.A., Menezes, G.B., 2015. Understanding liver immunology using intravital microscopy. *J. Hepatol.* 63, 733–742. doi:10.1016/j.jhep.2015.05.027
- Martini, F., Ferroni, P., Guadagni, F., Basili, S., Spila, A., D'Alessandro, R., Mineo, D., Laudisi, A., Portarena, I., Mariotti, S., Ambrogi, V., Mineo, T.C., Roselli, M., 2005. Plasma von Willebrand factor antigen levels in non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res.* 25, 403–407.
- Martinod, K., Wagner, D.D., 2014. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 123, 2768–2776. doi:10.1182/blood-2013-10-463646
- Massena, S., Christoffersson, G., Hjertström, E., Zcharia, E., Vlodavsky, I., Ausmees, N.,

- Rolny, C., Li, J.-P., Phillipson, M., 2010. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116, 1924–1931. doi:10.1182/blood-2010-01-266072
- Masui, T., Hosotani, R., Tsuji, S., Miyamoto, Y., Yasuda, S., Ida, J., Nakajima, S., Kawaguchi, M., Kobayashi, H., Koizumi, M., Toyoda, E., Tulachan, S., Arii, S., Doi, R., Imamura, M., 2001. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 3437–3443.
- Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D., 1993. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74, 541–554.
- McEver, R.P., Cummings, R.D., 1997. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* 100, 485–491. doi:10.1172/JCI119556
- McGrath, R.T., McRae, E., Smith, O.P., O'Donnell, J.S., 2010. Platelet von Willebrand factor--structure, function and biological importance. *Br. J. Haematol.* 148, 834–843. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08052.x
- Methia, N., André, P., Denis, C.V., Economopoulos, M., Wagner, D.D., 2001. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* 98, 1424–1428.
- Mezouar, S., Frère, C., Darbousset, R., Mege, D., Crescence, L., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L., Dubois, C., 2016. Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: Experimental and clinical evidences. *Thromb. Res.* 139, 65–76. doi:10.1016/j.thromres.2016.01.006
- Miszi-Blasius, K., Debreceni, I.B., Felszeghy, S., Dezso, B., Kappelmayer, J., 2011. Lack of P-selectin glycoprotein ligand-1 protects mice from thrombosis after collagen/epinephrine challenge. *Thromb. Res.* 127, 228–234. doi:10.1016/j.thromres.2010.11.022
- Mochizuki, S., Soejima, K., Shimoda, M., Abe, H., Sasaki, A., Okano, H.J., Okano, H., Okada, Y., 2012. Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 906–922. doi:10.1093/jnci/djs232
- Monteiro, V.G., Lobato, C.S.S., Silva, A.R., Medina, D.V., de Oliveira, M.A., Seabra, S.H., de Souza, W., DaMatta, R.A., 2005. Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol. Res.* 97, 380–385. doi:10.1007/s00436-005-1460-1
- Moore, K.L., 2003. The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. *J. Biol. Chem.* 278, 24243–24246. doi:10.1074/jbc.R300008200
- Moore, K.L., 1998. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk. Lymphoma* 29, 1–15. doi:10.3109/10428199809058377

- Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., McEver, R.P., 1994. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J. Biol. Chem.* 269, 23318–23327.
- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Li, F., Johnson, D.A., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., Bainton, D.F., McEver, R.P., 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J. Cell Biol.* 128, 661–671.
- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., McEver, R.P., 1992. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 118, 445–456.
- Morganti, M., Carpi, A., Amo-Takyi, B., Sagripanti, A., Nicolini, A., Giardino, R., Mittermayer, C., 2000. Von Willebrand's factor mediates the adherence of human tumoral cells to human endothelial cells and ticlopidine interferes with this effect. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 54, 431–436.
- Morganti, M., Mittermayer, C., Henze, U., Carpi, A., Sagripanti, A., 1996. Expression of tissue-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor in the supernatant of endothelial cell cultures in response to the seeding of adenocarcinoma cell line HRT-18. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 50, 373–375.
- Munday, J., Kerr, S., Ni, J., Cornish, A.L., Zhang, J.Q., Nicoll, G., Floyd, H., Mattei, M.G., Moore, P., Liu, D., Crocker, P.R., 2001. Identification, characterization and leucocyte expression of Siglec-10, a novel human sialic acid-binding receptor. *Biochem. J.* 355, 489–497.
- Murphy, G., 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 8, 929–941. doi:10.1038/nrc2459
- Nash, G.F., Turner, L.F., Scully, M.F., Kakkar, A.K., 2002. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 3, 425–430.
- Nemerson, Y., 1992. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin. Hematol.* 29, 170–176.
- Nicoll, G., Ni, J., Liu, D., Klenerman, P., Munday, J., Dubock, S., Mattei, M.G., Crocker, P.R., 1999. Identification and characterization of a novel siglec, siglec-7, expressed by human natural killer cells and monocytes. *J. Biol. Chem.* 274, 34089–34095.
- Nierodzik, M.L., Klepfish, A., Karpatkin, S., 1995. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb. Haemost.* 74, 282–290.
- Nordström, T., Møvert, E., Olin, A.I., Ali, S.R., Nizet, V., Varki, A., Areschoug, T., 2011. Human Siglec-5 inhibitory receptor and immunoglobulin A (IgA) have separate binding sites in streptococcal beta protein. *J. Biol. Chem.* 286, 33981–33991. doi:10.1074/jbc.M111.251728
- Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P., Ley, K., 1995. Leukocyte rolling in vivo is

- mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 86, 4417–4421.
- Noubade, R., del Rio, R., McElvany, B., Zachary, J.F., Millward, J.M., Wagner, D.D., Offner, H., Blankenhorn, E.P., Teuscher, C., 2008. von-Willebrand factor influences blood brain barrier permeability and brain inflammation in experimental allergic encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 173, 892–900. doi:10.2353/ajpath.2008.080001
- Nutku, E., Aizawa, H., Hudson, S.A., Bochner, B.S., 2003. Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis. *Blood* 101, 5014–5020. doi:10.1182/blood-2002-10-3058
- Nutku, E., Hudson, S.A., Bochner, B.S., 2005. Mechanism of Siglec-8-induced human eosinophil apoptosis: role of caspases and mitochondrial injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 918–924. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.202
- O’Connell, C.L., Boswell, W.D., Duddalwar, V., Caton, A., Mark, L.S., Vigen, C., Liebman, H.A., 2006. Unsuspected pulmonary emboli in cancer patients: clinical correlates and relevance. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 4928–4932. doi:10.1200/JCO.2006.06.5870
- O’Donnell, B.F., Barr, R.M., Black, A.K., Francis, D.M., Kermani, F., Niimi, N., Barlow, R.J., Winkelmann, R.K., Greaves, M.W., 1998. Intravenous immunoglobulin in autoimmune chronic urticaria. *Br. J. Dermatol.* 138, 101–106.
- Oleksowicz, L., Bhagwati, N., DeLeon-Fernandez, M., 1999. Deficient activity of von Willebrand’s factor-cleaving protease in patients with disseminated malignancies. *Cancer Res.* 59, 2244–2250.
- Organisation Mondiale de la Santé, 2013. Dernières statistiques mondiales sur le cancer.
- Ozaki, Y., Imanishi, T., Teraguchi, I., Nishiguchi, T., Orii, M., Shiono, Y., Shimamura, K., Ishibashi, K., Tanimoto, T., Yamano, T., Ino, Y., Yamaguchi, T., Kubo, T., Akasaka, T., 2014. Association between P-selectin glycoprotein ligand-1 and pathogenesis in acute coronary syndrome assessed by optical coherence tomography. *Atherosclerosis* 233, 697–703. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.052
- Paczuski, R., Bialkowska, A., Kotschy, M., Burduk, D., Betlejewski, S., 1999. Von Willebrand factor in plasma of patients with advanced stages of larynx cancer. *Thromb. Res.* 95, 197–200.
- Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y.M., Sajer, S.A., Furie, B., 1992. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 359, 848–851. doi:10.1038/359848a0
- Patel, N., Brinkman-Van der Linden, E.C., Altmann, S.W., Gish, K., Balasubramanian, S., Timans, J.C., Peterson, D., Bell, M.P., Bazan, J.F., Varki, A., Kastelein, R.A., 1999. OB-BP1/Siglec-6. a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *J. Biol. Chem.* 274, 22729–22738.
- Pegon, J.N., Kurdi, M., Casari, C., Odouard, S., Denis, C.V., Christophe, O.D., Lenting, P.J.,

