



Potentiel thérapeutique de l'activation du récepteur nucléaire PPARgamma dans la myélofibrose

Juliette Lambert

► To cite this version:

Juliette Lambert. Potentiel thérapeutique de l'activation du récepteur nucléaire PPARgamma dans la myélofibrose. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS536 . tel-03078934

HAL Id: tel-03078934

<https://theses.hal.science/tel-03078934>

Submitted on 17 Dec 2020

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.

Potentiel thérapeutique de l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ dans la myélofibrose

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582
Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé (CBMS)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 16 Décembre 2019, par

Juliette Lambert

Composition du Jury :

François Delhommeau
PUPH, Université de la Sorbonne
Valérie Ugo
PUPH, Université d'Angers
Bruno Cassinat
PH, Université Denis Diderot
Isabelle Plo
DR, Université Paris Saclay
Heriberto Bruzzoni-Giovanelli
MCUPH, Université Denis Diderot
Stéphane Prost
CEA-E4, Université Paris Sud
Philippe Rousselot
PUPH, Université Versailles Saint-Quentin

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Aux membres de mon jury :

Monsieur le Professeur François Delhommeau, je te remercie de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Madame le Professeur Valérie Ugo,

Monsieur le Docteur Bruno Cassinat,

Je vous remercie d'avoir accepté le rôle de rapporteur et le lourd travail qui s'y rapporte.

Madame le Docteur Isabelle Plo, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de m'avoir fait profiter de tes conseils et de ton expertise tout au long de ma thèse.

Monsieur le Docteur Heriberto Bruzzoni-Giovanelli, je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury et de juger ce travail.

A mes directeurs de thèse :

Monsieur le Docteur Stéphane Prost, je te remercie pour ton encadrement, ta présence, tes conseils, ta disponibilité et tant de choses encore. Ces années de thèse m'ont fait découvrir tes qualités scientifiques et aussi tes qualités humaines. J'espère pouvoir continuer à travailler à tes côtés pour la suite du projet.

Monsieur le Professeur Philippe Rousselot, je te remercie d'avoir cru en ma capacité à faire ce doctorat, de m'avoir présentée à Stéphane pour réaliser ce projet, et de m'avoir toujours soutenue dans cette démarche.

Aux membres du service des thérapies innovantes :

Je remercie le Docteur Stany Chrétien et le Professeur Philippe Leboulch qui m'ont ouvert les portes du laboratoire. Je remercie particulièrement Joseph Saliba qui m'a encadrée et formée pendant sa dernière année de post-doctorat. J'espère que tu es fier de ce travail avec ou sans « la manip du siècle ». Je remercie tous ceux qui m'ont aidée par leurs conseils et leur attention à apprivoiser le laboratoire et particulièrement Karine Sii-Felice, Emmanuel Payen, Olivier Goupille et Zahra Kadri. Je remercie Carolina Calderon pour son aide technique mais aussi pour son rire qui traverse les murs.

A nos collaborateurs de Gustave Roussy :

Je remercie Monsieur le Docteur William Vainchenker qui a eu la gentillesse de s'intéresser à ce projet et qui nous a fait bénéficier de ses inestimables conseils et Monsieur le Docteur Jean-Luc Villeval qui

nous a fait profiter de sa grande expérience des modèles murins et a collaboré avec enthousiasme à ce projet.

A Madame le Professeur Sylvie Castaigne. Je vous remercie de suivre avec tant de bienveillance mon parcours en Hématologie depuis mon premier stage d'interne. Vos conseils me sont toujours précieux.

A tout le service d'Hématologie-Oncologie du Centre Hospitalier de Versailles. Je remercie l'ensemble de mes collègues qui m'ont soutenue, supportée et parfois remplacée à l'hôpital, mention spéciale à Sophie Rigaudeau pour les livraisons à domicile, précieux gain de temps, et Géraldine Salmeron pour tout ce qui nous lie.

Je tiens à adresser également tous mes remerciements à mon entourage. Vous êtes la base solide qui me permet de réaliser mes projets.

A ma belle et grande famille. Je remercie tout particulièrement mes parents Thierry et Emmanuelle qui ont assuré le soutien moral et logistique de quatre thèses, mais aussi mes frères chéris, Jérôme, Thomas et Nicolas et mes belles belles-sœurs, Fatéma, Sandrina et Maéva.

A mes amis. Merci de votre soutien sans faille.

A Cédric, parce que tu crois que tout est possible.

A Sarah, parce que tu es une fille merveilleuse. Tu rends ma vie plus belle.

Table des matières

Table des illustrations.....	6
Abreviations	8
Première partie : Introduction.....	12
1.1 Chapitre 1 : La myélofibrose primitive	12
1.1.1 La myélofibrose primitive au sein des néoplasmes myéloprolifératifs	12
1.1.2 Anomalies génétiques conductrices.....	14
1.1.2.1 Mutation de JAK2	15
1.1.2.2 Mutation de MPL	16
1.1.2.3 Mutation de CALR.....	17
1.1.2.4 Myélofibrose primitive triple négative	18
1.1.2.5 Anomalies non conductrices additionnelles acquises.....	19
1.1.2.6 Anomalies cytogénétiques.....	20
1.1.3 Aspects cliniques, biologiques et anatomo-pathologiques	21
1.1.3.1 Epidémiologie	21
1.1.3.2 Aspects clinico-biologiques.....	21
1.1.3.3 Aspects anatomo-pathologiques.....	22
1.1.3.4 Critères diagnostiques selon la classification OMS 2016	23
1.1.4 Evolution et pronostic.....	24
1.1.5 Aspects thérapeutiques	26
1.1.5.1 Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.....	26
1.1.5.2 Traitements conventionnels hors inhibiteurs de JAK.....	26
1.1.5.3 Inhibiteurs de JAK.....	27
1.1.5.4 Traitements en développement.....	28
1.2 Chapitre 2 : Physiopathologie de la myélofibrose primitive	29
1.2.1 La myéloprolifération.....	29
1.2.1.1 La clonalité	29
1.2.1.2 La voie JAK/STAT.....	30
1.2.1.2.1 Les JAKs	30
1.2.1.2.2 Les STATs.....	31
1.2.1.2.3 Principe de la signalisation par la voie JAK-STAT.....	32
1.2.1.2.3.1 Voie canonique.....	32
1.2.1.2.3.2 Voie non canonique.....	33
1.2.1.2.4 Régulation négative de la voie JAK-STAT	33
1.2.1.3 Rôle des JAKs et des STATs dans l'hématopoïèse	34
1.2.1.4 Le facteur de transcription STAT5.....	35

1.2.1.4.1	Structure de STAT5.....	35
1.2.1.4.2	Rôle de STAT5 dans l'hématopoïèse	36
1.2.1.4.3	Rôle de STAT5 dans l'hématopoïèse pathologique des néoplasmes myéloprolifératifs : l'exemple de la leucémie myéloïde chronique	37
1.2.1.5	Dérégulation de la voie JAK-STAT dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques non BCR-ABL.....	38
1.2.2	La réaction stromale	39
1.2.2.1	Microenvironnement médullaire	39
1.2.2.1.1	Cadre osseux, vascularisation et cellules stromales	39
1.2.2.1.2	Matrice extracellulaire.....	40
1.2.2.1.2.1	Composants de la matrice extracellulaire	40
1.2.2.1.2.2	Dégradation de la matrice extracellulaire	41
1.2.2.2	Physiopathologie de la fibrose médullaire.....	41
1.2.2.3	Rôle majeur du TGF- β 1.....	43
1.2.2.3.1	Famille des TGF- β	43
1.2.2.3.2	Fonctions des TGF- β	44
1.2.2.3.3	Synthèse et activation du TGF- β 1	44
1.2.2.3.4	Voies de signalisation du TGF- β 1	45
1.2.2.3.4.1	Voie de signalisation canonique du TGF- β 1 : la voie des Smads	46
1.2.2.3.4.2	Les voies non canoniques	47
1.2.2.3.5	Effet du TGF- β 1 sur la matrice extra-cellulaire et la fibrose.....	48
1.2.2.3.6	Rôle du TGF- β 1 dans la myélofibrose primitive.....	49
1.2.2.4	Autres cytokines fibrogéniques	51
1.2.2.5	Physiopathologie de l'ostéosclérose	51
1.2.2.6	Physiopathologie de la néoangiogenèse	52
1.2.3	L'inflammation.....	53
1.2.3.1	Inflammation et néoplasmes myéloprolifératifs	53
1.2.3.2	Principales cytokines inflammatoires impliquées dans la myélofibrose primitive..	55
1.2.3.3	Voies de signalisation NF- κ B dans la myélofibrose primitive	56
1.2.3.4	Rôle du TGF- β 1 dans l'inflammation	57
1.3	Chapitre 3 : PPAR γ	58
1.3.1	Généralités sur les PPARs	58
1.3.1.1	Structure du récepteur nucléaire PPAR γ	59
1.3.1.2	Mécanisme d'action de PPAR γ	60
1.3.1.2.1	Activité transcriptionnelle	60
1.3.1.2.2	Régulation post-traductionnelle.....	62
1.3.1.3	Les ligands de PPAR γ	63

1.3.1.3.1	Ligands physiologiques	63
1.3.1.3.2	Ligands de synthèse.....	64
1.3.1.3.2.1	Les thiazolidinediones	64
1.3.1.3.2.2	Les modulateurs sélectifs des PPARs : les SPPARMs.....	65
1.3.1.3.2.3	Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	65
1.3.1.3.2.4	Les dérivés des triterpénoïdes.....	65
1.3.1.3.2.5	Les co-agonistes et les pan-agonistes	66
1.3.1.3.2.6	Les antagonistes.....	66
1.3.1.4	Rôles de PPAR γ	66
1.3.1.4.1	Rôle dans le métabolisme lipidique et glucidique	66
1.3.1.4.2	Rôle dans l'athérosclérose	67
1.3.1.4.3	Rôle dans le métabolisme osseux	68
1.3.1.4.4	Rôle dans les cancers.....	69
1.3.2	Effets putatifs de l'activation de PPAR γ dans la myélofibrose primitive	69
1.3.2.1	Rôle de PPAR γ dans l'hématopoïèse	69
1.3.2.1.1	Expression de PPAR γ dans le système hématopoïétique	69
1.3.2.1.2	Rôle dans l'érythropoïèse	70
1.3.2.1.3	Rôle dans l'hématopoïèse : axe PPAR γ /STAT5	70
1.3.2.1.4	Rôle dans les cellules souches hématopoïétiques.....	71
1.3.2.1.5	Rôle de PPAR γ dans l'hématopoïèse pathologique.....	72
1.3.2.1.5.1	Effet des ligands de PPAR γ dans les hémopathies.....	72
1.3.2.1.5.2	Effet des ligands de PPAR γ dans les néoplasmes myéloprolifératifs : l'exemple de la leucémie myéloïde chronique	74
1.3.2.2	Rôle dans l'inflammation	76
1.3.2.2.1	Effet anti-inflammatoire de l'activation de PPAR γ en clinique et dans les modèles expérimentaux de maladies inflammatoires.....	76
1.3.2.2.2	Rôle de PPAR γ dans les monocytes/macrophages.....	76
1.3.2.2.3	Rôle de PPAR γ dans les autres cellules du système immunitaire	77
1.3.2.2.4	Rôle de PPAR γ dans la régulation négative de la voie NF-kb	77
1.3.2.3	Rôle dans le développement de la fibrose	78
1.3.2.3.1	Rôle protecteur de l'activation de PPAR γ	78
1.3.2.3.2	Mécanismes physiopathologiques de l'action anti-fibrotique de PPAR γ : axe PPAR γ -TGF- β 1	79
Deuxième partie : Objectifs du travail de Thèse		81
Troisième partie : Matériel et méthodes.....		83
3.1	Etude de la prolifération <i>in vitro</i>	83
3.1.1	Sources cellulaires.....	83

3.1.2	Conditions de culture.....	83
3.1.3	Etude de la viabilité cellulaire	84
3.1.4	Etude du cycle cellulaire	84
3.1.5	Etude de l'apoptose	84
3.1.6	Etude du potentiel clonogénique	85
3.2	Etude de la fibrose <i>in vitro</i>	85
3.2.1	Sources cellulaires.....	85
3.2.2	Conditions de culture.....	86
3.2.3	Induction des gènes cibles de la fibrose par le TGF- β 1	86
3.2.4	Quantification de la transcription des gènes cibles de la fibrose par RT-qPCR.....	86
3.2.5	Etude de la phosphorylation des Smads	87
3.2.6	Etude des voies de signalisation par inhibiteurs chimiques.....	87
3.2.7	Etude du rôle du co-facteur p300	87
3.2.7.1	Surexpression du co-facteur de transcription p300	87
3.2.7.2	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq)	88
3.3	Etude du potentiel thérapeutique de l'activation de PPAR γ dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs	89
3.3.1	Provenance des souris.....	89
3.3.2	Procédure de transplantation	89
3.3.3	Modèles murins	89
3.3.3.1	Modèle de myélofibrose TPO ^{high}	89
3.3.3.2	Modèle de myélofibrose post-polyglobulie de Vaquez JAK2 ^{V617F}	90
3.3.3.3	Modèle JAK2 ^{V617F} -GFP.....	91
3.3.3.4	Modèle Calréticuline	91
3.3.4	Traitement des souris par les ligands de PPAR γ	92
3.3.5	Prélèvements issus des souris.....	93
3.3.5.1	Prélèvements sanguins.....	93
3.3.5.1.1	Hémogrammes.....	93
3.3.5.1.2	Quantification de la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation par RT-qPCR	93
3.3.5.2	Prélèvements médullaires	93
3.3.5.2.1	Etude de la cellularité médullaire et du potentiel clonogénique.....	93
3.3.5.2.2	Etude de la population médullaire Lin-Sca+ Kit+ (LSK).....	94
3.3.5.3	Analyse anatomo-pathologique des fémurs et des rates	94
3.4	Analyses statistiques.....	94
Quatrième partie : Résultats expérimentaux.....		95
4.1	Effet de l'activation de PPAR γ sur la prolifération du clone hématopoïétique.....	95

4.1.1	Effet des ligands de PPAR γ sur la prolifération et la clonogénicité des cellules des lignées HEL et UKE-1 et des progéniteurs hématopoïétiques issus de patients	95
4.1.2	Effet des ligands de PPAR γ sur la prolifération dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs	98
4.1.2.1	Effet des ligands de PPAR γ sur le clone malin dans le modèle PVJAK2 ^{V617F} -GFP.	98
4.1.2.2	Effet des ligands de PPAR γ sur le clone malin dans le modèle Calréticuline.....	100
4.2	Effet des ligands de PPAR γ sur le stroma médullaire et la fibrose	102
4.2.1	Effet des ligands de PPAR γ sur la transcription des gènes de la fibrose.....	102
4.2.2	Etude de la phosphorylation des Smads dans les cellules stromales	104
4.2.3	Etude des voies de signalisation du TGF- β 1 par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques	104
4.2.4	Etude du rôle du co-facteur de transcription p300 dans l'effet répressif de PPAR γ sur les gènes cibles de la fibrose.	106
4.2.4.1	Surexpression du co-facteur de transcription p300 dans les cellules stromales MS5 par stratégie lentivirale	106
4.2.4.2	Immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules stromales MS5 stimulées par le TGF- β 1	107
4.3	Effet des ligands de PPAR γ sur l'inflammation	111
4.3.1	Effet des ligands de PPAR γ sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires <i>ex vivo</i>	111
4.3.2	Etude des gènes de l'inflammation par immunoprécipitation de la chromatine.....	112
4.3.3	Effet des ligands de PPAR γ sur l'inflammation <i>in vivo</i>	113
4.4	Evaluation du potentiel thérapeutique des ligands de PPAR γ dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.	116
4.4.1	Effet des ligands de PPAR γ sur la chute de l'hémoglobine	116
4.4.2	Effet des ligands de PPAR γ sur le taux de plaquettes	117
4.4.3	Effet des ligands de PPAR γ sur la cellularité médullaire et le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques	118
4.4.4	Effet des ligands de PPAR γ sur les paramètres histologiques de la myélofibrose dans le modèle MF post-PVJAK2 ^{V617F}	120
4.4.5	Effet des ligands de PPAR γ sur les paramètres histologiques de la Myélofibrose dans les modèles TPO ^{high} et Calréticuline	122
	Cinquième partie : Discussion et perspectives	123
	Sixième partie : Références bibliographiques	135
	Septième partie : Annexes	163
7.1	Annexe 1 : Manuscrit de l'article	163
7.2	Annexe 2 : Référence des anticorps couplés aux fluorochromes	202
7.3	Annexe 3 : Séquence des amorces utilisées en RT-qPCR.....	203

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de la mutation JAK2V617F.	16
Figure 2 : Représentation schématique de MPL non muté et muté.	16
Figure 3 : Activation des récepteurs par les mutations de <i>JAK2</i> et les mutations de <i>MPL</i>	17
Figure 4 : Représentation schématique des mutations de <i>CALR</i> et de leur effet sur <i>MPL</i>	18
Figure 5 : Aspects clinico-biologiques de la myélofibrose primitive.	22
Figure 6 : Aspects anatomo-pathologiques de la myélofibrose primitive.	23
Figure 7 : Représentation schématique de la physiopathologie de la myélofibrose primitive.	29
Figure 8 : Structure des protéines de la famille des JAKs.	31
Figure 9 : Structure et mode d'action des protéines STATs.	32
Figure 10 : Synthèse du TGF- β 1.	45
Figure 11 : Voies de signalisation du TGF- β 1.	47
Figure 12 : Structure du récepteur nucléaire PPAR γ	60
Figure 13 : Mécanisme d'action de PPAR γ	62
Figure 14 : L'activation de PPAR γ régule négativement STAT5.	71
Figure 15 : Erosion du pool de cellules souches leucémiques par activation de PPAR γ dans la LMC.	75
Figure 16 : Représentation schématique du modèle murin TPO ^{high}	90
Figure 17 : Représentation schématique du modèle murin MF post-PVJAK2 ^{V617F}	91
Figure 18 : Représentation schématique du modèle murin JAK2 ^{V617F} -GFP.	91
Figure 19 : Représentation schématique du modèle murin Calréticuline.	92
Figure 20 : Effet de la pioglitazone sur la prolifération et la clonogénicité des cellules UKE-1 et HEL et sur les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ issus de patients atteints de PV et de MF.	96
Figure 21 : Effet de la pioglitazone sur l'apoptose et le cycle cellulaire des cellules UKE-1 et HEL.	97
Figure 22 : Effet anti-prolifératif du traitement par pioglitazone dans le modèle murin JAK2 ^{V617F} -GFP.	99
Figure 23 : Effet du traitement par pioglitazone sur les progéniteurs hématopoïétiques médullaires LSK dans le modèle JAK2 ^{V617F} -GFP.	100
Figure 24 : Effet anti-prolifératif du traitement par pioglitazone dans le modèle murin Calréticuline.	101
Figure 25 : Effet de l'activation de PPAR γ par la pioglitazone sur l'induction de la transcription du gène du CTGF.	103
Figure 26 : Effet de l'activation de PPAR γ par la pioglitazone sur l'induction de la transcription des gènes cibles du TGF- β 1 et de PPAR γ	103
Figure 27 : Effet de la pioglitazone sur la phosphorylation des Smads.	104
Figure 28 : Effet de l'inhibiteur de la fonction HAT du co-facteur p300 (C646) sur la répression de la transcription du gène du CTGF.	105

Figure 29 : Représentation schématique de l'hypothèse mécanistique de la compétition entre le TGF- β 1 et PPAR γ pour le recrutement du co-facteur p300.	106
Figure 30 : Etude du rôle du co-facteur p300 par stratégie lentivirale sur l'induction du gène du CTGF.	107
Figure 31 : Analyse de la densité des pics après immunoprécipitation de la chromatine.	108
Figure 32 : Diagramme de Venn représentant les groupes de gènes obtenus par immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-p300.	109
Figure 33 : Enrichissement moyen sur un panel de gènes pro-fibrotiques après immunoprécipitation de la chromatine.	110
Figure 34 : Quantification des transcrits des gènes de cytokines de l'inflammation et du gène <i>Plin2</i>	112
Figure 35 : Enrichissement moyen sur un panel de gènes de l'inflammation après immunoprécipitation de la chromatine.	113
Figure 36 : Effets du traitement par ligands de PPAR γ sur l'hyperleucocytose dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.	114
Figure 37 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur les sous-populations leucocytaires dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.	115
Figure 38 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur l'hémoglobine dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.	117
Figure 39 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur le taux de plaquettes dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.	118
Figure 40 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur la cellularité de la moelle osseuse.	119
Figure 41 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques.	119
Figure 42 : Coupes histologiques des fémurs.	122
Figure 43 : Domaines fonctionnels du co-facteur de transcription p300.	131
Tableau 1 : Classifications OMS 2016 des néoplasmes myéloprolifératifs.	14
Tableau 2 : Principales mutations additionnelles dans la myélofibrose primitive.	20
Tableau 3 : Critères OMS 2016 pour le diagnostic de la myélofibrose primitive.	24
Tableau 4 : Effets des ligands de PPAR γ sur les cellules d'hémopathies.	73
Tableau 5 : Analyse histologique des rates.	120
Tableau 6 : Analyse histologique de la moelle osseuse.	121
Tableau 7 : Référence des anticorps couplés aux fluorochromes.	202
Tableau 8 : Séquence des amorces humaines et murines utilisées en RT-qPCR.	203

Abbreviations

A

ABL : Abelson

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AP1 : activator protein 1

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASXL1 : additional sex combs like transcriptional regulator 1

B

BCL : B-cell lymphoma

BCR : breakpoint cluster region

C

CALR : calréticuline

CBL : casitas B-lineage lymphoma

C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein α

CD : cluster of differentiation

CDK : cyclin dependent kinase

CDK5RAP2 : CDK5 regulatory subunit associated protein 2

ChIP : chromatin immunoprecipitation

CITED 2 : CBP/P300-interacting transactivator 2

COL : collagène

CRP : C reactive protein

CSFR3 : colony stimulating factor receptor 3

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSL : cellule souche leucémique

CTGF : connective tissue growth factor

D

DNA : deoxyribonucleic acid

DNMT3A : DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A

E

EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

EPO : érythropoïétine

EPOR : récepteur à l'EPO

ERK : extracellular signal-regulated kinase

ES : embryonic stem cell

ETV6 : ETS variant 6

EZH2 : enhancer of zest homolog 2

F

FERM : band four-point-one ezrin radixin moesin

FGFR1 : fibroblast growth factor receptor-1

FIP1L1 : factor interacting with PAPOLA and CPSF1
FLT3 : fms-like tyrosine kinase 3
FOXH1 : forkhead box H1
FOXP1 : forkhead box P1
5-FU : 5-fluorouracile

G

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
G-CSFR : récepteur au G-CSF
GFP : green fluorescent protein
GM-CSF : granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
G6PD : glucose-6-phosphate dehydrogenase

H

HAT : histone acétyltransférase
HDAC : histone déacetylase
HIF2 α : hypoxia inducible factor 2 α

I

ICAM : intercellular adhesion molecule
IDH : isocitrate deshydrogénase
IFN : interferon
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
IL1RA : récepteur antagoniste de l'IL1
IPSS : International Prognostic Scoring System
ITK : inhibiteur de tyrosine kinase

J

JAK : Janus kinase
JH : JAK homology
JNK : c-Jun N-terminal kinase

K

Kb : kilobase
KDEL : lysine-aspartate-glutamate-leucine
KIF5B : kinesin family member 5B
KI : knock in
KO : knock out

L

LAM : leucémie aiguë myéloïde
LDL : low density lipoprotein
LIF : leukemia inhibitory factor
Lin- : lignage négatif
LMC : leucémie myéloïde chronique
LMMC : leucémie myélo-monocytaire chronique

LNK : lymphocyte adapter (=SH2B adapter protein 3, SH2B3)
LPS : lipopolysaccharide

M

MAP : mitogen-activated protein
MAPK : MAP kinase
MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1
MEC : matrice extracellulaire
MEF : mouse embryonic fibroblasts
MEK : MAP/ERK kinase
MFP : myéloblaste primitive
MF : myéloblaste
MGG : May-Grünwald-Giemsa
MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MO : moelle osseuse
MMP : matrix metalloproteinases
MPL : myeloproliferative leukemia virus (=TPOR)

N

NASH : non-alcoholic steatohepatitis ou stéatose hépatique non-alcoolique
NF1 : neurofibromine 1
NF- κ B : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell
NF- κ B α ou I κ B α : NF- κ B inhibitor α
NK : natural killer
NMP : néoplasme myéloprolifératif

O

OPG : ostéoprotégérine

P

PCR : polymerase chain reaction
PDGFR : platelet-derived growth factor receptor
PIAS : protein inhibitor of activated STAT
PI3K : phosphoinositide 3 kinase
PPAR : peroxisome proliferator activated receptor
PPRE : peroxysome proliferator response element
PTEN : phosphatase and tensin homolog
PV : polyglobulie de Vaquez

R

RANK : receptor activator of nuclear factor- κ B
RANKL : RANK ligand
RAS : rat sarcoma
RNA : ribonucleic acid
ROS : reactive oxygen species
RUNX1 : RUNX family transcription factor 1
RXR : retinoid X receptor ou récepteur à l'acide rétinoïque

S

SCF : stem cell factor
SEER : surveillance epidemiology, and end results
Ser : sérine
SF3B1 : splicing factor 3B subunit 1
SH : src (sarcome) homology
SIDA : syndrome d'immunodéficience humaine acquise
SMD : syndrome myélodysplasique
SRSF2 : serine and arginine rich splicing factor 2
STAT : signal transducer and activator of transcription
STRN : striatin
SUMO : small ubiquitin-related modifiers
SVF : sérum de veau fœtal

T

TE : thrombocytémie essentielle
TET2 : Tet methylcytosine dioxygenase 2
TFE3 : transcription factor E3
TGF- β : transforming growth factor β
Th : T helper
TIMP : tissue inhibitors of metalloproteinase
TNF : tumor necrosis factor
TNKS2 : Tankyrase 2
TPO : thrombopoïétine
TPOR : récepteur à la thrombopoïétine (= MPL)
T β RI : récepteur au TGF- β 1 de type I (= Alk5)
T β RII : récepteur au TGF- β 1 de type II
TYK2 : tyrosine kinase 2
Tyr : tyrosine
TZD : thiazolidinedione

U

U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

V

VCAM : vascular cell adhesion protein
VSVG : vesicular stomatitis virus G
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

W

WHO : World Health Organization
Wnt : wingless-related integration site

X, Y, Z

YY1 : ying yang 1
Zn : zinc

Première partie : Introduction

1.1 Chapitre 1 : La myélofibrose primitive

1.1.1 La myélofibrose primitive au sein des néoplasmes myéloprolifératifs

La myélofibrose primitive (MFP) est une hémopathie myéloïde maligne appartenant aux néoplasmes myéloprolifératifs (NMPs). La notion de maladie myéloproliférative a été introduite en 1951 par William Dameshek sous le nom « syndromes myéloprolifératifs » (SMP)¹. Les NMPs dits « classiques » comprennent la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez ou *polycythemia vera* (PV), la thrombocyémie essentielle (TE) et la MFP. La myélofibrose (MF) peut également être secondaire à un autre NMP de type PV ou TE et est alors dénommée myélofibrose secondaire. Ces NMPs sont liés à une altération clonale de la cellule souche hématopoïétique (CSH), responsable de la prolifération sans altération de la maturation des différentes lignées myéloïdes appelée myéloprolifération, touchant préférentiellement la lignée érythroblastique dans la PV et la lignée mégacaryocytaire dans la TE et la MFP. Le terme « néoplasme » a été introduit en 2008 par les auteurs de la WHO (*World Health Organization*) Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues² afin de souligner la nature clonale de la prolifération. Les NMPs sont associés à un risque accru de thrombose et d'accidents hémorragiques et l'évolution naturelle se fait vers la leucémie aigüe et/ou la fibrose médullaire.

Durant les vingt dernières années, la classification des NMPs a beaucoup évolué. Alors que les SMPs regroupaient toutes les hémopathies classiques ou atypiques avec une myéloprolifération chronique, les nombreuses découvertes d'anomalies génétiques et moléculaires à l'origine de la myéloprolifération ont permis des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des NMPs. La LMC a été rapidement classée à part après la découverte de la translocation équilibrée récurrente entre les chromosome 9 et 22, t(9 ;22)(q34 ;q11)³, aboutissant à un chromosome 22 raccourci appelé chromosome Philadelphie. Cette translocation est responsable du gène de fusion *BCR-ABL* codant pour une oncoprotéine BCR-ABL à activité tyrosine kinase constitutivement activée⁴. La mise en évidence de la t(9 ;22) et de *BCR-ABL* a permis de développer des tests de diagnostic et de suivi moléculaire de la LMC ainsi que des traitements ciblés très efficaces nommés inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), dont le chef de file est l'imatinib/ Glivec®⁵.

De nombreux gènes de fusion ou mutations ponctuelles, aboutissant à l'activation constitutive de protéines à activité tyrosine kinase conduisent à un mécanisme oncogénique similaire dans des maladies myéloprolifératives plus rares. Ces anomalies concernent des gènes codant des récepteurs à activité tyrosine kinase comme PDGFR α et PDGFR β (*platelet-derived growth factor receptor α et β*), FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor-1*), CSFR3 (*colony stimulating factor receptor 3*) ou KIT ainsi que des tyrosines kinases cytoplasmiques comme JAK2 (Janus kinase 2). Une délétion

interstitielle de 800 kb sur le chromosome 4 del(4)(q12q12) conduit au réarrangement *FIP1L1-PDGFRα*, responsable d'une myéloprolifération avec hyperéosinophilie. La fusion perturbe le domaine juxtamembranaire autoinhibiteur aboutissant à l'activation constitutive de la kinase^{6,7}. Sept autres partenaires de fusion de *PDGFRα* ont été décrits *BCR*, *ETV6*, *KIF5B*, *CDK5RAP2*, *STRN*, *TNKS2* et *FOXP1* et des mutations ponctuelles de *PDGFRα* ont aussi été identifiées. En 1994, le gène de fusion *ETV6-PDGFRβ*⁸ a été mis en évidence, et depuis, plus de trente partenaires de fusion de *PDGFRβ* ont été décrits chez des patients présentant des NMPs atypiques ou des formes frontières entre NMP et syndrome myélodysplasique (SMD) comme la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC). Les différents réarrangements partagent le même point de cassure moléculaire, le domaine tyrosine kinase de *PDGFRβ* est préservé et fusionné à une protéine partenaire en N-terminal qui contient toujours un motif de dimérisation ou d'oligomérisation mimant la dimérisation du récepteur et l'activant même en l'absence de ligand^{9,10}. De même, les gènes de fusion *FGFR1* avec l'un de ces quatorze gènes partenaires décrits, conduisent à la dimérisation de la protéine tyrosine kinase *FGFR1* et à son activation constitutive. Ils sont responsables du syndrome 8p11 dont la présentation clinique est très variable incluant des néoplasmes myéloprolifératifs, des hémopathies lymphoïdes, des leucémies aiguës et des lymphomes lymphoblastiques B ou T¹¹. Le gène de fusion impliquant *JAK2* le plus fréquent est *PCM1-JAK2*, conséquence de la t(8; 9) (p22; p24) et impliquant le gène de la tyrosine kinase cytoplasmique *JAK2* et le gène *PCM1*¹²⁻¹⁴. Les patients présentant un réarrangement *JAK2* ont une maladie plus proches des leucémies associées à d'autres gènes de fusion que des NMPs classiques¹⁵. En 2013, des mutations du gène *CSFR3* connu aussi sous le nom de *GCSFR* (*granulocyte colony stimulating factor receptor*) ont été mises en évidence dans plus de 80% des cas de leucémie chronique à neutrophiles et dans certaines LMC atypiques^{16,17}. Les mutations les plus fréquentes sont des mutations ponctuelles du domaine extracellulaire ou transmembranaire de *CSFR3*, entraînant une activation constitutive de l'activité tyrosine kinase du récepteur, indépendante du ligand. Des modifications du poids moléculaire et de la glycosylation de la forme mutée du récepteur ont été démontrées¹⁷ mais la relation précise entre ces changements post-traductionnels et la dimérisation du récepteur n'est pas encore élucidée. Les mastocytoses systémiques, caractérisées par une prolifération de cellules mastocytaires ont longtemps été classées dans les NMPs. De fait, le mécanisme oncogénique est similaire, des mutations ponctuelles du gène *c-kit*, dont la plus fréquente est la mutation D816V (remplacement d'une valine en position 816 par un aspartate) conduisent à l'activation constitutive de ce récepteur à activité tyrosine kinase^{18,19}.

L'hypothèse d'un mécanisme physiopathologique similaire dans les NMPs classiques dits non *BCR-ABL* (PV, TE et MFP) était donc plus que probable, et c'est en 2005 avec la découverte de la mutation ponctuelle V617F de la kinase *JAK2* (*JAK2V617F*) que la preuve en a été faite. Rapidement, des mutations du gène *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus*), codant pour le récepteur de la thrombopoïétine (TPO), ont été mises en évidence puis plus récemment, en 2013 des mutations du

gène de la calréticuline. Ces trois types de mutations aboutissent à la dérégulation de protéines à activités tyrosine kinase et sont détaillées dans le paragraphe 1.1.2.

La classification actuelle selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) répertorie les hémopathies myéloïdes sur des bases moléculaires et phénotypiques, la partie correspondant aux NMPs est présentée dans le **Tableau 1**.

Classification OMS 2016 des néoplasmes myéloprolifératifs
Leucémie myéloïde chronique (LMC), BCR-ABL+
Leucémie chronique à neutrophiles
Polyglobulie de Vaquez (PV)
Myélofibrose primitive (MFP)
MFP au stade pré-fibrotique ou pré-MFP
MFP avérée
Thrombocythémie essentielle (TE)
Leucémie chronique à éosinophiles, non spécifiée ailleurs
NMP non classable

Tableau 1 : Classifications OMS 2016 des néoplasmes myéloprolifératifs.

1.1.2 Anomalies génétiques conductrices

Avant 2005, les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendaient les NMPs classiques non BCR-ABL n'étaient pas connus. En 2005, une avancée majeure a été réalisée avec la découverte d'une mutation récurrente dans le gène *JAK2*, nommée JAK2V617F, présente dans 70% des NMPs : 95% des PV et 50 à 60% des TE et des MFP. Il a été ensuite rapidement mis en évidence des mutations du gène *MPL*, récepteur à la TPO, présentes dans 2 à 3% des TE et 3 à 5% des MFP. Enfin, plus récemment, en 2013, des mutations du gène *CALR* codant pour la calréticuline ont été rapportées dans 20 à 25% des TE et 25 à 30% des MFP. Au total, dans plus de 90% des cas, une de ces trois principales mutations est retrouvée chez les patients atteints de MFP. Les mutations de *JAK2*, *MPL* et *CALR* aboutissent à la dérégulation de protéines à activité tyrosine kinase et notamment à la dérégulation de la kinase JAK2 et de la voie JAK-STAT. Elles sont spécifiques des NMPs et sont dites conductrices ou *driver* car elles sont capables à elles seules d'induire la myéloprolifération. Les MFP pour lesquelles aucune anomalie conductrice n'est mise en évidence sont dites « triple négative ». D'autres mutations somatiques non spécifiques des NMPs et non conductrices, souvent nommées anomalies additionnelles, sont retrouvées dans une majorité de MFP.

1.1.2.1 Mutation de JAK2

La première mutation somatique récurrente commune aux NMPs classiques non BCR-ABL a été mise en évidence dans le gène *JAK2*, situé sur le chromosome 9²⁰⁻²⁴. Le remplacement d'une guanine par une thymidine au niveau du nucléotide 1849, dans l'exon 14, entraîne la substitution d'une valine par une phénylalanine en position 617, aboutissant à une protéine mutée JAK2V617F. La mutation JAK2V617F présente à l'état hétérozygote subit souvent une transition vers l'état homozygote par recombinaison mitotique avec perte d'hétérozygotie sur une région de taille variable du bras court du chromosome 9^{22,25}. Le fait qu'une même mutation puisse être responsable de phénotypes différents peut en partie être expliquée par ce mécanisme, les patients atteints de TE présentant le plus souvent la mutation à l'état hétérozygote alors que les patients atteints de PV ont dans la grande majorité des cas la mutation à l'état homozygote. Par ailleurs, il a aussi été montré que la charge allélique de la mutation JAK2V617F est plus importante dans les myélofibroses secondaires que dans les PV et les TE, indiquant le rôle de l'accumulation des allèles mutés dans la progression vers la myélofibrose²⁶.

Des mutations dans l'exon 12 de *JAK2* ont aussi été mises en évidence dans les NMPs et sont présentes dans la plupart des PV négatives pour JAK2V617F²⁷ mais ne sont pas retrouvées dans les TE et les MFP en dehors des myélofibroses secondaires à une PV ayant initialement cette mutation²⁸.

JAK2 est un membre de la famille des Janus kinases (JAK), famille dont la structure et les fonctions seront développés dans le chapitre 2. JAK2 est une tyrosine kinase associée au récepteur à l'érythropoïétine (EPOR), principal facteur de croissance de la lignée érythrocytaire, au récepteur à la TPO (nommé MPL ou TPOR), principal facteur de croissance de la lignée mégacaryocytaire, et au récepteur au G-CSF (G-CSFR), principal facteur de croissance de la lignée granuleuse. La mutation V617F de JAK2 se trouve dans le domaine pseudo-kinase et elle entraîne un changement conformationnel qui lève l'inhibition exercée par le domaine pseudo-kinase sur le domaine kinase²⁹ (**Figure 1**), induisant une activation du récepteur (**Figure 3**). En outre, il a été rapporté que la protéine JAK2V617F joue un rôle sur la chromatine. En phosphorylant la tyrosine 41 (Y41) de l'histone H3, elle diminue la liaison de la protéine HP1α (*heterochromatine protein 1α*) sur ce même site³⁰. Par ailleurs, JAK2V617F est aussi capable de phosphoryler PRMT5 (*protein arginine methyltransferase 5*), altérant sa capacité à méthyler les substrats d'histones³¹. Cependant l'importance des effets de JAK2V617F sur la chromatine dans la physiopathologie des NMPs est inconnue.

