

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro par des cellules cancéreuses

M. SASSI^{1,2},
G. GEROTZIAFAS¹,
T. CHAKROUN³,
V. GALEA¹,
H. VHASSINE⁴,
I. ELALAMY¹

Résumé : Les épisodes thrombotiques veineux constituent une complication fréquente et bien connue chez les patients atteints d'un cancer. L'expression constitutive du facteur tissulaire par les cellules cancéreuses est la cause majeure de la capacité procoagulante des cellules cancéreuses. Le test de génération de thrombine offre une mesure globale du potentiel de la coagulation. Il s'est imposé comme un outil d'apport considérable dans la détection des états d'hypercoagulabilité. L'objectif de notre étude était de développer et d'optimiser un modèle expérimental pour caractériser le phénotype procoagulant des cellules IGROV1 issues d'un adénocarcinome humain épithélial de l'ovaire par le biais du test de génération de thrombine. La génération de thrombine a été étudiée in vitro en plasma pauvre en plaquettes additionné de cellules cancéreuses. Nous avons montré que les cellules IGROV1 accélèrent et augmentent la génération de thrombine et que les paramètres chronométriques sont les paramètres les plus sensibles à l'augmentation du nombre de cellules cancéreuses. Ce modèle expérimental nous offre un outil précieux pour l'étude de l'hypercoagulabilité cellulaire induite par le cancer et nous ouvre la porte vers l'évaluation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux divers anticoagulants.

Mots clés : Cancer - facteur tissulaire - hypercoagulabilité - test de génération de thrombine.

Thrombin generation assessment : an in vitro characterization of hypercoagulability induced by cancer

- ¹ Service d'hématologie biologique, Hôpital Tenon, Paris-France.
² Laboratoire du Centre de Maternité et de Néonatalogie, Monastir
³ Centre Régional de Transfusion Sanguine, Sousse
⁴ Laboratoire d'hématologie, Hôpital Fattouma Bourguiba, Monastir

Abstract : Thromboembolic events are a major complication in cancer patients. Overexpression of tissue factor is favourable to the development of thrombosis. Thrombin generation test is sensitive to detect hypercoagulable changes in the plasma. The present study has been designed to investigate the capacity of thrombin generation assay to detect the hypercoagulability induced by ovarian cancer cells. We aimed to characterize, in an in vitro model, the procoagulant phenotype of human epithelial ovarian adenocarcinoma cells, IGROV1. Thrombin generation was assessed using Calibrated Automated Thrombogram. IGROV1 cells suspended into platelet poor plasma results in a significant acceleration of thrombin generation and an increase of the Peak and the ETP. The impact of cancer cells on blood coagulation process in human plasma relies upon the number of cells being in contact with human plasma. This experimental system, using thrombin generation assessment,

article original

allows to characterize the “procoagulant fingerprint” of ovarian cancers cells. The sensitivity of thrombin generation assay to detect the procoagulant activity of cancer cells allows to use this assay in pharmacological studies assessing the efficacy of antithrombotic drugs on cancer induced hypercoagulability.

Key Words : Cancer - tissue factor - hypercoagulability - thrombin generation test.