2012. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* 97, 1855–1863. doi:10.3324/haematol.2012.063297
- Pendu, R., Terraube, V., Christophe, O.D., Gahmberg, C.G., de Groot, P.G., Lenting, P.J., Denis, C.V., 2006. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood* 108, 3746–3752. doi:10.1182/blood-2006-03-010322
- Petri, B., Broermann, A., Li, H., Khandoga, A.G., Zarbock, A., Krombach, F., Goerge, T., Schneider, S.W., Jones, C., Nieswandt, B., Wild, M.K., Vestweber, D., 2010. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood* 116, 4712–4719. doi:10.1182/blood-2010-03-276311
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., Kubes, P., 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* 203, 2569–2575. doi:10.1084/jem.20060925
- Phillipson, M., Heit, B., Parsons, S.A., Petri, B., Mullaly, S.C., Colarusso, P., Gower, R.M., Neely, G., Simon, S.I., Kubes, P., 2009. Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 6870–6878. doi:10.4049/jimmunol.0803414
- Pimanda, J.E., Ganderton, T., Maekawa, A., Yap, C.L., Lawler, J., Kershaw, G., Chesterman, C.N., Hogg, P.J., 2004. Role of thrombospondin-1 in control of von Willebrand factor multimer size in mice. *J. Biol. Chem.* 279, 21439–21448. doi:10.1074/jbc.M313560200
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J.W., 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275, 21785–21788. doi:10.1074/jbc.R000003200
- Pober, J.S., 1987. Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found. Symp.* 131, 170–184.
- Prandoni, P., Casiglia, E., Piccioli, A., Ghirarduzzi, A., Pengo, V., Gu, C., Douketis, J.D., 2010. The risk of cancer in patients with venous thromboembolism does not exceed that expected in the general population after the first 6 months. *J. Thromb. Haemost. JTH* 8, 1126–1127. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03797.x
- Prandoni, P., Lensing, A.W.A., Piccioli, A., Bernardi, E., Simioni, P., Girolami, B., Marchiori, A., Sabbion, P., Prins, M.H., Noventa, F., Girolami, A., 2002. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 100, 3484–3488. doi:10.1182/blood-2002-01-0108
- Proudfoot, A.E.I., 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 106–115. doi:10.1038/nri722
- Pulliam, L., Sun, B., Rempel, H., 2004. Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load. *J. Neuroimmunol.* 157, 93–98.



doi:10.1016/j.jneuroim.2004.08.039

- Raes, G., Ghassebeh, G.H., Brys, L., Mpofu, N., Verschueren, H., Vanhecke, D., De Baetselier, P., 2007. The metastatic T-cell hybridoma antigen/P-selectin glycoprotein ligand 1 is required for hematogenous metastasis of lymphomas. *Int. J. Cancer* 121, 2646–2652. doi:10.1002/ijc.23067
- Raife, T.J., Cao, W., Atkinson, B.S., Bedell, B., Montgomery, R.R., Lentz, S.R., Johnson, G.F., Zheng, X.L., 2009. Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site. *Blood* 114, 1666–1674. doi:10.1182/blood-2009-01-195461
- Ramacciotti, E., Myers, D.D., Wroblewski, S.K., Deatrick, K.B., Londy, F.J., Rectenwald, J.E., Henke, P.K., Schaub, R.G., Wakefield, T.W., 2010. P-selectin/PSGL-1 inhibitors versus enoxaparin in the resolution of venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb. Res.* 125, e138–142. doi:10.1016/j.thromres.2009.10.022
- Rambaldi, A., Alessio, G., Casali, B., Passerini, C.G., Donati, M.B., Mantovani, A., Semeraro, N., 1986. Induction of monocyte-macrophage procoagulant activity by transformed cell lines. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 136, 3848–3855.
- Rapoport, E.M., Sapot'ko, Y.B., Pazynina, G.V., Bojenko, V.K., Bovin, N.V., 2005. Sialoside-binding macrophage lectins in phagocytosis of apoptotic bodies. *Biochem. Biokhimiia* 70, 330–338.
- Razi, N., Varki, A., 1998. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7469–7474.
- Reininger, A.J., 2008. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 14 Suppl 5, 11–26. doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01848.x
- Reiter, R.A., Knöbl, P., Varadi, K., Turecek, P.L., 2003. Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. *Blood* 101, 946–948. doi:10.1182/blood-2002-03-0814
- Ricketts, L.M., Dlugosz, M., Luther, K.B., Haltiwanger, R.S., Majerus, E.M., 2007. O-fucosylation is required for ADAMTS13 secretion. *J. Biol. Chem.* 282, 17014–17023. doi:10.1074/jbc.M700317200
- Rickles, F.R., Falanga, A., 2001. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res.* 102, V215–224.
- Rivera-Nieves, J., Burcin, T.L., Olson, T.S., Morris, M.A., McDuffie, M., Cominelli, F., Ley, K., 2006. Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *J. Exp. Med.* 203, 907–917. doi:10.1084/jem.20052530
- Romijn, R.A., Bouma, B., Wuyster, W., Gros, P., Kroon, J., Sixma, J.J., Huizinga, E.G., 2001. Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. *J. Biol. Chem.* 276, 9985–9991. doi:10.1074/jbc.M006548200
- Rondaij, M.G., Bierings, R., Kragt, A., van Mourik, J.A., Voorberg, J., 2006. Dynamics and

- plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1002–1007. doi:10.1161/01.ATV.0000209501.56852.6c
- Rose-John, S., Waetzig, G.H., Scheller, J., Grötzinger, J., Seeger, D., 2007. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 613–624. doi:10.1517/14728222.11.5.613
- Rosen, S.D., 2004. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 129–156. doi:10.1146/annurev.immunol.21.090501.080131
- Ruggeri, Z.M., 2007. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb. Res.* 120 Suppl 1, S5-9. doi:10.1016/j.thromres.2007.03.011
- Ruggeri, Z.M., 2001. Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 14, 257–279. doi:10.1053/beh.2001.0133
- Sadik, C.D., Kim, N.D., Luster, A.D., 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32, 452–460. doi:10.1016/j.it.2011.06.008
- Sadler, J.E., 2008. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 112, 11–18. doi:10.1182/blood-2008-02-078170
- Sadler, J.E., Moake, J.L., Miyata, T., George, J.N., 2004. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 407–423. doi:10.1182/asheducation-2004.1.407
- Sahut D'Izarn, M., Caumont Prim, A., Planquette, B., Revel, M.P., Avillach, P., Chatellier, G., Sanchez, O., Meyer, G., 2012. Risk factors and clinical outcome of unsuspected pulmonary embolism in cancer patients: a case-control study. *J. Thromb. Haemost. JTH* 10, 2032–2038. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04868.x
- Sako, D., Chang, X.J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., 1993. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75, 1179–1186.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., Ruggeri, Z.M., 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94, 657–666.
- Schellerer, V.S., Mueller-Bergh, L., Merkel, S., Zimmermann, R., Weiss, D., Schlabrakowski, A., Naschberger, E., Stürzl, M., Hohenberger, W., Croner, R.S., 2011. The clinical value of von Willebrand factor in colorectal carcinomas. *Am. J. Transl. Res.* 3, 445–453.
- Schenkel, A.R., Chew, T.W., Muller, W.A., 2004. Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 6403–6408.
- Seitz, R., Rappe, N., Kraus, M., Immel, A., Wolf, M., Maasberg, M., Egbring, R., Pfab, R., Havemann, K., 1993. Activation of coagulation and fibrinolysis in patients with lung cancer: relation to tumour stage and prognosis. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 4, 249–254.

- Siedlecki, C.A., Lestini, B.J., Kottke-Marchant, K.K., Eppell, S.J., Wilson, D.L., Marchant, R.E., 1996. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 88, 2939–2950.
- Simanek, R., Vormittag, R., Ay, C., Alguel, G., Dunkler, D., Schwarzingler, I., Steger, G., Jaeger, U., Zielinski, C., Pabinger, I., 2010. High platelet count associated with venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *J. Thromb. Haemost. JTH* 8, 114–120. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03680.x
- Sims, J.E., Smith, D.E., 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 89–102. doi:10.1038/nri2691
- Smith, N.L., Rice, K.M., Bovill, E.G., Cushman, M., Bis, J.C., McKnight, B., Lumley, T., Glazer, N.L., van Hylckama Vlieg, A., Tang, W., Dehghan, A., Strachan, D.P., O'Donnell, C.J., Rotter, J.I., Heckbert, S.R., Psaty, B.M., Rosendaal, F.R., 2011. Genetic variation associated with plasma von Willebrand factor levels and the risk of incident venous thrombosis. *Blood* 117, 6007–6011. doi:10.1182/blood-2010-10-315473
- Soejima, K., Mimura, N., Hirashima, M., Maeda, H., Hamamoto, T., Nakagaki, T., Nozaki, C., 2001. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J. Biochem. (Tokyo)* 130, 475–480.
- Sørensen, H.T., Mellekjaer, L., Olsen, J.H., Baron, J.A., 2000. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N. Engl. J. Med.* 343, 1846–1850. doi:10.1056/NEJM200012213432504
- Sørensen, H.T., Mellekjaer, L., Steffensen, F.H., Olsen, J.H., Nielsen, G.L., 1998. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med.* 338, 1169–1173. doi:10.1056/NEJM199804233381701
- Sporn, L.A., Chavin, S.I., Marder, V.J., Wagner, D.D., 1985. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* 76, 1102–1106. doi:10.1172/JCI112064
- Sporn, L.A., Marder, V.J., Wagner, D.D., 1987. von Willebrand factor released from Weibel-Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood* 69, 1531–1534.
- Starke, R.D., Ferraro, F., Paschalaki, K.E., Dryden, N.H., McKinnon, T.A.J., Sutton, R.E., Payne, E.M., Haskard, D.O., Hughes, A.D., Cutler, D.F., Laffan, M.A., Randi, A.M., 2011. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* 117, 1071–1080. doi:10.1182/blood-2010-01-264507
- Stepanian, A., Cohen-Moatti, M., Sanglier, T., Legendre, P., Ameziane, N., Tsatsaris, V., Mandelbrot, L., de Prost, D., Veyradier, A., 2011. Von Willebrand factor and ADAMTS13: a candidate couple for preeclampsia pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