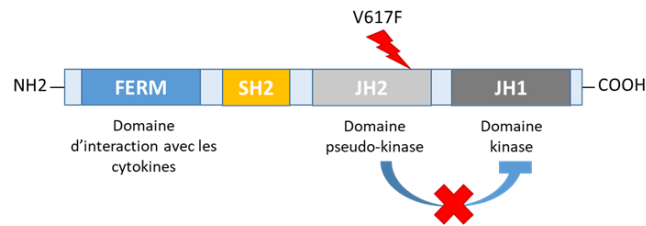


Figure 1 : Représentation schématique de la mutation JAK2V617F.

La mutation JAK2V617F se situe dans le domaine pseudokinase JH2 et lève l'inhibition du domaine kinase JH1. FERM: band four-point-one ezrin radixin moesin. SH: Src homology. JH: JAK homology.

1.1.2.2 Mutation de MPL

L'activation de MPL par son ligand la TPO, principal facteur de croissance des mégacaryocytes, induit l'activation de JAK2³². Deux types de mutation de MPL, sont décrits au niveau de l'exon 10 et sont présents à l'état hétérozygote. Les mutations de MPL retrouvées dans la MFP concernent la substitution d'un tryptophane en position 515 par un autre acide aminé, le plus souvent une leucine (W515L), ou une lysine (W515K)³³. Ces mutations se situent dans le domaine amphipatique de MPL, situé à la jonction des domaines transmembranaire et cytoplasmique, qui, à l'état normal, prévient la dimérisation du récepteur et son activation spontanée en l'absence de ligand³⁴. Toutes les substitutions en W515, excepté W515C (cystéine) et W515P (proline), aboutissent à l'activation de MPL en l'absence de cytokine, conduisant ensuite à l'activation de JAK2 (**Figure 2** et **Figure 3**). D'autres mutations de MPL beaucoup plus rares ont été retrouvées dans les TE comme la substitution d'une sérine en position 505 par une asparagine (S505N). Localisée dans le domaine transmembranaire, cette mutation stabilise le récepteur sous forme de dimère activé³⁵.

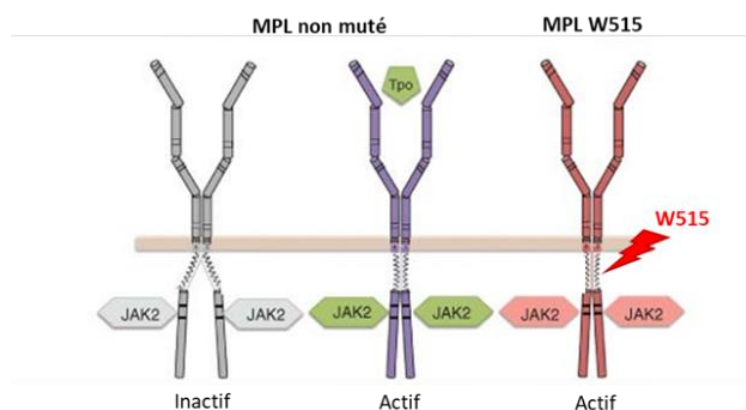


Figure 2 : Représentation schématique de MPL non muté et muté.

Le récepteur MPL non muté est inactif en l'absence de ligand. La présence du ligand (TPO) entraîne la dimérisation du récepteur et son activation. Les mutations W515 de MPL entraînent sa dimérisation en l'absence de ligand. Adapté de Pecquet, Blood, 2010.

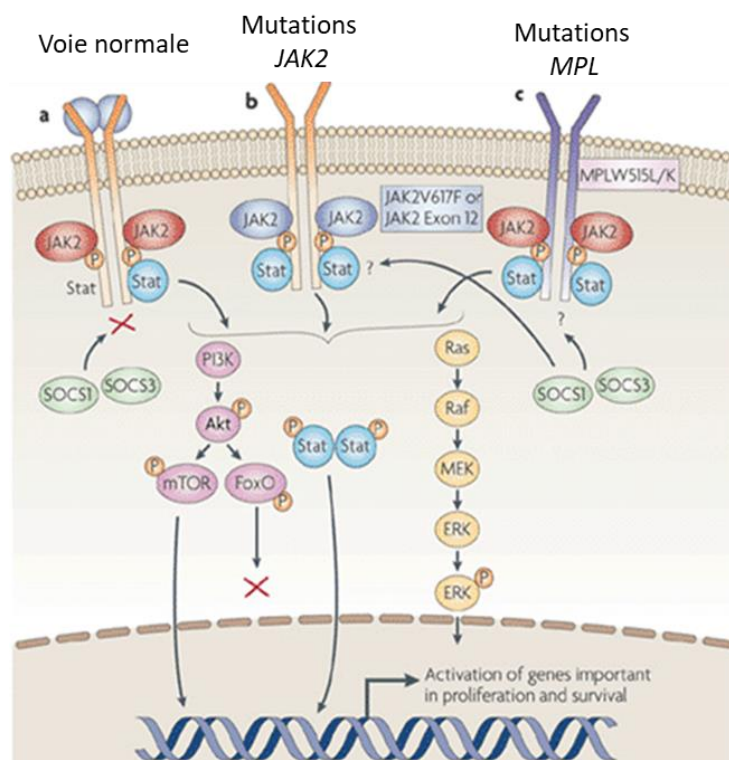


Figure 3 : Activation des récepteurs par les mutations de JAK2 et les mutations de MPL.

L'activation du récepteur non muté par liaison au ligand (a) induit la dimérisation du récepteur, entraînant la phosphorylation des JAKs puis des STATs. Les STATs phosphorylés induisent les voies de signalisation d'aval (par exemple PI3K/AKT) ou sont directement transloqués dans le noyau et activent des gènes impliqués dans la prolifération et la survie. En parallèle, l'activation du récepteur entraîne le recrutement de facteurs inhibiteurs (par exemple les SOCS) qui permettent d'arrêter le signal. Les mutations de JAK2 (b) et de MPL (c) entraînent une activation constitutive du récepteur et des voies de signalisation d'aval. D'après Levine, Nature reviews Cancer, 2007.

1.1.2.3 Mutation de CALR

En 2013, des mutations décalant le cadre de lecture dans le gène *CALR* ont été découvertes dans une majorité de MFP et de TE négatives pour la mutation JAK2V617F^{36,37}. Les mutations de *CALR* sont rarissimes dans la PV. Plus de cinquante mutations ont maintenant été décrites, toutes localisées dans l'exon 9, cependant les mutations de type 1 et 2 regroupent 80 à 90% des cas. Les mutations de type 1 sont liées à une délétion de 52 paires de bases (pb), dite *CALRdel52* alors que les mutations de type 2 sont liées à une insertion de 5 pb, dite *CALRins5*. La répartition est différente parmi les NMPs, *CALRdel52* est largement prédominante dans la MFP (75% contre 15% de mutation *CALRins5*) alors que dans la TE la prévalence des deux mutations est proche (55% pour *CALRdel52* et 35% pour *CALRins5*)³⁸. De même que pour JAK2V617F, la charge allélique de la mutation de *CALR* est plus élevée dans les myélofibroses secondaires que dans les TE²⁶. Les mutations de *CALR* sont le plus souvent hétérozygotes, de rares cas d'homozygotie ont été rapportés pour les 2 types. *CALR* code pour la calréticuline, protéine chaperonne du réticulum endoplasmique (RE) impliquée dans le contrôle de

la qualité des protéines N-glycosylées et dans le stockage du calcium. Les mutations de type 1 entraînent une perte quasi-totale de l'exon 9 sauvage et des sites de liaison au calcium alors que pour les mutations de type 2, la séquence mutée reste proche de la séquence sauvage et 50% des sites de liaison au calcium sont préservés³⁹. Toutes les mutations de *CALR* aboutissent à un nouveau domaine C-terminal de la protéine, dépourvu du motif d'acides aminés KDEL, signal de rétention dans le RE. Ce nouveau domaine C-terminal est chargé positivement alors que le domaine C-terminal sauvage est chargé négativement. La calréticuline, qu'elle soit mutée ou sauvage, se lie par son domaine lectine aux sites de N-glycosylation du domaine extracellulaire de MPL dans le RE. Cette interaction permet le contrôle qualité du récepteur, la calréticuline se détache du récepteur N-glycosylé mature qui circule alors jusqu'à la surface cellulaire. L'interaction entre la forme mutée et MPL est renforcée par le nouveau domaine C-terminal et la calréticuline mutée reste liée au récepteur qui circule jusqu'à la surface sous une forme immature, partiellement N-glycosylée. Il a été montré que les mutants *CALR* activent MPL et JAK2^{40,41} ainsi que les voies de signalisation d'aval et notamment STAT5³⁷(**Figure 4**). La calréticuline mutée agit par voie autocrine en se fixant le domaine extracellulaire de MPL⁴² qu'elle active et, sécrétée par le clone hématopoïétique, elle est responsable d'une activation paracrine des cellules hématopoïétiques non mutées⁴³.

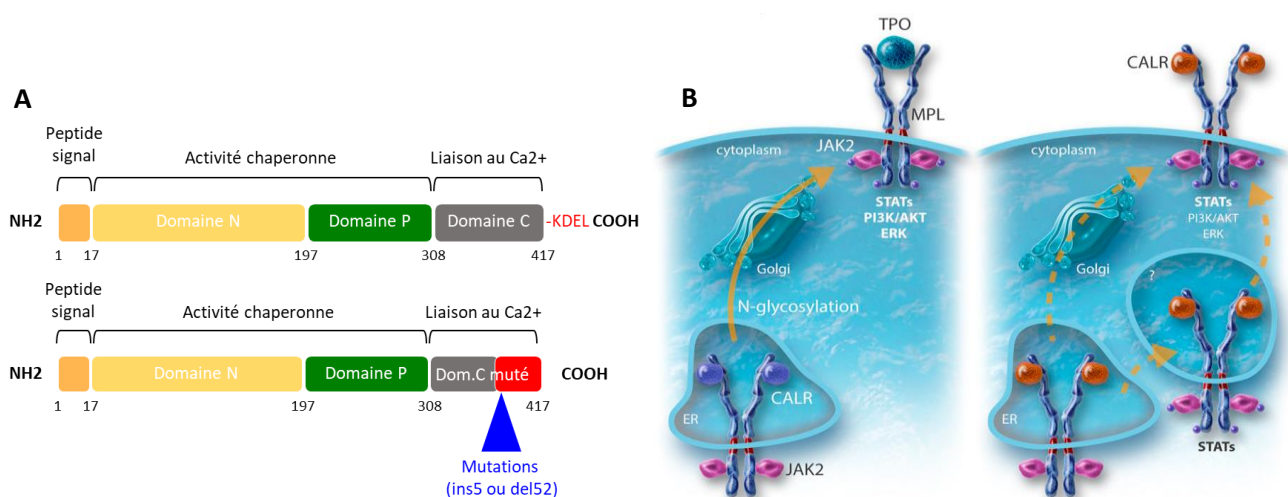


Figure 4 : Représentation schématique des mutations de *CALR* et de leur effet sur MPL.

A) Les mutations de *CALR*, *CALRdel52* et *CALRins5* sont responsables d'un nouveau domaine C-terminal et de la perte du motif KDEL. Domaine N (en jaune) : domaine N-terminal. Domaine P (en vert) : domaine riche en proline. Domaine C (en gris) : domaine C-terminal. Adapté de Klampfl, NEJM 2013 et Nangalia, NEJM, 2013. B) A gauche : la calréticuline non mutée se détache du récepteur MPL avant sa circulation jusqu'à la surface cellulaire. A droite : la calréticuline mutée reste fixée au récepteur MPL après sa migration à la surface cellulaire et l'active de façon constitutive. CALR: calréticuline, ER: endoplasmic reticulum. D'après Vainchenker, illustration Somersault, Blood, 2017.

1.1.2.4 Myélofibrose primitive triple négative

Lorsqu'aucune des trois principales mutations conductrices n'est retrouvée, on parle de NMP triple négatif. L'absence de mutation conductrice dans la PV doit faire remettre en question le

diagnostic, en revanche les patients triple négatifs représentent 10% des TE et entre 5 et 10% des MFP. Une étude de 2014 montre une signature transcriptionnelle cohérente avec l'activation de JAK2 quel que soit le statut mutationnel⁴⁴. Chez une minorité de patients, le séquençage à haut débit permet de mettre en évidence des mutations activatrices de *JAK2* ou *MPL* dites « non canoniques » acquises ou parfois héréditaires, identifiant des patients avec une forme familiale et diagnostiqué à tort comme NMP sporadique^{45,46}. Enfin, dans une grande majorité des cas de MFP triple négative, des mutations acquises non conductrices additionnelles sont retrouvées.

1.1.2.5 Anomalies non conductrices additionnelles acquises

Les trois principales mutations conductrices ne peuvent expliquer l'hétérogénéité des NMPs classiques, même en considérant la variation de la charge allélique. Le développement du séquençage à haut débit a permis d'identifier de nombreuses mutations acquises dans les NMPs. Ces mutations sont retrouvées dans d'autres hémopathies, et sont très fréquentes dans les SMDs, les formes frontières NMP/SMD comme la LMMC et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Elles sont impliquées dans les modifications phénotypiques, augmentant le caractère myélodysplasique des progéniteurs hématopoïétiques, et dans la progression des NMPs. Ces mutations additionnelles ciblent des facteurs régulant l'épigénétique (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *EZH2* et *ASXL1*), des facteurs de la machinerie de l'épissage ou spliceosome (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*), des protéines de signalisation (*NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *LNK*, *CBL*, *FLT3*) ou des facteurs de transcription (*TP53*, *RUNX1*) associés au risque de transformation leucémique. En dehors des mutations de *TET2* et *DNMT3A*, impliquées dans la dominance clonale et retrouvées à une fréquence équivalente dans les trois NMPs classiques, les mutations additionnelles sont plus fréquentes et plus nombreuses dans la MFP⁴⁷. En effet, des mutations des gènes de l'épigénétique ou du spliceosome sont retrouvées dans plus de 80% des MFP alors qu'elles ne sont présentes que dans moins de 25% des TE. En outre, deux anomalies ou plus sont mises en évidence dans plus de 50% des MFP. La fréquence et le nombre des mutations additionnelles expliquent en partie l'évolution défavorable de la MFP par rapport à la PV et à la TE, ainsi que le taux plus élevé de transformation leucémique, certaines de ces mutations comme *ASXL1* et *SRSF2* ayant été clairement associées à un mauvais pronostic⁴⁸⁻⁵⁰. La fréquence des principales anomalies additionnelles dans la MFP est indiquée dans le **Tableau 2**.

Gène	Effet de la mutation	Fréquence
<i>TET2</i>	Régulation épigénétique	10-20%
<i>DNMT3A</i>	Régulation épigénétique	8-12%
<i>IDH1/2</i>	Régulation épigénétique	5-6%
<i>EZH2</i>	Régulation épigénétique	7-10%
<i>ASXL1</i>	Régulation épigénétique	10-35%
<i>SF3B1</i>	Epissage	5%
<i>SRSF2</i>	Epissage	5-17%
<i>U2AF1</i>	Epissage	2-8%
<i>ZRSF2</i>	Epissage	1%
<i>RUNX1</i>	Transcription	<1%
<i>IKZF1</i>	Transcription	<1%
<i>TP53</i>	Réparation de l'ADN	<1%
<i>CBL</i>	Signalisation JAK-STAT	5-10%
<i>LNK (SH2B3)</i>	Signalisation JAK-STAT	3-6%

Tableau 2 : Principales mutations additionnelles dans la myélobiose primitive.

1.1.2.6 Anomalies cytogénétiques

Les études cytogénétiques n'ont pas mis en évidence de marqueur cytogénétique récurrent dans la MFP. Diverses anomalies du caryotype sont néanmoins retrouvées chez les patients atteints de MFP, elles ne sont pas spécifiques de la maladie et peuvent être retrouvées notamment dans la TE et dans la PV. Si les anomalies sont les mêmes que la myélobiose soit primitive ou secondaire, la fréquence varie de 30% chez les patients avec une MFP jusqu'à 90% chez les patients ayant une myélobiose secondaire à une PV JAK2V617F. Au total, environ 50% des patients présentent des anomalies du caryotype⁵¹. Les plus fréquentes sont la délétion du bras long des chromosomes 20 (q11; q13) et 13 (q12; q22) retrouvées dans respectivement 20 à 25% des cas et 15 à 20% des cas. Viennent ensuite, la trisomie partielle 1q, les trisomies 8 et 9, la délétion du bras court du chromosome 12 (p11; p13), ou encore les anomalies des chromosomes 7 et 5 (monosomie et délétions du bras long)⁵². Le caryotype n'est pas utile au diagnostic de la MFP, cependant, les anomalies cytogénétiques ont une valeur pronostique et deux groupes cytogénétiques sont distingués : le groupe défavorable comprenant les caryotypes complexes (trois anomalies ou plus) et une ou plusieurs anomalies incluant la trisomie 8, la délétion 7, l'isochromosome 17q, la délétion 5, la délétion 12p, l'inversion du 3 ou le réarrangement de MLL en 11q23 et le groupe favorable comprenant les délétions 20q et 13q^{53,54}.

1.1.3 Aspects cliniques, biologiques et anatomo-pathologiques

1.1.3.1 Épidémiologie

Les NMPs classiques sont des maladies rares, définies par une incidence annuelle inférieure à 6 cas pour 100 000 habitants. La MFP est le plus rare des NMPs classiques avec une incidence de 0,1 à 1 pour 100 000 habitants, contre 0,4 à 2,8 pour la PV et 0,38 à 1,7 pour la TE⁵⁵. De récentes données épidémiologiques américaines issues du programme SEER et portant sur plus de 30 000 cas de NMPs recueillis entre 2001 et 2012 retrouvent un âge médian au diagnostic de la MFP de 70 ans⁵⁶, 20% des patients sont âgés de moins de 50 ans et 10% sont âgés de moins de 45 ans. Il existe une prédominance masculine avec un sex ratio de 2/1. Une incidence plus élevée chez les juifs d'origine Ashkénaze a été rapportée⁵⁷ et les données américaines montrent une prévalence plus importante chez les sujets caucasiens comparés aux sujets hispaniques, asiatiques ou afro-américains⁵⁶.

1.1.3.2 Aspects clinico-biologiques

Contrairement à la PV et la TE qui sont souvent peu symptomatiques, la MFP se traduit par une altération de l'état général avec asthénie, amaigrissement et anorexie, associées à des symptômes généraux en partie liés à l'état inflammatoire, comme la fièvre, les sueurs nocturnes ou le prurit. La splénomégalie est constante, souvent marquée et son absence doit faire remettre en cause le diagnostic, une hépatomégalie est retrouvée dans 50% des cas, la rate et le foie étant les sites préférentiels de l'hématopoïèse extra-médullaire (**Figure 5 A et B**).

L'hémogramme est évocateur et met en évidence une anémie chez 75 à 80% des patients et une hyperleucocytose modérée à prédominance de polynucléaires neutrophiles. Le taux de plaquettes est variable, il est diminué chez 25% des patients, normal chez 50 % d'entre eux et augmenté chez 25% des patients. Il est à noter que l'anémie est d'origine multifactorielle liée à l'insuffisance de production médullaire due au remplacement du tissu hématopoïétique par la fibrose, à une érythropoïèse inefficace, à l'hypersplénisme avec séquestration et à l'état inflammatoire. Sur les frottis de sang colorés au May-Grünwald-Giemsa (MGG), la présence d'une érythro-myélémie, de dacryocytes (hématies déformées en larme ou en poire), d'une anisocytose plaquettaire avec des plaquettes géantes associées à des micromégacaryocytes circulants, orientent également le diagnostic (**Figure 5 C et D**). Le nombre de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ circulants, quantifié par cytométrie en flux, est augmenté chez 80% des patients, supérieur à $10-15.10^6/L$ pour une normale inférieure à $0,1.10^6/L$.

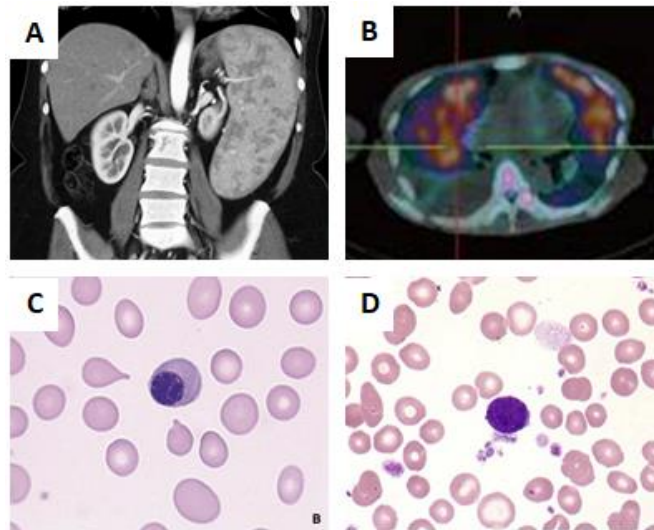


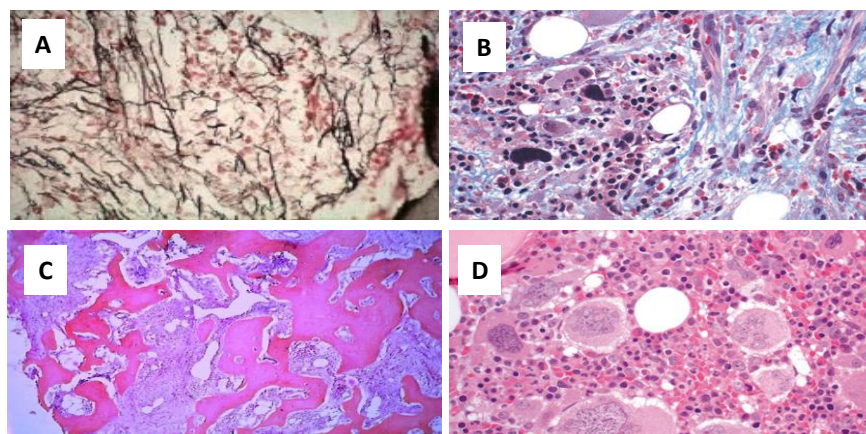
Figure 5 : Aspects clinico-biologiques de la myélofibrose primitive.

A) Splénomégalie majeure vue sur une coupe scannographique. B) Hématopoïèse extra-médullaire pulmonaire révélée sur une tomographie à émission de positrons (TEP). C) Dacryocytes. D) Micromégacaryocyte circulant. Images personnelles.

Le myélogramme est le plus souvent un échec, l'aspiration est difficile voire impossible à cause de la fibrose médullaire. Le diagnostic repose sur la biopsie ostéo-médullaire (BOM) dont l'analyse anatomo-pathologique fine est indispensable.

1.1.3.3 Aspects anatomo-pathologiques

L'analyse des coupes histologiques de la biopsie ostéo-médullaire permet le diagnostic de la maladie. Les lésions médullaires associent une hyperplasie myéloïde globale, prédominant sur la lignée mégacaryocytaire avec une dystrophie, une dilatation des sinusoides médullaires, une fibrose réticulinique et collagène, une ostéosclérose et une néoangiogénèse. Selon le consensus européen⁵⁸, la fibrose est gradée de façon semi-quantitative de 0 à 3 en fonction de la densité du réseau réticulinique, mis en évidence par coloration argentique et du réseau collagène, mis en évidence par la coloration au trichrome de Masson. Les mégacaryocytes sont très abondants, de taille hétérogène, regroupés en clusters, et présentent des noyaux boursoufflés et « nuageux » (**Figure 6**).



Grades de la MF	
MF-0	Réticuline linéaire sans intersection, correspondant à la MO normale
MF-1	Réseau de réticuline lâche, avec de nombreuses intersections, en particulier dans les zones périvasculaires
MF-2	Augmentation diffuse et dense de la réticuline avec nombreuses intersections, parfois avec localisation mal délimitée d'épaisses fibres compatibles avec du collagène et/ou ostéosclérose focale
MF-3	Augmentation diffuse et dense de la réticuline avec nombreuses intersections, faisceaux grossiers d'épaisses fibres compatibles avec du collagène généralement associée à une ostéosclérose

Figure 6 : Aspects anatomo-pathologiques de la myélofibrose primitive.

En haut : coupes de biopsie ostéo-médullaire. A) Fibres de réticuline mises en évidence par coloration argentique. B) Réseau collagène dense mis en évidence par coloration au trichrome de Masson. C) Ostéosclérose. D) Mégacaryocytes dystrophiques. Images personnelles.

En bas : grade de la myélofibrose (MF).

1.1.3.4 Critères diagnostiques selon la classification OMS 2016

Les critères diagnostiques de la MFP reposent essentiellement sur la mise en évidence d'une mutation conductrice, sur les anomalies biologiques sanguines et sur l'analyse anatomo-pathologique de la biopsie ostéo-médullaire. En 2008, deux entités ont commencé à être distinguées au sein des MFP : la MFP au stade pré-fibrotique ou pré-MFP essentiellement traduite cliniquement par une thrombocytose et souvent confondue avec une TE⁵⁹, et la MFP avérée. La classification 2016 de l'OMS a renforcé la distinction entre pré-MFP et TE, rendant la biopsie ostéo-médullaire indispensable au diagnostic, car ces deux entités ont une évolution et un pronostic très différents. Les critères diagnostiques OMS 2016 sont présentés dans le **Tableau 3**.

	Pré- MFP	MFP avérée
Critères majeurs	1. Prolifération mégacaryocytaire avec atypie, sans fibrose réticulinique > grade 1, accompagnée d'une augmentation de la cellularité médullaire par rapport à l'âge, à une prolifération granulocytaire et souvent à une diminution de l'érythropoïèse. 2. Absence de critère diagnostique de LMC, PV, TE, SMD ou autres hémopathies myéloïdes. 3. Présence d'une mutation <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou <i>CALR</i> ou, en leur absence, présence d'une autre anomalie clonale, ou absence de fibrose médullaire réactionnelle.	1. Prolifération mégacaryocytaire avec atypie, accompagnée d'une fibrose réticulinique et/ou collagène de grade 2 ou 3. 2. Absence de critère diagnostique de LMC, PV, TE, SMD ou autres hémopathies myéloïdes. 3. Présence d'une mutation <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou <i>CALR</i> ou, en leur absence, présence d'une autre anomalie clonale, ou absence de fibrose médullaire réactionnelle
Critères mineurs	Présence d'au moins 1 des critères suivants confirmés sur 2 examens consécutifs : • Anémie non attribuée à une comorbidité • Hyperleucocytose ≥ 11 G/L • Splénomégalie palpable • LDH élevées	Présence d'au moins 1 des critères suivants confirmés sur 2 examens consécutifs : • Anémie non attribuée à une comorbidité • Hyperleucocytose ≥ 11 G/L • Splénomégalie palpable • LDH élevées • Erythromylémie
Critères requis pour le diagnostic	3 critères majeurs Au moins 1 critère mineur	3 critères majeurs Au moins 1 critère mineur

Tableau 3 : Critères OMS 2016 pour le diagnostic de la myélofibrose primitive.

MFP: myélofibrose primitive. LMC: leucémie myéloïde chronique. PV: polyglobulie de Vaquez. TE: thrombocytémie essentielle. SMD: syndrome myélodysplasique. LDH : lactate déshydrogénase.

1.1.4 Evolution et pronostic

L'évolution de la myélofibrose qu'elle soit primitive ou secondaire se fait vers l'aggravation des symptômes, avec une altération de l'état général de plus en plus prononcée entraînant souvent un état cachectique. La majoration de la splénomégalie est responsable de douleurs abdominales, d'une hypertension portale, d'autant plus s'il existe une hépatomégalie associée. Les infarctus spléniques sont fréquents et la rate perd peu à peu sa fonction immunitaire. L'hématopoïèse extra-médullaire pulmonaire bien que rare peut entraîner une hypertension artérielle pulmonaire. La fibrose réticulinique et collagène se densifie avec le temps, de même que l'ostéosclérose, aboutissant à une raréfaction du tissu hématopoïétique et à une insuffisance médullaire. La neutropénie, associée à la perte de fonction de la rate, est responsable d'infections bactériennes et parfois d'infections à germes opportunistes, l'anémie et la thrombopénie nécessitent souvent des transfusions régulières en concentrés globulaires ou plaquettaires. Par ailleurs, il existe un risque de transformation en leucémie aiguë de 20% par an, bien plus élevé que dans la PV (10%) ou dans la TE (moins de 5%). L'évolution de la maladie est défavorable à court ou moyen terme. Une étude européenne portant sur des patients atteints de myélofibrose primitive ou secondaire entre 1980 et 1995 et entre 1996 et 2007 montre que la survie médiane reste médiocre bien qu'elle s'améliore avec le temps, passant de 4,6 ans à 6,5 ans⁶⁰. De plus, l'amélioration de la survie est constatée pour les patients de risque intermédiaire ou faible mais pas pour les patients à haut risque. Il est à noter que ces données ont été rapportées avant l'ère du ruxolitinib et des autres inhibiteurs de JAK.

Plusieurs scores ont été développés pour affiner le pronostic des patients. En 2009, l'*International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment* (IWG-MRF) a proposé un score robuste et simple, l'*International Prognostic Scoring System* (IPSS). L'IPSS prend en compte au moment du diagnostic : l'âge supérieur à 65 ans, l'existence de symptômes constitutionnels, un taux d'hémoglobine inférieur à 10g/dL, un taux de leucocytes supérieur à 25 G/L, et un taux de blastes circulants supérieur à 1%, pour définir quatre scores ou catégories : risque faible, intermédiaire-1, intermédiaire-2 et élevé. La médiane de survie dans les quatre catégories était de 135, 95, 48 et 27 mois dans la cohorte initiale⁶¹. L'inconvénient majeur de l'IPSS est qu'il s'agit d'un score au diagnostic, raison pour laquelle le score D-IPSS (pour *dynamic*-IPSS) a été proposé peu après⁶². Il retient les mêmes items et définit également quatre catégories, en revanche, il peut être utilisé à n'importe quel moment au cours de l'évolution de la maladie. La mise en évidence de facteurs influençant négativement la survie comme certaines anomalies cytogénétiques^{53,63}, l'apparition d'une thrombopénie ou la dépendance aux transfusions de concentrés globulaires, a conduit à intégrer ces trois items dans le score DIPSS-plus⁶⁴. Les avancées réalisées dans le domaine de la caractérisation génétique et moléculaire de la MFP rendent le modèle pronostique plus complexe. En effet, les mutations conductrices et additionnelles ont un impact sur la survie. Plusieurs études montrent un meilleur pronostic chez les patients avec mutation *CALRdel52* comparés aux patients mutés pour *JAK2* ou *MPL*. De même, la majorité des études retrouve un pronostic défavorable chez les patients ayant une MFP triple négative^{65,66}. Des anomalies additionnelles telles que les mutations d'*ASXL1* et *SRSF2* et la présence de deux anomalies additionnelles ou plus confèrent également un pronostic défavorable^{49,66}. En conséquence, un score pronostique prenant en compte les différentes mutations conductrices et additionnelles, le MIPSS pour *mutation-enhanced IPSS*, a été proposé⁶⁷ ainsi que le MIPSS70+ et sa nouvelle version le MIPSS70+ version 2.0 pour les patients en âge de recevoir une allogreffe de CSHs^{68,69}. Les anomalies cytogénétiques gardant une valeur pronostique indépendamment du MIPSS, un autre score basé uniquement sur l'âge et les caractéristiques cytogénétiques et moléculaire, le GPSS pour *genetics-based prognostic scoring system*⁷⁰ a été développé, évoluant ensuite en GIPSS pour *genetically-inspired prognostic scoring system*⁷¹.

Bien que les scores pronostiques prenant en compte la génomique soient d'une utilité incontestable dans les essais cliniques, ainsi que pour guider l'indication d'une allogreffe de CSHs, leur complexité, l'absence de traitement curatif pour les patients non éligibles à l'allogreffe ainsi que l'absence de traitement ciblant les anomalies génétiques rend leur utilisation en pratique moins pertinente, et les scores clinico-biologiques tels que le DIPSS restent largement utilisés.

Enfin, il faut noter qu'aucun des scores pronostiques disponibles ne prend en compte le grade de la fibrose médullaire bien que plusieurs études aient montré une corrélation entre le grade de la fibrose et le devenir des patients. Un grade élevé de fibrose est associé à un état clinique plus altéré, une

splénomégalie plus marquée et un plus grand risque de développer une anémie et une thrombopénie ainsi qu'à une survie plus courte^{72,73}. Les grades élevés de fibrose sont aussi plus souvent associés à des scores pronostiques (IPSS ou DIPSS) défavorables. De plus, la persistance d'un grade élevé de fibrose après allogreffe de CSHs est aussi associée à une survie plus courte⁷⁴. Cependant, avec l'avènement du score pronostique basé sur les mutations génétiques, l'impact du grade de la fibrose reste à démontrer.

1.1.5 Aspects thérapeutiques

L'indication du traitement des patients atteints de MFP est essentiellement basée sur l'existence de symptômes altérant la qualité de vie ainsi que sur le pronostic. Les patients de risque faible et intermédiaire 1 se voient généralement proposé une abstention thérapeutique en l'absence de symptôme. Les patients de risque intermédiaire 2 et élevé et ceux présentant des mutations à haut risque (*ASXL1*, *SRSF2*) vont généralement être traités rapidement et sont orientés en fonction de l'âge et des comorbidités vers un programme d'allogreffe de CSHs ou vers un traitement médicamenteux.

1.1.5.1 Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

A ce jour, l'allogreffe de CSHs reste la seule option curative pour les patients atteints de myélofibrose primitive ou secondaire. Cependant, la mortalité liée à la procédure est de 20 à 40%, les comorbidités liées à l'âge étant fréquentes et l'âge des donneurs intra-familiaux élevé. Récemment, l'*European leukemiaNet* (ELN) et l'*European Bone Marrow Transplant group* (EBMT) ont publié des critères de greffe consensuels visant à accorder les pratiques, notamment sur le choix de l'intensité et des modalités du conditionnement de greffe⁷⁵. Actuellement, dans cette population âgée, moins de 10% des patients sont transplantés, les futures améliorations des techniques de greffe et des traitements pré-greffe laissent espérer une utilisation plus large, à des stades moins avancés de la maladie.

1.1.5.2 Traitements conventionnels hors inhibiteurs de JAK

Avant l'ère des inhibiteurs de JAK, la prise en charge des patients atteints de myélofibrose symptomatique reposait essentiellement en première intention sur le traitement cytoréducteur et notamment l'hydroxyurée (Hydréa®) bien que peu d'études contrôlées sur son efficacité soient disponibles⁷⁶. L'hydroxyurée améliore l'hyperleucocytose, la thrombocytose et la splénomégalie mais est souvent inefficace sur les symptômes constitutionnels. Les cytoréducteurs n'ont pas d'effet sur l'évolution naturelle de la maladie vers la leucémie aiguë ni sur le développement de la fibrose médullaire.

La plus large étude sur l'utilisation de l'interféron α (IFN α) sous sa forme pegylée, rapporte une efficacité sur les symptômes constitutionnels et la splénomégalie notamment dans les stades peu

évolués de myélofibrose primitive ou secondaire⁷⁷. Dans une petite série de patients, le traitement par IFN α est associé à une amélioration des anomalies histologiques médullaires⁷⁸. L'IFN α est aussi associé à des réponses moléculaires avec une diminution de la charge allélique chez les patients avec mutation JAK2V617F, ainsi qu'à une tendance à l'augmentation de la survie dans le groupe des patients à risque intermédiaire et haut⁷⁹. Les principales limites de l'utilisation de l'IFN α sont la splénomégalie importante car le traitement est alors inefficace, et les cytopénies induites par le traitement. L'IFN α augmente également le risque de complication de type réaction du greffon contre l'hôte s'il est utilisé en pré-allogreffe^{77,79}.

La correction de l'anémie induite par la myélofibrose est un enjeu de par la fréquence et l'altération de la qualité de vie liées à cette cytopénie. Les corticoïdes, les androgènes et le danazol, les érythropoïétines recombinantes^{80,81} sont utilisés avec une efficacité variable et transitoire de 20 à 40%. Les immunomodulateurs comme le thalidomide et le pomalidomide sont maintenant rarement prescrits dans cette indication du fait de leur efficacité modeste et de leur toxicité^{82,83}.

La splénectomie ou l'irradiation splénique à faible dose sont parfois proposées chez les patients avec une splénomégalie majeure, réfractaire au traitement médical. Les indications sont l'anémie nécessitant des transfusions et induite par la séquestration splénique, l'hypertension portale et les douleurs spléniques non contrôlées. Le rapport bénéfice/risque de la splénectomie doit être bien évalué car la procédure est assortie d'une mortalité de 5 à 10% et de complications de type hémorragie, thrombose et thrombopénie sévère dans 30 à 40% des cas⁸⁴. L'irradiation splénique est souvent d'une efficacité transitoire et s'accompagne d'un risque de cytopénies prolongées du fait de l'hématopoïèse splénique⁸⁵. On peut noter ici que la radiothérapie à faible dose peut aussi être proposée sur les sites d'hématopoïèse extra-médullaire notamment en cas de localisation pulmonaire avec hypertension pulmonaire⁸⁶.

1.1.5.3 Inhibiteurs de JAK

La découverte de la mutation JAK2V617F a déclenché le développement de thérapie ciblant la famille des JAKs. Les inhibiteurs de JAK jouent sur la dérégulation de la voie JAK-STAT, présente chez tous les patients, ils ne sont pas spécifiques de la forme mutée de JAK2, expliquant leur utilisation quel que soit le statut mutationnel du patient. Ils possèdent tous une activité non sélective sur JAK2, inhibant les autres membres de la famille des JAKs et parfois d'autres tyrosine kinases. Bien que leur efficacité sur la réduction de la splénomégalie et des symptômes constitutionnels soit incontestable, leur effet sur la fibrose médullaire est beaucoup plus incertain et leur capacité à prolonger la survie est débattue⁸⁷.

Le ruxolitinib (Jakavi®) est le premier inhibiteur de JAK (JAK1/2) à avoir été approuvé pour le traitement de la myélofibrose primitive ou secondaire. L'étude de phase 1-2 a montré une efficacité

importante sur les symptômes constitutionnels et la réduction de la splénomégalie⁸⁸. Ces effets bénéfiques ont été confirmés dans deux essais de phase 3 COMFORT-I (ruxolitinib *versus* placebo) et COMFORT-II (ruxolitinib *versus* meilleure thérapie disponible)^{89,90}. Chez les patient recevant un traitement prolongé par ruxolitinib, un effet bénéfique sur la fibrose⁹¹ et la survie⁹² a été montré. Cependant, les effets secondaires du ruxolitinib et notamment les cytopénies induites par le traitement et le risque infectieux ainsi que la progression de la maladie conduisent à l'arrêt du traitement chez plus d'un patient sur deux dans la première année.