Introduction

Chez les patients atteints de cancer, les épisodes thrombotiques veineux (ETV) constituent une complication fréquente et bien connue (1,2). Les complications thrombotiques sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité élevées et posent de multiples problèmes thérapeutiques chez les patients cancéreux hospitalisés ou en ambulatoire (3). En effet, la thrombose veineuse profonde, du fait du risque d'embolie pulmonaire, représente la deuxième cause de mortalité en oncologie (4). L'expression constitutive du facteur tissulaire (FT) par les cellules cancéreuses est la cause majeure de la capacité procoagulante des cellules cancéreuses (2,5). En effet, les cellules cancéreuses expriment environ 1000 fois plus de FT que les cellules normales correspondantes étant donné que les mécanismes de contrôle de l'expression du FT sont déréglés par les cellules cancéreuses (6). Or, le complexe FT-FVIIa est le détonateur de la coagulation. L'évaluation du processus de la génération de thrombine a été proposée dans l'étude de l'hémostase dans les années 1950 (7). Au milieu des années 1980, Hemker et ses collègues ont revu ce «vieux test ré-actualisé» et ils ont introduit quelques modifications pratiques innovatrices rendant le test plus facile à performer (8,9). Le Calibrated Automated Thrombography (CAT) est la version la plus récente du test de génération de thrombine (TGT). Le TGT offre une mesure globale du potentiel de la coagulation (8). Sa pertinence a été évaluée dans différents domaines. En particulier, le TGT s'est imposé comme un outil d'apport considérable dans la détection des états d'hypercoagulabilité. Dans ce travail, nous nous sommes proposés de mettre au point un modèle expérimental pour étudier in vitro l'hypercoagulabilité induite

par les cellules IGROV1, issues d'un adénocarcinome humain épithélial de l'ovaire, par le biais du TGT. Nous avons optimisé ce modèle expérimental pour caractériser le phénotype procoagulant des cellules IGROV1 et nous avons analysé l'effet des cellules IGROV1 sur les différentes phases et sur les différents paramètres de la génération de thrombine mesurée dans du plasma humain.

Matériels et méthodes

Mise en culture des cellules IGROV1

La lignée des cellules IGROV1 étudiée, a été isolée la première fois à partir d'un carcinome ovarien d'une femme de 47 ans et elle a été entretenue dans des cultures cellulaires et chez des souris (10). Les cellules IGROV1 ont été cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² contenant du milieu RPMI-1640 (Invitrogen, Cergy, Pontoise, France) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen, Cergy, Pontoise, France), 5 mM de glutamine et 50 U/ml de pénicilline-streptomycine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les boîtes de culture ont été ensuite incubées dans une étuve à 37°C en présence de 100% d'humidité atmosphérique et 5% de CO₂. Quand les cellules ont atteint une confluence d'environ 50%, elles ont été incubées avec la trypsine (3 mn, 37°C), puis mises en suspension dans le milieu RPMI et enfin lavées dans un tampon phosphate salin. Après centrifugation (5 min, 200xg), le culot contenant les cellules IGROV1 a été mis en suspension dans du sérum physiologique (NaCl 9‰).

Recueil du plasma pauvre en plaquettes

Les prélèvements sanguins ont été effectués sur 6 volontaires sains ne prenant aucune médication pouvant interférer avec l'hémostase. Le sang a été collecté par ponction veineuse antécubitale atraumatique dans des

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro

tubes Vacutainer® siliconés (Becton Dickinson, Meylan, France) contenant du citrate de sodium (0.129 M, 9 Volumes de sang et 1 Volume d'anticoagulant).

L'obtention d'un plasma pauvre en plaquettes (PPP) nécessite une double centrifugation du sang total citraté à 2000g/15min. Toutes les expériences ont été effectuées sur chacun des 6 PPP recueillis.

Test de génération de thrombine

- Principe général du test de génération de thrombine dans un plasma pauvre en plaquette

La génération de thrombine a été étudiée dans le PPP in vitro selon la méthode décrite par Hemker et al (11). Le TGT pratiqué sur du PPP est une mesure automatisée et standardisée de la cinétique de la génération de thrombine. Les concentrations du FT et des phospholipides (PL) ajoutés dans le PPP pour la mesure de la génération de thrombine ont été particulièrement standardisées (8). La génération de thrombine est déclenchée par l'ajout d'une solution contenant du CaCl₂ (concentration finale de 16.7 mM) et d'un substrat fluorogénique spécifique de la thrombine (Z-Gly-Gly-Arg-Amino-Méthyl Coumarine, Bachem, Bubendorf, Switzerland). Ainsi, cette méthode nous permet d'analyser l'ensemble des phases de la génération de thrombine (initiation, propagation et inhibition) ainsi que l'intégralité du «travail enzymatique» fait par la thrombine pendant sa présence sous forme active. L'enregistrement et l'analyse de la génération de thrombine sont effectués au moyen d'un fluorimètre et d'un logiciel approprié. Le substrat fluorogénique émet un signal fluorescent lors de son hydrolyse par la thrombine. Le signal fluorogénique généré est donc directement lié à la quantité de thrombine présente dans le milieu. En parallèle avec chaque PPP étudié, on associe un puits où l'on ajoute un calibrant au PPP. En prenant comme référence ce calibrant, le logiciel d'analyse convertit au fur et à mesure le signal fluorescent en nM de thrombine. Le tracé obtenu pour chaque couple (échantillon, calibrant) est appelé «thrombogramme». Les paramètres analysés du thrombogramme sont indiqués sur la figure 1 (12) :