31, 1703–1709. doi:10.1161/ATVBAHA.111.223610

- Suzuki, M., Murata, M., Matsubara, Y., Uchida, T., Ishihara, H., Shibano, T., Ashida, S., Soejima, K., Okada, Y., Ikeda, Y., 2004. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 212–216.
- Takahashi, M., Yamashita, A., Moriguchi-Goto, S., Marutsuka, K., Sato, Y., Yamamoto, H., Koshimoto, C., Asada, Y., 2009. Critical role of von Willebrand factor and platelet interaction in venous thromboembolism. *Histol. Histopathol.* 24, 1391–1398.
- Terraube, V., Marx, I., Denis, C.V., 2007. Role of von Willebrand factor in tumor metastasis. *Thromb. Res.* 120 Suppl 2, S64-70. doi:10.1016/S0049-3848(07)70132-9
- Terraube, V., Pendu, R., Baruch, D., Gebbink, M.F.B.G., Meyer, D., Lenting, P.J., Denis, C.V., 2006. Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* 4, 519–526. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01770.x
- Tersteeg, C., de Maat, S., De Meyer, S.F., Smeets, M.W.J., Barendrecht, A.D., Roest, M., Pasterkamp, G., Fijnheer, R., Vanhoorelbeke, K., de Groot, P.G., Maas, C., 2014. Plasmin cleavage of von Willebrand factor as an emergency bypass for ADAMTS13 deficiency in thrombotic microangiopathy. *Circulation* 129, 1320–1331. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006727
- Tesselaar, M.E.T., Romijn, F.P.H.T.M., Van Der Linden, I.K., Prins, F.A., Bertina, R.M., Osanto, S., 2007. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J. Thromb. Haemost. JTH* 5, 520–527. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x
- Thomas, G.M., Brill, A., Mezouar, S., Crescence, L., Gallant, M., Dubois, C., Wagner, D.D., 2015. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J. Thromb. Haemost. JTH* 13, 1310–1319. doi:10.1111/jth.13002
- Thomas, G.M., Panicot-Dubois, L., Lacroix, R., Dignat-George, F., Lombardo, D., Dubois, C., 2009. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 1913–1927. doi:10.1084/jem.20082297
- Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Ashida, K., Walsh, K.A., Chopek, M.W., Sadler, J.E., Fujikawa, K., 1986. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry (Mosc.)* 25, 3171–3184.
- Toombs, C.F., DeGraaf, G.L., Martin, J.P., Geng, J.G., Anderson, D.C., Shebuski, R.J., 1995. Pretreatment with a blocking monoclonal antibody to P-selectin accelerates pharmacological thrombolysis in a primate model of arterial thrombosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 941–949.
- Trousseau, A., 1865. Phlegmasia alba dolens. *Clin. Médicale Hôtel-Dieu Paris* 654–712.

- Trujillo-Santos, J., Di Micco, P., Iannuzzo, M., Lecumberri, R., Guijarro, R., Madridano, O., Monreal, M., RIETE Investigators, 2008. Elevated white blood cell count and outcome in cancer patients with venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thromb. Haemost.* 100, 905–911.
- Tsai, A.W., Cushman, M., Rosamond, W.D., Heckbert, S.R., Tracy, R.P., Aleksic, N., Folsom, A.R., 2002. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am. J. Med.* 113, 636–642.
- Tsai, H.M., 1996. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 87, 4235–4244.
- Tsai, H.M., Sussman, I.I., Nagel, R.L., 1994. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 83, 2171–2179.
- Tsurikisawa, N., Taniguchi, M., Saito, H., Himeno, H., Ishibashi, A., Suzuki, S., Akiyama, K., 2004. Treatment of Churg-Strauss syndrome with high-dose intravenous immunoglobulin. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 92, 80–87. doi:10.1016/S1081-1206(10)61714-0
- Turner, N., Nolasco, L., Tao, Z., Dong, J.-F., Moake, J., 2006. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost. JTH* 4, 1396–1404. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01959.x
- Uemura, M., Tatsumi, K., Matsumoto, M., Fujimoto, M., Matsuyama, T., Ishikawa, M., Iwamoto, T.-A., Mori, T., Wanaka, A., Fukui, H., Fujimura, Y., 2005. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood* 106, 922–924. doi:10.1182/blood-2005-01-0152
- Vachino, G., Chang, X.J., Veldman, G.M., Kumar, R., Sako, D., Fouser, L.A., Berndt, M.C., Cumming, D.A., 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J. Biol. Chem.* 270, 21966–21974.
- Valentijn, K.M., Sadler, J.E., Valentijn, J.A., Voorberg, J., Eikenboom, J., 2011. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood* 117, 5033–5043. doi:10.1182/blood-2010-09-267492
- Van Doormaal, F.F., Terpstra, W., Van Der Griend, R., Prins, M.H., Nijziel, M.R., Van De Ree, M.A., Büller, H.R., Dutilh, J.C., ten Cate-Hoek, A., Van Den Heiligenberg, S.M., Van Der Meer, J., Otten, J.M., 2011. Is extensive screening for cancer in idiopathic venous thromboembolism warranted? *J. Thromb. Haemost. JTH* 9, 79–84. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04101.x
- Vandendries, E.R., Furie, B.C., Furie, B., 2004. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb. Haemost.* 92, 459–466. doi:10.1160/TH04-05-0306
- Vanderheijden, N., Delputte, P.L., Favoreel, H.W., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., van