D'autres inhibiteurs de JAK sont en développement. On peut citer ici le pacritinib (JAK2/FLT3) qui semble prometteur, un essai comparant cette molécule au meilleur traitement disponible incluant le ruxolitinib retrouve des taux de réduction de la splénomégalie et des symptômes constitutionnels supérieurs dans le bras expérimental. De plus, le pacritinib induit moins de cytopénies et peut être utilisé chez les patients thrombopéniques⁹³. Le momelotinib (JAK1/2) est plus décevant montrant une efficacité similaire au ruxolitinib sur la diminution de la splénomégalie mais une moindre réduction des symptômes constitutionnels⁹⁴ ainsi que l'absence de bénéfice s'il est utilisé en deuxième intention après le ruxolitinib⁹⁵. Le fedratinib (inhibiteur sélectif de JAK2) a montré son efficacité sur la taille de la rate et sur les symptômes constitutionnels⁹⁶, et ce bénéfice est obtenu également chez les patients résistants ou intolérants au ruxolitinib bien que l'étude ait été suspendue prématurément devant la suspicion d'encéphalopathie de Wernicke induite par le traitement^{96,97}. Cette molécule a été approuvée dans le traitement de la myélofibrose aux Etats-Unis en 2019.

1.1.5.4 Traitements en développement

De nombreux traitements sont explorés dans la MFP visant d'autres voies de signalisation (inhibiteurs de PI3 kinase, inhibiteurs de Hedgehog), ciblant l'épigénétique (inhibiteurs d'histone déacétylase, agents hypométhylants), les télomères (inhibiteurs de télomérase), ou la fibrose directement (anticorps monoclonaux dirigés contre le TGF- β , ou contre son récepteur T β RI ou Alk5, régulateurs de la réparation tissulaire). Si certains semblent prometteurs comme l'imetelstat (inhibiteur de télomérase)⁹⁸ ou le PRM151 (inhibiteur de pentraxin)⁹⁹ d'autres sont abandonnés du fait d'un manque d'efficacité ou de toxicité trop importante comme les inhibiteurs de la voie Hedgehog¹⁰⁰.

Actuellement, aucune de ces molécules ne laissent espérer de progrès majeur dans la prise en charge de la myélofibrose primitive, et toute avancée thérapeutique est d'intérêt dans cette pathologie.

1.2 Chapitre 2 : Physiopathologie de la myélofibrose primitive

La physiopathologie de la maladie comprend des processus distincts mais intriqués. L'émergence puis l'expansion d'un clone hématopoïétique malin va entraîner une sécrétion inappropriée de cytokines inflammatoires et fibrogéniques conduisant, en réponse, à une réaction stromale, associant fibrose médullaire, ostéosclérose et néoangiogenèse (**Figure 7**).

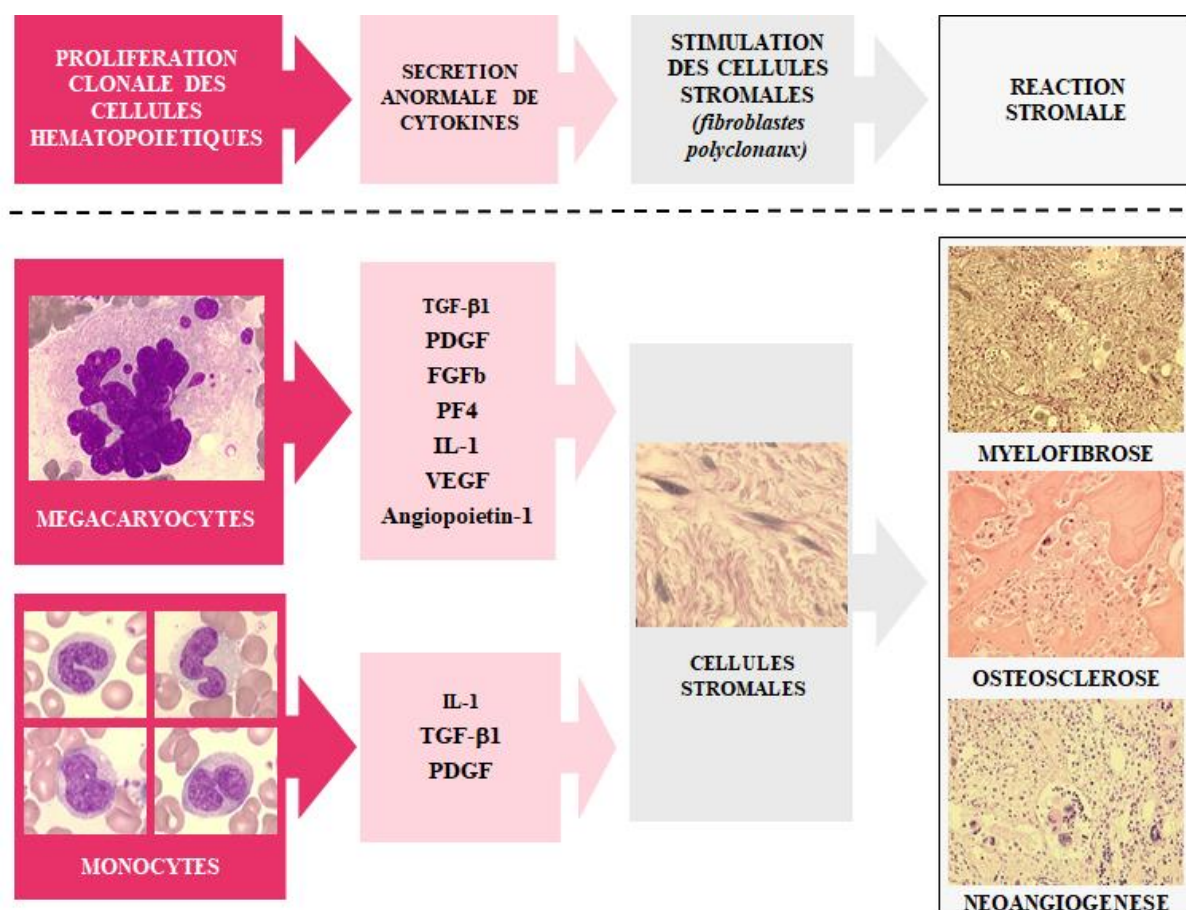


Figure 7 : Représentation schématique de la physiopathologie de la myélofibrose primitive.
D'après Wagner-Ballon, Hématologie, 2006.

1.2.1 La myéloprolifération

1.2.1.1 La clonalité

L'hématopoïèse physiologique qui permet la différenciation, à partir de cellules souches hématopoïétiques, des différents lignages myéloïdes et lymphoïdes est un processus polyclonal¹⁰¹. En revanche, la myéloprolifération pathologique observée dans les néoplasmes myéloprolifératifs est monoclonale. Cette nature monoclonale a d'abord été démontrée par des travaux basés pour la plupart sur le phénomène physiologique de lyonisation qui conduit à l'inactivation aléatoire d'un des deux

chromosomes X parentaux dans les cellules femelles, permettant ainsi une compensation du dosage des gènes autosomiques et des gènes liés au chromosome X par rapport aux cellules mâles. Ainsi l'étude de l'expression des isoenzymes A et B de la glucose-6-phosphatedeshydrogénase (G6PD) chez une patiente a permis de démontrer il y a quarante ans la nature clonale de la myéloprolifération dans la myélofibrose primitive¹⁰². La présence d'anomalies cytogénétiques et la mise en évidence d'anomalies conductrices et/ou additionnelles ont renforcé la notion de clonalité, des études montrant que le clone malin se différencie vers les lignages myéloïdes (mégacaryocytaire, érythrocytaire, granulocytaire et monocytaire) mais possède également des potentialités lymphocytaires B et T.

1.2.1.2 La voie JAK/STAT

Comme abordé au paragraphe 1.1.2, les principales mutations conductrices responsables de la myéloprolifération vont déréguler la voie de signalisation JAK-STAT. La voie JAK-STAT est très conservée dans l'évolution, elle est utilisée par diverses cytokines, interférons, hormones, facteurs de croissance et par des molécules apparentées via une interaction ligand/récepteur. Cette voie fournit un mécanisme par lequel des facteurs extracellulaires contrôlent l'expression des gènes impliqués dans la croissance, la prolifération, la différenciation cellulaires mais aussi l'apoptose, la migration et d'autres processus cellulaires. Cette voie de régulation est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques dont l'hématopoïèse et l'immunité.

1.2.1.2.1 Les JAKs

La famille des Janus kinases (JAKs) comprend quatre membres JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (tyrosine kinase 2). Ce sont des protéines cytoplasmiques à activité tyrosine kinase non récepteurs avec une structure conservée. Elles sont formées de sept domaines présentant des homologies de séquence, JH1 à JH7 (JAK homology), organisés en quatre grands domaines. En C-terminal, se trouve le domaine kinase JH1, essentiel pour l'activité catalytique des JAKs. Ce domaine contient des résidus tyrosine (Y) conservés nécessaires à l'activation, par exemple en Y1007/Y1008 pour JAK2. Lorsque la protéine JAK est phosphorylée sur ces résidus, elle change de conformation pour faciliter l'activité kinase et la liaison aux substrats. JH2 est le domaine pseudo-kinase. Il est sans activité catalytique et prévient l'auto-activation du JH1. Le domaine JH3 et une partie du domaine JH4 forment un domaine homologue des oncoprotéines Src (sarcome) de type 2 nommé SH2 (*src homology 2*). SH2 permet la liaison à des résidus tyrosine phosphorylés. En N-terminal, les domaines JH4 à JH7 forment le domaine FERM (*band four-point-one ezrin radixin moesin*). La fixation non covalente des JAKs aux récepteurs de cytokines dépend du domaine FERM (**Figure 8**).

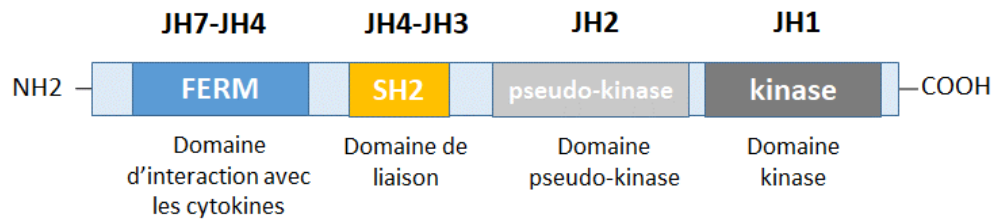


Figure 8 : Structure des protéines de la famille des JAKs.

JH: JAK homology. FERM: band four-point-one ezrin radixin moesin. SH2: src homology 2.

1.2.1.2.2 Les STATs

Les STATs (*signal transducer and activator of transcription*) sont des facteurs de transcription présents dans le cytoplasme et dans le noyau. Ils partagent plusieurs domaines structuraux et fonctionnels communs plus ou moins conservés entre eux et sont impliqués dans de très nombreuses fonctions cellulaires en réponse aux stimulations par les cytokines. Les STATs sont les substrats principaux des JAKs. La famille des STATs comprend sept membres chez l'être humain : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6. Six domaines particuliers ont été identifiés par comparaison de séquence et mutagenèse dirigée¹⁰³. En N-terminal, le domaine ND (*N-terminal dimerization-domain*) est impliqué dans les interactions des dimères STAT-STAT et dans la liaison à d'autres protéines. Le domaine superhélice CC (*coiled-coil*) intervient dans les interactions protéine-protéine. Le domaine de liaison à l'ADN ou DBD (*DNA binding domain*) est impliqué dans la liaison à l'ADN. La plupart des STATs reconnaît une séquence consensus palindromique d'ADN, 5'-TTCN₂-₄GAA-3', nommée motif GAS ou GAS element en anglais (*gamma interferon activation site*). L'affinité de liaison d'un dimère de STATs pour une séquence d'ADN est déterminée par le nombre de nucléotides entre TTC et GAA. Le domaine LK (*linker*) connecte le domaine de liaison à l'ADN à la région C-terminale. A cette extrémité se trouvent le domaine SH2 permettant la liaison à des résidus tyrosine phosphorylés et le domaine de transactivation TAD (*trans-activation domain*). Le domaine de transactivation contient un résidu tyrosine crucial pour la liaison des STATs à l'ADN et pour l'activation de la transcription. D'autres résidus peuvent être phosphorylés comme certaines sérines et jouent dans la régulation de l'activité biologique des STATs. Le domaine de transactivation est le moins conservé parmi les STATs (**Figure 9, A**). A l'état basal dans le cytoplasme, les STATs inactifs sont sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère pré-formés via une interaction entre les domaines CC et ils sont liés aux récepteurs aux cytokines. Les STATs agissent tous selon le même cycle qui consiste en une activation dans le cytoplasme, une translocation dans le noyau, une activité nucléaire de promotion de transcription, un export nucléaire et une désactivation. En fin de cycle, les facteurs de transcription rejoignent le réservoir cytoplasmique des STATs latents et activables (**Figure 9, B**).

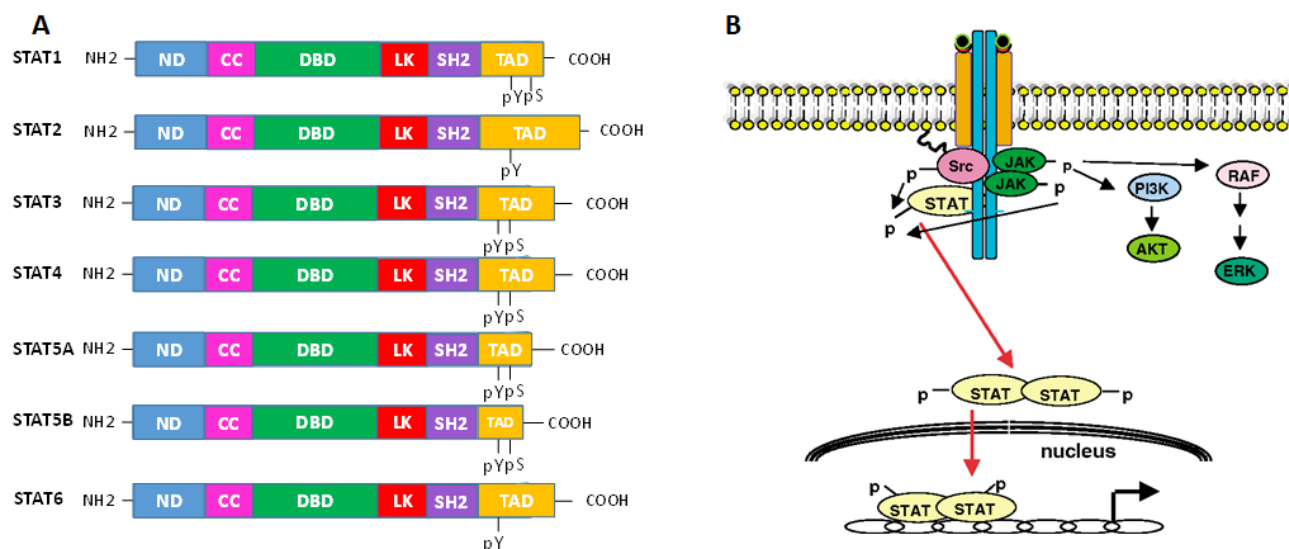


Figure 9 : Structure et mode d'action des protéines STATs.

A) Structure des protéines STATs. Le domaine TAD est le moins conservé entre les protéines STAT, il comporte un résidu tyrosine crucial pour la liaison des STATS à l'ADN. ND: N-ter-dimerization-domain. CC: coil-coiled. DBD: DNA binding domain. LK: Linker. SH2: src homology 2. TAD: trans-activation domain. pY: tyrosine phosphorylée. pS: sérine phosphorylée.

B) Mode d'action des STATs. Les STATs phosphorylés par les JAKs sont transloqués dans le noyau dans lequel ils exercent leur fonction de facteurs de transcription. D'après Baker, Oncogene, 2007.

1.2.1.2.3 Principe de la signalisation par la voie JAK-STAT

1.2.1.2.3.1 Voie canonique

Les récepteurs associés à la voie de signalisation JAK-STAT sont les récepteurs des cytokines de classe I et de classe II. Ils possèdent un domaine transmembranaire, une partie extracellulaire qui lie le ligand (cytokine) et une partie intracellulaire servant à l'interaction avec JAK et STAT. Les JAKs sont essentiels au trafic et à la stabilité des récepteurs¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Les récepteurs sont inactifs en l'absence totale de ligand, cependant ils interagissent avec une forte affinité avec les cytokines, 50 % de l'activité biologique est obtenu avec une saturation de moins de 10% des récepteurs¹⁰⁷. Les protéines JAKs peuvent être considérées comme la partie catalytique de récepteurs aux cytokines et elles y sont liées en intracellulaire de façon constitutive.

La liaison aux cytokines induit des modifications de la conformation des récepteurs, qui activent les JAKs liés au récepteur par trans-phosphorylation. Les JAKs activés vont à leur tour trans-phosphoryler les récepteurs. Le récepteur devient alors un site de fixation pour les facteurs de transcription STATs inactifs présents dans le cytoplasme qui sont recrutés par le récepteur *via* leurs domaines SH2. Les JAKs phosphorylent ensuite le résidu tyrosine spécifique de la partie C-terminale des STATs. L'homo ou hétérodimérisation des STATs se produit par l'interaction réciproque entre le résidu tyrosine phosphorylé d'un monomère et le domaine SH2 du second monomère. Le dimère de

STATs phosphorylés est libéré du récepteur puis transloqué dans le noyau par l'intermédiaire d'importines. Dans le noyau, le dimère va se lier à l'élément de réponse GAS sur l'ADN et peut activer ou réprimer la transcription des gènes cibles.

1.2.1.2.3.2 Voie non canonique

En dehors de la voie canonique par cascade de phosphorylation, il existe d'autres voies de signalisation pour les JAKs et les STATs. L'une des premières voies non canoniques mise en évidence est la phosphorylation des STATs par d'autres tyrosine kinases comme les Src kinases¹⁰⁸ ou par des oncoprotéines comme BCR-ABL¹⁰⁹. Par ailleurs, il a été montré pour la plupart des STATs qu'à l'état basal et en l'absence de phosphorylation, une partie des STATs se trouve dans le noyau et peut contribuer à la régulation des gènes. Par exemple, STAT3 non phosphorylé peut former des complexes avec NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*) et avoir des effets transcriptionnels¹¹⁰. Les JAKs et les STATs peuvent aussi contribuer à la modification épigénétique de la chromatine. Il a été montré dans les cellules hématopoïétiques que JAK2 activé peut entrer dans le noyau et phosphoryler l'histone H3, prévenant alors la liaison de HP1 α ³⁰. Par ailleurs, les dimères de STAT5A non phosphorylés peuvent être localisés dans le noyau et influencer la formation de l'hétérochromatine en se liant à HP1 α ¹¹¹. Il a aussi été montré que les STATs ont des effets indépendants de la transcription. STAT3 phosphorylé sur un résidu sérine particulier en C-terminal peut se localiser dans la mitochondrie et augmenter l'activité de la chaîne de transport d'électrons¹¹². Dans les cellules vasculaires, STAT5A non phosphorylé et dans une moindre mesure STAT5B, peuvent être associés à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique et contribuer au maintien de la structure et de la fonction de ces organelles¹¹³.

1.2.1.2.4 Régulation négative de la voie JAK-STAT

A l'état physiologique, l'activation de la voie JAK-STAT est transitoire. Plusieurs mécanismes d'inactivation du signal sont décrits. Le récepteur peut être internalisé et dégradé dans les lysosomes et les protéasomes par ubiquitination des motifs lysine du domaine intracellulaire comme cela a été démontré notamment pour EPOR et TPOR^{114,115}. Par ailleurs, l'activation du récepteur conduit à la transcription de gènes de nombreuses protéines tyrosine phosphatase contenant des domaines SH2 en tandem et conduisant à la déphosphorylation des résidus tyrosine. La phosphatase SHP1 (*src homology region 2 containing phosphatase 1*) est la mieux décrite, elle se lie aux JAKs phosphorylés et aux récepteurs phosphorylés, induisant leur déphosphorylation et l'arrêt du signal¹¹⁶. SHP1 pourrait aussi se lier directement aux STATs phosphorylés¹¹⁷. Les STATs induisent aussi la transcription des gènes des protéines SOCS (*suppressor of cytokine signaling*). Les SOCS inhibent la voie JAK-STAT par trois mécanismes. Elles peuvent se lier aux JAKs phosphorylés et aux récepteurs aboutissant à la fin du signal. Elles peuvent également se lier aux tyrosines phosphorylées du récepteur, et empêcher le recrutement des STATs par encombrement allostérique. Enfin, les SOCS interagissent avec le

complexe ubiquitine ligase, facilitant l'ubiquitination des JAKs, et induisant la dégradation du récepteur par le protéasome¹¹⁸. Une autre famille de protéines, les PIAS (*protein inhibitors of activated stat*), se lie aux dimères de STATs phosphorylés et prévient leur liaison à l'ADN¹¹⁸. Les PIAS pourraient réprimer de nombreux facteurs de transcription par SUMOylation (*small ubiquitin-related modifiers*)¹¹⁹.

1.2.1.3 Rôle des JAKs et des STATs dans l'hématopoïèse

Les JAKs et les STATs sont essentiels à la prolifération et à la fonction des cellules hématopoïétiques. Dans les lignées de cellules hématopoïétiques, le déficit en JAK1 ou JAK2 inhibe la réponse à une stimulation par l'interféron γ et les lignées cellulaires déficientes en TYK2 sont incapables de transduire le signal des interférons α et β . De même, l'expression de JAKs déficients ou des mutations abolissant la liaison des JAKs aux récepteurs inhibent la prolifération cellulaire. Le rôle essentiel des JAKs dans l'hématopoïèse a été étudié en invalidant les gènes correspondant chez la souris et en générant des modèles murins dits *knock-out* (KO)^{120,121}. Le KO de *Jak1* est létal dans la période périnatale avec un défaut de développement lymphoïde. Le KO *Jak2* entraîne une mort *in utero* par blocage de l'érythropoïèse définitive. Le KO *Jak3* est responsable d'un défaut du développement lymphoïde et d'une hématopoïèse myéloïde dérégulée. Enfin, les souris KO pour *Tyk2* ont un phénotype normal et présentent une réponse atténuée à l'interleukine (IL) 2, associée à une susceptibilité modeste aux infections virales. De même que pour les JAKs, les modèles murins KO ont permis de mieux cerner le rôle des STATs dans l'hématopoïèse. Le KO de *Stat1* est responsable d'un déficit de la réponse immune innée lié à l'absence de réponse à l'IFN avec une grande susceptibilité aux infections virales et bactériennes et le KO *stat2* entraîne également un défaut de réponse à l'IFN et une susceptibilité aux infections virales. Le KO de *Stat3* est létal au stade embryonnaire. Les souris KO pour *Stat4* et *Stat6* ont un défaut de différenciation des lymphocytes T auxiliaires CD4+. Le KO *Stat4* entraîne la perturbation de la réponse à l'IL12 et l'absence de différenciation Th1 (*T helper*) alors que le KO *Stat6* induit la perte de réponse à l'IL4 et l'absence de différenciation Th2 ainsi qu'un défaut de la commutation de classe et l'absence de production des immunoglobulines (Ig) E par les lymphocytes B. Le rôle de *Stat5* sera développé dans le chapitre 1.2.1.4.2.

La spécificité dans la signalisation des cytokines est largement déterminée par la combinaison de JAK et de STAT activés. JAK2 est la protéine kinase qui s'associe principalement aux récepteurs homodimériques tels que les récepteurs aux principales cytokines hématopoïétiques impliquées dans la prolifération myéloïde : EPOR, MPL/TPOR et G-CSFR^{32,122,123}. MPL/TPOR active aussi TYK2, mais seule l'activation de JAK2 est indispensable pour la signalisation³², et G-CSFR peut également activer JAK1¹²⁴. Ces trois récepteurs font partie de la famille des récepteurs homodimériques de type

I. Ils contiennent, dans leur partie extracellulaire, quatre résidus cystéine conservés, un motif WSXWS et des domaines fibronectine de type III. Dans la partie intracellulaire juxta-membranaire se trouvent les box 1 et 2. L'interaction entre le récepteur et JAK2 se fait entre la box 1 et le domaine FERM. La protéine JAK2 joue un rôle de chaperon au niveau du réticulum endoplasmique, fixée au récepteur, elle favorise sa stabilité et sa montée à la surface cellulaire. Une fois ancré à la surface, le récepteur et JAK2 restent associés. La fixation de la cytokine sur le récepteur entraîne une homodimérisation pour G-CSFR ou des changements conformationnels pour EPOR et MPL/TPOR qui sont des homodimères préformés. JAK2 est alors activée par trans-phosphorylation sur les résidus tyrosine Y1007 et Y1008 situés dans la boucle d'activation du domaine kinase. Les protéines JAK2 phosphorylées activent ensuite les tyrosines conservées dans la partie intra-cytoplasmique des récepteurs par trans-phosphorylation, permettant le recrutement de protéines possédant un domaine SH2 comme les facteurs de transcriptions de la famille des STATs. EPOR active principalement STAT5, MPL/TPOR active STAT1, STAT3 et STAT5 et G-CSFR active principalement STAT3. En dehors de la voie des STATs, MPL/TPOR et G-CSFR activent les voies MAP (*mitogen-activated protein*) kinase et PI3 (*phosphoinositide* 3) kinase, également activées par EPOR dans une moindre mesure. Ces différentes voies vont réguler des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules hématopoïétiques.

1.2.1.4 Le facteur de transcription STAT5

Le facteur de transcription STAT5 a été découvert en 1992 lors de l'étude de la régulation du gène de la β -caséine dans les glandes mammaires¹²⁵. Il était initialement nommé MGF pour *Mammary Gland Factor* puis a été renommé après son séquençage montrant son homologie avec STAT1 et STAT2. Plusieurs équipes ont ensuite cloné le gène homologue chez la souris, et deux gènes distincts ont été mis en évidence *Stat5a* et *Stat5b* exprimés de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus. La répartition tissulaire entre STAT5A et STAT5B est identique dans la plupart des tissus en dehors du tissu mammaire dans lequel STAT5A est prédominant et des tissus musculaire et hépatique dans lesquels STAT5B est prédominant. Les facteurs de transcription STAT5A et B sont activés par un grand nombre de cytokines comme les interleukines IL2, IL3, IL4, IL7 et IL15, l'EPO, la TPO mais aussi par l'hormone de croissance ou la prolactine.

1.2.1.4.1 Structure de STAT5

Les gènes *Stat5a* et *Stat5b* ont été identifiés sur le chromosome 11 chez la souris, *STAT5A* et *STAT5B* se trouvent sur le chromosome 17 chez l'être humain. Les deux gènes sont juxtaposés, ils possèdent chacun un site promoteur différent. Leurs sites d'initiation de la transcription sont éloignés d'environ 11 kb. *STAT5A* est composé de 20 exons et *STAT5B* de 19 exons. *STAT5A* possède un seul site d'initiation de la transcription alors que *STAT5B* possède deux premiers exons possibles nommés E1a et E1b. E1a est exprimé de façon ubiquitaire alors qu'E1b est retrouvé dans certains tissus comme

le placenta et la rate. Le codon d'initiation de la traduction ATG est situé dans l'exon 3 de *STAT5A* et l'exon 2 de *STAT5B* et le codon stop se situe quant à lui respectivement dans l'exon 20 et l'exon 19. Les facteurs de transcription *STAT5A* et *STAT5B* partagent plus de 96% d'homologie au niveau protéique. *STAT5A* est constitué de 793 acides aminés et *STAT5B* de 786 acides aminés. Leurs différences sont principalement situées dans le domaine de transactivation TAD, en C-terminal. Dans ce domaine se trouvent les tyrosines et les sérines cibles de la phosphorylation, Tyr694 et Ser725 et 779 pour *STAT5A* et Tyr699 et Ser731 et 193 pour *STAT5B*. Par ailleurs, il existe des isoformes tronquées de *STAT5A* et *STAT5B*, par protéolyse au niveau C-terminal¹²⁶. Ces isoformes pourraient jouer un rôle de dominant négatif sur les isoformes complètes de *STAT5*, cependant leur impact sur la signalisation dépendante de *STAT5* est controversé. Les homodimères *STAT5A* et *STAT5B* peuvent se lier aux mêmes éléments GAS. Contrairement à *STAT5B*, *STAT5A* peut former des tétramères via son domaine N-terminal qui permet l'oligomérisation des dimères. Ces tétramères sont capables d'interagir avec des motifs GAS en tandem ne contenant pas la séquence consensuelle 5'-TTCN₂-₄GAA-3'¹²⁷. Les facteurs de transcription *STAT5* régulent la transcription de très nombreux gènes cibles et notamment des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tels que les gènes des cyclines D1 et D2 mais également des gènes anti-apoptotiques, tels que *BCL-X_L*, *BCL-2* et *PIM1*.

1.2.1.4.2 Rôle de *STAT5* dans l'hématopoïèse

Les facteurs de transcription *STAT5A* et *STAT5B* sont des acteurs majeurs de l'hématopoïèse normale et ont des rôles multiples au niveau des cellules souches, des progéniteurs et des cellules hématopoïétiques matures. La fonction de *STAT5* a été largement étudiée *in vitro* dans les lignées et les cellules primaires et *in vivo* par la génération de modèles murins KO. Les KO simples *Stat5a*^{-/-} et *Stat5b*^{-/-} ainsi que les premiers doubles KO ne montraient pas d'anomalies dans la production de globules rouges et de plaquettes¹²⁸. Le double KO induisait en revanche une lymphopénie modeste avec un défaut dans la prolifération des lymphocytes T et dans la réponse T à une stimulation par l'IL2¹²⁹ ainsi qu'un défaut de réponse à la stimulation par l'IL3, le GM-CSF et le G-CSF confirmé par l'inhibition de cette même réponse par un dominant négatif de *STAT5* dans les lignées. Ce premier modèle double KO entraînait la production d'une isoforme tronquée en N-terminal de *STAT5A* et *STAT5B*, conservant une fonction de liaison à l'ADN et de transactivation. L'absence d'effet majeur sur l'hématopoïèse chez ces souris renommées *Stat5a/5b*^{ΔN/ΔN} peut s'expliquer par l'activité partielle conservée de *STAT5A* et *STAT5B*. Les souris réellement double KO pour *Stat5a/b* et nommées *Stat5a/b*^{null/null} meurent dans la période périnatale suite à de nombreux défauts et notamment suite à une anémie sévère, ayant permis de démontrer le rôle majeur de *Stat5* dans l'érythropoïèse. L'anémie se développe au stade fœtal en conséquence d'une augmentation importante de l'apoptose des progéniteurs érythroïdes liée notamment à la régulation négative du gène anti-apoptotique *BCL-X_L*^{130,131}. Les rares souris survivantes présentent un déficit immunitaire combiné sévère, ne pouvant

produire de lymphocytes B, de lymphocytes T et de cellules NK (*natural killer*), ainsi qu'une anémie, une thrombopénie et une leucopénie^{132,133}. En dehors de ses rôles dans les progéniteurs et les cellules matures, STAT5 joue aussi un rôle dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques. Dans les CSHs, *in vitro* ou dans les modèles murins transgéniques, la perte de STAT5 entraîne la perte de la quiescence et leur mise en cycle, responsable à long terme d'un épuisement du potentiel de repopulation^{134,135}. Ces effets pourraient être liées à la régulation négative de *CDKN1C* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1C* ou p57) et de *CITED2* (*CBP/P300-interacting transactivator 2*), deux gènes maîtres de la quiescence des CSHs et gènes cibles de *STAT5*¹³⁶. Parallèlement, la surexpression de *STAT5* peut promouvoir le développement et le maintien des CSHs. Chez la souris, l'introduction d'une protéine mutante *STAT5A* constitutivement activée dans les cellules souches embryonnaires (cellules ES pour *embryonic stem cell*) facilite la génération de CSHs dérivées des ES, efficaces pour la reconstitution hématopoïétique *in vivo*¹³⁷. L'expression constitutive de *STAT5* dans les progéniteurs murins Lin-Sca+Kit- et dans les progéniteurs hématopoïétiques humains CD34+ augmente leur capacité d'auto-renouvellement^{138,139}. Plus récemment, il a été mis en évidence que *STAT5* est impliqué dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*) dans les CSHs. A l'état normal, les CSHs présentent un faible niveau de ROS qui contribue à la quiescence¹⁴⁰ et l'inactivation de *STAT5A* par ARN interférence provoque une augmentation de la production de ROS dans les CSHs humaines dévoilant un rôle protecteur de *STAT5* contre le stress oxydatif¹⁴¹. Les phénomènes d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation dans la cellule hématopoïétique pourraient être en partie régulés par le niveau de ROS¹⁴², impliquant alors *STAT5* dans la boucle de régulation.

1.2.1.4.3 Rôle de *STAT5* dans l'hématopoïèse pathologique des néoplasmes myéloprolifératifs : l'exemple de la leucémie myéloïde chronique

Il y a plus de vingt ans, Van Etten a montré dans des lignées cellulaires Ba/F3 (lymphoïde) et FDCP1 (myéloïde) que la protéine oncogénique BCR-ABL induisait la phosphorylation de *STAT5*¹⁴³. Depuis, de nombreux travaux ont démontré que *STAT5* est un acteur essentiel dans l'initiation, le maintien et la progression de la maladie et que son activation est en partie indépendante de la kinase oncogénique. *In vitro*, l'inhibition de *STAT5* par un dominant négatif affecte la survie des lignées cellulaires BCR-ABL¹⁴⁴ et la suppression de *STAT5* par ARN interférence dans les progéniteurs hématopoïétiques de patients atteints de LMC inhibe la formation de colonies myéloïdes en culture semi-solide¹⁴⁵. L'activation de *STAT5* médiée par BCR-ABL confère une résistance à l'apoptose, en partie par la régulation positive de *BCL-X_L*¹⁴⁶ et la suppression de *STAT5* induit l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 et l'apoptose des cellules. *In vivo*, l'haploinsuffisance pour *STAT5* entraîne un phénotype atténué de LMC alors que la délétion complète du gène prévient le développement de la maladie^{147,148}. *STAT5* est aussi nécessaire à la progression de la maladie vers une forme plus aiguë (nommée crise ou phase blastique). En effet, des taux élevés de *STAT5* sont retrouvés dans les

progéniteurs des patients en phase blastique de LMC¹⁴⁹ et il a été montré *in vitro* et *in vivo* que STAT5 est nécessaire à l'initiation de la forme aiguë et au maintien et à la prolifération des cellules leucémiques¹⁵⁰. STAT5 intervient également dans les mécanismes de résistance des cellules de la LMC. Un niveau élevé de STAT5 favorise l'accumulation des ROS, et les ROS activent STAT5, résultant en une instabilité génétique et en la survenue de mutations additionnelles, fréquentes chez les patients présentant une LMC résistante au traitement ou au moment de la progression^{151,152}. A l'inverse, la régulation négative de STAT5A entraîne un faible niveau de ROS et une protection contre le stress oxydatif dans les cellules souches leucémiques (CSLs) de LMC¹⁴¹, soulignant le rôle complexe de la régulation des ROS dans la LMC. Par ailleurs STAT5 est aussi impliqué dans le maintien des cellules souches leucémiques en activant des voies de quiescence les rendant inaccessibles aux traitements¹⁵³.

1.2.1.5 Dérégulation de la voie JAK-STAT dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques non BCR-ABL

Dans les NPMs classiques, les mutations de JAK2, MPL et CALR aboutissent toutes à l'activation de la kinase JAK2 et à la dérégulation de la voie JAK-STAT. La physiopathologie de la mutation JAK2V617F est la plus largement étudiée. Comme nous l'avons vu précédemment, la mutation JAK2V617F située dans le domaine auto-inhibiteur JH2 altère sa fonction inhibitrice sur le domaine kinase JH1 et induit son activation constitutive. Cette mutation confère aux cellules hématopoïétiques une hypersensibilité, voire une indépendance aux cytokines suite à l'activation constitutive de nombreuses voies de signalisation cellulaire situées en aval de JAK2 comme les voies STAT, MAPK, et PI3K/AKT qui sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. *In vitro*, la mutation JAK2V617F permet la croissance et la prolifération spontanée des cellules hématopoïétiques murines Ba/F3, normalement dépendante de l'IL3. L'expression de JAK2V617F dans les lignées cellulaires entraîne une prolifération indépendante des facteurs de croissance uniquement en présence d'un récepteur homodimérique de type I (EPOR, MPL/TPOR ou G-CSFR)¹⁵⁴ et la co-expression du récepteur et de JAK2V617F est nécessaire pour induire l'activation et la phosphorylation constitutive de JAK2 et de STAT5 dans les cellules. L'implication de la mutation JAK2V617F dans la physiopathologie des NMPs a été clairement mise en évidence grâce à de nombreuses études réalisées *in vivo* dans des modèles murins. Dans les premiers modèles obtenus par greffe de CSHs après transduction rétrovirale permettant l'expression de la protéine mutée, les souris développaient une polyglobulie évoluant vers la myélofibrose, démontrant le caractère oncogénique de la mutation JAK2V617F, capable à elle seule d'induire un phénotype de NMP^{20,155}. D'autres modèles de souris transgéniques ou KI (*knock-in*) ont permis de confirmer le rôle de la mutation JAK2V617F dans le développement des NMPs¹⁵⁶. L'utilisation de ces modèle KI permet l'introduction de la mutation au niveau du locus de JAK2 et par conséquent un niveau d'expression de JAK2V617F

plus proche du niveau physiologique endogène. Les souris développent un phénotype de polyglobulie de Vaquez avec un hémocrite élevé, une thrombocytose, une splénomégalie, ainsi qu'une fibrose médullaire et splénique¹⁵⁶. Le rôle crucial de STAT5 a été mis en évidence dans ces modèles murins en utilisant les double KO *Stat5* inductibles. Chez ces souris, l'haplo-insuffisance pour *Stat5* entraîne un phénotype atténué de NMP et la délétion complète du gène prévient le développement de la maladie^{147,157}.

De même que pour JAK2V617F, des modèles murins comportant les mutations de *MPL* ou de *CALR* ont permis de montrer que la mutation était capable à elle seule d'induire un phénotype de NMP. Pour *MPL*, seuls des modèles basés sur la transduction rétrovirale de la mutation sont décrits, aboutissant à un phénotype de thrombocythémie essentielle rapidement suivi d'une myélofibrose¹⁵⁸. Les modèles murins par transplantation de progéniteurs hématopoïétiques transduits avec les mutants *CALRdel52* et à un moindre degré *CALRins5* développent un phénotype de thrombocythémie essentielle qui évolue secondairement et de façon systématique vers une myélofibrose en neuf à douze mois, uniquement pour les mutants *CALRdel52*. Un modèle KI pour *CALRdel52* a aussi été récemment rapporté. *In vitro* et *in vivo*, il a été mis en évidence que la présence de *MPL/TPOR* était nécessaire au développement du NMP et que la mutation de *CALR* induisait une augmentation de STAT5^{40,159,160}.