lag-time : temps de latence correspondant à la phase d'initiation de la génération de thrombine, exprimé en

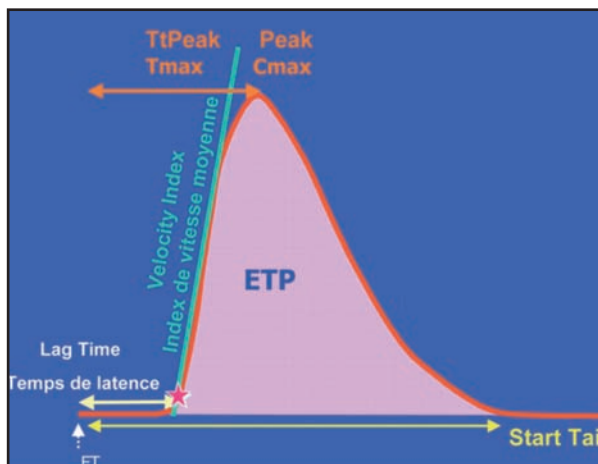


Figure 1. Les paramètres du test de génération de thrombine formant le «thrombogramme» (12)

minutes (min) ttPeak(time to peak) : temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale de thrombine, exprimé en min; Peak : concentration maximale de la thrombine générée, exprimée en nM ;

ETP (Endogenous Thrombin Potential) : aire sous la courbe correspondant au travail enzymatique de la thrombine générée, exprimé en nMxmin.

MRI (Mean Rate Index) : vitesse de la phase de propagation traduisant la vitesse de la génération de thrombine, calculée par la formule : $MRI = \frac{Peak}{(ttPeak - lagtime)}$ et exprimée en nM/min.

Les paramètres chronométriques (lag-time et ttPeak) sont sensibles à la variation de la quantité de FT présente dans l'échantillon étudié ou apporté par le réactif. Cependant, le Peak, le MRI et l'ETP sont influencés par la quantité de phospholipides (PL) présente dans le système expérimental.

- Mise au point du modèle expérimental pour l'étude in vitro de la capacité des cellules IGROV1 à générer la thrombine

Les cellules IGROV1 en suspension dans le sérum physiologique ont été mélangées avec du PPP. Le nombre des cellules IGROV1 dans le PPP a varié de 5 à 250 cellules/ μ l. Le PPP dépourvu de cellules IGROV1, constituant l'expérience «Contrôle», a été testé au même temps que le PPP combiné aux cellules IGROV1. On a éliminé dans notre modèle expérimental toute source exogène de FT et de PL. Dans chaque puits d'une plaque

article original

de microtitration à fond plat de 96 puits, la génération de thrombine a été par la suite déclenchée et mesurée comme décrit précédemment.

Résultats

Effets des cellules IGROV1 sur les différents paramètres du test de génération de thrombine

• Lag-time

Dans l'expérience «Contrôle» (en l'absence de cellules IGROV1), la valeur du lag-time a été de 12.67 ± 2.5 min. L'addition des cellules IGROV1 dans le PPP a entraîné un raccourcissement du lag-time. En effet, à 5 cellules/ μ l, les cellules IGROV1 ont réduit de façon significative le lag-time (4.33 ± 0.5 min) par comparaison à l'expérience «Contrôle» ($p < 0.05$) (Tableau I). En outre, le lag-time a été corrélé négativement ($r = -0.51$) au nombre de cellules IGROV1 rajoutées au PPP avec un effet plateau atteint à partir de 100 cellules/ μ l (Figure 2). Ce plateau correspond à un raccourcissement d'environ 7 fois par rapport à l'expérience «Contrôle» (Figure 3A).