- Woensel, P.A., Nauwynck, H.J., 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207–8215.
- Varki, A., Angata, T., 2006. Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* 16, 1R–27R. doi:10.1093/glycob/cwj008
- Varki, A., Crocker, P.R., 2009. I-type Lectins, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Veldman, G.M., Bean, K.M., Cumming, D.A., Eddy, R.L., Sait, S.N., Shows, T.B., 1995. Genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding human P-selectin glycoprotein ligand. *J. Biol. Chem.* 270, 16470–16475.
- Verweij, C.L., de Vries, C.J., Distel, B., van Zonneveld, A.J., van Kessel, A.G., van Mourik, J.A., Pannekoek, H., 1985. Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 4699–4717.
- Veyradier, A., Coppo, P., 2011. [ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease]. *Médecine Sci.* MS 27, 1097–1105. doi:10.1051/medsci/20112712016
- Veyradier, A., Girma, J.-P., 2004. Assays of ADAMTS-13 activity. *Semin. Hematol.* 41, 41–47.
- Vimr, E., Lichtensteiger, C., 2002. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol.* 10, 254–257.
- Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L., Steenbergen, S.M., 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 68, 132–153.
- Vitale, C., Romagnani, C., Falco, M., Ponte, M., Vitale, M., Moretta, A., Bacigalupo, A., Moretta, L., Mingari, M.C., 1999. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15091–15096.
- Vlot, A.J., Koppelman, S.J., Bouma, B.N., Sixma, J.J., 1998. Factor VIII and von Willebrand factor. *Thromb. Haemost.* 79, 456–465.
- von Andrian, U.H., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Erlandsen, S.L., Butcher, E.C., 1995. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 82, 989–999.
- von Gunten, S., Schaub, A., Vogel, M., Stadler, B.M., Miescher, S., Simon, H.-U., 2006. Immunologic and functional evidence for anti-Siglec-9 autoantibodies in intravenous immunoglobulin preparations. *Blood* 108, 4255–4259. doi:10.1182/blood-2006-05-021568
- von Gunten, S., Vogel, M., Schaub, A., Stadler, B.M., Miescher, S., Crocker, P.R., Simon, H.-U., 2007. Intravenous immunoglobulin preparations contain anti-Siglec-8 autoantibodies.