1.2.2 La réaction stromale

Dans la myélofibrose, la réaction stromale est une réponse du microenvironnement médullaire à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques par le clone malin. Les cellules stromales stimulées de façon inappropriée vont entraîner la fibrose, l'ostéosclérose et la néoangiogenèse de la moelle osseuse.

1.2.2.1 Microenvironnement médullaire

1.2.2.1.1 Cadre osseux, vascularisation et cellules stromales

Chez l'adulte, le tissu hématopoïétique se trouve dans la moelle osseuse, localisée dans les os trabéculaires ou os spongieux. Les travées osseuses y délimitent des logettes qui contiennent la moelle hématopoïétique. La vascularisation joue un rôle essentiel dans la structure médullaire, les logettes contenant les sinusoides capillaires et l'hématopoïèse ayant lieu dans les espaces extravasculaires. La surface endostéale des os constitue la niche dans laquelle résident et vont se différencier les CSHs. Il existe deux types de niches : la niche ostéoblastique qui se trouve près de l'endostéum et la niche vasculaire près des sinusoides. Les deux niches comprennent les cellules hématopoïétiques mais aussi les cellules stromales de la moelle osseuse qui composent le tissu de soutien et sont définies comme les cellules non hématopoïétiques. Elles comprennent les fibroblastes, les cellules endothéliales, les adipocytes, les ostéoblastes, les cellules des muscles lisses, les cellules de Schwann et les cellules

réticulaires. Des cellules d'origine hématopoïétiques participent aussi à ce stroma comme les ostéoclastes et les mastocytes. Les cellules stromales et notamment les fibroblastes sont responsables de la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire qui supportent les CSHs et leurs interactions avec les autres cellules. Il n'existe pas de séparation nette entre les deux niches. Dans la niche ostéoblastique, l'environnement hypoxique favorise la quiescence et l'auto-renouvellement des CSHs alors que la niche vasculaire, plus oxygénée pourrait promouvoir la différenciation et la prolifération des cellules hématopoïétiques.

1.2.2.1.2 Matrice extracellulaire

1.2.2.1.2.1 Composants de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un ensemble complexe, acellulaire, composé de trois grands types de macromolécules : les protéines fibreuses, volumineuses, en particulier les collagènes, les glycoprotéines et les glycosaminoglycanes généralement liées à des protéines et formant les protéoglycanes.

Les collagènes sont une famille de protéines fibreuses et sont parmi les protéines les plus abondantes de l'organisme. Ils sont formés à partir de l'enroulement de trois chaînes polypeptidiques α et une trentaine de types de collagènes est décrite chez les vertébrés. La matrice extracellulaire de la moelle osseuse est constituée essentiellement des collagènes de type I et III, alors que le tissu osseux comprend uniquement du collagène de type I. Les cellules endothéliales synthétisent du collagène de type IV, composant majeur des membranes basales des sinusoides médullaires. Le collagène est synthétisé sous forme de pro-chaînes α organisées en hélices droites qui s'assemblent trois par trois, formant la triple hélice de procollagène. Le procollagène sécrété par la cellule est ensuite clivé par une enzyme, la procollagène peptidase qui le transforme en tropocollagène. Des assemblages conduisent ensuite à la microfibrille puis à la macrofibrille et enfin à la fibre de collagène ou de réticuline.

Les principaux glycosaminoglycanes de la moelle osseuse sont l'acide hyaluronique, l'héparane sulfate, la chondroïtine sulfate et le dermatane-sulfate. Ils se lient de manière covalente à des protéines et forment les protéoglycanes comme la décorine, le perlecan ou le versican. Les protéoglycanes piègent l'eau et constituent un gel hydraté nommé substance fondamentale dans laquelle sont incluses les fibres de collagène et baignent les cellules hématopoïétiques.

Les glycoprotéines comme la laminine, la fibronectine, l'ostéonectine, ou la thrombospondine permettent l'adhésion des différentes protéines de la matrice extracellulaire entre elles et l'adhésion entre les protéines de la matrice extracellulaire et les cellules stromales.

1.2.2.1.2.2 Dégradation de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est une structure dynamique résultant de l'équilibre entre la synthèse des protéines matricielles et leur dégradation assurée par deux types d'enzymes : la plasmine et les métalloprotéases matricielles (MMPs pour *matrix metalloproteinases*).

La plasmine est une enzyme issue du clivage du plasminogène sécrété par le foie. La plasmine intervient dans la dégradation directe de la laminine et de la fibronectine ou dans la dégradation indirecte des protéines de la matrice extracellulaire via des interactions avec les MMPs. L'activation du plasminogène en plasmine est régulée par des systèmes activateurs et inhibiteurs. Le système pro-urokinase/urokinase (scu-PA/tcu-PA pour *single-/two-chain urokinase plasminogen activator*) induirait l'activation et la dégradation des composants matriciels, tandis que l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA pour *tissue plasminogen activator*) serait impliqué dans la fibrinolyse systémique. Les systèmes inhibiteurs comprennent en particulier les inhibiteurs d'activateur de plasminogène de type I, (PAI-1 pour *plasminogen activator inhibitor-1*) capable de réguler négativement le t-PA et l'urokinase et de type 2 (PAI-2) qui inhibe l'urokinase.

Les MMPs sont une famille d'endopeptidases comprenant une vingtaine de membres classés suivant leur structure et leur spécificité de substrat. Les plus puissantes enzymes collagénolytiques sont MMP-1, MMP-8, MMP-9, MMP-13 et MMP-14. La plupart des MMPs est sécrétée sous forme de proenzyme inactive et qui peut être activée par diverses protéases dont la plasmine. Les MMPs activées sont également capables d'activer d'autres MMPs latentes. L'activité protéolytique des MMPs est contrôlée par des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP pour *tissue inhibitors of metalloproteinase*) dont il existe quatre types (TIMP 1 à 4).

1.2.2.2 Physiopathologie de la fibrose médullaire

L'accumulation des fibres dans la moelle osseuse est due à une augmentation de synthèse des collagènes de type I, III, IV et V par les fibroblastes mais aussi à un dépôt de glycoprotéines telles que la fibronectine, la vitronectine et la tenascine et dans une moindre mesure à la diminution de la dégradation de la matrice extracellulaire.

Contrairement à la prolifération des cellules hématopoïétiques qui est clonale, il a été démontré par l'étude de l'expression des isoenzymes A et B de la G6PD puis par étude cytogénétique que les fibroblastes impliqués dans la réaction stromale sont polyclonaux^{102,161}. Il n'est pas constaté d'augmentation massive du nombre de fibroblastes dans la moelle osseuse des patients atteints de myélofibrose primitive suggérant que l'augmentation de production des protéines fibreuses est liée à l'activation des fibroblastes plus qu'à leur prolifération. Dans ce sens, de récents travaux ont montré

l'implication des myofibroblastes comme cellules conductrices de la fibrose dans la moelle osseuse. Ces myofibroblastes sont issus de la différenciation de cellules stromales particulières résidant dans la moelle osseuse, ils prolifèrent dans la moelle osseuse pathologique des NMPs et leur absence limitent le développement de la fibrose dans un modèle murin de fibrose^{162,163}. Par ailleurs, une étude récente a montré la participation de cellules néoplasiques, les fibrocytes néoplasiques, dans la production de collagène et de fibronectine chez les patients atteints de myélofibrose. Les fibrocytes sont des cellules dérivées des monocytes et portant des marqueurs à la fois de cellules hématopoïétiques et de cellules stromales. Ils sont impliqués dans le processus de fibrose de nombreux organes solides. Par analyse cytogénétique chez les patients atteints de myélofibrose primitive avec une délétion 20q ou par PCR chez les patients porteurs d'une mutation JAK2V617F ou d'une mutation de *CALR*, les auteurs ont pu montrer l'origine clonale de ces fibrocytes¹⁶⁴.

L'activation et/ou la prolifération des fibroblastes responsable de la majoration de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire est le résultat de leur stimulation par des cytokines pro-fibrotiques. Dans la myélofibrose primitive, plusieurs arguments plaident pour un rôle prépondérant du mégacaryocyte dans cette sécrétion inappropriée de cytokines. Tout d'abord, aussi bien chez les patients que dans les modèles murins de myélofibrose, il existe une hyperplasie de la lignée mégacaryocytaire. Les mégacaryocytes sont anormaux, dysplasiques, voire apoptotiques. De plus, les fibres de collagène sont fréquemment retrouvées au voisinage des mégacaryocytes dysplasiques, voire les englobent¹⁶⁵. L'implication du mégacaryocyte dans deux autres pathologies associées à une fibrose médullaire, la leucémie aiguë mégacaryoblastique¹⁶⁶ et le syndrome des plaquettes grises¹⁶⁷ est un argument indirect de son rôle dans la fibrose. Par ailleurs dans la myélofibrose primitive, il a été mis en évidence une augmentation du phénomène d'empériplèse. Ce phénomène physiologique rare est caractérisé par le passage aléatoire de différents types de cellules médullaires à travers le système canaliculaire ouvert du mégacaryocyte, normalement sans conséquence. Dans le cas de la myélofibrose primitive, le passage de polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles pourrait conduire à l'activation du polynucléaire qui relarguerait ses granules lytiques dans le cytoplasme du mégacaryocyte, entraînant ainsi la sécrétion inappropriée des cytokines stockées dans les granules α ^{168,169}. Une fois relarguées, les cytokines pro-fibrotiques peuvent être séquestrées par le stroma médullaire en se liant aux protéoglycanes¹⁷⁰ et stimulent les cellules stromales. Une étude récente a montré qu'un inhibiteur d'Aurora kinase entraînait la polyploïdisation et la différenciation des mégacaryocytes des patients atteints de myélofibrose primitive, et limitait leur potentiel fibrotique. Dans cette même étude, l'haplo-insuffisance pour le gène de l'Aurora kinase A était également suffisant pour entraîner une polyploïdisation des mégacaryocytes et diminuer de façon variable la fibrose dans deux modèles murins de myélofibrose¹⁷¹. Enfin, dans une autre étude récente, la présence de la mutation JAK2V617F uniquement dans les mégacaryocytes conduit à l'expansion des cellules hématopoïétiques mutées et non mutées et est suffisante pour entraîner une myéloprolifération et favoriser la fibrose. *In vivo*, les

auteurs ont montré que la déplétion en mégacaryocytes porteur de la mutation JAK2V617F ou de la mutation MPLW515L améliore la polyglobulie et l'hyperleucocytose¹⁷².

L'accumulation des protéines de la matrice extracellulaire est également liée à une diminution de leur dégradation. Bien qu'une surexpression de MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-13 et MMP-14 ait été rapportée chez les patients atteints de myélofibrose primitive et d'autres NMPs non BCR-ABL^{173,174}, il semble que le ratio MMP/TIMP soit altéré favorisant l'absence de dégradation^{175,176}. Par ailleurs, la surexpression de MMP-14 au niveau mégacaryocytaire et endothéliale joue un rôle dans la néoangiogénèse¹⁷⁴, et MMP-9 serait impliqué dans la mobilisation des cellules hématopoïétiques CD34+ dans la myélofibrose primitive¹⁷⁷. Enfin certaines MMPs peuvent activer le *transforming growth factor-β1* (TGF-β1), cytokine majeure dans la physiopathologie de la fibrose dont le rôle sera développé dans ce chapitre.

La physiopathologie de la myélofibrose primitive est souvent décrite comme une relation linéaire, à sens unique : la cellule hématopoïétique clonale prolifère, est responsable de la sécrétion inappropriée de cytokines qui stimulent les fibroblastes provoquant en retour la réaction stromale. Cependant, il s'agit plus probablement d'un système complexe dans lequel le dialogue est altéré entre les cellules hématopoïétiques et le microenvironnement, les cellules stromales activées favorisant à leur tour l'hématopoïèse pathologique aux dépens de l'hématopoïèse normale par altération des niches hématopoïétiques^{178,179}.

1.2.2.3 Rôle majeur du TGF-β1

Le TGF-β1 est une cytokine majeure dans le développement de la fibrose de nombreux organes et apparait comme un élément clé du développement de la fibrose médullaire.

1.2.2.3.1 Famille des TGF-β

Le TGF-β1 appartient à une superfamille de facteurs de croissance et de différenciation ubiquitaire appelée superfamille TGF-β, qui contient plus de trente membres. Outre les isoformes des TGF-β, la superfamille comprend les BMPs (*bone morphogenetic proteins*), les activines, la protéine Nodal, l'hormone antimüllérienne et les GDFs (*growth and differentiation factors*). Les TGF-β sont des cytokines ubiquitaires et sont impliqués dans une grande variété de fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la survie. Les TGF-β interviennent dans la formation et la dégradation de la matrice extracellulaire, dans le processus de cicatrisation, dans le développement du cartilage, des os, du système nerveux, dans l'hématopoïèse et dans les réponses immunitaire et inflammatoire. Les TGF-β sont exprimés précocement au cours du développement embryonnaire dans de nombreux organes et l'expression est particulièrement marquée dans les régions soumises à des

changements morphogénétiques. Les effets des TGF- β varient selon le type cellulaire et l'état physiologique de la cellule.

1.2.2.3.2 Fonctions des TGF- β

Chez les mammifères, trois gènes *TGF- β* sont décrits *TGF- β 1*, *TGF- β 2* et *TGF- β 3* qui présentent une analogie de structure de 70% et une similitude fonctionnelle. Les trois gènes sont localisés sur des chromosomes différents, en 19q13, 1q41, 14q24, respectivement. La structure de ces trois gènes est très proche, comprenant 7 exons et 6 introns (**Figure 10**, A, structure du gène *TGF- β 1*). Toutefois, les séquences promotrices de ces trois gènes sont différentes, expliquant des patrons d'expression temporels et spatiaux distincts. Les trois isoformes TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 sont hautement conservées chez les mammifères et ne sont pas redondantes puisque l'inactivation d'un seul gène est létale chez la souris. Le TGF- β 1 est l'isoforme la plus abondante. L'inactivation du gène du TGF- β 1 chez la souris (*Tgf- β 1^{-/-}*), induit une mortalité soit au stade embryonnaire, soit au stade périnatal. La létalité embryonnaire est de pénétrance variable suivant le fond génétique des géniteurs *Tgf- β 1^{+/-}*. Cette mortalité prénatale qui touche 50% des embryons *Tgf- β 1^{-/-}* peut s'expliquer par deux fonctions différentes du TGF- β 1 durant l'embryogenèse à deux stades distincts : un défaut d'implantation au stade pré-implantatoire et un défaut d'hématopoïèse et de différenciation endothéliale du sac vitellin au stade extraembryonnaire. Les souriceaux qui survivent à la naissance n'ont pas de phénotype particulier pendant les deux premières semaines de vie. Cette absence de symptômes pourrait être liée à l'apport maternel en TGF- β 1 bien que cette notion soit controversée. A la troisième semaine, tous les souriceaux développent un syndrome inflammatoire généralisé létal en quelques jours. L'analyse histologique de ces animaux révèle une infiltration importante par des lymphocytes et des macrophages associée à une nécrose tissulaire dans de nombreux organes, en particulier le cœur et les poumons. L'inactivation du gène du TGF- β 2 chez la souris (*Tgf- β 2^{-/-}*) conduit à la mortalité de tous les souriceaux. Deux tiers des souriceaux *Tgf- β 2^{-/-}* meurent peu avant ou à la naissance, le tiers restant naissant cyanosés et succombant en quelques minutes. De multiples malformations sont retrouvées chez ces animaux au niveau cardiaque, pulmonaire, osseux, ainsi qu'au niveau des yeux, de l'oreille interne et de l'appareil urogénital. Enfin, les souriceaux *Tgf- β 3^{-/-}* meurent dans les 24 heures suivant la naissance, cyanosés, suffoquant et incapables de téter en raison de malformations de la voûte palatine et d'une atélectasie pulmonaire avec hypoplasie alvéolaire¹⁸⁰.

1.2.2.3.3 Synthèse et activation du TGF- β 1

Le TGF- β 1 est synthétisé sous forme d'un complexe biologiquement inactif. L'ARN messager du TGF- β 1 code pour un précurseur latent le LTGF- β (*latent TGF- β*), une pré-pro-protéine de 390 acides aminés composé d'un peptide signal de 29 acides aminés en N-terminal, d'une région centrale qui sera le LAP (*latency associated peptide*) et du peptide actif en C-terminal, de 25 kDa. Un premier clivage protéolytique en N-terminal libère le peptide signal et conduit à la pro-protéine TGF- β 1. Un deuxième

clivage protéolytique par la furine convertase entre les résidus arginine 278 et 279 libèrent le LAP et le peptide actif. Le peptide actif du TGF- β 1 va subir une maturation pour former un homodimère. Le TGF- β 1 peut être sécrété sous deux formes : le petit complexe latent ou le grand complexe latent. Le petit complexe latent est composé du dimère de TGF- β 1 et du dimère de LAP, liés de façon non covalente. Le grand complexe latent comprend, en plus du LAP et du TGF- β 1, la LTBP (*latent TGF- β 1 binding protein*), liée de façon covalente au LAP. Le LAP confère la latence du complexe alors que la LTBP permet la fixation et le stockage du TGF- β 1 au niveau de la matrice extracellulaire (**Figure 10**, B et C). Pour exercer ses fonctions biologiques, le TGF- β 1 doit être libéré du LAP et de la LTBP. *In vitro*, l'interaction entre le TGF- β 1 et le LAP peut être levée par la chaleur, l'acidification, l'alcalinisation, les détergents ou par l'irradiation et la production de ROS. *In vivo*, le pH acide au cours de la résorption osseuse entraîne l'activation du TGF- β 1, de même, l'inflammation et l'apoptose induisant un stress oxydatif sont responsables de lésions de la matrice extracellulaire qui active le TGF- β 1¹⁸¹. De nombreuses protéases telles que la plasmine, la MMP-2, la MMP-9 induisent le clivage et la déstabilisation des liaisons entre le TGF- β 1, le LAP et la LTBP. La thrombospondine 1 (TSP-1) et les intégrines se lient au LAP et entraînent un changement conformationnel qui permet la libération du TGF- β 1 bioactif^{182,183}.

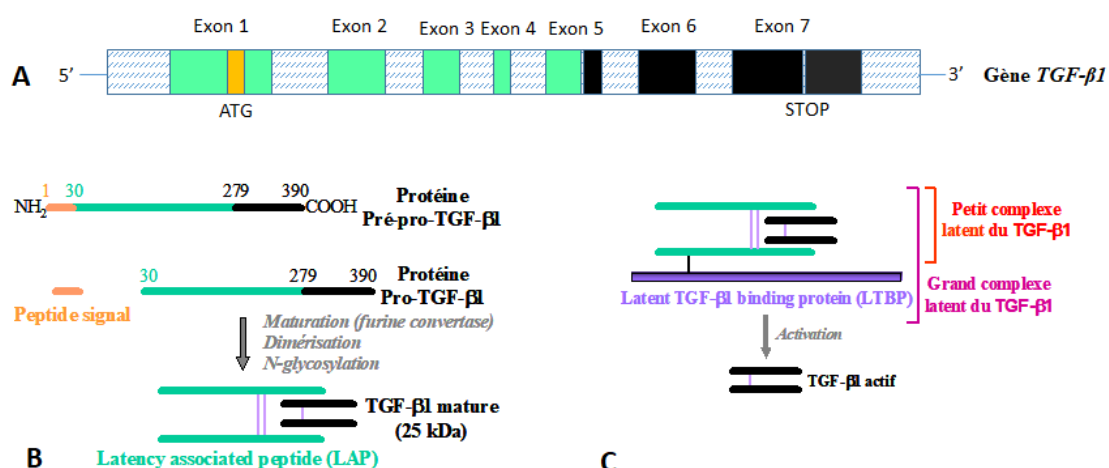


Figure 10 : Synthèse du TGF- β 1.

A) Représentation schématique du gène *TGF- β 1*. B) Biosynthèse du TGF- β 1. En perdant le peptide signal, le pré-pro-TGF- β 1 devient le pro-TGF- β 1. Le pro-TGF- β 1 clivé par la furine convertase libère le TGF- β 1 mature et le LAP. C) Forme latente de TGF- β 1. Le TGF- β 1 est maintenu inactif par l'association avec le LAP, formant le petit complexe latent, lui-même relié au LTBP, formant le grand complexe latent. LAP: latency associated peptide. LTBP: latent TGF- β 1 binding protein.

1.2.2.3.4 Voies de signalisation du TGF- β 1

Une fois activé, le TGF- β 1 induit la transduction du signal intracellulaire en interagissant avec ses récepteurs I et II nommés T β RI et T β RII. Ces récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase sont composés d'une région extracellulaire riche en cystéine et d'une région intracellulaire

comprenant le domaine kinase. Les deux types de récepteur sont des homodimères en l'absence de ligand. Le TGF- β 1 se lie au T β RII, et ce complexe recrute et phosphoryle le T β RI sur les résidus sérine et thréonine, activant le domaine kinase du T β RI, par la liaison du T β RI à la protéine FKBP12 (*FK506-binding protein 12*). Un protéoglycane nommé betaglycane ou T β RIII permet la fixation du TGF- β 1 sur le T β RII avec une plus grande affinité.

1.2.2.3.4.1 Voie de signalisation canonique du TGF- β 1 : la voie des Smads

La voie de signalisation canonique du TGF- β 1 passe par les protéines cytoplasmiques Smads. Les Smads sont divisés en trois groupes R-Smads, co-Smads et I-Smads. Les R-Smads (Smad2 et Smad3) sont les Smads associés au récepteur, spécifiques d'un ligand, elles interagissent avec le T β RI activé. Le co-Smad (Smad4) est un médiateur commun à tous les membres de la superfamille des TGF et enfin les I-Smads (Smad6 et Smad7) sont les Smads inhibiteurs. Les R-Smads sont liés à la membrane plasmique par les microtubules, et sont présentés au récepteur par la protéine SARA (*Smad-anchor for receptor activation*). Smad2 et Smad3 possèdent deux domaines très conservés MH (*mad homology*), MH1 en N-terminal impliqué dans la liaison à l'ADN et MH2 en C-terminal comprenant un motif conservé de type –SSXS–, reliés par une région intermédiaire variable riche en proline. Après liaison du TGF- β 1 sur son récepteur, T β RI actif phosphoryle Smad2 et Smad3 sur deux résidus sérines présents dans le motif –SSXS–. Les R-Smads s'associent à l'unique co-Smad, Smad4, et ce nouveau complexe migre alors dans le noyau où il joue le rôle de facteur de transcription. L'importation nucléaire de ce complexe est un processus actif, Smad4 est importé dans le noyau uniquement lorsqu'il est associé aux R-Smads, alors que Smad2 et Smad3 peuvent être importés dans le noyau de façon indépendante de Smad4 mais ne peuvent avoir d'activité transcriptionnelle en l'absence de Smad4¹⁸⁴. Les complexes R-Smad/Smad4 se lient à l'ADN directement via le *Smad binding element* (SBE) présent sur de nombreuses régions promotrices seul ou en association avec d'autres protéines co-activatrices. Le TGF- β régule la transcription de plus de cinq cents gènes, l'activation transcriptionnelle spécifique et optimale des promoteurs des gènes cibles requiert le recrutement de facteurs supplémentaires comme des facteurs de transcription (AP-1, TFE3 ou YY1), des adaptateurs comme FOXH1, ou encore des co-activateurs tels que CBP (*CREB-binding protein*)/p300¹⁸⁵. Par ailleurs, l'association des Smads avec des répresseurs transcriptionnels comme TGIF (*TG-interacting factor*), Ski et SnoN, module leur interaction avec les co-activateurs transcriptionnels comme CBP/p300¹⁸⁶. Ainsi, en s'associant à des partenaires différents, les Smads peuvent établir des interactions de haute affinité et très sélectives avec les séquences promotrices de leurs gènes cibles. L'arrêt du signal va faire intervenir Smad7, un Smad inhibiteur. Il s'associe au T β RI activé et empêche la phosphorylation de Smad2 et Smad3. Smad7 peut également contrecarrer l'effet du TGF- β 1 dans le noyau en interférant avec la formation du complexe Smad/ADN. De plus, Smad7 peut recruter deux ubiquitine ligases E3, Smurf1 et Smurf2, au niveau du T β RI activé, ce qui entraîne la dégradation du

complexe des récepteurs par le protéasome. L'action inhibitrice de Smad7 est une boucle de rétrocontrôle négatif car l'expression de Smad7 est induite par le TGF- β 1 de façon dépendante des Smads¹⁸⁷ (**Figure 11**). D'autres voies de régulation négative sont impliquées dans l'arrêt du signal comme la diminution d'expression des récepteurs au TGF- β 1 à la surface cellulaire, l'activation des protéines de latence et l'interaction avec des co-répresseurs transcriptionnels dans le noyau.

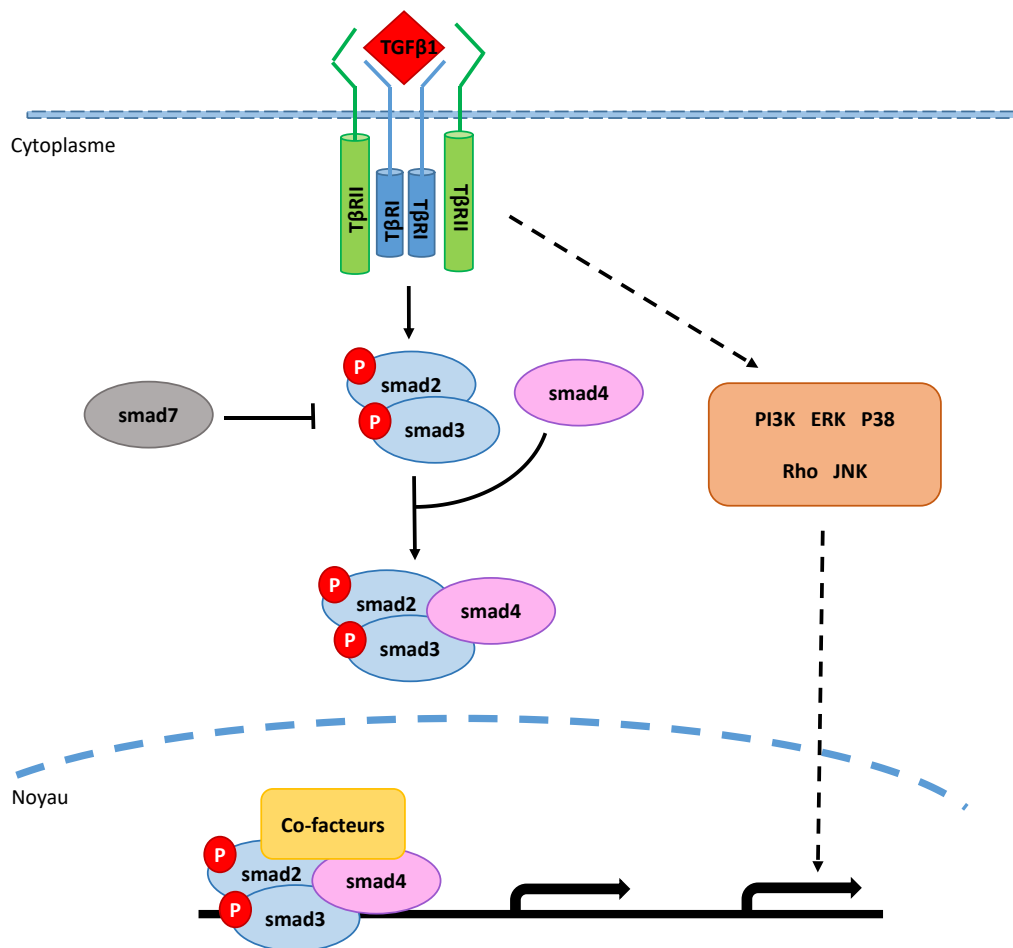


Figure 11 : Voies de signalisation du TGF- β 1.

Voie canonique des Smads : Le TGF- β 1 se lie au T β RII qui recrute le T β RI. Le récepteur ainsi activé phosphoryle les R-Smads, Smad2 et Smad3. Les R-Smads phosphorylés recrutent le co-Smad, Smad 4. Le complexe R-Smads/co-Smad est transloqué dans le noyau et recrute des co-facteurs pour initier la transcription des gènes cibles du TGF- β 1. L'I-Smad, Smad7, intervient dans l'arrêt du signal. Voies non canoniques : les voies non canoniques (indiquées par les flèches en pointillés) comprennent les voies MAPK, PI3K/AKT, Rho GTPase. T β RI: récepteur au TGF- β 1 de type I. T β RII: récepteur au TGF- β 1 de type II. R-Smad: Smad associé au récepteur. I-Smad: Smad inhibiteur.

1.2.2.3.4.2 Les voies non canoniques

Les protéines Smads représentent les messagers hautement spécifiques du TGF- β , cependant de nombreuses voies non canoniques sont décrites grâce aux approches protéomiques et

phosphoprotéomiques. Ainsi, il a été montré que le TGF- β peut activer les cascades de signalisation de la voie MAP kinase telles qu'ERK1/ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), et p38, de la voie PI3K/AKT ou de la voie des Rho GTPases. Ces voies non canoniques peuvent être autonomes ou interagir avec la voie des Smads pour en contrôler l'activation. L'activation de ces voies de signalisation par le TGF- β est dépendante du contexte et du type cellulaires étudiés¹⁸⁸.

1.2.2.3.5 Effet du TGF- β 1 sur la matrice extra-cellulaire et la fibrose

La régulation des protéines de la matrice extracellulaire est une des fonctions clés du TGF- β 1. La stimulation par le TGF- β 1 déséquilibre la matrice extracellulaire en favorisant son accumulation. L'action du TGF- β 1 sur la matrice extracellulaire s'exerce en grande partie au niveau transcriptionnel et de nombreuses études ont montré l'accumulation des ARN messagers des collagènes, de la fibronectine, du perlecan, de la thrombospondine mais aussi de la TIMP1 et du PAI1. Une approche par puce à ADN a montré la régulation de 58 gènes impliqués dans la matrice extracellulaire après stimulation de fibroblastes du derme par le TGF- β 1. Si Smad3 semble essentiel à la transcription des gènes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A2*, *COL6A1*, *COL6A3* et *TIMP1*, la transcription de la fibronectine est régulée par la voie JNK, indépendamment des Smads¹⁸⁹. Le TGF- β 1 régule également la transcription du CTGF (*connective tissue growth factor*), par la voie dépendante des Smads¹⁹⁰. Ce facteur de croissance est un effecteur d'aval du TGF- β 1 impliqué dans la prolifération des fibroblastes et dans l'accumulation de la matrice extracellulaire¹⁹¹.

In vivo, l'injection de TGF- β 1 purifié en sous-cutané a montré l'apparition de lésions fibrotiques au site d'injection¹⁹². Ce potentiel effet pro-fibrotique a été confirmé par de nombreuses expériences démontrant que la surexpression du TGF- β 1 dans un tissu donné induit une fibrose alors que sa neutralisation améliore les modèles expérimentaux de fibrose du poumon, du cœur, de la peau, du rein ou du foie. Par ailleurs, il a aussi été montré que la voie des Smads est largement utilisée dans le processus de fibrose, les souris KO pour Smad3 ne développant pas de fibrose pulmonaire ni cutanée après irradiation, ni de fibrose rénale après obstruction urétérale¹⁹³. L'effet pro-fibrotique du TGF- β 1 implique la combinaison de plusieurs mécanismes et de plusieurs types cellulaires. Outre l'accumulation et la diminution de dégradation de la matrice extracellulaire induite par une stimulation soutenue par le TGF- β 1, celui-ci est aussi impliqué dans la prolifération des fibroblastes, dans la différenciation en myofibroblastes, et dans la transition épithélio-mésenchymateuse qui accompagne le processus de fibrose de nombreux organes solides.

1.2.2.3.6 Rôle du TGF- β 1 dans la myélofibrose primitive

Le TGF- β 1 est une des cytokines majeures impliquées dans le développement de la fibrose médullaire. Les taux de TGF- β 1 mesurés au niveau du plasma, de la moelle osseuse ou de la rate des patients atteints de myélofibrose primitive sont deux à trois fois supérieurs à ceux retrouvés chez les sujets sains^{194–196}. Par ailleurs, le TGF- β 1 est impliqué dans le développement de la fibrose médullaire dans d'autres pathologies. Dans la leucémie aiguë mégacaryoblastique qui s'accompagne de fibrose médullaire, il a été montré *in vitro* que les mégacaryoblastes issus de patients produisent et sécrètent une forme active de TGF- β capable de stimuler la synthèse de collagène par les fibroblastes¹⁹⁷. De même, une surexpression du TGF- β 1 a été retrouvée dans la moelle osseuse, le plasma et le sérum de patients atteints de leucémie à tricholeucocytes. Le niveau de TGF- β 1 a été corrélé au grade de la fibrose médullaire, et des expériences *ex vivo* ont montré que le plasma de ces patients était capable de stimuler la production de collagène par les fibroblastes¹⁹⁸.

Deux principaux modèles murins de myélofibrose ont permis d'obtenir d'importantes informations sur la physiopathologie de la fibrose médullaire et de mettre en évidence le rôle prépondérant du TGF- β 1. Le modèle TPO^{high} est obtenu par surexpression de la TPO murine, principal facteur de croissance des mégacaryocytes. Les progéniteurs hématopoïétiques murins de souris donneuses sont co-cultivés sur un stroma producteur de rétrovirus codant pour la TPO puis transplantés dans des souris receveuses irradiées de façon létale. Les animaux développent rapidement en quatre à six semaines un syndrome myéloprolifératif avec hyperleucocytose, thrombocytose, splénomégalie ainsi qu'une prolifération des mégacaryocytes et des dépôts de fibres de réticuline dans la moelle osseuse et la rate, associées à une ostéosclérose. Lorsque la fibrose s'installe et s'aggrave, les animaux développent une anémie et la maladie est rapidement létale, en une vingtaine de semaines¹⁹⁹. De même que chez les patients, les taux de TGF- β 1 mesurés dans la moelle osseuse, le plasma et les extraits plaquettaires des souris TPO^{high} sont élevés. Pour déterminer le rôle du TGF- β 1 dans le processus de fibrose, des progéniteurs hématopoïétiques de souris KO pour le TGF- β 1 (*Tgf- β 1*^{-/-}) ou des progéniteurs hématopoïétiques de souris sauvages ont été transduits avec le rétrovirus codant pour la TPO murine puis transplantés dans des souris sauvages receveuses irradiées de façon létale. Les deux groupes d'animaux ont développés un syndrome myéloprolifératif caractéristique du modèle TPO^{high}. Les animaux transplantés avec les progéniteurs hématopoïétiques sauvages ont développé une fibrose médullaire et splénique sévère alors que les animaux transplantés avec les progéniteurs hématopoïétiques *Tgf- β 1*^{-/-} n'ont pas développé de fibrose, mettant en évidence le rôle majeur du TGF- β 1 dans la réaction stromale. Dans cette expérience, les taux de TGF- β 1 latent mesurés dans le plasma et la rate étaient quatre à six fois supérieurs chez les souris sauvages comparées aux souris *Tgf- β 1*^{-/-}²⁰⁰. Dans ce même modèle murin, l'injection d'un adénovirus codant pour un récepteur soluble au TGF- β 1 de type II, permettant la diminution drastique des taux de TGF- β 1, a contrecarré le développement

de la fibrose dans la moelle osseuse et la rate des souris traitées²⁰¹. Un autre modèle murin de myélofibrose, le modèle GATA-1^{low}, est obtenu par mutation du gène *GATA-1*, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire. Si le KO *GATA-1* induit la mort *in utero* des souris, sa répression partielle conduit à l'accumulation de mégacaryocytes dans la moelle osseuse et dans la rate, en bloquant leur maturation. Les souris GATA-1^{low} développent une myélofibrose tardive, au bout de quinze mois environ²⁰². Dans ce modèle, l'inhibition du TGF-β1 par inhibition de l'activité kinase du récepteur de type I au TGF-β1 (TβRI) entraîne une maturation normale des mégacaryocytes mais aussi une réduction de la fibrose, de la néoangiogénèse et de l'ostéosclérose dans la moelle osseuse, ainsi qu'une réduction de l'hématopoïèse splénique²⁰³.

Ainsi, le TGF-β1 est un élément clé dans le développement de la fibrose médullaire. Bien qu'aucun argument direct ne confirme la source principale du TGF-β1 dans la myélofibrose primitive, plusieurs arguments indirects plaident pour une origine en grande partie mégacaryocytaire. Comme nous l'avons vu précédemment, le mégacaryocyte est une cellule majeure dans le développement de la fibrose dans la myélofibrose primitive mais aussi dans d'autres pathologies associées à la fibrose. L'étude histologique de la moelle osseuse des patients atteints de myélofibrose primitive montre une localisation mégacaryocytaire du TGF-β1²⁰⁴, et il a été récemment montré *in vitro* que la stimulation des mégacaryocytes par la TPO entraîne une sécrétion de composants de la matrice extracellulaire qui est inhibée lorsque le récepteur de type I au TGF-β1 est inactivé²⁰⁵. L'augmentation du phénomène d'empéripolèse décrit dans la myélofibrose primitive est aussi retrouvée dans les modèles murins TPO^{high} et GATA-1^{low}^{168,169} et les mégacaryocytes des souris GATA-1^{low} sont riches en TGF-β1. Dans ce même modèle murin, il a été montré par microscopie électronique à transmission que les mégacaryocytes interagissent avec les fibrocytes qui les entourent et que ces aires contiennent un taux élevé de TGF-β1 bioactif²⁰⁶. Par ailleurs, il a aussi été montré que le monocyte n'est pas la source majeure de TGF-β1 dans le modèle TPO^{high}²⁰⁷.

Enfin il semble que l'activation du TGF-β1 responsable de la fibrose médullaire soit essentiellement un phénomène local. En effet, les taux plasmatiques élevés retrouvés chez les patients et dans les modèles murins de myélofibrose mesurent le TGF-β1 latent, la forme active étant très rarement mise en évidence dans la circulation périphérique. De plus, la fibrose se développe uniquement dans la moelle osseuse ou dans les sites d'hématopoïèse extra-médullaire et non dans d'autres organes, plaçant pour une activation locale.