• ttPeak

En présence de 5 cellules/ μ l, le ttPeak a été deux fois plus court (8.01 ± 0.5 min) comparativement à

l'expérience «Contrôle» (16.33 ± 3 min) (Tableau I). Ce raccourcissement du ttPeak a été plus prononcé avec l'augmentation du nombre des cellules avec un plateau atteint à partir de 200 cellules/ μ l correspondant à un ttPeak 4 fois plus court que dans l'expérience «Contrôle» (Figure 3A). Le ttPeak a été, toutefois, moins sensible que le lag-time à la présence des cellules IGROV1 dans le PPP.

• Peak

À 5 cellules/ μ l, les cellules IGROV1 ont induit une augmentation significative du Peak (145 ± 13 nM) par comparaison à l'expérience «Contrôle» (78 ± 10 nM) ($p < 0.05$) (Tableau I). Cependant, l'effet du nombre des cellules sur le Peak a été moins prononcé que sur les paramètres chronométriques (lag-time, ttPeak).

L'augmentation du Peak n'a pas été exacerbée à 10 et à 20 cellules/ μ l par rapport à 5 cellules/ μ l (Tableau I, Figure 2). À 50 cellules/ μ l, le Peak a été augmenté d'environ 2 fois par rapport à l'expérience «Contrôle».

Le Peak n'a pas été significativement modifié à 100 cellules/ μ l par rapport à 50 cellules/ μ l. Les valeurs les plus élevées du Peak ont été atteintes à 250 cellules/ μ l avec une augmentation environ 4 fois supérieure par rapport à l'expérience «Contrôle» (Tableau I). Il n'a pas été observé de plateau pour le Peak avec les nombres étudiés

Tableau I : Effets de la variation du nombre de cellules IGROV1 sur les paramètres du test de génération de thrombine. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Sd de 6 expériences (* versus 0 cellules/ μ l; $p < 0,05$).

IGROV1 (cellules/ μ l)	lag-time (min)	ttPeak (min)	Peak (nM)	ETP (nMxmin)	MRI (nM/min)
0	$12,67 \pm 2,5$	$16,33 \pm 3$	$78,08 \pm 10$	760 ± 100	$21,33 \pm 8$
5	$4,33 \pm 0,5^*$	$8,01^* \pm 0,5$	$145^* \pm 13$	$1935^* \pm 150$	$39,47^* \pm 5$
10	$3,66 \pm 0,3^*$	$7,01^* \pm 0,4$	$145^* \pm 8$	$1841^* \pm 200$	$43,25^* \pm 3$
20	$2,66 \pm 0,2^*$	$6,34^* \pm 0,5$	$149^* \pm 10$	$1775^* \pm 155$	$40,55^* \pm 8$
50	$2,33 \pm 0,4^*$	$5,67^* \pm 0,3$	$169^* \pm 5$	$1804^* \pm 225$	$50,64^* \pm 8$
100	$1,66^*$	$4,67^* \pm 0,1$	$201^* \pm 15$	$1796^* \pm 176$	$66,77^* \pm 11$
200	$1,66^*$	4^*	$247^* \pm 18$	$1785^* \pm 180$	$105,71^* \pm 18$
250	$1,66^*$	4^*	$319^* \pm 20$	$1926^* \pm 300$	$136,28^* \pm 23$