- J. Allergy Clin. Immunol. 119, 1005–1011. doi:10.1016/j.jaci.2007.01.023
- von Gunten, S., Yousefi, S., Seitz, M., Jakob, S.M., Schaffner, T., Seger, R., Takala, J., Villiger, P.M., Simon, H.-U., 2005. Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. *Blood* 106, 1423–1431. doi:10.1182/blood-2004-10-4112
- Vormittag, R., Simanek, R., Ay, C., Dunkler, D., Quehenberger, P., Marosi, C., Zielinski, C., Pabinger, I., 2009. High factor VIII levels independently predict venous thromboembolism in cancer patients: the cancer and thrombosis study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 2176–2181. doi:10.1161/ATVBAHA.109.190827
- Wagner, D.D., 1990. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 217–246. doi:10.1146/annurev.cb.06.110190.001245
- Wakefield, T.W., Strieter, R.M., Downing, L.J., Kadell, A.M., Wilke, C.A., Burdick, M.D., Wroblewski, S.K., Phillips, M.L., Paulson, J.C., Anderson, D.C., Greenfield, L.J., 1996. P-selectin and TNF inhibition reduce venous thrombosis inflammation. *J. Surg. Res.* 64, 26–31. doi:10.1006/jsre.1996.0301
- Wang, H., Kleiman, K., Wang, J., Luo, W., Guo, C., Eitzman, D.T., 2015. Deficiency of P-selectin glycoprotein ligand-1 is protective against the prothrombotic effects of interleukin-1 $\beta$ . *J. Thromb. Haemost. JTH* 13, 2273–2276. doi:10.1111/jth.13146
- Wang, W.-S., Lin, J.-K., Lin, T.-C., Chiou, T.-J., Liu, J.-H., Yen, C.-C., Chen, P.-M., 2005. Plasma von Willebrand factor level as a prognostic indicator of patients with metastatic colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* 11, 2166–2170.
- Wang, Y., Neumann, H., 2010. Alleviation of neurotoxicity by microglial human Siglec-11. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 3482–3488. doi:10.1523/JNEUROSCI.3940-09.2010
- Werner, T.L., Agarwal, N., Carney, H.M., Rodgers, G.M., 2007. Management of cancer-associated thrombotic microangiopathy: what is the right approach? *Am. J. Hematol.* 82, 295–298. doi:10.1002/ajh.20783
- Whitney, G., Wang, S., Chang, H., Cheng, K.Y., Lu, P., Zhou, X.D., Yang, W.P., McKinnon, M., Longphre, M., 2001. A new siglec family member, siglec-10, is expressed in cells of the immune system and has signaling properties similar to CD33. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 6083–6096.
- Xia, L., Sperandio, M., Yago, T., McDaniel, J.M., Cummings, R.D., Pearson-White, S., Ley, K., McEver, R.P., 2002. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J. Clin. Invest.* 109, 939–950. doi:10.1172/JCI14151
- Xie, L., Chesterman, C.N., Hogg, P.J., 2001. Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1. *J. Exp. Med.* 193, 1341–1349.
- Yamanaka, M., Kato, Y., Angata, T., Narimatsu, H., 2009. Deletion polymorphism of SIGLEC14 and its functional implications. *Glycobiology* 19, 841–846.

doi:10.1093/glycob/cwp052

- Yang, J., Galipeau, J., Kozak, C.A., Furie, B.C., Furie, B., 1996. Mouse P-selectin glycoprotein ligand-1: molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood* 87, 4176–4186.
- Yang, J., Hirata, T., Croce, K., Merrill-Skoloff, G., Tchernychev, B., Williams, E., Flaumenhaft, R., Furie, B.C., Furie, B., 1999. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J. Exp. Med.* 190, 1769–1782.
- Yigit, E., Gönüllü, G., Yücel, I., Turgut, M., Erdem, D., Cakar, B., 2008. Relation between hemostatic parameters and prognostic/predictive factors in breast cancer. *Eur. J. Intern. Med.* 19, 602–607. doi:10.1016/j.ejim.2007.06.036
- Yokoi, H., Myers, A., Matsumoto, K., Crocker, P.R., Saito, H., Bochner, B.S., 2006. Alteration and acquisition of Siglecs during in vitro maturation of CD34+ progenitors into human mast cells. *Allergy* 61, 769–776. doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01133.x
- Yousef, G.M., Ordon, M.H., Foussias, G., Diamandis, E.P., 2001. Molecular characterization, tissue expression, and mapping of a novel Siglec-like gene (SLG2) with three splice variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 900–910. doi:10.1006/bbrc.2001.5053
- Zander, C.B., Cao, W., Zheng, X.L., 2015. ADAMTS13 and von Willebrand factor interactions. *Curr. Opin. Hematol.* 22, 452–459. doi:10.1097/MOH.000000000000169
- Zarbock, A., Ley, K., 2009. New insights into leukocyte recruitment by intravital microscopy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 334, 129–152. doi:10.1007/978-3-540-93864-4\_6
- Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., Hidalgo, A., 2011. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118, 6743–6751. doi:10.1182/blood-2011-07-343566
- Zhang, J.Q., Nicoll, G., Jones, C., Crocker, P.R., 2000. Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 22121–22126. doi:10.1074/jbc.M002788200
- Zhang, P., Lu, X., Tao, K., Shi, L., Li, W., Wang, G., Wu, K., 2015. Siglec-10 is associated with survival and natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Res.* 194, 107–113. doi:10.1016/j.jss.2014.09.035
- Zhang, X.W., Liu, Q., Wang, Y., Thorlacius, H., 2001. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 133, 413–421. doi:10.1038/sj.bjp.0704087
- Zhao, B.-Q., Chauhan, A.K., Canault, M., Patten, I.S., Yang, J.J., Dockal, M., Scheiflinger, F., Wagner, D.D., 2009. von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood* 114, 3329–3334. doi:10.1182/blood-2009-03-213264