1.2.2.4 Autres cytokines fibrogéniques

D'autres cytokines secrétées dans le contexte de la myélofibrose primitives sont des régulateurs positifs du TGF- β 1, comme l'IL1 β et l'IL6. Le TGF- β 1 va également entraîner l'expression de cytokines favorisant la synthèse de la matrice extracellulaire comme le CTGF ou inhibant sa dégradation comme le TIMP. Par ailleurs, le taux d'ARM messager du PDGF, cytokine impliquée dans la prolifération des fibroblastes, a été retrouvé élevé chez les patients atteints de myélofibrose primitive²⁰⁸. Cependant, la surexpression du PDGF chez la souris induit un syndrome myéloprolifératif létal sans fibrose médullaire²⁰⁹, ce qui suggère que le PDGF pourrait jouer un rôle secondaire dans l'entretien du processus de fibrose en favorisant la prolifération des fibroblastes.

1.2.2.5 Physiopathologie de l'ostéosclérose

L'ostéosclérose est une des composantes de la réaction stromale décrite dans la myélofibrose primitive. Nous ne détaillerons pas l'ensemble des mécanismes de l'ostéosclérose mais uniquement les grands principes de la régulation du remodelage du tissu osseux et les indices de sa dérégulation dans la myélofibrose primitive.

Le remodelage du tissu osseux est assuré essentiellement par deux types cellulaires, l'ostéoclaste qui résorbe le tissu osseux et l'ostéoblaste qui produit du tissu osseux. L'ostéoclaste est une cellule d'origine hématopoïétique de la lignée des monocytes-macrophages et l'ostéoblaste provient d'une cellule souche mésenchymateuse ou stromale. Les ostéoblastes sont nécessaires à la différenciation des ostéoclastes. Le système RANK-L/OPG (*receptor activator of nuclear factor- κ B-ligand/osteoprotegerin*) médiateur de cette communication intercellulaire entre ostéoblastes et ostéoclastes, exerce un rôle fondamental dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse et la plupart des hormones et cytokines modulant la résorption osseuse agissent au moins en partie à travers cette voie. RANK-L est une cytokine de la famille des TNF (*tumor necrosis factor*) dont le domaine extracytoplasmique est capable de reconnaître de manière sélective les progéniteurs hématopoïétiques engagés dans la différenciation ostéoclastique. RANK-L active le récepteur RANK situé à la surface des ostéoclastes et agit de multiples manières sur la lignée ostéoclastique. RANK-L stimule la différenciation des ostéoclastes et inhibe leur apoptose. Les facteurs stimulant la résorption osseuse stimulent la transcription de RANK-L. L'ostéoprotégérine (OPG) est une glycoprotéine sécrétée entre autres par les ostéoblastes. Elle agit comme un récepteur soluble dans le milieu extracellulaire. L'OPG se lie à RANK-L dans le milieu extracellulaire et le piège, empêchant sa liaison à RANK et le ratio OPG/RANK-L contrôle la résorption par les ostéoclastes. Chez la souris, la surexpression de l'OPG aboutit à une ostéopétrose²¹⁰ alors que l'inactivation des gènes de l'OPG²¹¹, de RANK²¹² ou de RANK-L²¹³ aboutit à une ostéoporose.

Le TGF- β 1 est stocké abondamment dans la matrice osseuse. Il est sécrété sous forme latente par les ostéoblastes *in vitro*. Son rôle dans le remodelage osseux est dépendant de sa concentration. A concentration faible, le TGF- β 1 stimule la différenciation ostéoclastique en augmentant le ratio RANK-L/OPG alors qu'à des concentrations plus élevées le TGF- β 1 est capable d'inhiber la prolifération, la différenciation et la migration des précurseurs des ostéoclastes et d'induire l'apoptose des ostéoclastes matures^{214,215}. De plus, le TGF- β 1 stimule directement la prolifération des ostéoblastes²¹⁶ et inhibe leur apoptose²¹⁷. Il semble donc probable que dans la myélofibrose primitive, le taux élevé de TGF- β 1 bioactif de la moelle osseuse soit en partie responsable de la néo-ostéogénèse et de l'ostéosclérose.

Dans le modèle TPO^{high}, des expériences de greffe de progéniteurs hématopoïétiques dans des souris dont le gène codant pour l'OPG a été invalidé (*Opg*^{-/-}) ont permis de montrer l'importance de cette glycoprotéine dans l'ostéosclérose. En effet, les souris receveuses *Opg*^{-/-} n'ont pas développé de néo-ostéogénèse alors qu'une ostéosclérose ainsi qu'une augmentation des taux circulants d'OPG ont été retrouvés chez les souris receveuses *Opg*^{+/+}²¹⁸. Des taux élevés d'OPG plasmatique ont également été retrouvés chez les patients atteints de myélofibrose primitive comparativement à des patients atteints d'autres NMPs classiques et à des volontaires sains^{219,220}. Dans une étude de 2007, l'analyse histologique et morphologique par microtomographie de la moelle osseuse de treize patients atteints de myélofibrose primitive conclue à une augmentation nette de la durée de vie des ostéoblastes associée à une diminution moins marquée de l'activité ostéoclastique²²¹. Plus récemment, il a été montré que les cellules stromales mésenchymateuses issues de patients atteints de myélofibrose primitive gardent un potentiel de différenciation ostéogénique *in vitro* et *in vivo* avec une capacité de minéralisation supérieure à celle des cellules stromales mésenchymateuses de patients atteints d'autres NMPs classiques ou de volontaires sains. Dans les cellules stromales mésenchymateuses de patients, l'activation des gènes impliqués dans la différenciation ostéogénique est également supérieure. De plus, ces cellules ont une signature transcriptomique de lignée ostéogénique et de signalisation du TGF- β 1²²².

1.2.2.6 Physiopathologie de la néoangiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique complexe et dynamique qui dépend de la balance entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Les deux principales cytokines pro-angiogéniques plasmatiques sont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) qui stimulent directement les cellules endothéliales en interagissant avec leur récepteur à la surface cellulaire via une boucle de stimulation mitogénique autocrine. D'autres cytokines peuvent stimuler indirectement les cellules endothéliales en activant la synthèse du VEGF et du bFGF tels que l'IL6, le TNF α , le PDGF ou le TGF- β 1. L'angiogenèse physiologique est un processus limité à l'embryogenèse, l'ovulation et la réparation tissulaire²²³. La perturbation de

l'équilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques aboutissant à la formation de nouveaux vaisseaux est nommée néoangiogenèse. La néoangiogenèse est un processus essentiel et bien connu dans le développement, la progression et l'apparition de métastases dans les cancers solides. La néoangiogenèse est également observée dans de nombreuses hémopathies comme le myélome multiple, les syndromes myélodysplasiques, les leucémies aiguës et les NMPs. La densité en microvaisseaux de la moelle osseuse peut être estimée par mesures morphométriques quantitatives ou par immuno-histochimie par différents marqueurs des cellules endothéliales, notamment le CD34 et le CD105, ce dernier étant préférentiellement exprimé par les micro-vaisseaux nouvellement formés²²⁴. Dans les NMPs classiques, la densité en micro-vaisseaux est augmentée par rapport à des sujets sains^{225,226}. Au sein des NPMs classiques, cette augmentation est plus fréquente et plus marquée dans la myélofibrose primitive que dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocythémie essentielle²²⁷⁻²²⁹, ce qui pourrait être corrélé avec la charge allélique JAK2V617F²³⁰. Un taux élevé de progéniteurs des cellules endothéliales circulants a été retrouvé chez les patients atteints de myélofibrose primitive à un stade peu évolué, pouvant contribuer à cette néoangiogenèse^{231,232}. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré des taux élevés de VEGF et de bFGF plasmatiques dans la myélofibrose primitive^{233,234} ainsi que de cytokines stimulant indirectement l'angiogenèse²³⁵. Dans la moelle osseuse, l'analyse histologique retrouve une expression locale du VEGF élevée, parfois localisée au niveau des mégacaryocytes^{236,237}. L'origine mégacaryocytaire du VEGF est également soutenue par la corrélation entre la densité en microvaisseaux et l'abondance des mégacaryocytes regroupés en clusters dans la moelle osseuse chez les patients atteints de myélofibrose primitive²³⁸ ainsi que par la densité en microvaisseaux dans les modèles murins TPO^{high} et GATA-1^{low}, dans lesquels le mégacaryocyte joue un rôle prépondérant.

1.2.3 L'inflammation

1.2.3.1 Inflammation et néoplasmes myéloprolifératifs

Les néoplasmes myéloprolifératifs et plus particulièrement la myélofibrose primitive s'accompagnent d'une inflammation chronique liée au relargage continu de cytokines par les cellules hématopoïétiques activées. Les conséquences cliniques de cette inflammation sont nombreuses. Elle est en partie responsable des symptômes constitutionnels tels que les sueurs nocturnes, la fièvre et la perte de poids qui affectent la qualité de vie des patients. Elle favorise également une athérosclérose prématurée responsable d'événements vasculaires, et une dérégulation de l'immunité avec perte de la veille immunitaire anti-tumorale, jouant un rôle dans l'évolution clonale des NMPs et augmentant le risque de second cancer^{239,240}. Sur le plan biologique, l'hyperleucocytose et la thrombocytose sont la conséquence de la myéloprolifération mais pourraient résulter également de la stimulation de l'hématopoïèse par l'inflammation. L'état inflammatoire est responsable de l'élévation plasmatique de

protéines de l'inflammation non spécifiques comme la pentraxine 3 ou comme la protéine C-réactive (CRP pour *C-reactive protein*) Un taux élevé de CRP a été associé à un phénotype plus agressif de la maladie²⁴¹⁻²⁴³, ainsi qu'à un risque plus élevé de thrombose artérielle et veineuse²⁴⁴. A l'inverse, un taux élevé de pentraxine 3 semble avoir un effet protecteur. Les JAKs sont largement impliqués dans la régulation de l'inflammation, et l'efficacité des inhibiteurs non spécifiques de JAK comme le ruxolitinib tant sur les symptômes constitutionnels que sur la diminution des cytokines pro-inflammatoires plasmatiques^{245,246} est un argument de plus confirmant l'état inflammatoire chronique des patients atteints de NMPs. Le lien entre inflammation et NMP est complexe, l'inflammation chronique est le plus souvent considérée comme la conséquence du développement d'un clone malin, cependant, l'état inflammatoire modifie le microenvironnement et participe au développement de la fibrose médullaire et de l'hématopoïèse extra-médullaire^{179,247}. Il favorise également le développement de l'hématopoïèse pathologique^{240,248,249}. Le clone hématopoïétique malin est le principal responsable de la sécrétion inappropriée de cytokines, comme le démontre le fait que l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques permet non seulement de restaurer une hématopoïèse normale mais aussi de reverser la fibrose médullaire. Cependant, le clone malin est aussi responsable d'une sécrétion paracrine de cytokines pro-inflammatoires par différentes cellules normales présentes dans le microenvironnement tumoral^{250,251}. Il a été montré que les cellules du microenvironnement médullaire sécrètent des cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'oncostatine M produite par le clone malin JAK2V617F²⁵². De même, les cellules hématopoïétiques normales sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et l'inhibition de la voie JAK-STAT est requise dans les cellules hématopoïétiques normales et dans les cellules hématopoïétiques pathologiques afin de réduire la signalisation inflammatoire²⁵³. Par ailleurs, l'inflammation chronique peut précéder et favoriser l'émergence du clone pathologique. Actuellement, le lien entre inflammation et cancer est reconnu, notamment grâce aux études épidémiologiques qui ont montré que l'inflammation chronique est un facteur de risque majeur dans le développement des cancers et que les voies de signalisation de l'inflammation sont utilisées par les cellules tumorales^{254,255}. Plusieurs arguments plaident en faveur du rôle de l'inflammation chronique dans l'initiation des NMPs. Dans une large étude clinique rétrospective, il a été montré que les patients atteints de pathologies auto-immunes et inflammatoires comme la maladie de Crohn, l'artérite à cellules géante ou le syndrome de Reiter ont un risque de développer un néoplasme myéloprolifératif plus important que des sujets contrôles²⁵⁶. Dans les modèles murins, l'injection répétée de lipopolysaccharide (LPS) est responsable d'une inflammation chronique qui induit des modifications de la cellule souche hématopoïétique avec notamment une perte du potentiel de repopulation lymphoïde alors que le potentiel de repopulation myéloïde persiste après transplantation sériée²⁵⁷. De plus, chez la souris, la diminution d'un micro-ARN impliqué dans la régulation négative des cytokines inflammatoires, le miR-146a, entraîne une myéloprolifération liée à une augmentation de la transcription via la voie NF- κ B²⁵⁸. L'inflammation chronique induit également

la production d'un excès de ROS, responsable de cassures double-brin au niveau de l'ADN, conduisant à l'évolution des néoplasmes myéloprolifératifs^{259,260} et l'inhibition des ROS *in vivo* dans le modèle murin de NMP JAK2V617F prévient la myéloprolifération²⁶¹. L'inflammation chronique apparaît donc comme une composante essentielle des NMPs en favorisant l'émergence et la persistance du clone hématopoïétique malin, ainsi qu'en induisant le remodelage du microenvironnement. Certains auteurs ont fait émerger le concept de NMP comme un modèle humain d'inflammation et de développement des cancers^{240,259,262}.

1.2.3.2 Principales cytokines inflammatoires impliquées dans la myélofibrose primitive

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'élévation de cytokines et chimiokines impliquées dans l'inflammation dans le plasma ou le sérum de patients atteints de NMPs et dans les modèles murins de NMPs. Si les premiers travaux s'intéressaient à quelques cytokines particulières comme l'IL6, l'IL2 et son récepteur soluble ou le TNF α ^{235,263}, l'évolution des techniques a permis de doser de larges panels de cytokines ou de molécules apparentées. En 2011, un travail de Tefferi *et al.*, basé sur la technologie multiplex qui utilise des nanobilles magnétiques couplées à la cytométrie en flux, a permis d'évaluer le taux de 30 cytokines dans le plasma de 127 patients atteints de myélofibrose primitive et de 35 sujets sains. Cette étude a confirmé la dérégulation déjà décrite de l'expression des cytokines comme l'IL6, l'IL2, l'IL8 mais a également mis en évidence l'augmentation de l'IL10, de l'IL12 ou encore de l'IL15 ainsi que la dérégulation de nombreux facteurs de croissance comme le G-CSF ou le VEGF²⁶⁴. En utilisant la même technologie, Vaidya *et al.* ont étudié le profil cytokinique d'une cohorte de 65 patients atteints de polyglobulie de Vaquez et ont comparé les résultats à ceux obtenus dans la cohorte des 127 patients atteints de myélofibrose primitive et à ceux des 35 sujets sains. Comparés aux sujets sains, les taux plasmatiques de nombreuses cytokines inflammatoires comme l'IL1RA, l'IL6, l'IL8 sont plus élevés chez les patients atteints de polyglobulie de Vaquez. Cependant le profil cytokinique diffère de celui des patients atteints de myélofibrose primitive décrit par Tefferi²⁶⁵. Une étude utilisant également la technologie multiplex a dosé les taux plasmatiques de 13 cytokines chez 17 patients atteints de polyglobulie de Vaquez et chez 21 patients atteints de thrombocythémie essentielle. Les résultats montrent que les profils cytokiniques sont pro-inflammatoires mais différents en fonction du type de NMP²⁶⁶. L'inflammation ne provenant pas exclusivement du clone malin, une étude s'est intéressée aux taux d'IL22, d'IL23 et d'IL10, classiquement considérées comme liées à l'activation des lymphocytes T helper, chez des patients atteints de polyglobulie de Vaquez et de thrombocythémie essentielle. Les résultats montrent une élévation de l'IL23 chez les patients atteints de polyglobulie de Vaquez comparés à des sujets sains, mais cette élévation n'est pas retrouvée chez les patients atteints de thrombocythémie essentielle²⁶⁷. Une étude comparant les lymphocytes T régulateurs et les lymphocytes T helper de 17 des patients atteints de myélofibrose primitive à ceux de sujets sains, n'a

pas montré de différence entre les patients mais suggère que les lymphocytes T régulateurs seraient la principale source de production du récepteur soluble à l'IL2 α , cytokine dérégulée dans la myélofibrose primitive²⁶⁸. Ces différentes études indiquent que la dérégulation des cytokines impliquées dans l'inflammation est présente dans tous les NMPs non BCR-ABL, cependant les profils cytokiniques mis en évidence sont différents et il ne semble pas exister de continuum entre les maladies ni de profil spécifique de chaque NMP²⁶⁹. Dans la myélofibrose primitive, des expériences sur cellule unique ont montré une augmentation du nombre de cytokines secrétées par cellule *in vivo* et dans les cellules primaires de patients et ont également mis en évidence une grande hétérogénéité dans les profils de sécrétion de cytokines²⁵³.

Dans les modèles murins de NMP, une dérégulation des cytokines inflammatoires est également mise en évidence. Une étude de 2010 s'intéressant à l'effet thérapeutique du ruxolitinib, a montré que les taux plasmatiques d'IL6 et de TNF α dosés par technique ELISA dans un modèle murin de polyglobulie de Vaquez, obtenu par injection de cellules Ba/F3 portant la mutation JAK2V617F, étaient supérieurs chez les animaux non traités, comparés aux animaux traités et aux animaux contrôles non atteints de NMP²⁵⁰. La technologie multiplex a permis de montrer une élévation plasmatique de 13 cytokines et chémokines inflammatoires, les interleukines IL1 β , IL3, IL4, IL6, IL9, IL17, l'IP10, le LIF, le MCP-1, CXCL9 (MIG), le VEGF, le TNF α et l'IFN γ dans un modèle murin de polyglobulie de Vaquez avec myélofibrose secondaire²⁷⁰. Cependant, de même que chez l'être humain, il n'existe pas à ce jour de profil cytokinique bien défini.

1.2.3.3 Voies de signalisation NF- κ B dans la myélofibrose primitive

La voie NF- κ B est un médiateur clé de la cancérogénèse induite par l'inflammation²⁷¹ et depuis près de vingt ans, NF- κ B a été identifié comme un acteur du développement des néoplasmes myéloprolifératifs et plus spécifiquement de la myélofibrose primitive. En 2000, Rameshwar *et al.*, ont montré que les monocytes de patients atteints de myélofibrose primitive présentaient une activation spontanée de la voie NF- κ B responsable d'une production d'IL1 elle-même responsable d'une production autocrine de TGF- β 1²⁷². Par la suite, il a été démontré que la voie NF- κ B est également activée dans d'autres types cellulaires chez les patients atteints de myélofibrose primitive, notamment dans les cellules CD34+ circulantes et les mégacaryocytes dérivés des cellules CD34+ et ayant une pousse spontanée²⁷³. Dans cette étude, l'inactivation de la voie NF- κ B entraîne également une diminution de la sécrétion du TGF- β 1 par les mégacaryocytes. Dans le modèle murin de myélofibrose TPO^{high}, un traitement par le bortézomib, inhibiteur du protéasome, inhibe l'activation de NF- κ B et diminue les taux d'IL1 α plasmatiques²⁷⁴. Plus récemment, Wang *et al.* ont montré le rôle du miR-155, un microARN impliqué dans la régulation de l'inflammation dont l'expression forcée induit une myéloprolifération²⁷⁵. La régulation positive du miR-155 dans les cellules stromales et endothéliales de la moelle osseuse induit l'activation de NF- κ B, et augmente la production de cytokines pro-

inflammatoires alors que la délétion du miR-155 dans le stroma médullaire conduit à l'abrogation de la myéloprolifération et de l'inflammation *in vivo*²⁷⁶. Par ailleurs, il a été montré par cytométrie de masse à l'échelle unicellulaire que la voie NF-κB est activée dans les cellules primaires de patients atteints de myélofibrose primitive, via une signalisation autonome en aval de JAK2 et via une signalisation non autonome, par stimulation cytokinique²⁷⁷. *In vivo*, Kleppe *et al.* ont montré par des expériences de transplantation de moelle osseuse dans le modèle MPLW515 que l'activation de la voie NF-κB est retrouvée dans les cellules hématopoïétiques mutées et dans les cellules hématopoïétiques non mutées. Dans cette même étude, il a été montré *in vitro* que la signalisation aberrante via JAK2 conduit à des modifications de la chromatine qui vont promouvoir la voie NF-κB²⁷⁸.

1.2.3.4 Rôle du TGF-β1 dans l'inflammation

Outre son rôle dans le remodelage du microenvironnement médullaire, le TGF-β1 a également un rôle dans l'établissement d'un contexte pro-inflammatoire. Les expériences d'inactivation du *Tgf-β1* chez la souris montrent que les souriceaux homozygotes décèdent 20 jours après la naissance dans un état cachectique en rapport avec l'installation brutale d'un syndrome inflammatoire aigu. Il n'est pas noté d'anomalies du développement organique chez ces animaux mais les analyses histologiques montrent une nécrose tissulaire multifocale et une inflammation traduite par l'infiltration des organes tels que le cœur, les poumons ou l'estomac par des plasmocytes, des lymphocytes B et T et des macrophages ainsi que des manifestations d'auto-immunité^{279,280}. Le rôle du TGF-β1 est dépendant du tissu et du contexte, des actions pro et anti-inflammatoires sont décrites avec cette même cytokine. Son rôle a été largement étudié dans diverses pathologies inflammatoires d'organe. Par exemple, sa dérégulation dans les lymphocytes T et les cellules dendritiques de l'intestin résulte en une colite inflammatoire chez la souris mimant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin humaines²⁸¹.

1.3 Chapitre 3 : PPAR γ

1.3.1 Généralités sur les PPARs

Les PPARs, récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes ou *peroxisome proliferator activated receptor* en anglais, sont ainsi nommés du fait de leur capacité à activer la prolifération des peroxysomes chez le rongeur. Les peroxysomes sont des organites des cellules eucaryotes et sont le siège de réaction de détoxification. Ce sont des facteurs de transcription qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones, initialement classés dans les récepteurs orphelins, c'est-à-dire sans ligand endogène identifié. Trois sous-types de PPARs ont été identifiés et nommés PPAR α , β et γ . PPAR α a été découvert chez les rongeurs en 1990²⁸² puis deux isotypes supplémentaires PPAR β et PPAR γ ont été isolés chez le Xénope²⁸³. Chez les mammifères, la séquence de PPAR β n'était pas hautement homologue à celle du Xénope et a été nommé PPAR δ . Cependant PPAR δ est l'orthologue de PPAR β et le récepteur est depuis nommé PPAR β/δ . Chaque isotype, α , β/δ et γ , est codé par un gène distinct nommé respectivement *NR1C1*, *NR1C2* et *NR1C3*. *NR1C3* est également appelé *PPARG*. Chez l'être humain, les isotypes α , β/δ et γ sont localisés respectivement au niveau des chromosomes 22 (région 22q12-q13.1), 6 (région 6p21.1-p21.2) et 3 (région 3p25)²⁸⁴⁻²⁸⁶. La distribution des isotypes n'est pas homogène au sein de l'organisme. Le récepteur PPAR α est principalement exprimé au niveau du foie, des reins et du tissu adipeux. Le récepteur β/δ est ubiquitaire. Le récepteur PPAR γ est principalement exprimé au niveau du tissu adipeux, mais également dans d'autres tissus tels que le colon, le système immunitaire et les cellules musculaires lisses de l'aorte. Chez l'être humain, il existe deux isoformes de la protéine PPAR γ : PPAR γ 1 et PPAR γ 2. Initialement, ces deux isoformes ont été mise en évidence en criblant une banque d'ADN complémentaire de moelle osseuse humaine²⁸⁶. Ces isoformes résultent de l'utilisation de promoteurs alternatifs conduisant à la transcription de quatre ARN messagers. Les transcrits hPPAR γ 1, 3 et 4 codent pour la même protéine PPAR γ 1, alors que le transcrit hPPAR γ 2 code pour une protéine plus longue de 28 acides aminés PPAR γ 2²⁸⁷. L'isoforme PPAR γ 1 est principalement exprimée dans l'intestin et le tissu adipeux et plus faiblement dans les reins, le foie et l'intestin grêle. L'isoforme PPAR γ 2 est surtout exprimée dans le tissu adipeux et le foie²⁸⁸. Dans le tissu hématopoïétique, les deux isoformes de PPAR γ sont exprimées.

Dans cette partie, nous développerons la structure, la fonction et les ligands de PPAR γ . Nous décrirons succinctement les différents rôles connus de PPAR γ et nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle potentiel de PPAR γ dans la myéloprolifération, dans l'inflammation et dans la fibrose, composantes majeures de la physiopathologie de la myélofibrose primitive.

1.3.1.1 Structure du récepteur nucléaire PPAR γ

Les gènes des PPARs sont caractérisés par une organisation commune des ORFs (*Open Reading Frame*) qui sont composées de six exons codants. Le premier exon code pour les domaines A/B. Les deuxième et troisième exons codent pour le domaine C de fixation à l'ADN, chacun d'eux codant pour un des deux doigts de zinc de ce domaine. Le quatrième exon code la région charnière D du récepteur. Les cinquième et sixième exons codent pour les domaines E/F de liaison au ligand²⁸⁹ (**Figure 12, A**).

Les domaines A/B : Ces domaines sont situés dans la partie N-terminale et contiennent une séquence appelée AF-1 (*activating fonction-1*) impliquée dans la transactivation du récepteur de manière indépendante du ligand²⁹⁰. Ces domaines peuvent être phosphorylés ce qui permet de moduler l'activité transcriptionnelle de PPAR γ . Des sites de phosphorylations spécifiques aux MAP kinases et aux ERK/JNK ont été identifiés²⁸⁹.

Le domaine C : Le domaine C est le mieux conservé, il correspond au domaine de liaison à l'ADN ou DBD (*DNA binding domain*) et compte environ 65 acides aminés. Il est composé de deux structures en doigt de zinc. Chacune est stabilisée par un atome de zinc lié à quatre cystéines conservées. Deux boîtes conservées ont été identifiées. La première est une hélice α , appelée boîte P, située dans la partie C-terminale du premier doigt de zinc. Sa séquence (CEGCKG) détermine l'affinité du récepteur pour son élément de réponse sur l'ADN. La seconde est également une hélice α appelée boîte D. Elle est impliquée dans la dimérisation des récepteurs. Il a aussi été décrit que le domaine de liaison à l'ADN possède, à l'extrémité C-terminale des doigts de zinc, une extension CTE (*C-terminal extension*). Cette séquence attribue à PPAR une forte affinité pour son élément de réponse puisqu'elle reconnaît spécifiquement son extrémité 5'²⁹¹.

Le domaine D : Le domaine D est une région charnière conférant une flexibilité au récepteur. Il pourrait également interagir avec des régulateurs. Une séquence de localisation nucléaire (NLS) est retrouvée à la jonction des domaines D et C et est démasquée lorsque le récepteur est activé. Cette séquence a été identifiée pour le récepteur PPAR α ²⁹² mais pas pour PPAR γ .

Les domaines E/F : Ils contiennent le domaine de liaison au ligand ou LBD (*ligand binding domain*). L'analyse de la structure du LBD par cristallographie montre que la structure tertiaire du LBD est composé de 12 hélices α organisées en trois couches antiparallèles et d'un feuillet β à quatre brins. La cavité est majoritairement de nature hydrophobe, en accord avec le type de ligands naturels qui s'y fixent : acides gras polyinsaturés et prostaglandines. Le rôle de l'hélice H12 est central dans l'activation du récepteur. Elle contient la seconde séquence de transactivation appelée AF-2 (*activating fonction-2*). Lors de la fixation d'un agoniste, cette hélice effectue un basculement qui conduit au démasquage du site de fixation des co-activateurs. La fixation de l'agoniste permet également la stabilisation dans une conformation active. La poche de liaison au ligand est de grande taille, et les

ligands occupent seulement 30 à 40% de la cavité^{293,294}. De nombreux ligands agonistes totaux, partiels ou antagonistes ont été co-cristallisés avec PPAR γ et leur position dans la poche de liaison au ligand a été modélisée. Le mode de fixation va déterminer les modifications de la poche de liaison et l'action spécifique de chaque ligand²⁹⁵⁻²⁹⁷. Les domaines E/F sont également impliqués dans la dimérisation avec le récepteur à l'acide rétinoïque RXR (*retinoid X receptor* ou *9-cis retinoic acid receptor*) qui se situe à l'interface avec les hélices H10/H11²⁹⁸ (**Figure 12, B**).

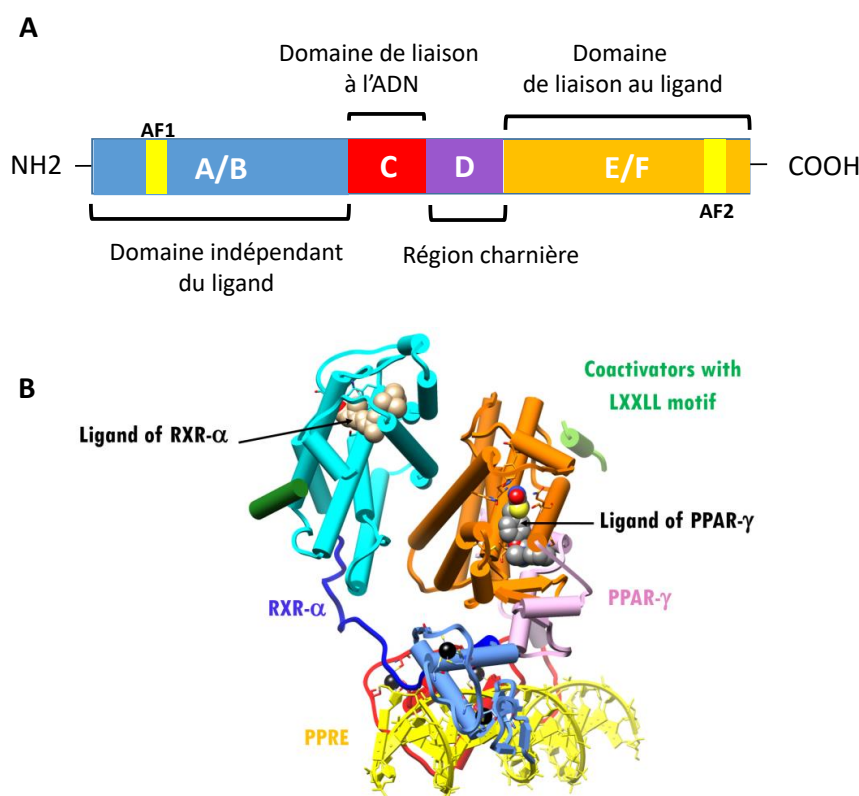


Figure 12 : Structure du récepteur nucléaire PPAR γ .

A) Organisation fonctionnelle de PPAR γ . B) Structure cristallographique du complexe actif PPAR γ -RXR α -PPRE. En bleu turquoise : domaine de liaison au ligand de RXR. En bleu foncé : région charnière de RXR. En bleu clair : domaine de liaison à l'ADN de RXR. En orange : domaine de liaison au ligand de PPAR γ . En rose : région charnière de PPAR γ . En rouge : domaine de liaison à l'ADN de PPAR γ . En vert : co-activateurs. En jaune : segment d'ADN correspondant au PPRE (PPAR responding element). D'après la *protein data bank* <https://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/thiazolidinedione/ppar-gamma>.

1.3.1.2 Mécanisme d'action de PPAR γ

1.3.1.2.1 Activité transcriptionnelle

PPAR γ est activé par liaison à son ligand, comme tous les PPARs. PPAR γ activé forme un hétérodimère avec l'un des trois sous-types du récepteur à l'acide rétinoïque RXR lui-même couplé à son ligand : l'acide rétinoïque^{299,300}. L'hétérodimère PPAR γ /RXR se fixe à l'élément de réponse aux PPAR ou PPRE (*peroxysome proliferator response element*), situé en 5' dans la région contenant les promoteurs des gènes cibles des PPAR. Les séquences PPRE sont de type DR1 (*direct repeat 1*) et

sont constituées de deux séquences hexanucléotidiques de même sens (AGGTCA) séparées par un nucléotide aléatoire (n) : 5'AGGTCA n AGGTCA 3'. Il peut également exister des séquences allant de DR2 à DR6, dans lesquelles les deux séquences hexanucléotidiques sont séparées par plusieurs nucléotides aléatoires (de 2 à 6 selon la séquence PPRE). PPAR γ et RXR se fixent respectivement sur les parties 5' et 3' des demi-sites.

Lorsque que PPAR γ n'est pas lié à son ligand, son activité transcriptionnelle est réprimée par l'interaction avec des protéines agissant comme co-répresseurs. Les co-répresseurs se lient généralement au niveau des domaines C- et N-terminaux des récepteurs. Parmi les plus importants, on peut citer NCoR (*nuclear receptor corepressor*) et SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*). Ces co-répresseurs agissent en recrutant des facteurs impliqués dans la déacétylation des histones nommées HDAC (histone déacetylase), qui permettent de maintenir la chromatine dans un état condensé. Certains de ces co-répresseurs peuvent également s'associer pour former un complexe de répression. En présence de ligands, une autre classe de co-répresseurs peut agir. Ils contiennent un motif qui permet normalement aux co-activateurs de se fixer à PPAR γ , ils agissent ainsi par compétition avec les co-activateurs et recrutent à leur tour des HDAC.

La liaison du ligand au récepteur PPAR entraîne la dissociation du complexe co-répresseur et l'interaction avec le PPRE. La fixation au PPRE est suivie par le recrutement de protéines co-activatrices nécessaires à l'activité transcriptionnelle de PPAR γ (**Figure 13**). Ces co-activateurs vont permettre un remodelage de la chromatine facilitant l'accès aux différents composants de la machinerie transcriptionnelle. De nombreux co-activateurs sont décrits et peuvent être classés en plusieurs groupes :

- Les protéines modifiant les histones par acétylation, méthylation, phosphorylation ubiquitination : ce groupe comprend par exemple la famille des SRC (*steroids receptor co-activator*). Cependant l'activité histone acétyltransférase (HAT) des SRC est faible, et ces co-activateurs agissent en recrutant d'autres protéines à activité histone acétyltransférase comme le co-activateur CBP/p300.
- Les protéines interagissant avec la machinerie de transcription : protéines TRAP (*thyroid hormone receptor associated protein*) et DRIP (*vitamin D receptor interacting protein*). Elles ne possèdent pas d'activité enzymatique mais elles favorisent le recrutement de composantes de la machinerie de transcription au niveau du promoteur, comme l'ARN polymérase.
- Les protéines de l'ensemble SWI/SNF (*SWItch/sucrose nonfermentable*) qui produisent un remodelage de la chromatine de façon ATP-dépendante.

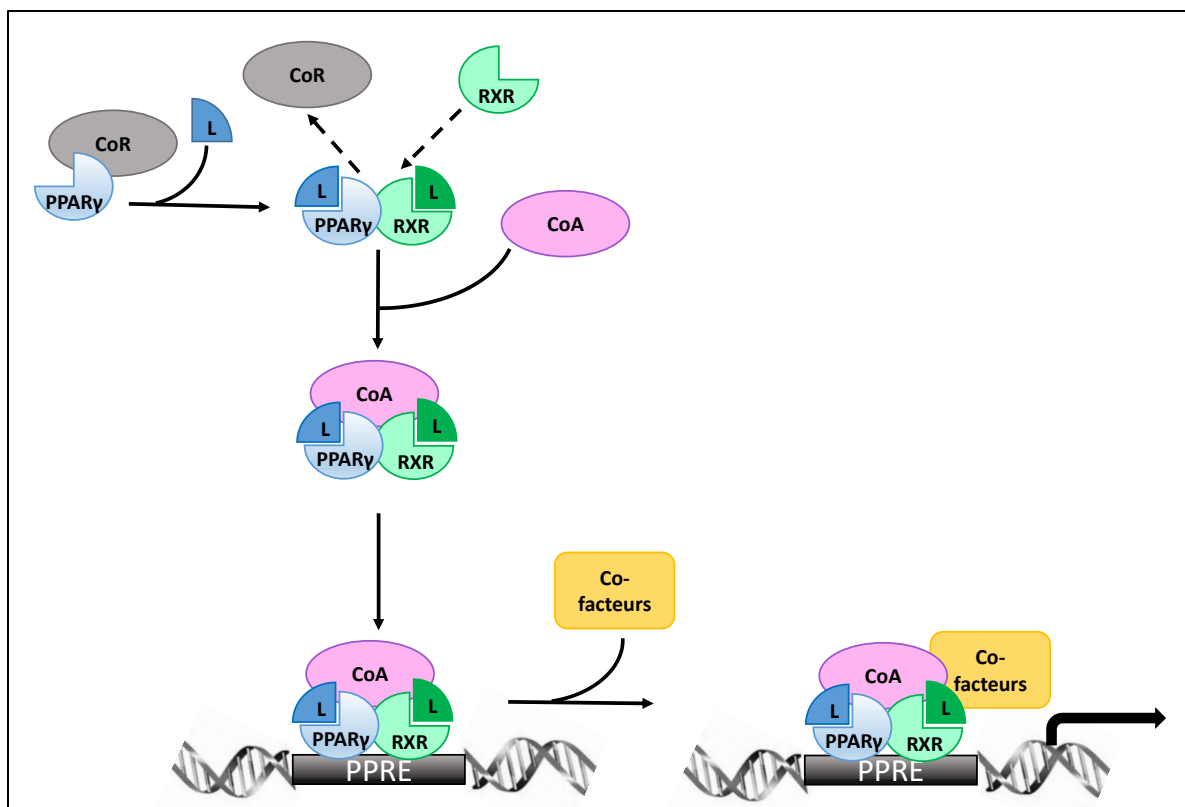


Figure 13 : Mécanisme d'action de PPAR γ .

PPAR est lié à des co-répresseurs (CoR) en l'absence de ligand. Lorsque le ligand (L) se lie à PPAR γ , le co-répresseur est libéré et PPAR γ se lie au récepteur à l'acide rétinoïque (RXR) lui-même lié à son ligand. L'hétérodimère PPAR γ -RXR recrute des co-activateurs (CoA). La fixation à l'élément de réponse des PPARs (PPRE) est suivie du recrutement d'autres co-facteurs de transcription (co-facteurs) permettant la transcription des gènes cibles de PPAR γ .

PPAR γ peut également avoir un rôle de répression de la transcription par différents mécanismes. D'abord par la séquestration des co-activateurs communs à plusieurs facteurs de transcription tels que CBP/p300, présents en quantité limitée dans la cellule. L'utilisation de ces co-facteurs par l'hétérodimère PPAR γ -RXR les rend indisponibles pour les autres voies³⁰¹. PPAR γ -RXR est également capable de former des complexes avec d'autres facteurs de transcription activés entraînant une inhibition croisée. Les interactions protéines-protéines sont décrites entre PPAR γ et NF- κ B par exemple : PPAR γ interagit avec la sous-unité p65 de NF- κ B, entraînant son ubiquitination et sa dégradation³⁰². Enfin, PPAR γ -RXR peut inhiber la phosphorylation et l'activation de certains acteurs de la cascade des MAP kinases tels que JNK ou p38MAPK³⁰³.