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro

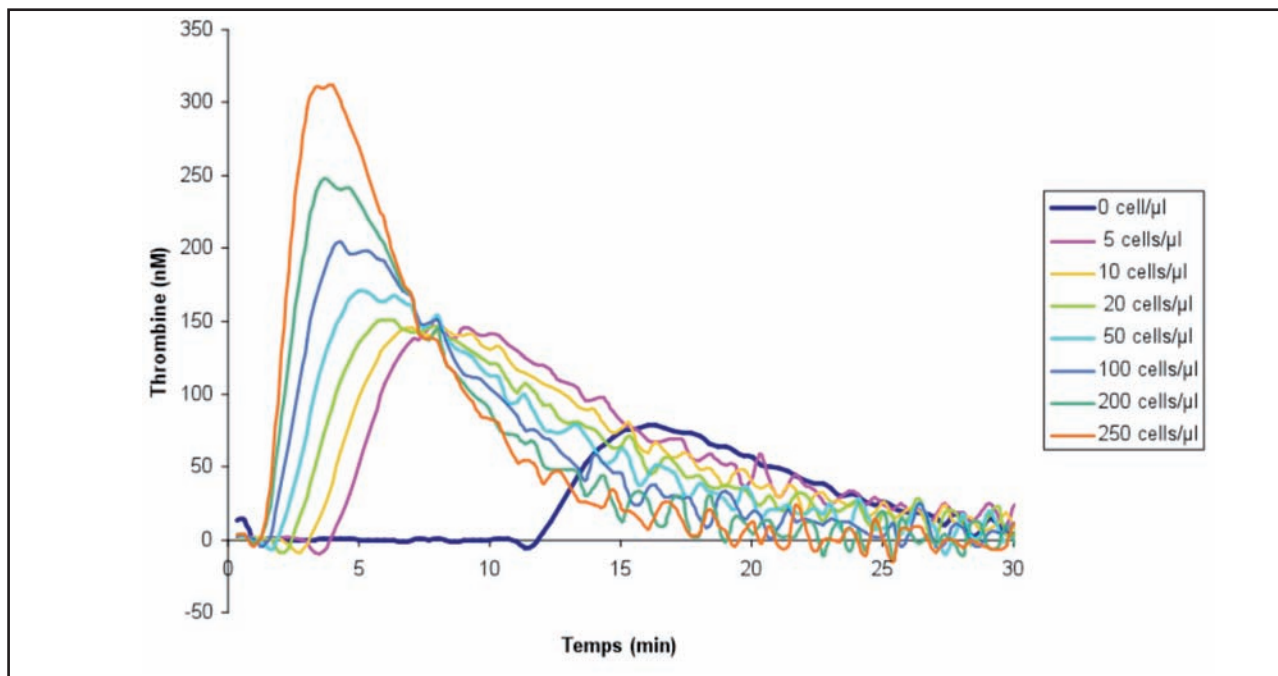


Figure 2 : Thrombogrammes représentatifs d'une expérience parmi les 6 effectuées. Les résultats soulignent l'effet du nombre croissant de cellules IGROV1 sur la génération de thrombine par comparaison aux résultats de l'expérience «Contrôle».

de cellules dans ces évaluations contrairement aux paramètres chronométriques (Figure 3B).

• MRI

Les cellules IGROV1 ont induit une augmentation significative du MRI à 5 cellules/ μ l (39.47 ± 5 nM/min) par comparaison à l'expérience «Contrôle» (21.33 ± 8 nM/min) ($p < 0.05$). Comme pour le Peak, l'augmentation du MRI n'a pas été exacerbée à 10 et à 20 cellules/ μ l par rapport à 5 cellules/ μ l. Le Peak est augmenté de façon importante à 200 cellules/ μ l, par rapport à 50 et à 100 cellules/ μ l. A 250 cellules/ μ l, l'augmentation du MRI a été 6 fois supérieure par rapport à l'expérience «Contrôle» (Tableau I). Comme pour le Peak, il n'a pas été observé de plateau avec les nombres étudiés de cellules (Figure 3C).