- Zheng, X., Chung, D., Takayama, T.K., Majerus, E.M., Sadler, J.E., Fujikawa, K., 2001. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Biol. Chem.* 276, 41059–41063. doi:10.1074/jbc.C100515200
- Zheng, X.L., Sadler, J.E., 2008. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 249–277. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154311
- Zhou, W., Inada, M., Lee, T.-P., Benten, D., Lyubsky, S., Bouhassira, E.E., Gupta, S., Tsai, H.-M., 2005. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 85, 780–788. doi:10.1038/labinvest.3700275
- Zhou, Y.-F., Eng, E.T., Zhu, J., Lu, C., Walz, T., Springer, T.A., 2012. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* 120, 449–458. doi:10.1182/blood-2012-01-405134
- Zietek, Z., Iwan-Zietek, I., Paczulski, R., Kotschy, M., Wolski, Z., 1996. von Willebrand factor antigen in blood plasma of patients with urinary bladder carcinoma. *Thromb. Res.* 83, 399–402.



Caractérisation de nouveaux médiateurs entre cancer, inflammation et thrombose : VWF, ADAMTS13, PSGL-1 et Siglec-5

**Mots clés :** Cancer, Thrombose, Inflammation, Médiateurs

Le cancer et la thrombose sont des problématiques fréquentes et graves en pathologie humaine et en santé publique. Elles ont une relation réciproque médiée par des interactions cellulaires et des mécanismes moléculaires complexes faisant intervenir des acteurs de l'hémostase et de l'immunité. Ces phénomènes impliquent les processus d'inflammation et de réponse de l'organisme à l'agression. La caractérisation de médiateurs moléculaires ayant des rôles connus dans l'hémostase et l'inflammation peut nous permettre d'améliorer la compréhension de ces phénomènes et de proposer des pistes de réflexion diagnostiques ou thérapeutiques. Nous nous sommes intéressé au couple facteur Willebrand/ADAMTS13. Cette étude menée chez des patients atteints de cancer nous a permis de montrer que l'utilisation de ces protéines comme des biomarqueurs peut améliorer l'évaluation du risque individuel de thrombose et donc la prise en charge thérapeutique. Le rôle de ces protéines dans la physiopathologie de ces mécanismes reste à préciser. Par ailleurs, sur la base de connaissances structurales, nous avons émis l'hypothèse d'une interaction entre deux récepteurs de la surface des leucocytes, cellules-clés de la réponse inflammatoire. En effet, PSGL-1, est le ligand de la P-sélectine sur l'endothélium vasculaire et joue un rôle majeur dans le roulement des leucocytes permettant leur recrutement aux sites de l'inflammation. PSGL-1 a une structure riche en acides sialiques. Le Siglec-5 est un récepteur qui lie des acides sialiques. Nous avons donc décrit et caractérisé la liaison entre ces deux protéines. L'utilisation d'une forme soluble de Siglec-5 réduit fortement le roulement et le recrutement des leucocytes *in vitro et in vivo*. Avant d'envisager toute application, il reste bien sûr à caractériser plus précisément les modalités de cette interaction et ses conséquences dans d'autres mécanismes régulés par l'interaction PSGL-1/P-sélectine comme la formation du thrombus.

Characterization of new mediators between cancer, inflammation and thrombosis : VWF, ADAMTS13, PSGL-1 et Siglec-5

**Keywords :** Cancer, Thrombosis, Inflammation, Mediators

Cancer and thrombosis are frequent and serious concerns in human pathology and public health. This conditions are known to share closed relationships, and reciprocal promotion involving cellular interactions and complex molecular mechanisms. Molecular pathways often involve hemostasis or immunity actors and participate in inflammation process, which can be either cause or consequence. Improved knowledge on molecular mediators at the crossroads of hemostasis and inflammation may allow best understanding of these mechanisms and improving therapeutic management. Thus, we studied Willebrand factor / ADAMTS13 couple : a key protein in hemostasis whose rate is influenced by inflammatory processes and its regulatory protease. This study in cancer patients shows that Willebrand factor and ADAMTS13 could be used as biomarkers to predict individual thrombosis risk and thus improve therapeutic management. Precise role of this proteins in cancer-mediated thrombosis remain unexplored. Furthermore, we hypothesized an interaction between two leukocyte receptors : PSGL-1 and Siglec-5. Leukocytes, especially neutrophils are recruited to inflammation sites after a key step of rolling along vasculature. PSGL-1 expressed on the majority of leukocytes is P-selectin ligand and plays a major role in leukocyte rolling. PSGL-1 has a structure rich in sialic acids. Siglec-5 is an immunoglobulin-like receptor and binds sialic acids. Thus, we described and characterized the interaction between these two proteins, and studied its role in leukocyte rolling *in vitro* and *in vivo*. Before considering any application, the modalities of this interaction should further analyzed (binding site, etc. ...) and its effect in other mechanism involving PSGL-1/P-selectin interaction like thrombus formation.