1.3.1.2.2 Régulation post-traductionnelle

La phosphorylation de PPAR est largement médiée par les ERK et les MAPK et régule négativement son activation³⁰⁴. Par exemple, la phosphorylation de PPAR γ sur un résidu sérine 112 de la région NH2 terminale va gêner la communication entre les domaines A/B et LBD conduisant à une perte d'affinité pour les ligands tels que les thiazolidinediones et à une diminution de son activité³⁰⁵.

Il a également été montré que la phosphorylation de PPAR γ par les ERK induit la dégradation protéasome-dépendante du récepteur dans des cellules cancéreuses de colon sous l'action de l'EGF (*epidermal growth factor*)³⁰⁶. Enfin, il a été observé que les MAPK et MEK (MAPK/ERK Kinase) peuvent interagir avec PPAR γ et provoquer son exportation nucléaire³⁰⁷.

L'activité de PPAR γ est également régulée par ubiquitination et SUMOylation. L'ubiquitine, ajoutée par une enzyme à activité ubiquitine ligase, conduit à la dégradation du récepteur par le protéasome. L'ubiquitination est généralement ligand-dépendante, et, dans le cas de PPAR γ , le co-activateur p300 est, par exemple, un régulateur connu possédant cette activité ubiquitine ligase. La SUMOylation permet de réguler l'activité transcriptionnelle sans entraîner la dégradation du récepteur. La SUMOylation est l'ajout de la protéine SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) et régule différents mécanismes comme la stabilité des protéines, la translocation nucléaire et la transcription³⁰⁸. La SUMOylation affecte la stabilité et l'activité transcriptionnelle du récepteur PPAR γ mais pas sa localisation nucléaire³⁰⁹. La protéine SUMO-1 se lie de manière covalente à PPAR γ sous l'effet de l'activité enzymatique de PIAS-1. Ce PPAR γ SUMOylé interagit directement avec des co-répresseurs tels que NCoR et HDAC3 présents sur les promoteurs cibles, empêchant leur ubiquitination et ainsi leur dégradation par le protéasome. Le complexe co-répresseur ne pouvant être décroché du promoteur, le complexe co-activateur ne pourra pas venir se fixer et permettre la transcription du gène. Ce mécanisme a été décrit dans l'inhibition des gènes pro-inflammatoires par PPAR γ ³¹⁰.

1.3.1.3 Les ligands de PPAR γ

1.3.1.3.1 Ligands physiologiques

Les ligands de PPAR γ sont principalement des acides gras à longue chaîne qui se fixent et activent les PPARs avec une certaine spécificité. Les PPARs sont capables de fixer un grand nombre de ligands avec une affinité relativement faible par rapport à d'autres types de récepteurs hormonaux²⁸⁹. Les PPARs sont qualifiés de senseurs par leur capacité à adapter l'expression de leurs gènes cibles en fonction du type et de la concentration du ligand. Certains ligands sont fixés plus spécifiquement par les isotypes α , β/δ et γ des récepteurs PPARs. Les acides gras à chaîne longue, et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés comme les acides arachidonique et linoléique sont les ligands naturels des PPARs³¹¹. L'acide arachidonique est un acide gras incorporé dans la membrane cellulaire sous forme de phospholipides, il est libéré de la membrane par l'enzyme phospholipase A2. L'acide arachidonique peut être dégradé par deux voies enzymatiques : la voie des cyclooxygénases et la voie des lipooxygénases menant à la formation d'écosanoïdes de deux types : les prostanoïdes et les leucotriènes respectivement. L'ensemble de ces dérivés peut activer les PPARs. Parmi les prostanoïdes, les prostaglandines des séries A, D, J sont des ligands puissants des différents isotypes

du récepteur PPAR lorsqu'elles sont utilisées à forte concentration. Certains de ces ligands sont spécifiques telle que la 15-désoxy- Δ 12, 14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2), activateur de PPAR γ . L'affinité de ces ligands est relativement basse^{312,313}. Toutefois, malgré le grand nombre de travaux dans lesquels la 15d-PGJ2 est considérée comme un ligand de référence de PPAR γ , certains auteurs doutent de sa spécificité ainsi que de son rôle réel aux concentrations physiologiques³¹⁴. Les dérivés de l'acide linoléique, 9(S)- et 13(S) acidhydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE et 13-HODE) provenant de la métabolisation de l'acide linoléique par la voie des lipooxygénases, sont également des activateurs endogènes des PPARs et notamment de PPAR γ ³¹⁵. Ce sont par ailleurs des LDL (*low density lipoprotein*) oxydées jouant un rôle dans le développement de l'athérosclérose. L'acide lysophosphatidique est également un puissant activateur de PPAR γ ³¹⁶. Un acide gras saturé, l'acide phytanique apporté par l'alimentation, a aussi été rapporté comme étant un ligand de PPAR γ ³¹⁷.

1.3.1.3.2 Ligands de synthèse

1.3.1.3.2.1 Les thiazolidinediones

Comme nous le verrons au chapitre 1.3.1.4.1, PPAR γ est impliqué dans le métabolisme des lipides et l'homéostasie du glucose. Les thiazolidinediones (TZDs) ou glitazones sont des agonistes du récepteur PPAR γ qui ont été découvertes en recherchant des analogues du gemfibrozil, un fibrat ayant des effets hypolipémiants, antioxydant et hypoglycémiant. Il a été rapidement mis en évidence que les TZDs augmentaient la différenciation adipocytaire ce qui a permis de découvrir que ces molécules étaient des agonistes de PPAR γ . La première TZD développée, la ciglitazone, a montré une activité anti-diabétique et permettait de diminuer la résistance à l'insuline dans les modèles animaux³¹⁸. D'autres TZDs ont ensuite été développées comme la rosiglitazone, la troglitazone et la pioglitazone. L'affinité entre le récepteur PPAR γ et les TZDs est grande³¹⁹ cependant chaque TZD possède une affinité différente pour le site de liaison au ligand de PPAR γ . Le changement de conformation tridimensionnelle du complexe PPAR γ /ligand est par conséquent variable selon chaque molécule. Ces différentes conformations aboutissent au recrutement de co-facteurs distincts et entraînent donc une régulation transcriptionnelle particulière pour chaque complexe³²⁰. Les TZDs ont été utilisées avec succès chez les patients diabétiques de type 2 seule ou en association à d'autres anti-diabétiques. Cependant, la troglitazone a été retirée du marché dès 2007 suite à des effets indésirables hépatiques sévères. L'utilisation de la rosiglitazone a ensuite été suspendue en 2010 en France en raison d'effets cardiovasculaires. Enfin, la pioglitazone a été retirée du marché en 2011 devant la constatation d'une augmentation du risque de cancer de la vessie chez les patients traités. Ce surrisque de cancer de la vessie a été réfuté par d'autres études et plusieurs méta-analyses montrent des résultats discordants³²¹⁻³²⁴. Bien que la molécule soit à nouveau disponible dans de nombreux pays, la pioglitazone n'est plus commercialisée en France. D'autres effets secondaires communs aux TZDs sont décrits, notamment la prise de poids, la rétention hydrosodée ou bien l'ostéopénie.

1.3.1.3.2.2 Les modulateurs sélectifs des PPARs : les SPPARMs

Des ligands plus sélectifs de PPAR γ sont en cours de développement afin de réduire les effets secondaires observés avec les TZDs. Ces ligands sont souvent nommés modulateurs sélectifs des PPARs ou SPPARMs (*selective PPAR modulators*). Par exemple, il a été montré dans un modèle de souris résistantes à l'insuline que le composé SR1664 possède une mode de liaison unique à PPAR γ , totalement dépourvu de l'effet agoniste transcriptionnel classique des ligands de PPAR γ . *In vivo*, le SR1664 a une activité anti-diabétique mais n'entraîne pas de rétention hydrosodée ni de prise de poids. *In vitro*, le SR1664 n'interfère pas avec la formation osseuse³²⁵. Les ligands de PPAR γ pouvant être des agonistes de faible ou de forte affinité en fonction du type cellulaire, recrutant des co-facteurs spécifiques différents, des différences structurales mineures entre les ligands pourraient résulter en une meilleure séparation de l'efficacité par rapport aux effets secondaires³²⁶.

1.3.1.3.2.3 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

L'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), composé actif des dérivés salicylés comme la sulfasalazine ou la mésalazine, est utilisé depuis de nombreuses années dans la prise en charge de maladies inflammatoires telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique). Dans un modèle murin de colite, le traitement des animaux par 5-ASA est bénéfique chez les souris sauvages mais pas chez les souris haplo-insuffisantes pour PPAR γ . *In vitro*, le 5-ASA augmente l'expression de PPAR γ , favorise sa translocation du cytoplasme vers le noyau et induit son changement de conformation et le recrutement de co-facteurs activateurs, démontrant que le 5-ASA est un ligand de PPAR γ ³²⁷.

D'autres AINS sont des ligands de PPAR γ . Il a été montré par cristallographie aux rayons X que le sulfure de sulindac, le diclofenac, l'indométhacine et l'ibuprofène se lient à PPAR γ et agissent comme des agonistes partiels puissants de PPAR γ . Il a également été montré que la régulation des gènes cibles de PPAR γ par ces molécules est dépendante du mode de liaison de l'agoniste³²⁸.

1.3.1.3.2.4 Les dérivés des triterpénoïdes

Les triterpénoïdes appartiennent à une famille de molécules synthétisées par les plantes. Certains triterpénoïdes tels que les acides oléanolique et ursolique sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires et anticarcinogéniques. Des dérivés synthétiques de ces triterpénoïdes ont été synthétisés dont le plus efficace est le CDDO (acide 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oïque), dérivé de l'acide oléanolique. Ce dérivé, capable d'activer le récepteur PPAR γ , montre une activité anti-proliférative, anti-inflammatoire et induit la différenciation cellulaire³²⁹.

1.3.1.3.2.5 Les co-agonistes et les pan-agonistes

Les co-agonistes sont des molécules agissant à la fois comme ligands de PPAR γ et comme ligands de PPAR α ou de PPAR β/δ . Les co-agonistes α/γ de synthèse sont nommés glitazar et cherchent à associer l'effet de régulation du glucose liée à l'activation de PPAR γ à l'effet hypolipidémiant de l'activation de PPAR α . En dehors des essais cliniques, une seule molécule, le saroglitazar, est actuellement autorisée dans quelques pays, notamment en Inde, pour le traitement des dyslipidémies chez les patients diabétique de type 2.

Les pan-agonistes sont capables d'activer les trois isotypes α , β/δ et γ de PPAR. On peut citer par exemple le GW677954. Ces molécules sont actuellement uniquement utilisées en recherche.

1.3.1.3.2.6 Les antagonistes

Il existe des molécules antagonistes du récepteur PPAR γ , qui ont été utilisées en recherche pour inhiber la différenciation adipocytaire comme par exemple le GW9662 qui se fixe par liaison covalente sur le résidu cystéine 285 du domaine LBD de PPAR γ ³³⁰. Le bisphénol A diglycidyl ether (BADGE) est également un antagoniste du récepteur PPAR γ ainsi que le composé T0070907.

1.3.1.4 Rôles de PPAR γ

De nombreux rôles physiologiques de PPAR γ ont été mis en évidence. Nous décrirons succinctement les différents rôles connus de PPAR γ puis nous nous intéresserons plus particulièrement à ses effets putatifs dans la myélofibrose primitive qui est l'objet de cette thèse.

1.3.1.4.1 Rôle dans le métabolisme lipidique et glucidique

La différenciation des préadipocytes et le stockage des acides gras dans les adipocytes matures, deux processus centraux de l'adipogénèse, sont contrôlés par PPAR γ , et en particulier par l'isoforme PPAR γ 2, isoforme majoritaire du tissu adipeux. *In vitro*, la surexpression de PPAR γ dans des fibroblastes et des myoblastes induit leur différenciation adipocytaire^{331,332}. L'inactivation de PPAR γ chez la souris est létale, de par un défaut de placentation et un amincissement du myocarde, et il a été montré une absence de tissu adipeux chez les fœtus PPAR $\gamma^{-/-}$ ^{333,334}. La localisation et la répartition du tissu adipeux sont également contrôlées par PPAR γ , les différents modèles murins d'inactivation tissu-spécifique du gène montrant très souvent une lipodystrophie. PPAR γ favorise la capture des acides gras sanguins et leur stockage dans les adipocytes sous forme de triglycérides. Il a été décrit une action conjointe de PPAR γ et de C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α) dans la régulation d'une voie de signalisation unique du développement et du maintien du phénotype adipocytaire. PPAR γ est capable d'induire l'adipogénèse dans des cellules déficientes pour C/EBP α alors que C/EBP α est incapable de promouvoir l'adipogénèse dans des fibroblastes dans lesquels PPAR γ a été invalidé.

PPAR γ serait le régulateur direct de l'adipogénèse alors que le rôle majeur de C/EBP α serait le maintien de l'expression de PPAR γ et la régulation de la sensibilité à l'insuline³³⁵. Les gènes cibles induits par PPAR γ sont impliqués dans la mise en réserve et le métabolisme des lipides, comme par exemple les gènes de l'acyl-CoA synthase qui joue un rôle dans la première étape de la β -oxydation des acides gras ou le gène de la lipoprotéine lipase qui permet l'hydrolyse des lipoprotéines au niveau des cellules endothéliales^{336,337}.

L'activation de PPAR γ possède un effet de sensibilisation des organes cibles à l'insuline : le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux. La stimulation de PPAR γ induit l'expression de gènes qui augmentent l'absorption du glucose comme le gène du transporteur de glucose GLUT 4 (*glucose transporter 4*)^{338,339} ainsi que la formation de nouveaux adipocytes plus petits et plus sensibles à l'insuline³⁴⁰. PPAR γ va également réguler de nombreux facteurs sécrétés par le tissu adipeux et influençant la résistance à l'insuline : l'adiponectine qui réduit la production de glucose hépatique et augmente l'oxydation des acides gras dans les muscles, la leptine qui joue sur le comportement alimentaire ou encore la résistine, petite protéine de découverte récente qui favorise la résistance à l'insuline³⁴¹. PPAR γ favorise le flux de triglycérides vers le tissu adipeux et réserve l'utilisation du glucose par le muscle squelettique, le cerveau et le foie. Enfin, chez l'être humain, une mutation dominant-négatif sur un allèle du gène de PPAR γ est responsable d'une lipodystrophie partielle et d'une résistance à l'insuline, confortant le rôle prédominant de PPAR γ dans le métabolisme lipidique et glucidique³⁴².

1.3.1.4.2 Rôle dans l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères qui se caractérise par le dépôt d'une plaque d'athérome essentiellement composée de lipides, responsable de lésions de la paroi artérielle. L'activation de PPAR γ augmente l'expression des récepteurs dit « éboueurs » ou *scavenger* en anglais (CD36), responsables du transfert des LDL oxydées de la circulation sanguine vers les macrophages, transformant ces derniers en macrophages spumeux³⁴³. Lorsqu'il est dérégulé, ce mécanisme d'épuration lipidique au niveau de l'intima conduit à l'athérosclérose. L'accumulation de LDL dans l'intima entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires responsables de l'activation et du recrutement de différents types cellulaires, en particulier les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes T de l'intima qui sont à l'origine d'une réponse inflammatoire chronique et locale. L'activation de PPAR γ limite les lésions d'athérosclérose dans les modèles murins et chez les patients. Dans un modèle murin inactivé pour le récepteur aux LDL, LDLR^{-/-}, l'activation de PPAR γ diminue la synthèse des LDL et favorise l'efflux des HDL (*high density lipoprotein*) via l'activation de l'axe LXR/ABCA1³⁴⁴. Dans le modèle LDLR^{-/-}, les ligands de PPAR γ entraînent également une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la sécrétion de TNF α et de MMP-9. L'activation de PPAR γ permettrait également une diminution de

l'expression de molécules d'adhésion comme ICAM-1 ou VCAM-1 inhibant le recrutement et l'adhésion des monocytes/macrophages sur les parois de l'endothélium³⁴⁵. Le rôle de PPAR γ dans l'athérosclérose peut donc être en partie expliqué par son effet anti-inflammatoire et son rôle dans la régulation lipidique, cependant d'autres mécanismes pourraient être mis en jeu. En effet, les ligands de PPAR γ limiteraient également la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux³⁴⁶ et leur capacité de migration³⁴⁷.

1.3.1.4.3 Rôle dans le métabolisme osseux

Les études cliniques portant sur l'efficacité et la tolérance des traitements par TZD chez les patients diabétiques de type 2 ont permis de mettre en évidence un potentiel rôle de PPAR γ dans le métabolisme osseux. Les études de l'impact des TZDs sur le métabolisme osseux sont contradictoires, certaines mettant en évidence une perte osseuse et une augmentation du risque fracturaire alors que d'autres ne retrouvent pas cet effet, le diabète de type 2 étant par-lui même responsable d'une perte osseuse. La méta-analyse de Loke en 2009 a montré que le traitement par thiazolidinediones est associé à une augmentation de 45% du risque fracturaire, uniquement chez la femme ménopausée³⁴⁸. Les analyses *post-hoc* montrent que l'augmentation du risque fracturaire devient manifeste au-delà de deux ans de traitement^{349,350}.

L'un des mécanismes avancés pour expliquer ce risque fracturaire est le rôle de PPAR γ dans l'ostéoblastogénèse. En effet, il a été montré que l'activation de PPAR γ favorise la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers la voie adipocytaire au détriment de la voie ostéoblastique³⁵¹. Il est décrit une régulation réciproque entre PPAR γ 2 et RUNX2, facteur de transcription clé de la différenciation ostéoblastique, la phosphorylation de RUNX2 entraînant la déphosphorylation de PPAR γ 2 et inversement³⁵². Par ailleurs, *in vitro*, le traitement de cellules de la lignée adipocytaire 3T3-L1 et de la lignée ostéoblastique MC3T3-E1 par un antagoniste de PPAR γ , l'acide bétulinique, promeut l'ostéoblastogénèse et inhibe l'adipogénèse³⁵³.

Les études sur le rôle de PPAR γ dans l'ostéoclastogénèse sont contradictoires. Si certaines mettent en évidence une augmentation de l'ostéoclastogénèse par l'activation de PPAR γ ^{354,355}, d'autres montrent une réduction de l'activité ostéoclastique^{356,357}. Une étude récente portant sur l'interaction des PPARs et de la voie RANKL, principale voie de l'ostéoclastogénèse, montre que l'activation des récepteurs PPAR α , β / δ et γ par leur ligand respectif régule négativement la voie RANKL, limitant donc l'ostéoclastogénèse³⁵⁸. Ces données contradictoires pourraient être en partie expliquée par l'effet du contexte : PPAR γ ne régulerait ni l'activité ostéoclastique physiologique ni l'activité ostéoclastique en contexte pathologique mais aurait un effet sur l'ostéoclastogénèse uniquement lorsque le récepteur est stimulé par les TZDs³⁵⁹.

1.3.1.4.4 Rôle dans les cancers

Ici nous ne décrivons pas en détails les mécanismes pouvant expliquer l'effet des ligands de PPAR γ dans les cellules cancéreuses. L'effet des TZD sur les cellules de néoplasmes myéloprolifératifs sera détaillé dans le chapitre 1.3.2.1.5.2.

Les premières études utilisant des ligands de PPAR γ dans les cellules cancéreuses ont mis en évidence leur capacité à bloquer la prolifération de cellules primaires de liposarcome et à induire leur différenciation terminale en adipocytes³⁶⁰. Actuellement, des études ont été rapportées sur une grande variété de cellules dérivant de cancers solides, incluant celles du colon, du poumon, des ovaires, du sein, de la thyroïde et de la prostate ainsi que des cellules dérivant d'hémopathies³⁶¹. Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer l'effet de l'activation de PPAR γ sur les cellules tumorales et pour revue générale voir Yousefnia *et al.*³⁶² :

- L'arrêt du cycle cellulaire en G1/S
- La diminution de la cycline D1 et l'augmentation de ses inhibiteurs p21 et p27
- La répression de l'expression de la β -caténine
- La surexpression de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) conduisant à la diminution de l'activité PI3Kinase
- L'induction de l'apoptose
- La diminution de l'angiogenèse
- La diminution du potentiel de migration des cellules cancéreuse
- L'augmentation des ROS.

1.3.2 Effets putatifs de l'activation de PPAR γ dans la myélofibrose primitive

1.3.2.1 Rôle de PPAR γ dans l'hématopoïèse

1.3.2.1.1 Expression de PPAR γ dans le système hématopoïétique

Le gène *PPARG* a été initialement cloné à partir d'une bibliothèque d'ADN complémentaires de moelle osseuse. Il a été montré que *PPARG* était exprimé au niveau des cellules sanguines matures et notamment au niveau des monocytes/macrophages, des lymphocytes, des polynucléaires neutrophiles mais aussi au niveau des progéniteurs CD34⁺ de la moelle osseuse et au niveau de nombreuses lignées cellulaires dérivées de cellules leucémiques^{363,364}. *PPARG* est aussi exprimé au niveau des mégacaryocytes et dans les plaquettes bien que ces dernières ne possèdent pas de noyau³⁶⁵. Enfin, les cellules stromales de la moelle osseuse expriment également *PPARG*³⁶⁶.

1.3.2.1.2 Rôle dans l'érythropoïèse

Les études cliniques portant sur les patients diabétiques traités par TZDs ont permis de mettre en évidence l'apparition d'une anémie chez certains patients³⁶⁷. Si cette anémie a d'abord été rapportée à l'hémodilution liée à la rétention hydrosodée causée par les TZDs, le rôle de PPAR γ dans l'érythropoïèse a ensuite été mis en évidence. *In vitro*, il a été montré que *PPARG* est exprimé dans des progéniteurs érythroïdes purifiés à partir de sang humain. La prolifération cellulaire de ces progéniteurs est diminuée par les TZDs (troglitazone et pioglitazone) sans induction de l'apoptose, par régulation négative de la transcription des gènes de maturation érythroïde comme *GATA2*³⁶⁸. Plus récemment, il a également été montré un défaut de la maturation érythroïde des cellules souches hématopoïétiques humaines CD133+ issues de sang de cordon en présence d'agonistes de PPAR γ . En effet, lorsque les CSHs CD133+ sont cultivées en présence de baicaline ou de troglitazone, les marqueurs de maturation érythroïde, récepteur à la transferrine et glycophorine A, diminuent à la surface des cellules, de manière dose dépendante³⁶⁹.

1.3.2.1.3 Rôle dans l'hématopoïèse : axe PPAR γ /STAT5

L'équipe de Stéphane Prost s'est intéressée aux perturbations hématologiques liées à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, le VIH se caractérise en premier lieu par un déficit immunitaire profond lié à une atteinte quantitative et qualitative des lymphocytes auxiliaires CD4+, cependant il existe également des cytopénies de type neutropénie, anémie ou thrombopénie, voire des pancytopénies, chez les patients infectés par le VIH. La fréquence de ces cytopénies augmente de l'infection chronique jusqu'au stade SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Par ailleurs, des perturbations de l'hématopoïèse fœtale ont également été rapportées chez les mères séropositives. Les cytopénies liées au VIH sont au moins en partie d'origine centrale et s'accompagnent d'une atteinte du potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques médullaires. L'étude des cytopénies liées au VIH a été réalisée dans un modèle de primate non humain infecté par le virus SIVmac251 qui récapitule bien les différentes étapes de l'infection humaine. Dans ce modèle, il a été montré à cinq semaines post-infection que les progéniteurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse des animaux infectés présentent un important déficit clonogénique. Cette atteinte hématopoïétique touche toutes les lignées, sans que le virus ne soit détectable dans les progéniteurs, avec une inhibition plus forte des progéniteurs les plus immatures. *In vitro*, il a été mis en évidence que l'inhibition du potentiel clonogénique est liée à la présence d'une protéine virale appelée Nef. Par ailleurs, l'analyse transcriptionnelle des progéniteurs hématopoïétiques a montré une importante diminution de l'ARNm de STAT5 chez les animaux infectés. Ce déficit en ARNm de STAT5 est présent au stade de la primo-infection et persiste huit mois après l'infection, tout comme le défaut clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques. La surexpression de STAT5 dans les progéniteurs hématopoïétiques d'animaux infectés s'accompagne d'une restauration de leur potentiel clonogénique,

suggérant un lien direct entre la diminution de STAT5 et le déficit clonogénique. La dernière étape fut de démontrer le rôle de PPAR γ dans l'atteinte de l'hématopoïèse. De par son rôle dans l'adipogénèse, PPAR γ a été étudié dans les dyslipidémies liées au VIH et il a été mis en évidence que la protéine virale Nef est un potentiel ligand de PPAR γ ³⁷⁰. L'incubation de progéniteurs hématopoïétiques de macaques sains avec des agonistes de PPAR γ , TZDs ou 15d-PGJ2, induit une diminution significative de la clonogénicité des progéniteurs hématopoïétiques, levée par l'ajout d'un antagoniste de PPAR γ . L'ensemble de ces résultats a révélé une voie de régulation PPAR γ /STAT5 dans l'hématopoïèse, l'activation de PPAR γ agissant comme un frein sur la myéloprolifération en régulant négativement l'expression de STAT5³⁷¹(Figure 14).

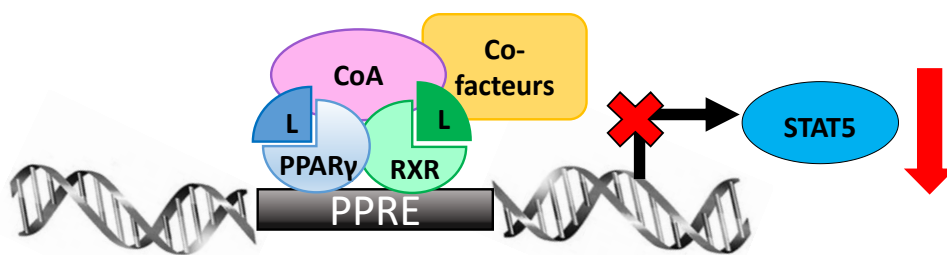


Figure 14 : L'activation de PPAR γ régule négativement STAT5.
L=ligand, PPRE= élément de réponse au PPAR.

1.3.2.1.4 Rôle dans les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des cellules sanguines matures. Elles possèdent des propriétés de quiescence et d'auto-renouvellement. Leur régulation et leur homéostasie assurent le fonctionnement correct du système hématopoïétique. En condition de stress hématopoïétique, les CSHs vont entrer en cycle afin de maintenir le pool de progéniteurs et finalement de cellules matures du système hématopoïétique. Les différents stress peuvent être responsables de dommages à l'ADN et l'accumulation des dommages dans les CSHs et les progéniteurs hématopoïétiques est un facteur de vieillissement et de dégénérescence pouvant conduire à la transformation cancéreuse. L'anémie de Fanconi est une maladie héréditaire dans laquelle le système de réparation de l'ADN est déficient, aboutissant à une insuffisance médullaire et à un taux élevé de leucémie. Dans un modèle murin d'anémie de Fanconi, il a été montré l'implication de la voie PPAR γ dans l'homéostasie des CSHs, par une technique de criblage par ARN interférence. Les auteurs ont montré que l'inhibition de PPAR γ par ARN interférence ou par des antagonistes chimiques améliorent le potentiel de repopulation des CSHs issues de souris atteintes d'anémie de Fanconi³⁷². Le stress hématopoïétique peut également être induit par injection de 5-fluorouracile (5-FU) chez la souris. L'injection de 5-FU induit des cytopénies profondes avec un nadir au 6^{ème} jour, suivi d'une

récupération hématologique avec normalisation de l'hémogramme vers le 10^{ème} jour post-injection. Il a été montré que la cinétique de récupération des cellules souches hématopoïétiques murines Lin-Sca+Kit+ (LSK) est plus lente chez les souris soumises à un régime riche en graisses alors même que le nombre de CSHs était plus élevé chez ces souris comparées aux souris soumises au régime classique. Or, chez les souris soumises au régime riche en graisse, l'expression de *PPARG* est régulée positivement au niveau des cellules de la moelle osseuse. Dans ce modèle, le traitement par injection intrapéritonéale d'un antagoniste de PPAR γ , le BADGE, permet d'augmenter le nombre de CSHs et le nombre de progéniteurs érythro-myéloïdes et d'accélérer la récupération hématologique³⁷³. Ces résultats suggèrent qu'en condition de stress hématopoïétique, l'activation de PPAR γ exerce un rôle de frein sur la myéloprolifération et favorise l'érosion du pool de CSHs alors que l'inhibition de PPAR γ lève ce frein et restaure en partie l'hématopoïèse.

Récemment, le potentiel d'expansion du pool de CSHs par inhibition de PPAR γ a été testé dans le contexte de la greffe de moelle osseuse. En effet, certaines allogreffes de moelle osseuse sont réalisées à partir de sang de cordon ombilical, cependant le nombre de CSHs est souvent insuffisant pour permettre une récupération médullaire correcte chez l'adulte. Guo *et al.* ont montré que l'utilisation d'un antagoniste de PPAR γ , le GW9662, permettait l'expansion *ex vivo* des CSHs, ainsi que l'expansion de progéniteurs multipotents. Le gène *PPARG* est très exprimé au niveau des CSHs et des progéniteurs multipotents et son invalidation par ARN interférence augmente considérablement l'expansion de ces cellules suggérant un rôle de régulateur négatif de PPAR γ dans l'auto-renouvellement. *In vivo*, les souris immunodéficientes transplantées avec les CSHs de sang de cordon traitées avec le GW9662 montrent un meilleur taux de greffe de ces cellules dans la moelle osseuse et dans le sang, comparées aux souris contrôles, en greffe primaire comme en greffe secondaire, démontrant l'absence d'atteinte fonctionnelle des CSHs par l'inhibition de PPAR γ . Sur le plan mécanistique, l'inhibition de PPAR γ entraîne la régulation négative de nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire ainsi que la régulation négative du gène *FBP1* (*fructose-bisphosphatase 1*), régulateur négatif de la glycolyse. Les auteurs montrent par ailleurs que l'inhibition de la glycolyse ou le retrait du glucose contrecarre l'effet de l'inhibition de PPAR γ dans l'expansion des CSHs, suggérant la possibilité d'une reprogrammation métabolique des CSHs³⁷⁴.

1.3.2.1.5 Rôle de PPAR γ dans l'hématopoïèse pathologique

1.3.2.1.5.1 Effet des ligands de PPAR γ dans les hémopathies

L'effet des ligands de PPAR γ a été testé sur une grande variété de lignées cellulaires dérivées d'hémopathies. Comme dans les cancers solides, de nombreux mécanismes ont été suggérés et sont résumés dans le **Tableau 4**, et pour revue générale, voir Simpson-Haidaris, 2010³⁷⁵ et Ryu, 2018³⁷⁶.

Effet décrit	Type de cellules (hémopathie)	Ligands de PPAR γ
Induction de la différenciation cellulaire	HL60 (LAP)	CDDO ou dérivés, TZD, oroxylin A
	U937 (LAM)	CDDO ou dérivés, TZD
	Cellules primaires de LAM	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
	Cellules primaires de LLC	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
Inhibition de la prolifération cellulaire	HL60 (LAM)	TZD
	K562, KU812, KCL22, BV173, SD1, SupB-15, KPB-M15 (LMC)	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
	U-tree-O2, Bay91 (LAL-B)	TZD
	Cellules primaires de LAM	Dérivé du CDDO, DIM34
	Cellules primaires de LAL	15d-PGJ2, TZD
	Cellules primaires de LBDGC	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
Inhibition de la croissance cellulaire	HL60, TH-P1 (LAM)	15d-PGJ2, TZD
	K562	15d-PGJ2, TZD
	LP-1, RPMI-8226, U266 (MM)	15d-PGJ2, TZD
	Cellules primaires de LAM	CDDO ou dérivés
	Cellules primaires de MW	TZD
Induction de l'apoptose - Apoptose induite par les caspases - Apoptose induite par TRAIL - Apoptose induite par augmentation des ROS - Apoptose par dépolarisation des mitochondries - Apoptose via un mécanisme dépendant de RXR - Régulation de Bax/BCL2 - Régulation négative de c-myc - Régulation négative de BCL-xL - Régulation négative de la cycline D1 - Régulation négative des protéines anti-apoptotiques dépendantes de NF-κB - Régulation négative de la cyclo-oxygénase2	HL60, NB4, MR2 (LAP),	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
	U937, Mono Mac 6 (LAM)	15d-PGJ2, TZD
	K562, KU812, KCL22, BV173, SD1, SupB-15, KPB-M15 (LMC)	15d-PGJ2, TZD
	Jurkat (LAL-T)	15d-PGJ2, CDDO ou dérivés
	U-tree-O2, Bay91 (LAL-B)	TZD
	GRANTA-519, HBL-2, JeKo-1 (Lymphome du manteau)	15d-PGJ2, TZD
	ANBL6, RPMI-8226, U266 (MM)	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
	Cellules primaires de LAP	CDDO ou dérivés
	Cellules primaires de LAM	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2, Dim#34
	Cellules primaires de LAL-B	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
	Cellules primaires de LAL-T	15d-PGJ2
	Cellules primaires de LLC	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
	Cellules primaires de LBDGC	CDDO ou dérivés, TZD, 15d-PGJ2
	Cellules primaires de MW	TZD
Inhibition de la migration cellulaire	THP-1 (LAM)	TZD
Inhibition de l'adhésion cellulaire	MM.1S, MM.1R, KAS6/1, ANBL6 (MM)	15d-PGJ2, TZD

Tableau 4 : Effets des ligands de PPAR γ sur les cellules d'hémopathies.

LAP: leucémie aiguë promyélocytaire. LAM: leucémie aiguë myéloïde. LAL: leucémie aiguë lymphoblastique. LMC: leucémie myéloïde chronique. LBDGC: lymphome B diffus à grandes cellules. LLC: leucémie lymphoïde chronique. MW: macroglobulinémie de Waldenström. MM: myélome. TZD: thiazolidinedione. CDDO: acide 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oïque. 15d-PGJ2: 15-désoxy- Δ 12, 14-prostaglandine J2. D'après Simpson-Haidaris, PPAR research, 2010 et Ryu, cancers letter, 2018.

1.3.2.1.5.2 Effet des ligands de PPAR γ dans les néoplasmes myéloprolifératifs : l'exemple de la leucémie myéloïde chronique

De par l'action de frein sur la myéloprolifération mise en évidence dans l'hématopoïèse du primate non humain infecté par le SIV, l'équipe de Stéphane Prost s'est tout particulièrement intéressé à la caractérisation moléculaire et au potentiel thérapeutique de la voie PPAR γ /STAT5 dans les néoplasmes myéloprolifératifs et en premier lieu dans la leucémie myéloïde chronique (LMC).

La LMC, qui représente environ 15% des néoplasmes myéloprolifératifs, est traitée depuis maintenant plus de quinze ans de façon très efficace par des inhibiteurs de tyrosine kinase dont le chef de file est l'imatinib ou Glivec®. Les ITKs ciblent directement la protéine oncogénique BCR-ABL, résultant du transcrit de fusion *BCR-ABL* à l'origine de la LMC. Cependant, si près de 60% des patients atteints une rémission moléculaire majeure définie par un ratio de transcrit *BCR-ABL/ABL* inférieur à 0,1%, moins de 10% des patients atteignent la rémission moléculaire profonde, définie par un ratio inférieur à 0,0032% et l'arrêt des ITKs conduit dans un cas sur deux à la réapparition de la maladie, signant la persistance de cellules souches leucémiques (CSL) peu sensibles aux ITKs³⁷⁷⁻³⁷⁹. Prost *et al.* ont montré *in vitro* que l'imatinib est actif sur l'élimination des CSLs de LMC qui se divisent activement mais entraîne une accumulation de CSLs quiescentes, qui ne se sont jamais divisées ou se sont divisées une seule fois. Si la pioglitazone utilisée seule est moins efficace que l'imatinib sur la réduction de la masse des cellules de LMC en division, elle induit une sortie de cet état de quiescence. La combinaison de l'imatinib et de la pioglitazone agit de façon synergique, éliminant à la fois les cellules en division et les cellules quiescentes. L'étude des voies moléculaires sous-jacentes a montré que l'addition de la pioglitazone à l'imatinib diminuait la transcription de *STAT5* et de ses gènes cibles dans les CSLs quiescentes notamment *HIF2 α* (*hypoxia inducible factor 2 α*) et son gène cible *CITED2*. Pris dans leur ensemble ces résultats suggèrent que les CSLs de la LMC présentent une dépendance à la voie STAT5-HIF2 α -CITED2, inhibée directement et efficacement lors l'activation de PPAR γ par la pioglitazone. Ce travail a permis de mettre en évidence que l'imatinib et la pioglitazone diminue l'activation de STAT5 par deux mécanismes distincts : l'imatinib inhibe la phosphorylation de STAT5 par la protéine oncogénique BCR-ABL et la pioglitazone réduit l'activité de STAT5 au niveau de la CSL quiescente. La combinaison de ces deux traitements permettrait donc une érosion progressive du pool de CSLs et permet d'espérer une éradication des cellules malignes¹⁵³ (**Figure 15**).

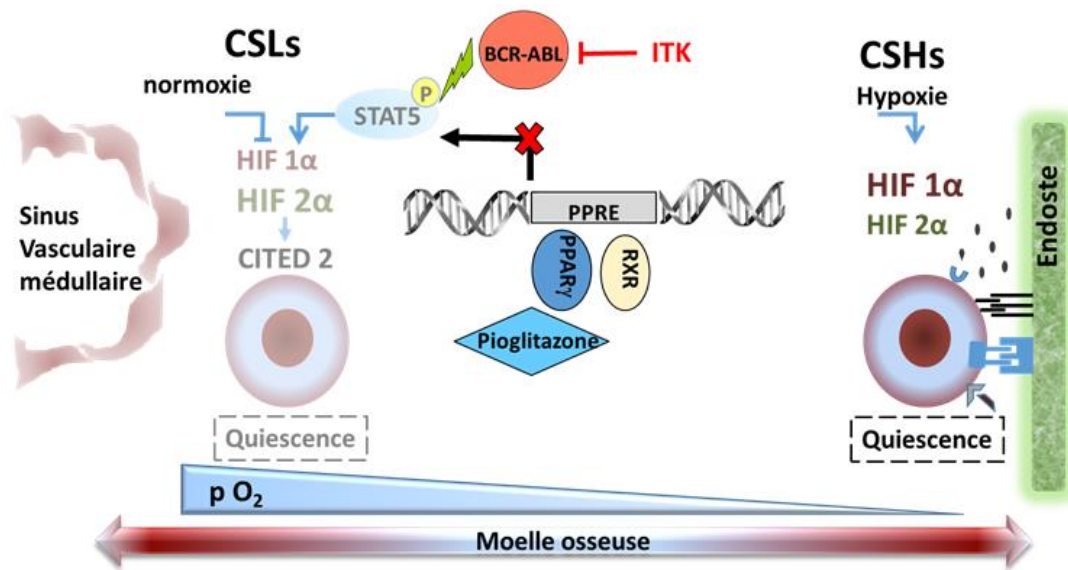


Figure 15 : Erosion du pool de cellules souches leucémiques par activation de PPAR γ dans la LMC.