• ETP

A 5 cellules/ μ l, l'ETP a été significativement augmenté (1935 ± 150 nMxmin) par comparaison à l'expérience Contrôle (760 ± 100 nMxmin) ($p < 0.05$) (Tableau I).

Lorsque le nombre des cellules IGROV1 a été augmenté, l'ETP n'a pas atteint, en revanche, de valeur plus élevée que celle obtenue avec 5 cellules/ μ l (Figure 3D).

Discussion

Le cancer de l'ovaire, qui est l'exemple d'étude des cellules cancéreuses choisi dans notre travail, est étroitement associé à la survenue des ETV (13). En effet, selon une méta-analyse récente ayant estimé le risque d'ETV en fonction de la localisation du cancer, le risque relatif (RR) le plus élevé a été attribué au cancer de l'ovaire (RR : 6,5%), suivi par le cancer du pancréas (RR : 6,11%) et le cancer du foie (RR : 5,55%) (14). Les cellules IGROV1 en suspension dans le PPP accélèrent la génération de thrombine et augmentent le Peak, le MRI et l'ETP en l'absence de source exogène de FT et de PL. Tout d'abord, les paramètres chronométriques sont raccourcis en fonction du nombre croissant de cellules

article original

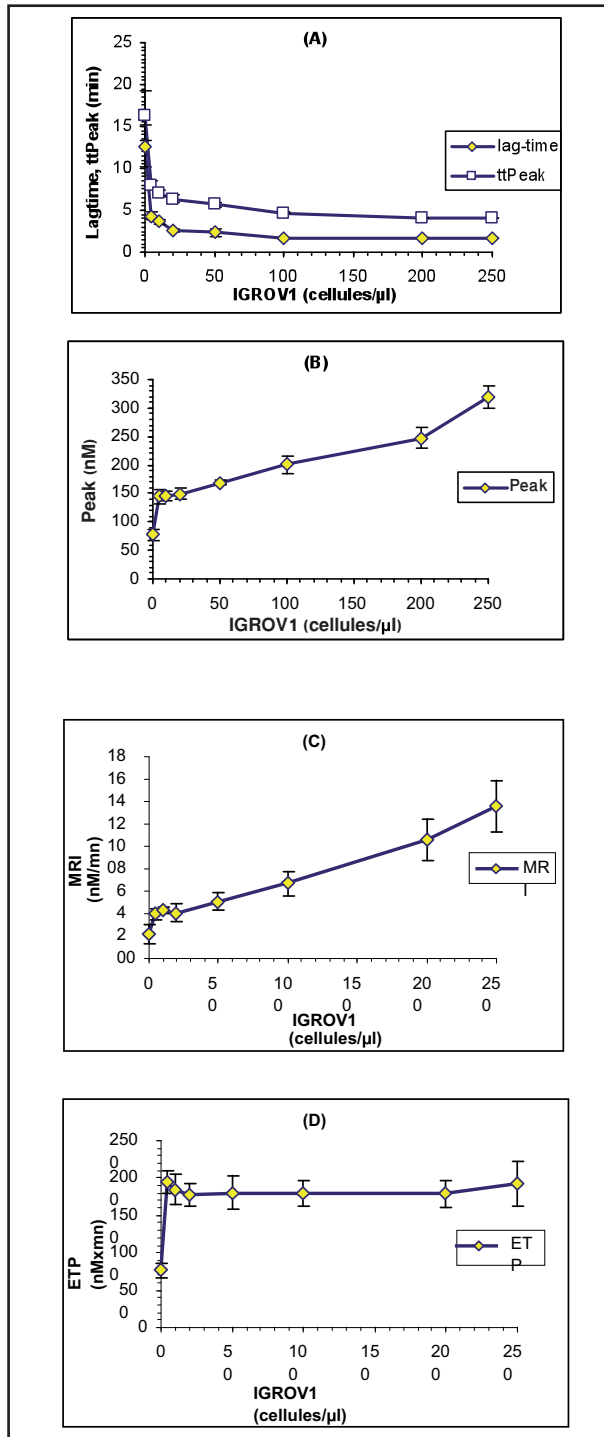


Figure 3 : Influence des cellules IGROV1 sur les paramètres du thrombogramme. (A) lag-time et ttPeak; (B) Peak; (C) MRI; et (D) ETP. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm Sd (n=6).