Les CSHs sont en hypoxie dans la moelle osseuse et activent $HIF1\alpha/HIF2\alpha$, impliqués dans la quiescence. Dans la LMC, les CSLs sont capables d'activer $HIF1\alpha$ en normoxie, favorisant leur quiescence et les rendant insensibles au traitement par ITK. L'activation de PPAR γ par la pioglitazone régule négativement STAT5 et ses gènes cibles $HIF1\alpha$ et $CITED2$ dans la CSL et permet, combinée à l'action de l'imatinib, d'éroder le pool de CSLs. LMC: leucémie myéloïde chronique. CSLs: cellules souches leucémiques. CSHs: cellules souches hématopoïétiques. pO_2 : pression en dioxygène. Adapté de Prost, Nature, 2015.

Ces travaux *in vitro* et *ex vivo* ont été à la base d'un essai clinique combinant le traitement par imatinib à un traitement par pioglitazone chez des patients atteints de LMC. Dans cet essai nommé ACTIM, vingt-quatre patients atteints de LMC, en rémission moléculaire majeure stable mais n'ayant jamais atteints la rémission moléculaire profonde et traités depuis au moins deux ans par imatinib, ont reçu un traitement concomitant par pioglitazone pendant 12 mois. L'objectif principal de l'essai était d'évaluer l'incidence cumulée des patients passant d'une réponse moléculaire majeure à une réponse moléculaire profonde. Les résultats ont montré que treize patients (56%) ont obtenu une rémission moléculaire profonde à 12 mois, alors que le pourcentage de réponse moléculaire profonde est de l'ordre de 23% dans une cohorte historique de patients ayant des caractéristiques similaires à ceux de l'essai ACTIM. Par ailleurs, la combinaison des deux traitements a été très bien tolérée. L'étude des cellules hématopoïétiques CD34 $^{+}$ des patients avant le début du traitement combiné puis à six mois et à 12 mois de traitement a permis de montrer une réduction des taux d'ARN messager de $STAT5$ et une réduction de la clonogénicité des progéniteurs hématopoïétiques³⁸⁰.

1.3.2.2 Rôle dans l'inflammation

PPAR γ a un rôle anti-inflammatoire et régulateur de l'immunité innée et adaptative, de même que les deux autres isoformes de PPAR.

1.3.2.2.1 Effet anti-inflammatoire de l'activation de PPAR γ en clinique et dans les modèles expérimentaux de maladies inflammatoires

Les agonistes de PPAR γ sont utilisés depuis des décennies dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques. L'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), principe actif de la sulfasalazine et de la mésalazine, est notamment utilisé depuis les années quarante dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), maladie de Crohn et recto-colite hémorragique et dans le traitement des rhumatismes inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde^{381,382}. Ce n'est qu'en 2005 qu'il a été montré que le 5-ASA était un ligand de PPAR γ . Dans un modèle murin de MICI, le traitement par 5-ASA est efficace chez les souris sauvages mais pas chez les souris haplo-insuffisantes pour PPAR γ . *In vitro*, dans les cellules épithéliales, le 5-ASA augmente l'expression du gène de PPAR γ et induit la translocation de PPAR γ vers le noyau ainsi qu'une modification de sa conformation entraînant le recrutement de co-activateurs³²⁷. Le traitement par TZD (rosiglitazone) a également montré une amélioration clinique chez les patients atteints de MICI³⁸³. Par ailleurs, chez l'être humain, de nombreux polymorphismes du nucléotide simple (*single nucleotid polymorphism* ou SNP) de *PPARG* sont décrits. Des études ont montré que ces polymorphismes influencent les maladies inflammatoires, certains étant protecteurs alors que d'autres sont délétères^{384,385}, en revanche aucune mutation de *PPARG* n'a été retrouvée dans les maladies inflammatoires. L'inflammation étant un processus dynamique faisant entrer en jeu de nombreux types cellulaires, le rôle de PPAR γ a été étudié dans des modèles expérimentaux variés de maladies inflammatoires et l'activation de PPAR γ diminue l'inflammation dans les modèles de MICI mais aussi d'encéphalomyélite auto-immune, de myocardite auto-immune ou encore d'athérosclérose. A l'inverse, l'inactivation de *Ppar γ* dans les modèles de MICI entraîne une plus grande sensibilité au développement de la maladie ainsi que des lésions plus sévères³⁸⁶.

1.3.2.2.2 Rôle de PPAR γ dans les monocytes/macrophages

Les cellules myéloïdes de type monocytes/macrophages ont été les premières cellules du système immunitaire dans lesquelles la fonction de PPAR γ a été étudiée. Dès 1998, Nagy *et al.* ont montré que l'activation de PPAR γ par les LDL oxydées induit d'importantes modifications dans les macrophages et notamment l'expression du récepteur *scavenger* CD36, conduisant aux macrophages spumeux retrouvés dans l'athérosclérose³¹⁵. Il a ensuite été montré dans les monocytes/macrophages activés par l'IFN γ que le traitement par ligands de PPAR γ , 15d-PGJ2 ou troglitazone, diminue l'expression de gènes de l'inflammation comme l'oxyde nitrique synthase inductible, la gélatinase B ou encore ceux des récepteurs *scavenger*³⁸⁷. L'activation de PPAR γ par les TZDs diminue la production de

nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL1 β et l'IL6 par les monocytes³⁸⁸. PPAR γ est également impliqué dans la polarisation des macrophages, favorisant la transition du phénotype M1 (pro-inflammatoire) en phénotype M2 (modulateur de la réponse immune). L'activation constitutive de PPAR γ dans les macrophages induit un phénotype proche du phénotype M2 dans le tissu adipeux alors que son invalidation empêche la polarisation M2³⁸⁹. Les travaux de Szanto *et al.* suggèrent que PPAR γ n'est pas par lui-même le régulateur de la polarisation des macrophages mais serait un effecteur d'aval de la voie de signalisation IL4-STAT6³⁹⁰.

1.3.2.2.3 Rôle de PPAR γ dans les autres cellules du système immunitaire

PPAR γ est également exprimé au niveau des cellules dendritiques, principales cellules présentatrices d'antigènes qui régulent la réponse immune innée et adaptative. Des analyses par puces à ADN ont montré que la différenciation *ex vivo* des cellules dendritiques à partir de monocytes humains implique la régulation positive de gènes du métabolisme des lipides. L'activation de PPAR γ dans les cellules dendritiques semble biaiser la différenciation aboutissant à un phénotype unique par son profil transcriptionnel. Les fonctions exactes de ces cellules dendritiques ne sont pas élucidées, il semblerait tout de même que l'activation de PPAR γ augmente la capacité des cellules dendritiques à présenter des antigènes lipidiques et à activer les cellules natural killer T invariantes (*invariant natural killer T cells* ou iNKT), effecteurs de la réponse immunitaire précoce³⁹¹.

PPARG est également exprimé par les lymphocytes T et les lymphocytes B. En présence de d'agonistes de PPAR γ , les lymphocytes T produisent moins d'IL2, cytokine impliquée dans la réponse immunitaire et la prolifération des lymphocytes T³⁹². PPAR γ intervient également dans la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs Th17 ou en lymphocytes T régulateurs. L'invalidation du gène de PPAR γ dans les lymphocytes T augmente la différenciation vers les lymphocytes Th17 ce qui aggrave les pathologies expérimentales auto-immunes médiées par ces lymphocytes, alors que les agonistes de PPAR γ inhibent la différenciation Th17³⁹³. L'expression du gène de PPAR γ est augmentée au niveau des lymphocytes B activés³⁹⁴ et la réponse des lymphocytes B à des stimuli inflammatoires comme le LPS est également modulée par PPAR γ ³⁹⁵.

1.3.2.2.4 Rôle de PPAR γ dans la régulation négative de la voie NF- κ B

Les mécanismes qui sous-tendent l'activité anti-inflammatoire des ligands de PPAR γ ne sont pas tous connus. Cependant, l'activation de PPAR γ va réguler négativement NF- κ B, facteur de transcription majeur de l'inflammation^{387,396}. Le principal mécanisme avancé est la transrépression de NF- κ B par PPAR γ . Il a été montré que la SUMOylation de PPAR γ par son ligand empêche l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome des co-répresseurs fixés sur les promoteurs des gènes de l'inflammation, inhibant ainsi leur transcription³⁰⁹. Par ailleurs, PPAR γ est également capable de jouer le rôle d'ubiquitine-ligase, ciblant NF- κ B et induisant sa dégradation par le protéasome³⁰².

Plusieurs auteurs rapportent également une action anti-inflammatoire des ligands de PPAR γ indépendante du récepteur, ciblant l'activité du complexe de la kinase I κ B (IKK) et/ou la sous-unité p65 de NF- κ B, empêchant la dégradation des inhibiteurs de NF- κ B et notamment d'I κ B α ^{397,398}.

1.3.2.3 Rôle dans le développement de la fibrose

1.3.2.3.1 Rôle protecteur de l'activation de PPAR γ

Les premières études s'intéressant à l'action anti-fibrotique de PPAR γ ont été conduites dans la fibrose hépatique. Dès les années 2000, il a été montré que *PPARG* est exprimé par les myofibroblastes quiescents du foie nommés cellules hépatiques stellaires quiescentes. Lors de la progression vers la fibrose hépatique, les cellules hépatiques stellaires sont activées et il a été constaté une régulation négative de l'expression de *PPARG* dans ces cellules. En revanche, l'activation de PPAR γ par ses ligands, 15d-PGJ2 ou thiazolidinedione, permet la diminution de la synthèse de protéines de la fibrose comme le collagène ou la *smooth muscle α -actin* (α SMA) par les cellules hépatiques stellaires activées^{399,400}. Depuis, de nombreuses études *in vitro* et dans des modèles pré-cliniques de fibrose d'organes variés comme le foie, le cœur, les reins, la peau, les poumons, l'intestin ou encore l'œil ont établi le potentiel anti-fibrotique de l'activation de PPAR γ (pour revue générale : Da Rocha Junior, 2013⁴⁰¹ et Mcvicker, 2017⁴⁰²). La plupart de ces études utilisent les thiazolidinediones comme activateurs de PPAR γ , cependant d'autres agonistes sont décrits, démontrant que l'effet anti-fibrotique est PPAR γ -dépendant. Le VCE-004.8, par exemple, un dérivé du cannabis, est un co-agoniste de PPAR γ et du récepteur cannabinoïde de type 2 (CB2). *In vitro* sur des fibroblastes d'origine diverse et *in vivo* dans un modèle murin de fibrose cutanée induite par la bléomycine, le VCE-004.8 inhibe la synthèse du collagène A2 dépendante du TGF- β 1 et réduit la fibrose cutanée. Dans ce même modèle, l'utilisation d'un antagoniste de PPAR γ , le T0070907, contrecarre l'effet anti-fibrotique médié par PPAR γ ⁴⁰³. L'invalidation de *Ppar γ* dans les fibroblastes de la peau chez la souris conduit à une susceptibilité accrue aux lésions causées par la bléomycine comparées aux souris contrôles⁴⁰⁴, démontrant le rôle anti-fibrotique de PPAR γ . Chez l'être humain, des essais cliniques utilisant des agonistes de PPAR γ ont été menés chez des patients atteints de stéatose hépatique non-alcoolique (*non-alcoholic steatohepatitis* ou NASH) dont les résultats concernant la fibrose sont parfois discordants. Les raisons de cette discordance ne sont pas claires cependant le choix de la molécule pourrait jouer un rôle important. En effet, une méta-analyse récente a montré que le traitement par pioglitazone mais pas le traitement par rosiglitazone réduit la fibrose hépatique de façon significative chez les patients atteints de NASH⁴⁰⁵. Afin de limiter les effets secondaires liés aux thiazolidinediones, d'autres agonistes de PPAR sont en cours d'évaluation clinique pour leur potentiel anti-fibrotique. Dans la sclérodémie systémique, pathologie fibrosante de la peau, un pan-agoniste des récepteurs PPAR, l'IVA337 réduit le développement de la fibrose induite par l'inflammation et peut également faire

régresser cette fibrose une fois qu'elle est installée⁴⁰⁶. Cette molécule est actuellement en cours d'évaluation clinique chez des patients atteints de sclérodermie systémique (NCT02503644).

1.3.2.3.2 Mécanismes physiopathologiques de l'action anti-fibrotique de PPAR γ : axe PPAR γ -TGF- β 1

La physiopathologie qui sous-tend l'action anti-fibrotique de PPAR γ n'est pas complètement élucidée. Cependant, le TGF- β 1 est la cytokine majeure impliquée dans le développement de la fibrose quel que soit l'organe et l'un des mécanismes proposés pour expliquer l'effet anti-fibrotique de PPAR γ est la relation antagoniste entre les signalisations de PPAR γ et du TGF- β 1. A l'état physiologique, PPAR γ est faiblement activé par ses ligands naturels. Dans de nombreuses maladies fibrosantes, la stimulation pro-fibrotique prolongée ou récurrente entraîne la diminution de l'expression de PPAR γ et inhibe l'activation de PPAR γ par ses ligands naturels. Il a été montré dans des fibroblastes issus de la peau de patients atteints de sclérodermie systémique, que la stimulation par le TGF- β 1 diminuait l'expression de *PPARG* de manière temps-dépendante et dose-dépendante⁴⁰⁷. De même, le TGF- β 1 régule négativement l'expression de *PPARG* dans les cellules hépatiques stellaires⁴⁰⁸. Dans les fibroblastes de la peau, l'activation de PPAR γ a peu d'effet sur la synthèse du collagène, en revanche, lorsque ces fibroblastes sont stimulés par le TGF- β 1, les ligands de PPAR γ diminuent de manière significative la synthèse de collagène et de l' α -SMA⁴⁰⁹. De même, dans les cellules hépatiques stellaires, les fibroblastes cutanés et les cellules musculaires aortiques, l'activation de PPAR γ supprime l'expression du gène du CTGF induite par le TGF- β 1^{410,411}. Ghosh *et al.* ont montré que la synthèse de collagène A2 est augmentée dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) invalidés pour *Ppar γ* et que l'expression du récepteur au TGF- β 1 de type I (T β RI) et le taux de TGF- β 1 sont élevés dans les MEFs *Ppar γ ^{-/-}*. Enfin, dans les MEFs *Ppar γ ^{-/-}*, Smad2/3, impliquée dans la voie canonique du TGF- β 1, est phosphorylée même en l'absence de TGF- β 1 exogène. Ces résultats suggèrent que PPAR γ a un rôle physiologique dans le contrôle de l'expression des gènes pro-fibrotiques dépendant des Smads⁴¹². La mécanistique qui sous-tend l'action antagoniste de PPAR γ sur la voie du TGF- β 1 n'est pas complètement élucidée. Certains auteurs ont suggéré que l'activation de PPAR γ bloque la phosphorylation des Smads⁴¹³. Cependant, d'autres travaux de Ghosh *in vitro* sur des fibroblastes humains de la peau ont montré que la réponse transcriptionnelle dépendante des Smads est bloquée par l'activation de PPAR γ alors même que la phosphorylation de Smad 2/3 est conservée. Les auteurs ont également montré que l'activation de PPAR γ dans les fibroblastes stimulés par le TGF- β 1 prévient l'interaction du cofacteur de transcription p300 avec Smad3 ainsi que le recrutement de p300 au niveau du complexe transcriptionnel se liant à l'ADN et abroge l'acétylation p300-dépendante de l'histone H4 sur le locus du collagène A2⁴¹⁴. Le cofacteur de transcription p300 a été décrit comme un acteur majeur du développement de la fibrose^{415,416} et les travaux de Ghosh soutiennent l'hypothèse que PPAR γ interfère dans la signalisation entre le TGF- β 1 et le cofacteur p300. D'autres mécanismes indépendants des Smads et de p300 sont décrits. Dans les fibroblastes de la peau, la rosiglitazone

diminue l'induction d'Egr-1 (*early growth response protein-1*), facteur de transcription précoce de la voie du TGF- β 1. PPAR γ a également été impliqué dans la régulation positive de PTEN, PTEN activée inhibant la transcription des gènes cibles du TGF- β 1⁴¹⁷. Enfin, il est décrit un rôle opposé des voies PPAR γ et Wnt (*wingless-related integration site*)/ β -caténine, la régulation positive de l'une entraînant la régulation négative de l'autre. Or, l'activation de la voie Wnt par ses ligands induit une activation du TGF- β 1 par smad2, de manière dépendante de la β -caténine, favorisant ainsi un contexte pro-fibrotique^{418,419}. Dans la fibrose liée à l'irradiation, l'activation de PPAR γ stimule les inhibiteurs de la voie Wnt/ β -caténine tels que Smad7 et PTEN et diminue la signalisation du TGF- β 1⁴²⁰.

Il faut noter qu'aucune étude à ce jour n'a été conduite concernant le rôle de PPAR γ dans des modèles de fibrose médullaire.

Deuxième partie : Objectifs du travail de Thèse

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'activation de la voie PPAR γ dans la myélofibrose primitive. Ce travail fait suite à l'étude du potentiel thérapeutique que représente l'axe PPAR γ /STAT5 dans la leucémie myéloïde chronique¹⁵³. Nous avons voulu transposer ce modèle à d'autres néoplasmes myéloprolifératifs et plus particulièrement à la myélofibrose primitive qui, par l'action putative de l'activation de PPAR γ sur ses trois composantes physiopathologiques, semble une cible pertinente. Nous avons donc évalué *in vitro* et *in vivo* l'activation de PPAR γ sur la prolifération du clone hématopoïétique, l'inflammation et la fibrose médullaire.

Contrairement aux travaux menés dans la leucémie myéloïde chronique, il ne s'agissait pas dans ce travail de cibler spécifiquement la cellule souche leucémique mais d'évaluer le potentiel anti-prolifératif de l'activation de PPAR γ sur la masse des cellules du clone hématopoïétique. Les modèles expérimentaux *in vitro* sur lignée cellulaire et *ex vivo* sur cellules de patients nous ont permis d'appréhender les mécanismes qui sous-tendent l'action anti-proliférative de PPAR γ sur le clone hématopoïétique. Ces analyses ont ensuite été confrontées aux résultats que nous avons pu observer *in vivo* concernant la myéloprolifération des lignées érythrocytaires ou mégacaryocytaires dans les modèles précliniques murins de polyglobulie de Vaquez (JAK2V617F) ou de thrombocyémie essentielle (CALRdel52).

L'approche *in vitro* a également permis d'appréhender l'effet anti-fibrotique de l'activation de PPAR γ et d'en caractériser la mécanistique. Etant donné le rôle pivot du TGF- β 1 dans l'induction et le développement de la fibrose médullaire, nous avons dans un premier temps évalué l'effet de l'activation de PPAR γ sur le potentiel pro-fibrotique du TGF- β 1. Cette approche a été menée sur des lignées de stroma médullaire murin et humain ainsi que sur des cultures primaires de stroma médullaire humain. Ces modèles nous ont permis d'explorer différents aspects mécanistiques comme l'action de PPAR γ sur les voies canoniques du TGF- β 1 (Smad2/3), sur des voies alternatives (p38/MAPK), ou sur une interaction via des cofacteurs importants pour l'initiation de la transcription des gènes cibles du TGF- β 1 (AP-1, p300). Le cofacteur de transcription p300 apparaissant comme l'élément déterminant dans la capacité de PPAR γ à contrecarrer l'effet du TGF- β 1, nous avons fait l'hypothèse que les actions antagonistes de PPAR γ et du TGF- β 1 passent par un déplacement du cofacteur de transcription p300 de la voie du TGF- β 1 vers la voie PPAR γ dans les cellules de stroma médullaire. Afin d'étayer ces résultats, nous avons comparé par immunoprécipitation de la chromatine les profils des promoteurs de gènes activés par des complexes intégrant la p300 dans des cellules de stroma médullaire stimulées par le TGF- β 1 seul ou par l'association TGF- β 1 et ligand de PPAR γ (pioglitazone). Le cofacteur de transcription AP-1, également décrit comme acteur des voies de

signalisation sous-jacentes à l'activation de PPAR γ et du récepteur au TGF- β 1, a été étudié en parallèle.

L'inflammation résultant de phénomènes complexes faisant intervenir différents facteurs et types cellulaires effecteurs et répresseurs, il est difficile d'établir des modèles *in vitro* permettant de reproduire le contexte inflammatoire propre aux néoplasmes myéloprolifératifs. Nous avons donc choisi d'aborder cette problématique *in vivo* à travers l'utilisation de modèles murins.

En effet, si les expérimentations *in vitro* et *ex vivo* ont permis d'élucider plusieurs mécanismes d'action inhérents à l'activation de PPAR γ dans la myélofibrose primitive, seuls les modèles expérimentaux murins pré-cliniques permettent d'évaluer cette activation dans un modèle dynamique. Trois modèles murins nous ont permis d'établir la pertinence de l'activation de PPAR γ dans la myélofibrose : le modèle TPO^{high}, le modèle de myélofibrose post-polyglobulie de Vaquez (JAK2V617F) et le modèle de myélofibrose post-thrombocytémie essentielle (CALRdel52). Deux ligands de PPAR γ ont été testés : une thiazolidinedione, la pioglitazone ou Actos® et un dérivé salicylé, la mésalazine ou Pentasa®. L'intérêt de ces deux molécules est qu'elles sont disponibles en clinique chez l'être humain et que leurs principaux effets secondaires sont connus.

Troisième partie : Matériel et méthodes

Dans cette partie, nous décrivons de manière succincte les différentes procédures expérimentales utilisées, nécessaires à l'interprétation et à la compréhension des résultats expérimentaux présentés dans la quatrième partie de ce manuscrit.

3.1 Etude de la prolifération *in vitro*

3.1.1 Sources cellulaires

Afin d'étudier le potentiel anti-prolifératif de l'activation de PPAR γ sur le clone hématopoïétique, nous avons utilisé plusieurs sources cellulaires. Nous avons choisi deux lignées cellulaires UKE-1 (RRID: CVCL_0104, ExPasy) et HEL (*Human ErythroLeukemia*, ACC 11, DSMZ) présentant toutes deux la mutation JAK2V617F. Nous avons également purifié des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus du sang de patients atteints de polyglobulie de Vaquez ou issus du sang et/ou de la moelle osseuse de patients atteints de myélofibrose primitive ou secondaire ainsi que des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de sang de cordon ombilical (UBC, *umbilical cord blood*), utilisés comme contrôle. Pour ce faire, 7 à 15 ml de sang et/ou 1 à 3 mL de moelle osseuse sont centrifugés sur un milieu de séparation des lymphocytes (Histopaque[®]-1077, Sigma-Aldrich). L'anneau de cellules mononucléées est lavé avec du D-PBS 1X (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, GIBCO[™]), puis la suspension cellulaire est incubée avec un anticorps anti-fragment Fc des immunoglobulines et avec des microbilles magnétiques recouverte d'anticorps anti-CD34 provenant du Kit « CD34 MicroBead Kit, human » (Miltenyi Biotec) à doses saturantes. Après une étape de lavage au D-PBS 1X, le mélange billes/cellules est placé sur un aimant permettant de retenir les cellules CD34⁺ liées aux billes. Les cellules CD34⁺ sont ensuite éluées avec du D-PBS 1X. Les cellules sont comptées en cellule de Malassez et la pureté du tri cellulaire est évaluée en marquant une partie de la suspension cellulaire avec un anticorps anti-CD45 humain couplé au PerCP et un anticorps anti-CD34 humain couplé à l'APC. Les références des anticorps utilisés sont indiquées dans le **Tableau 7**. L'analyse du phénotype est réalisée par cytométrie en flux (FACSCanto[™]II, BD Biosciences).

3.1.2 Conditions de culture

Les cellules de lignées UKE-1 et HEL sont maintenues en culture dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO[™]) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, CP17-180 CliniSciences) et 1% de pénicilline-streptomycine-néomycine (Invitrogen[™]). Les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de polyglobulie de Vaquez sont maintenues en culture dans du milieu StemSpan[™] (StemCell[™]Technologies) sans cytokines ou avec une concentration suboptimale de cytokines : TPO à 20 ng/mL ou Stem Cell Factor (SCF) à 20 ng/mL (StemCell[™]Technologies). Les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de myélofibrose primitive ou secondaire sont maintenus en culture dans du milieu

StemSpan™ supplémenté en SCF à 20 ng/mL (StemCell™Technologies) pendant 48h puis dans du milieu Stemspan™ sans cytokine. Les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ de sang de cordon sont maintenues en culture dans du milieu StemSpan™ contenant du SCF à 20 ng/mL (StemCell™Technologies). Toutes les cultures cellulaires sont maintenues dans un incubateur à une température de 37°C dans une atmosphère humide comprenant 5% de CO₂.

3.1.3 Etude de la viabilité cellulaire

Les cellules des lignées UKE-1 et HEL et les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ sont mis en culture en présence ou non de pioglitazone (Cayman Chemical Company) à une concentration finale de 10 ou 20µM. La viabilité des cellules est estimée par cytométrie en flux (FACSCanto™II) aux jours 3, 6 et 10 de culture. En pratique, un volume égal de cellules HEL et UKE-1 dans les différentes conditions de cultures est analysé sur une durée de temps définie en excluant les cellules mortes grâce à une coloration mettant en évidence la perte d'intégrité membranaire (SYTOX™ Blue Dead Cell Stain). Les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ sont marqués au préalable par un anticorps anti-CD45-PerCP et un anticorps anti-CD34-APC (**Tableau 7**).

3.1.4 Etude du cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire est réalisée par l'analyse conjointe de l'incorporation de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) par les cellules UKE-1 et HEL (Click-iT® Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits, Invitrogen™) et le marquage de l'ADN par du colorant Hoechst (33342). En pratique, les cellules UKE-1 et HEL sont mise en culture avec ou sans pioglitazone à 10 µM. Au 6^{ème} jour de culture, de l'EdU à la concentration finale de 10 µM est ajouté au milieu de culture. Après une incubation de 2h, les cellules subissent une étape de fixation par du D-PBS 1X contenant 3,7% de formaldéhyde. Après deux étapes de lavage avec du D-PBS 1X contenant 3% d'albumine sérique de bovin (*bovin serum albumin*, BSA, Miltenyi Biotec), les cellules sont perméabilisées par une solution de D-PBS 1X contenant 0,5% de Triton. Après deux étapes supplémentaires de lavage avec la solution de D-PBS 1X contenant 3% de BSA, et une étape de coloration avec le colorant Hoechst permettant de déterminer la phase du cycle cellulaire, la détection de l'EdU et du Hoechst est réalisée par cytométrie en flux (FACSCanto™II).

3.1.5 Etude de l'apoptose

L'étude de l'apoptose est réalisée par un marquage Annexin V des cellules UKE-1 et HEL. En pratique, les cellules UKE-1 et HEL sont mises en culture avec ou sans pioglitazone à 10 µM. Au 6^{ème} jour de culture, les cellules sont lavées avec du D-PBS 1X et suspendues dans le tampon de marquage de l'Annexin V (tampon de liaison). L'Annexin V couplée à l'APC (référence indiquée dans le **Tableau 7**) est ajoutée dans le tampon de liaison contenant les cellules. Après une incubation de 25 minutes à température ambiante, les cellules subissent une étape de lavage avec le tampon de liaison

puis sont resuspendues dans cette même solution. Enfin une dernière incubation avec de l'iodure de propidium ou du 7-AAD (BD pharmingen™) permet de marquer les cellules mortes. Le pourcentage de cellules en apoptose marquées par l'Annexin V-APC est estimé par cytométrie en flux (FACSCanto™II).

3.1.6 Etude du potentiel clonogénique

Le potentiel clonogénique des cellules des lignées HEL et UKE-1 et des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ est évalué en culture semi-solide. Les cellules sont mises en culture 48h avec ou sans pioglitazone à 20μM dans les conditions décrites plus haut. Ensuite, un volume de cette suspension cellulaire est mis en culture dans un milieu methylcellulose comprenant des cytokines recombinantes humaines (MethoCult™H4434, StemCell™Technologies). Les cultures semi-solides sont maintenues 12 à 14 jours. Enfin, les cellules formant des colonies (CFC, *colony forming cells*) sont comptées et reparties en catégories en fonction de leur aspect cytologique.

3.2 Etude de la fibrose *in vitro*

3.2.1 Sources cellulaires

Le potentiel anti-fibrotique de l'activation de PPARγ a été testé sur plusieurs sources de fibroblastes médullaires : la lignée MS5, cellules de stroma médullaire murin (ACC 441, DSMZ), la lignée HS5, cellules de stroma médullaire humain (ATCC® CRL-11882™) et des cellules primaires de stroma médullaire humain. Les cellules primaires de stroma médullaire humain proviennent de la moelle osseuse de patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Brièvement, après tri des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ tel que précédemment décrit, la fraction cellulaire CD34⁻ est mise en culture dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO™) supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et 1% de pénicilline-streptomycine-néomycine. Après 24h, les cellules adhérentes sont visibles au microscope. La moitié du milieu de culture est changé toutes les 48h jusqu'à confluence des cellules adhérentes à 80-90% de la surface du support. Une fois cette confluence obtenue, l'intégralité du milieu est retirée, les cellules adhérentes sont lavées avec du D-PBS 1X puis sont détachées du support avec une solution de trypsine-EDTA à 0,05% (GIBCO™). Après un second lavage au D-PBS 1X, les cellules sont suspendues dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et 1% de pénicilline-streptomycine-néomycine. La stratégie de passages successifs des cellules permet de ne conserver en culture que les cellules stromales dont le potentiel d'adhésion est fort et d'exclure progressivement les macrophages.

3.2.2 Conditions de culture

Toutes les cellules stromales sont maintenues en culture dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et 1% de pénicilline-streptomycine-néomycine dans un incubateur permettant de maintenir une température à 37°C dans une atmosphère humide comprenant 5% de CO₂.

3.2.3 Induction des gènes cibles de la fibrose par le TGF-β1

Les cellules stromales adhérentes sont détachées de la flasque de culture et suspendues dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et 1% de pénicilline-streptomycine-néomycine selon la procédure décrite précédemment puis réparties à 100 000 cellules par puits dans une plaques 24 puits. Après 24h, l'adhésion des cellules et leur confluence satisfaisante (soit 70 à 80% de la surface du puits) sont vérifiées au microscope. La pioglitazone est ajoutée à H-1 à la concentration finale de 10 ou 20 μM. Puis, afin d'induire la transcription des gènes cibles de la fibrose, du TGF-β1 (Recombinant Human TGF-beta 1 Protein, R&D Systems) à la concentration finale de 5ng/mL est ajouté au milieu de culture à H0. L'ajout simultané d'un inhibiteur du récepteur au TGF-β1, le composé chimique nommé SB431542 (4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide, StemCell™Technologies) permet de vérifier que l'induction des gènes cibles est bien liée au TGF-β1. Les cellules stromales sont ensuite replacées en culture pour 5 heures. A H5, l'intégralité du milieu est retiré, et après un lavage avec du D-PBS 1X, les cellules sont suspendues dans 350 μL d'un tampon de permettant secondairement l'extraction des ARNs.

3.2.4 Quantification de la transcription des gènes cibles de la fibrose par RT-qPCR

La quantification de la transcription des gènes cibles de la fibrose dans les différentes conditions de stimulation est réalisée par PCR (*polymerase chain reaction*), après une étape de rétrotranscription, en temps réel (RT-qPCR). Après la lyse des cellules stromales dans le tampon adéquat, l'extraction de l'ARN est réalisé avec le kit « RNAqueous Total RNA isolation Kit » (Ambion, Invitrogen™) selon les recommandations du fabricant. L'intégralité de l'ARN extrait est ensuite soumise à une étape de rétrotranscription utilisant la rétrotranscriptase SuperScript™ IV VILO™ (Invitrogen™) et son tampon afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). Enfin, la réaction d'amplification est effectuée en présence de 2 μL d'ADNc, de 4 pM de chacune des amorces, de 12,5 μL d'un mélange contenant les 4 déoxyribonucléotides (dNTP) et l'enzyme Taq polymérase (SYBR® Green PCR Master Mix, SYBR®) et d'eau stérile pour un volume final de 25μL. Toutes les PCR ont été réalisées avec un appareil BioRad CFX96 (Bio-Rad). La quantification de la transcription du gène d'intérêt dans un échantillon est rapportée à la quantification de la transcription de la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), utilisée comme gène de ménage, dans ce même échantillon. Les séquences des différentes amorces utilisées sont indiquées dans le **Tableau 8**.

3.2.5 Etude de la phosphorylation des Smads

La phosphorylation des Smads est évaluée par cytométrie en flux (FACSCanto™II) à l'aide d'un anticorps anti-Smad2(pS465/pS467)/Smad3(pS423/pS425) (clone O72-670, BD Phosflow™ Smad Monoclonal Antibodies, BD Pharmingen™). Le clone O72-670 reconnaît le Smad2 humain et le Smad2 murin lorsque Smad2 est phosphorylé sur les sérines 465 et 467 et reconnaît le Smad3 humain et le Smad3 murin quand Smad3 est phosphorylé sur les sérines 423 et 425. Ce clone ne reconnaît pas les formes non phosphorylées des protéines. En pratique, des cellules stromales MS5 et HS5 sont stimulées par le TGF-β1 en présence ou non de pioglitazone à 20μM selon la procédure décrite précédemment. Après différents temps d'incubation allant de 1h à 5h, les cellules sont détachées et lavées avec du D-PBS 1X, puis subissent une étape de perméabilisation de 30 minutes dans du tampon froid (Phosflow Perm Buffer III). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois et resuspendues dans un tampon de coloration composé de D-PBS 1X avec 1% de SVF et 0,09% d'azide de sodium. Puis, les cellules sont marquées dans ce tampon avec l'anticorps anti-Smad couplé au fluorochrome PE (phycoerythrin) pendant 30 minutes. Enfin, elles subissent deux lavages supplémentaires avec le D-PBS 1X contenant 1% de SVF et 0,09% d'azide de sodium et sont analysées par cytométrie en flux (FACSCanto™II).

3.2.6 Etude des voies de signalisation par inhibiteurs chimiques

L'inhibition des voies de signalisation du TGF-β1 est évaluée en utilisant des inhibiteurs chimiques. Les cellules stromales MS5 et/ou HS5 et/ou primaires sont mises en culture

- 24h avec le C646 (4-[4-[[5-(4,5-Dimethyl-2-nitrophenyl)-2-furanyl]methylene]-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-pyrazol-1-yl]benzoic acid, Sigma-Aldrich), un inhibiteur de l'histone acétyltransférase du co-facteur de transcription p300/CBP.
- 1h avec le SP600125 (MedChemExpress), un inhibiteur sélectif et réversible de JNK.
- 1h avec l'U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)-butadiene, InvivoGen), un inhibiteur sélectif des MAP kinase kinases MEK1 et MEK2.

Les cellules sont ensuite stimulées par le TGF-β1 en présence ou non de pioglitazone à 10μM selon la procédure décrite précédemment. L'étude de la transcription des gènes cibles du TGF-β1 est réalisée selon la procédure décrite précédemment.

3.2.7 Etude du rôle du co-facteur p300

3.2.7.1 Surexpression du co-facteur de transcription p300

La surexpression du co-facteur de transcription p300 est obtenue par transduction lentivirale des cellules stromales MS5. Le transgène de la p300 humaine ou le transgène d'une forme mutée de la p300 humaine déficiente pour l'activité histone acétyltransférase (HAT, mutation : H141A E1423A

Y1424A L1428S Y1430A H1434A), provenant respectivement des plasmides pcDNA3.1-p300 et pcDNA3.1-300(HAT-) (addgen), a été introduit par des techniques de digestion et de ligation enzymatiques classiques dans des plasmides lentiviraux qui permettent l'expression de la GFP (*green fluorescent protein*) et d'un gène de résistance à la puromicine (SV40-GFP-2A-Puro), sous contrôle du promoteur CMV. Les plasmides complets ont été transférés par choc thermique dans des bactéries *Escherichia coli* compétentes (MAX Efficiency™ Stbl2™ Competent Cells, Invitrogen™). Les clones bactériens contenant le plasmide ont été sélectionnés par résistance antibiotique et vérifiés par PCR. La culture bactérienne des clones sélectionnés a été amplifiée puis l'ADN plasmidique a été purifié à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (Macherey Nigel). Les lentivirus sont produits par transfection de cellules HEK293T (*Human Embryonic Kidney*) par 3 plasmides : pLenti-2A, codant pour des gènes de la machinerie virale, pLenti-2B codant pour l'enveloppe VSVG (ABM®) et le plasmide d'intérêt. La transfection est réalisée par une technique classique de co-précipitation avec le phosphate de calcium en présence des 3 plasmides en quantité stoechiométrique. Les lentivirus ont été récupérés par ultracentrifugation du milieu de culture des cellules HEK293T. Nous avons produit trois lentivirus différents : un lentivirus comprenant le transgène de la p300, un lentivirus contenant le transgène de la forme déficiente de la p300 et un lentivirus ne comprenant pas de transgène (contrôle).

Des cellules stromales MS5 sont mises en culture à raison de 40 000 cellules/puits en plaque 48 puits dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et 1% de pénicilline-streptomycine-néomycine et sont transduites avec la suspension virale concentrée. Les cultures sont maintenues 48h puis les cellules stromales sont stimulées par le TGF-β1 en présence ou non de pioglitazone à 10μM selon la procédure décrite précédemment. L'étude de la transcription des gènes cibles du TGF-β1 est réalisée selon la procédure décrite précédemment.