dans le plasma jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Or, la concentration du FT affecte la phase d'initiation de la génération de thrombine ce qui expliquerait que la réduction du lag-time en présence d'un nombre croissant de cellules cancéreuses serait due à une expression importante en FT. Cette expression accrue en FT explique l'effet significatif observé en présence de seulement 5 cellules/μl. Nos résultats sont en accord avec ceux de Debaugnies et al (15). Ces auteurs ont évalué le profil procoagulant de sujets ayant un cancer nouvellement diagnostiqué par le biais du TGT dans des conditions expérimentales variées afin de bien étudier l'impact du FT et des PL en excès retrouvés dans le plasma des patients cancéreux sur les différents paramètres du TGT. Lorsque des PL exogènes sont additionnés seuls au PPP, les auteurs ont retrouvé un raccourcissement significatif du lag-time par comparaison aux sujets normaux ce qui suggère que du FT endogène est présent en forte concentration dans le plasma des patients cancéreux. L'addition d'anti-FT a entraîné un allongement de la phase d'initiation de la génération de thrombine et donc une prolongation du lag-time. L'expression constitutive accrue du FT par les cellules cancéreuses est la cause majeure d'hypercoagulabilité associée au cancer (2,5).

Le Peak, le MRI et l'ETP augmentent en présence de cellules IGROV1. Or, ces paramètres sont dépendants de la quantité de PL anioniques apportée par le système étudié et qui constituent ainsi la surface catalytique sur laquelle se forment les complexes enzymatiques de la coagulation. Ceci suggère la présence de PL procoagulants dérivant probablement des cellules IGROV1.

Debaugnies et al (15), en ajoutant cette fois du FT exogène dans le milieu réactionnel, ont retrouvé une augmentation significative du Peak, du MRI et de l'ETP dans le plasma des patients cancéreux ce qui évoque des taux élevés de PL endogènes circulant dans leur plasma. Les travaux de Debaugnies et al (15) suggèrent alors que le plasma des patients cancéreux nouvellement diagnostiqués contient un excès de FT et de PL circulant probablement sous forme de microparticules (MP) dérivant des cellules cancéreuses. Les MP FT+ ont été détectées à des taux élevés dans différents types de cancer (16,17).

Application du test de génération de thrombine à l'évaluation de l'hypercoagulabilité induite in vitro

Dans le même sens, Zwicker et al. (18) ont retrouvé un taux élevé de MP FT+ circulantes mesurées par cytométrie en flux dans le cas de différents types de cancers y compris les cancers ovariens. En outre, Davila et al. (19) ont montré que l'hypercoagulabilité induite par les cellules cancéreuses in vitro et in vivo est associée essentiellement aux MP relarguées. Cette hypercoagulabilité liée aux MP dépend complètement du FT et de la phosphatidylsérine étant donné qu'elle est abolie par l'ajout d'anti-FT et d'annexine V dans le milieu réactionnel (19).

Nos résultats sont donc en accord avec les données de la littérature (20). Ils soulignent, tout particulièrement, un raccourcissement du lag-time dû à une surexpression du FT et une augmentation du travail enzymatique de la thrombine due probablement à la présence de PL procoagulants en excès dans le milieu réactionnel.

Conclusion

La physiopathogénie des troubles hémostatiques décrits au cours du cancer est particulièrement complexe et elle traduit les multiples connexions de cette pathologie avec les systèmes de l'inflammation et de l'hémostase (21).

Le cancer pourrait en fait être simulé à un «volcan thrombotique» avec deux principaux acteurs : le FT sur-exprimé par les cellules cancéreuses et la phosphatidylsérine présente à la surface des plaquettes activées. Rappelons que les plaquettes activées et les cellules tumorales émettent des MP particulièrement riches en FT et en phosphatidylsérine. Ces MP se trouvant alors en grandes quantités dans la circulation amplifient et entretiennent ce «volcan thrombotique». Un tel contexte thrombotique exerce un impact négatif sur la qualité de vie des patients, déjà altérée par la maladie cancéreuse elle-même et par les effets indésirables des traitements anticancéreux. Notre étude a contribué à la mise au point d'un modèle expérimental pour la caractérisation du phénotype procoagulant des cellules IGROV1 d'un adénocarcinome ovarien humain. Ce modèle expérimental d'étude in vitro des cellules cancéreuses pourrait constituer un outil précieux pour l'évaluation de l'effet de divers antithrombotiques sur l'hypercoagulabilité cellu-

laire induite par le cancer et pour l'adaptation de la prise en charge anticoagulante des patients cancéreux en fonction du type histologique du cancer.

Références

1. Sallah S, Ahmad O, Kaiser HE. Pathogenesis of thrombotic disorders in patients with cancer. *In Vivo* 2000; 14 (1):251-3.
2. Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res* 2010 ;125 (2):S36-8.
3. Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer* 2010;102 (1):S2-9.
4. Sallah S, Wan JY, Nguyen NP. Venous thrombosis in patients with solid tumors: determination of frequency and characteristics. *ThrombHaemost* 2002; 87: 575-9.
5. Garniera D, Milsomb C, Magnusa N et al. Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. *Thromb Res* 2010; 125: S44-S50.
6. Milsom C, Rak J. Tissue factor and cancer. *PathophysiolHaemostThromb* 2007-08; 36:160-76.
7. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res* 2011; 127 (suppl 3): S21-5.
8. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Le Flem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment : the influence of the tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal value of thrombogram-thrombinoscope assay. *Thromb J* 2005; 3: 16.
9. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *Br J Hematol* 2005; 130, 653-61.
10. Castelli R, Porro F et Tarsia P. The heparins and cancer : a review of clinical trials and biological properties. *Vasc Med* 2004; 9: 205-13.
11. Hemker HC, Willems GM, Beguin S. A computer assisted method to obtain the prothrombin activation velocity in whole plasma independent of thrombin decay processes. *ThrombHaemost* 1986; 56 (1):9-17.
12. Gerotziafas GT. Le test de génération de thrombine. Un test utile pour la recherche et nécessaire pour une exploration moderne de l'hémostase. *BIOTRIBUNE* 2007 ;24.

article original

13. Tateo S, Mereu L, Salamano S et al. Ovarian cancer and venous thromboembolism risk. *Gynecol oncol* 2005; 99: 119-25.
14. Iodice S, Gandini S, Lohr M, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Venous thromboembolic events and organ-specific occult cancers : a review and meta-analysis. *J ThrombHaemost* 2008; 6: 781-8.
15. Debaugnies F, Azerad MA, Noubououssié D et al. Evaluation of the procoagulant activity in the plasma of cancer patients using a thrombin generation assay. *Thromb Res* 2010; 126: 531-35.
16. Tesselaar M, Romijn F, Van Der Linden IK, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J ThrombHaemost* 2009; 7:1421-3.
17. Zwicker JI. Predictive value of tissue factor bearing microparticles in cancer associated thrombosis. *Thromb Res* 2010;125 (Suppl 2): S89-S91.
18. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* 2009;15 (22): 6830-40.
19. Davila M, Amirkhosrvi A, Coll E et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J ThrombHaemost* 2008; 6: 1517-24.
20. Duchemin J, Pan-Petes B, Arnaud B, Blouch MT, Abgrall JF. Influence of coagulation factors and tissue factor concentration on the thrombin generation test in plasma. *ThrombHaemost* 2008; 99: 767-73.
21. Elalamy I, Verdy E, Gerotziapas G, Hatmi M. Physiopathogénie de la maladie thromboembolique veineuse au cours du cancer. *Pathologie Biologie* 2008 ; 56 :184-94.