3.2.7.2 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq)

Afin de mieux cerner l'implication du co-facteur de transcription p300, nous avons réalisé une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (*chromatin immunoprecipitation sequencing*, ChIP-seq) avec un anticorps dirigé contre le co-facteur p300 murin (Santa Cruz Biotechnology, référence B0201). En parallèle, une immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps dirigé contre la protéine c-jun murine (Santa Cruz Biotechnology, référence A2413) a permis d'appréhender une potentielle implication du complexe de transcription AP-1 dans la mécanistique. Brièvement, des cellules stromales MS5 sont mises en culture à 3.10⁶ cellules par flasque de 175 cm². Les cellules sont stimulées par du TGF-β1 à la concentration de 10 ng/mL en présence ou non de pioglitazone à 20 μM. Après 5h d'incubation à 37°C dans une atmosphère humide comprenant 5% de CO₂, les cellules sont fixées selon les recommandations du fabricant (société Active Motif). Toutes les étapes de la sonication de l'ADN jusqu'à sa purification ainsi que le séquençage de l'ADN ont été réalisées par la

société Active Motif. L'analyse des résultats de cette expérience s'est effectuée en collaboration avec l'équipe d'Eric Soler (Labex EPIGENMED, Montpellier, France).

3.3 Etude du potentiel thérapeutique de l'activation de PPAR γ dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs

Toutes les expériences *in vivo* ont été approuvées par le comité d'éthique local (projet numéro 16_032) et autorisées par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche.

3.3.1 Provenance des souris

Les souris sont sur un fond génétique C57BL/6. Pour les expériences de transplantation, des souris possédant soit le variant CD45.1 soit le variant CD45.2 de l'allèle du CD45, porté par toutes les cellules hématopoïétiques nucléées, sont utilisées. Toutes les souris possédant le variant CD45.2 (dénommées souris 45.2 dans la suite du manuscrit) proviennent d'un élevage commercial (Charles River Laboratories) et sont des femelles âgées de 6 à 8 semaines. Les souris portant le variant CD45.1 (dénommées souris 45.1 dans la suite du manuscrit) sont des souris mâles et/ou femelles âgées de 6 à 8 semaines provenant de l'élevage de l'animalerie du CEA et fournis par Karine Sii-Felice. Les souris 45.2 exprimant constitutionnellement JAK2^{V617F} (dénommées souris KI, pour *knock-in*, JAK2^{V617F} dans la suite du manuscrit) sont des mâles et/ou des femelles âgées de 6 à 8 semaines et sont fournies par Jean-Luc Villeval (Gustave Roussy, Villejuif, France). Les souris exprimant constitutionnellement JAK2^{V617F} et la GFP (dénommées souris KI JAK2^{V617F}- GFP dans la suite du manuscrit) sont des mâles et/ou des femelles âgées de 6 à 8 semaines et sont également fournies par Jean-Luc Villeval.

3.3.2 Procédure de transplantation

Les souris receveuses reçoivent une irradiation corporelle totale de 10 Grays à raison de 1 Gy/min, 24h avant la transplantation des cellules hématopoïétiques dans un irradiateur à rayonnement γ . Après anesthésie de la souris receveuse par injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et de kétamine, la transplantation s'effectue par injection de 100 à 200 μ L de suspension cellulaire au niveau du sinus rétro-orbital. Après transplantation, les animaux reçoivent un antibiotique, la néomycine, pendant 14 jours dans l'eau de boisson (néomycine-sulfate, 2mg/mL, Sigma-Aldrich®).

3.3.3 Modèles murins

Les modèles murins utilisés pour évaluer la pertinence de l'activation de PPAR γ *in vivo* ont été développés initialement par l'équipe de Jean-Luc Villeval.

3.3.3.1 Modèle de myélofibrose TPO^{high}

Ce modèle est obtenu par transduction des progéniteurs hématopoïétiques murins par un rétrovirus TPO. Brièvement, la moelle osseuse des souris donneuses 45.1 est récupérée 4 jours après

une injection intra-péritonéale de 150mg/kg de 5-fluorouracile (5-FU) par rinçage de la cavité médullaire des fémurs. Après lyse des érythrocytes dans la solution de lyse dite solution de Hayem, les progéniteurs hématopoïétiques sont mis en culture sur un stroma de cellules GP+E86, produisant en continu un rétrovirus contenant le transgène de la TPO murine (fournies par Jean-Luc Villeval). Cette co-culture est maintenue 3 jours dans un milieu DMEM avec 20% de SVF et enrichi en cytokines murines IL3, SCF et TPO provenant respectivement des surnageant de culture de cellules WEHI, BMK/HKL et FDCP. Ensuite, les progéniteurs hématopoïétiques sont lavés et resuspendus dans du D-PBS 1X. La suspension cellulaire est immédiatement transplantée dans des souris receveuses 45.2 irradiées de façon létale. Au total, environ 200 000 cellules sont transplantées par souris. Après reconstitution hématopoïétique, les animaux développent une hyperleucocytose majeure, une thrombocytose et une fibrose médullaire rapide et sévère dès la 10^{ème} semaine post transplantation¹⁹⁹. Bien que non physiologique, ce modèle a l'intérêt d'être rapide et la totalité des animaux développent une fibrose médullaire. Le taux de TPO circulant chez les souris receveuses a été mesuré par méthode immunoenzymatique de type sandwich (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) à l'aide du kit Mouse Thrombopoietin Quantikine® ELISA kit (R&D system®). Ce modèle est nommé TPO^{high} dans le manuscrit (**Figure 16**).

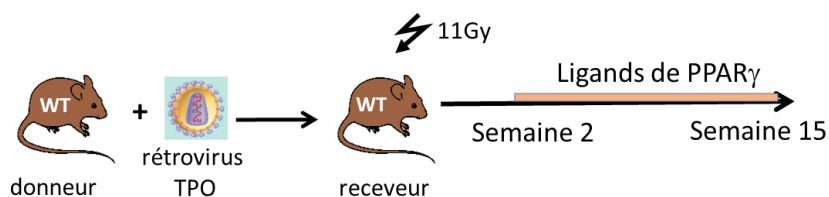


Figure 16 : Représentation schématique du modèle murin TPO^{high}.
WT: wild type (sauvage). Gy: Gray.

3.3.3.2 Modèle de myélofibrose post-polyglobulie de Vaquez JAK2^{V617F}

Ce modèle est obtenu en transplantant un mélange composé de 30% de moelle osseuse totale provenant d'une souris 45.2 KI JAK2^{V617F} et de 70% de moelle osseuse totale provenant d'une souris 45.1 dans une souris receveuse 45.2 irradiée de façon létale. Environ 3.10⁶ cellules sont transplantées par souris. Ce modèle est proche de la physiopathologie humaine, les souris développent en 4 à 6 semaines un phénotype de polyglobulie de Vaquez avec un hémocrite élevé, une hyperleucocytose modérée, une thrombocytose et une splénomégalie. L'évolution naturelle se fait vers la fibrose médullaire secondaire, environ 24 semaines après la transplantation de moelle osseuse et pour 70% des animaux¹⁵⁵. Ce modèle est nommé MF post-PVJAK2^{V617F} dans le manuscrit (**Figure 17**).

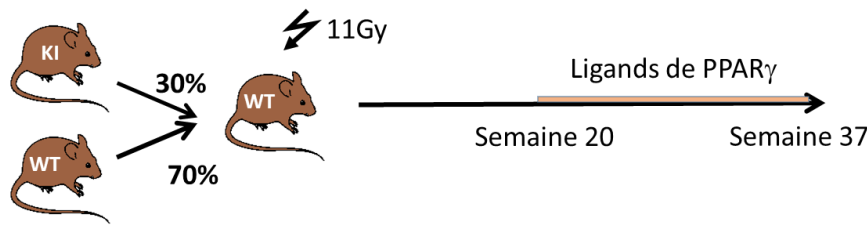


Figure 17 : Représentation schématique du modèle murin MF post-PV JAK2^{V617F}.
MF: myélofibrose. PV: polyglobulie de Vaquez. KI: knock-in. WT: wild type (sauvage). Gy: Gray.

3.3.3.3 Modèle JAK2^{V617F}-GFP

Pour les expérimentations concernant le potentiel anti-prolifératif des agonistes de PPAR γ *in vivo*, le modèle de polyglobulie de Vaquez JAK2^{V617F} a été reproduit selon les mêmes modalités avec des souris donneuses KI JAK2^{V617F}-GFP, permettant d'estimer la proportion de cellules hématologiques provenant du clone muté chez les souris receveuses par cytométrie en flux. Ce modèle est nommé JAK2^{V617F}-GFP dans le manuscrit (**Figure 18**).

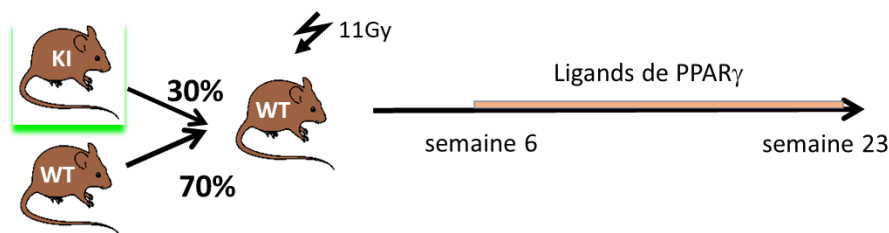


Figure 18 : Représentation schématique du modèle murin JAK2^{V617F}-GFP.
KI: knock-in. WT: wild type (sauvage). Gy: Gray.

3.3.3.4 Modèle Calréticuline

Ce modèle est obtenu par transduction des progéniteurs hématopoïétiques par un rétrovirus porteur du transgène de la forme mutée de la calréticuline (mutation *CALRdel52*). La première étape pour reproduire ce modèle a été d'établir une lignée de cellules stromales productrices du rétrovirus *CALRdel52* et d'une lignée productrice du rétrovirus *CALR* non muté, dénommé *CALRWT* pour *wild type* et utilisé comme contrôle. Nous avons utilisé une lignée humaine dérivée de la lignée HEK293 nommée Platinum-E ou Plat-E (RV-101, Cell Biolabs, Inc). Cette lignée intègre de façon stable un plasmide permettant l'expression des gènes viraux Gag-Pol et de l'enveloppe écotrope du Moloney Murine Leukemia Virus (respectivement sous la sélection de la blasticidine et de la puromycine). Afin d'obtenir une lignée productrice, nous avons transduit cette lignée avec un vecteur rétroviral pseudotypé VSVG et permettant l'expression de *CALRdel52* ou *CALRWT* et de la GFP, fournis par Caroline Marty (Gustave Roussy, Villejuif, France)¹⁵⁹. Les clones Plat-E *CALRdel52* ou Plat-E *CALRWT* ont été mis en expansion puis sélectionnés en fonction de l'expression de la GFP par tri cellulaire (FACS Aria, BD Biosciences) afin d'obtenir en production le meilleur titre viral possible.

Les cellules Plat-E CALRdel52 et CALRWT sélectionnées sont ensuite mises en culture dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et 1% de pénicilline-streptomycine-néomycine. Après 72h de culture, le milieu est récupéré et les particules virales sont concentrées par centrifugation tangentielle. La capacité de transduction du surnageant viral ainsi obtenu a d'abord été testé *in vitro* sur des progéniteurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse des souris récupérés 4 jours après une injection intra-péritonéale de 150 mg/kg de 5-FU. Le taux de transduction estimé par cytométrie en flux sur l'expression de la GFP par les progéniteurs hématopoïétiques est de 50%. Afin de reproduire le modèle murin Calréticuline, la moelle osseuse des souris donneuses 45.1 est récupérée par rinçage de la cavité médullaire des fémurs 4 jours après une injection intra-péritonéale de 150 mg/kg de 5-FU. Après lyse des érythrocytes, les cellules hématopoïétiques sont activées en culture dans du milieu StemSpan™ contenant les cytokines suivantes : SCF 100 ng/mL, TPO 20 ng/mL, FLT3-ligand 100 ng/mL, IL3 20ng/mL, IL6 20 ng/mL (jour 1). Après 24h, le surnageant viral concentré est ajouté au milieu de culture (jour 2) et les cellules sont maintenues en culture avec ce surnageant pendant 48h (jours 2 et 3). Enfin les cellules hématopoïétiques sont lavées et resuspendues dans du D-PBS 1X puis immédiatement transplantées dans des souris receveuses 45.2 irradiées de façon létale (jour 4). Au total, environ 200 000 cellules sont transplantées par souris. Dans ce modèle, les souris développent une thrombocytose modérée et l'évolution naturelle se fait vers la fibrose médullaire pour tous les animaux, en 6 à 9 mois¹⁵⁹. Ce modèle est nommé Calréticuline dans le manuscrit (**Figure 19**).

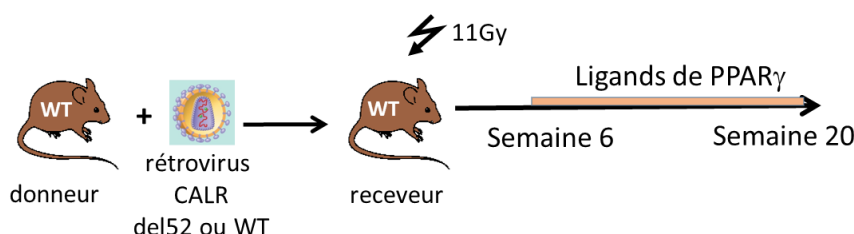


Figure 19 : Représentation schématique du modèle murin Calréticuline.

CALRdel52 : rétrovirus contenant le gène de la calréticuline mutée. CALRWT : rétrovirus contenant le gène de la calréticuline sauvage. WT: wild type (sauvage). Gy: Gray

3.3.4 Traitement des souris par les ligands de PPAR γ

Quel que soit le modèle murin, chaque groupe de traitement comprend huit à dix souris. Chaque souris est identifiée après la transplantation et avant le début du traitement en insérant par voie sous cutanée au niveau dorsal une puce contenant un numéro d'identification unique. Les souris ont été réparties dans les groupes de traitement après transplantation par tirage au sort (www.randomization.com). Le traitement par ligands de PPAR γ est donné par voie orale dans des croquettes contenant de la pioglitazone (Actos®, Takeda) à la dose de 250 mg/kg de nourriture, des croquettes contenant de la mésalazine (Sigma-Aldrich) à la dose 2500 mg/kg de nourriture ou des

croquettes contrôles (C1000). Toutes les croquettes ont été fabriquées sur commande et proviennent d'Altromin.

Les souris du modèle TPO^{high} sont traitées à partir de la semaine 2 et jusqu'à euthanasie à la semaine 15. Les souris du modèle MF post-PVJAK2^{V617F} sont traitées à partir de la semaine 22 et jusqu'à euthanasie à la semaine 37. Les souris du modèle JAK2^{V617F}-GFP sont traitées à partir de la semaine 6 et jusqu'à euthanasie à la semaine 23. Les souris du modèle Calréticuline sont traitées à partir de la semaine 6 et jusqu'à euthanasie à la semaine 20.

3.3.5 Prélèvements issus des souris

3.3.5.1 Prélèvements sanguins

Des prélèvements de sang veineux itératifs de 100 à 200µL ont été réalisés soit au niveau du sinus rétro-orbital soit au niveau de la veine mandibulaire. Une partie du prélèvement sanguin est soumis à deux étapes de centrifugation afin de récupérer le plasma qui est conservé à -80°C. Le culot cellulaire subit une étape de lyse des globules rouges puis deux étapes de lavage au D-PBS 1X et est conservé à -20°C.

3.3.5.1.1 Hémogrammes

Tous les hémogrammes ont été réalisés sur un appareil scil Vet abc® (scil).

3.3.5.1.2 Quantification de la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation par RT-qPCR

Le culot cellulaire conservé après chaque prélèvement sanguin itératif est lysé dans le tampon adéquat puis les échantillons sont préparés selon la procédure précédemment décrite. Les séquences des différentes amorces utilisées sont indiquées dans le **Tableau 8**.

3.3.5.2 Prélèvements médullaires

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale en fin d'expérimentation. Après dissection, la cavité médullaire d'un fémur par souris est rincée dans un volume constant (100 µL).

3.3.5.2.1 Etude de la cellularité médullaire et du potentiel clonogénique

Une partie de la suspension cellulaire obtenue par rinçage de la cavité médullaire est marquée par un mélange d'anticorps monoclonaux et comptée par cytométrie en flux. Ce comptage absolu est réalisé dans les tubes BD Trucount™ (BD Biosciences). Ces tubes contiennent un nombre défini de billes fluorescentes, le nombre absolu de cellules est déterminé en comparant le nombre d'évènements cellulaires au nombre de billes. Une autre partie de cette suspension cellulaire est mise en culture semi-solide dans un milieu méthylcellulose comprenant des cytokines recombinantes (MethoCult™ GF M4434, StemCell™ Technologies) pour l'analyse du potentiel clonogénique des progéniteurs myéloïdes. Les cultures semi-solides sont maintenues 14 jours dans un incubateur à une température

de 37°C, dans une atmosphère humide comprenant 5% de CO₂. Enfin, les cellules formant des colonies (CFC) sont comptées et réparties en catégories en fonction de leur aspect cytologique.

3.3.5.2.2 Etude de la population médullaire Lin-Sca⁺ Kit⁺ (LSK)

Une partie de la suspension cellulaire obtenue après rinçage de la cavité médullaire d'un fémur par souris a permis l'étude de la population Lin-Sca⁺Kit⁺. Afin d'obtenir une déplétion en cellules différenciées, un mélange d'anticorps biotinylés anti-CD5, anti-CD45R(B220), anti-CD11b, anti-Gr1 (Ly-6G/C), antiCD7-4, et anti-Ter119 est ajouté au culot cellulaire selon les recommandations du fabricant (« Lineage Cell depletion Kit, Mouse », Miltenyi Biotec). Une seconde étape de marquage est réalisée avec un anticorps anti-biotine couplé à des microbilles. Le mélange billes/cellules est ensuite placé sur un aimant permettant de retenir les cellules différenciées liées aux billes et de récupérer la fraction Lin- (lignage négatif). Les cellules Lin- sont ensuite marquées par un anticorps anti-Sca.1 et un anticorps anti-CD117 ou Kit permettant d'identifier la fraction dite LSK. Un marquage supplémentaire avec un anticorps anti-CD34 permet de différencier les cellules LSK-CD34⁺ correspondant aux progéniteurs hématopoïétiques ayant un potentiel de repopulation à court terme, des LSK-CD34⁻, correspondant aux progéniteurs hématopoïétiques ayant un potentiel de repopulation à long terme. Les références des anticorps utilisés sont indiquées dans le **Tableau 7**.

3.3.5.3 Analyse anatomo-pathologique des fémurs et des rates

Après dissection, la rate est mesurée et pesée puis conservée, ainsi qu'un fémur et un lobe hépatique, dans une solution de D-PBS 1X contenant 4% de formaldéhyde. Les organes ainsi fixés sont inclus en paraffine puis des coupes de fémur et de rate sont colorées par une coloration hématoxyline-éosine (HE) qui permet d'apprécier la cellularité et par une coloration argentique qui permet de mettre en évidence les fibres de réticuline (plateau d'anatomo-pathologie de Gustave Roussy, Villejuf, France). L'ensemble des coupes a été lu par Jean-Luc Villeval.

3.4 Analyses statistiques

Pour les graphiques représentant les résultats de RT-qPCR ou de culture cellulaire, les valeurs sont représentées en moyenne +/- l'écart type standard pour au minimum 3 expériences indépendantes. Les analyses statistiques appariées et non-appariées ont été réalisées en utilisant respectivement les tests non-paramétriques : test de rang de Wilcoxon et test de Mann et Whitney (Statview). Les étoiles sur les figures correspondent à une valeur de $p < 0,05$.

Quatrième partie : Résultats expérimentaux

4.1 Effet de l'activation de PPAR γ sur la prolifération du clone hématopoïétique

4.1.1 Effet des ligands de PPAR γ sur la prolifération et la clonogénicité des cellules des lignées HEL et UKE-1 et des progéniteurs hématopoïétiques issus de patients

Afin de déterminer l'effet des ligands de PPAR γ sur la prolifération cellulaire du clone malin, nous avons cultivé des cellules des lignées HEL et UKE-1 porteuses de la mutation JAK2V617F, ainsi que des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de Polyglobulie de Vaquez et de Myélofibrose en présence de pioglitazone. L'effet de la pioglitazone a également été testé sur des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de sang de cordon et utilisés comme contrôle. Comme rapporté précédemment³⁷¹, nous avons constaté que la pioglitazone diminue de façon très modérée la prolifération et la clonogénicité des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de sang de cordon (**Figure 20**, C et G). En revanche, l'effet de la pioglitazone est beaucoup plus marqué sur la prolifération des cellules UKE-1 et HEL ainsi que sur celle des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de polyglobulie de Vaquez et de myélofibrose primitive ou secondaire et ce, avec un effet dose (10 et 20 μ M) (**Figure 20**, A et B). Nous avons également constaté que la pioglitazone (10 μ M) induit à la fois une réduction des progéniteurs CD45⁺ CD34⁺ et une réduction des cellules plus différenciées CD45⁺ CD34⁻ (**Figure 20**, C, D et E). Par ailleurs, une incubation de 48h avec la pioglitazone (10 μ M) dans le milieu de culture permet de restreindre le potentiel clonogénique des cellules de lignées et des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ de patients atteints de polyglobulie de Vaquez et de myélofibrose primitive ou secondaire avec une réduction significative du nombre de cellules formant des colonies au 14^{ème} jour de culture (**Figure 20**, F, H et I).

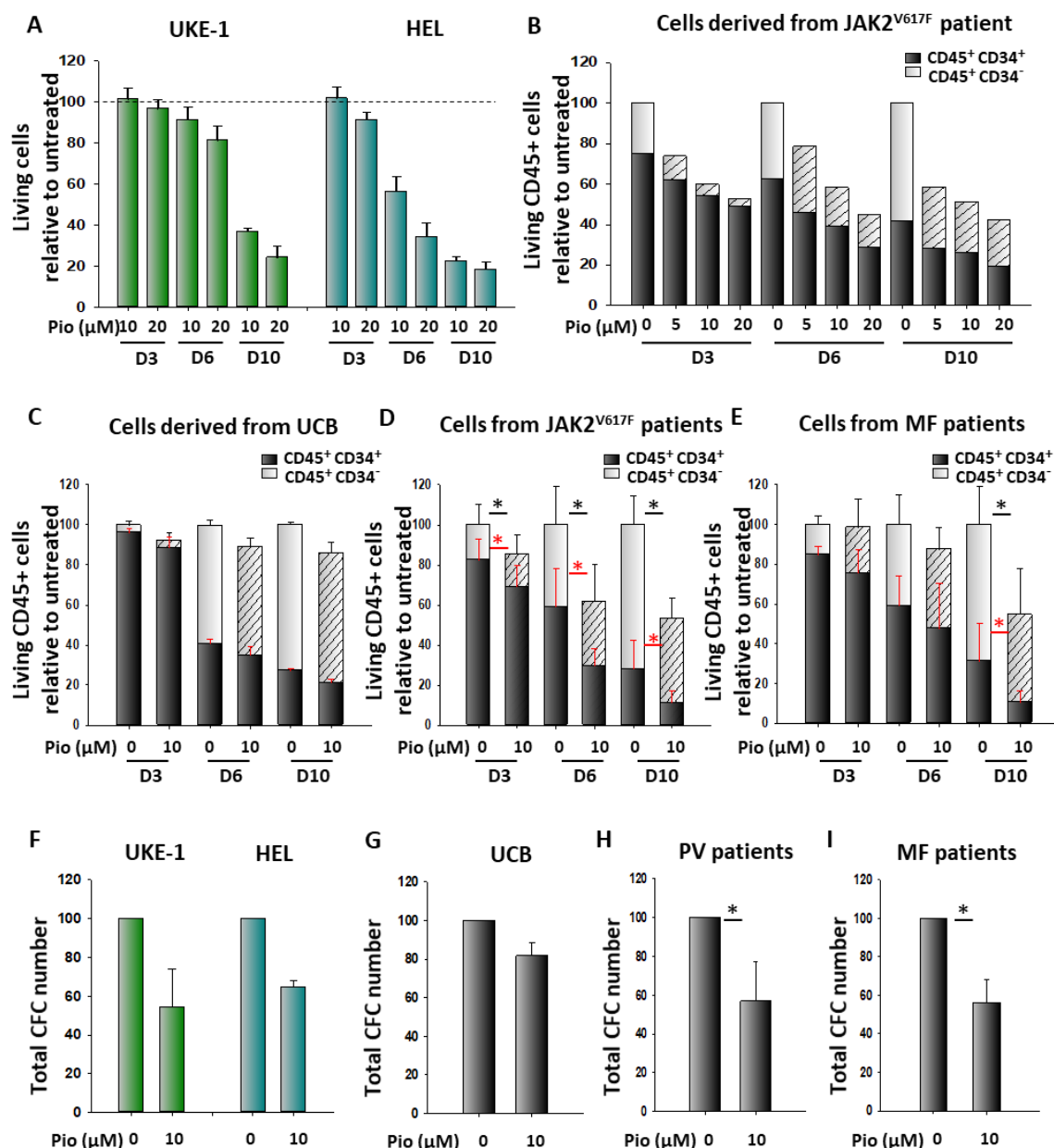


Figure 20 : Effet de la pioglitazone sur la prolifération et la clonogénicité des cellules UKE-1 et HEL et sur les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de PV et de MF.

Effet dose de la pioglitazone sur le nombre de cellules vivantes en culture sur A) cellules des lignées UKE-1 et HEL (n=4), B) progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de PV (n=1).

Effet de la pioglitazone sur le nombre de cellules vivantes, la prolifération et la différenciation sur C) cellules de sang de cordon ombilical (n=3), D) progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de PV (n=6), E) progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de MF (n=8).

Effet de la pioglitazone sur la clonogénicité F) des cellules des lignées UKE-1 et HEL (n=3), G) des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de sang de cordon ombilical (n=3), H) des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de PV (n=5), I) des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ issus de patients atteints de MF (n=6).

Piog: pioglitazone. PV: polyglobulie de Vaquez. MF: myélofibrose. UCB: umbilical cord blood (sang de cordon ombilical). D: day (jour). CFC: colony forming cell (cellules formant des colonies). Les différences statistiquement significatives (p<0,05) sont signifiées par *.

Afin de déterminer les mécanismes impliqués dans cet effet anti-prolifératif, nous avons évalué, dans les cellules des lignées UKE-1 et HEL, la proportion de cellules en apoptose par un marquage Annexin V en présence ou non de pioglitazone (10 μ M). Au sixième jour de culture, 7,5% des cellules UKE-1 et 5% des cellules HEL traitées par la pioglitazone sont en apoptose contre respectivement 3% et 2% des cellules non traitées (**Figure 21, A**) démontrant une augmentation de la mort cellulaire programmée induite par les ligands de PPAR γ . Nous avons également évalué l'effet de la pioglitazone sur le cycle cellulaire en comparant l'incorporation de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (Edu) et la proportion de cellules en phase G0/G1 des cellules UKE-1 et HEL cultivées en présence ou non de pioglitazone (10 μ M). Au sixième jour de culture, 30 % des cellules UKE-1 traitées sont en cycle contre 37% des cellules non traitées et 22% des cellules HEL traitées sont en cycle contre 34% des cellules non traitées (**Figure 21, B**). Cette réduction de la prolifération est associée à une augmentation de la proportion de cellules en phase G0/G1 : 68% des cellules UKE-1 et 73% des cellules HEL traitées par la pioglitazone sont en phase G0/G1 contre respectivement 60% et 61% des cellules non traitées (**Figure 21, C**).

L'ensemble de ces résultats *in vitro* suggère un effet anti-myeloprolifératif de l'activation de PPAR γ sur les cellules hématopoïétiques du clone malin.

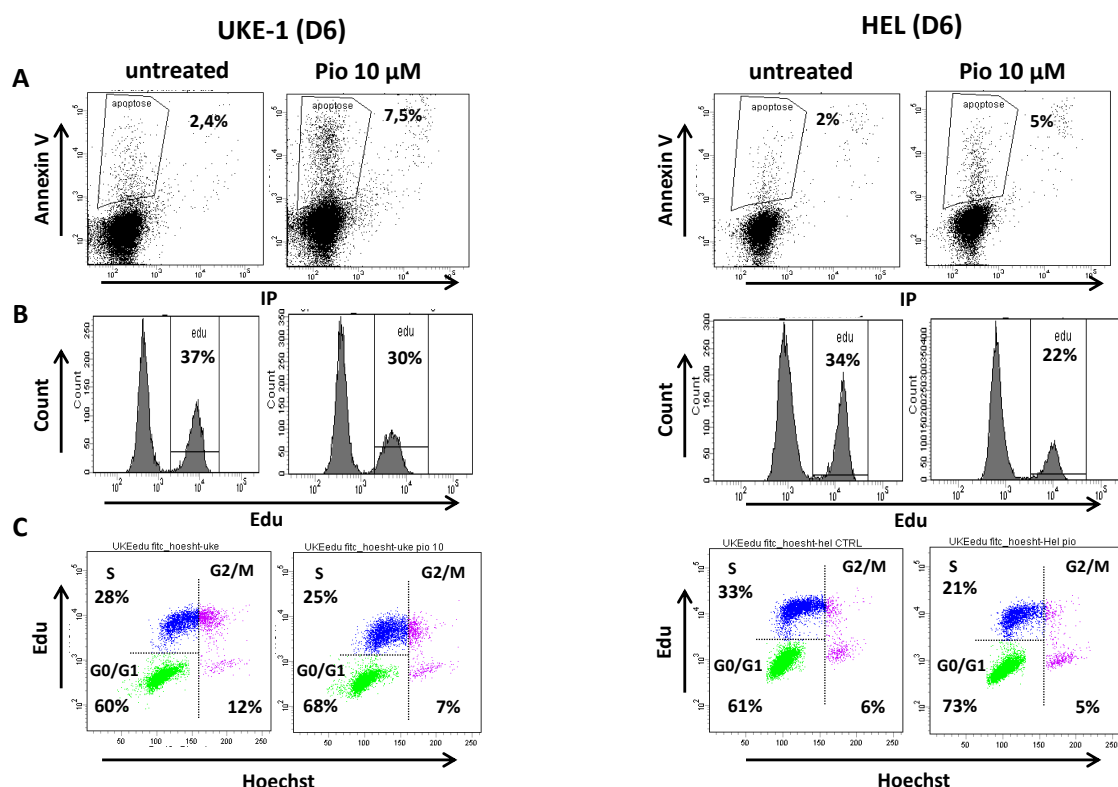


Figure 21 : Effet de la pioglitazone sur l'apoptose et le cycle cellulaire des cellules UKE-1 et HEL.

A) Proportion de cellules en apoptose. B) Proportion de cellules ayant incorporé l'Edu. C) Proportion de cellules en phase G0/G1. Les analyses sont effectuées après 6 jours de culture en présence ou non de pioglitazone (10 μ M). Pio: pioglitazone. D: day (jour). Edu: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine.

4.1.2 Effet des ligands de PPAR γ sur la prolifération dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs

In vivo, l'effet des ligands de PPAR γ sur la myéloprolifération a été testé dans des modèles pré-cliniques de néoplasmes myéloprolifératifs. Nous avons choisi de tester l'effet de la pioglitazone dans deux modèles murins de NMPs : le modèle de polyglobulie de Vaquez JAK2^{V617F}-GFP et le modèle de thrombocytemie essentielle Calréticuline (CALRdel52). Nous avons restreint notre étude à la période qui précède le développement de la myélofibrose afin de minimiser l'impact que pourrait avoir l'atteinte médullaire sur nos résultats.

4.1.2.1 Effet des ligands de PPAR γ sur le clone malin dans le modèle PVJAK2^{V617F}-GFP.

Nous avons reproduit le modèle de PV JAK2^{V617F} dans lequel les progéniteurs hématopoïétiques porteurs de la mutation expriment également la GFP (**Figure 22, A**). Nous avons traité les animaux à partir de la semaine 6 post-transplantation et nous avons effectué des prélèvements sanguins aux semaines 5 (avant traitement), 8, 10, 14 et 23 post-transplantation. La proportion de cellules sanguines circulantes provenant du clone malin JAK2^{V617F}-GFP est estimée par cytométrie en flux sur l'expression de la GFP. Le traitement par pioglitazone réduit significativement la proportion de cellules CD45+ JAK2^{V617F}-GFP circulantes par rapport aux animaux non traités (**Figure 22, B**) et cet effet est plus marqué dans les cellules myéloïdes CD11b+ (**Figure 22, C**). La réduction est visible dès deux semaines de traitement (semaine 8 post-transplantation) et se maintient dans le temps. Cet effet de la pioglitazone sur le clone malin est concordant avec l'effet anti-prolifératif retrouvé *in vitro*. Enfin, le traitement par pioglitazone permet également un contrôle partiel de la polyglobulie, avec un hémocrite moyen de 82% *versus* 73% à la semaine 10, 86% *versus* 76% à la semaine 14 et de 86% *versus* 75% à la semaine 23 ($p < 0,05$), respectivement chez les souris contrôles et chez les souris traitées (**Figure 22, D**). Cet effet sur l'hémocrite est plus tardif que l'effet sur le clone GFP puisqu'il est constaté après quatre semaines de traitement, possiblement en raison de la demi-vie longue des érythrocytes.

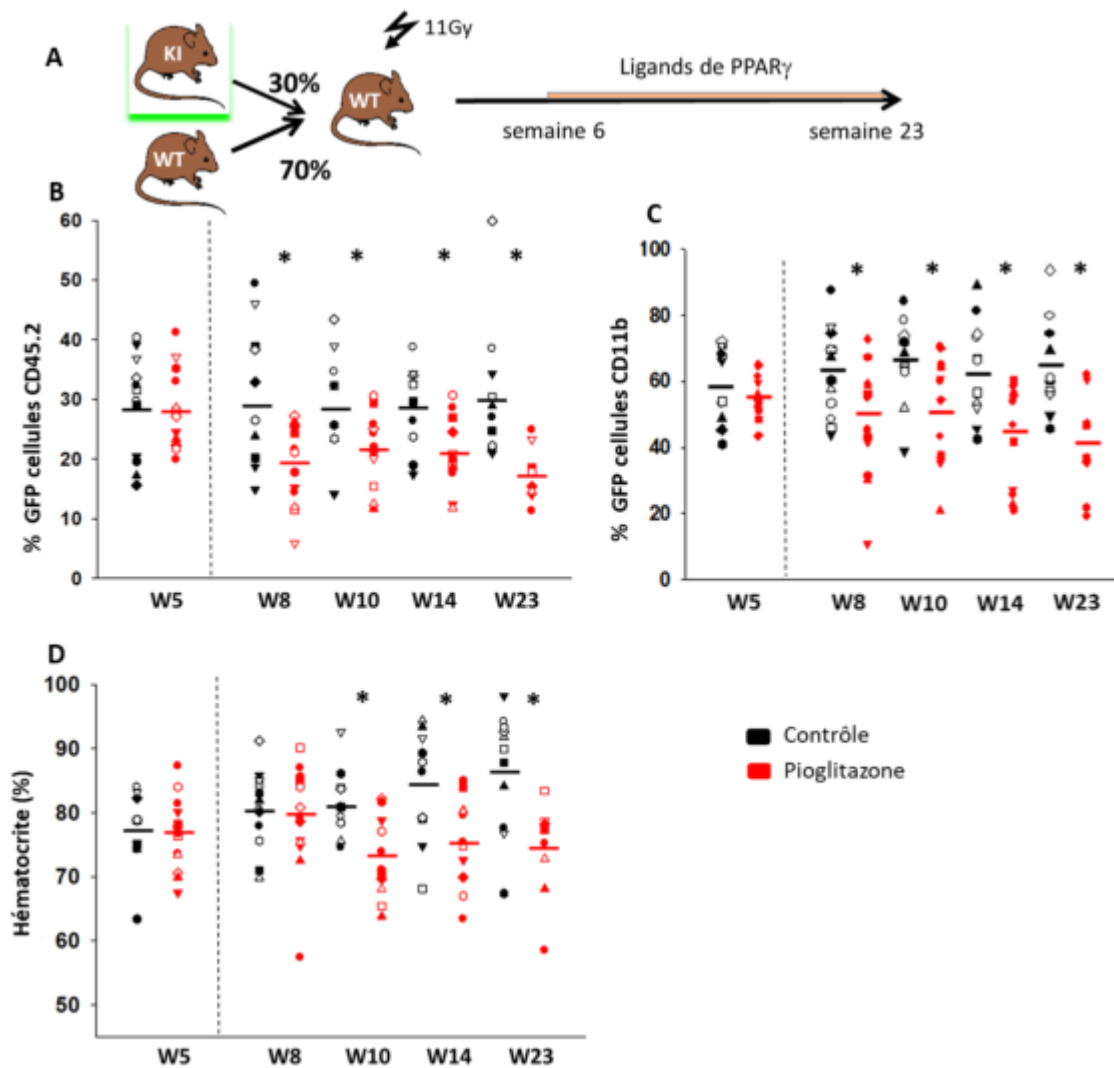


Figure 22 : Effet anti-prolifératif du traitement par pioglitazone dans le modèle murin JAK2^{V617F}-GFP. A) Représentation schématique du modèle murin JAK2^{V617F}-GFP. B) Proportion de cellules circulantes CD45.2+ JAK2^{V617F}-GFP en fonction du temps. C) Proportion de cellules circulantes myéloïdes CD11b+ JAK2^{V617F}-GFP en fonction du temps. D) Hématocrite en fonction du temps. KI: knock-in. WT: wild type. W: week (semaine). Gy: gray. La ligne en pointillé indique le début du traitement. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

Après euthanasie, la comparaison de la proportion de progéniteurs hématopoïétiques Lin⁻, Sca⁺, Kit⁺ (LSK) issus de la moelle osseuse montre que le nombre total de LSK est plus important chez les souris traitées que chez les souris non traitées. Cet effet est particulièrement marqué pour les progéniteurs hématopoïétiques à court terme définis comme les cellules LSK exprimant le CD34 (LSK CD34⁺) alors qu'il est très modeste pour les progéniteurs hématopoïétiques à long terme définis comme les cellules LSK n'exprimant pas le CD34 (LSK CD34⁻) (**Figure 23, A**). De plus, l'augmentation de la proportion des progéniteurs hématopoïétiques immatures s'accompagne d'une réduction de la fréquence des cellules LSK exprimant la GFP et issues du clone JAK2^{V617F}-GFP chez

les souris traitées, suggérant à nouveau que l'effet de la pioglitazone est plus important sur les cellules du clone malin. Toutefois cet effet n'est observable que dans le pool des LSK CD34+ correspondant aux progéniteurs à court terme (**Figure 23, B**).

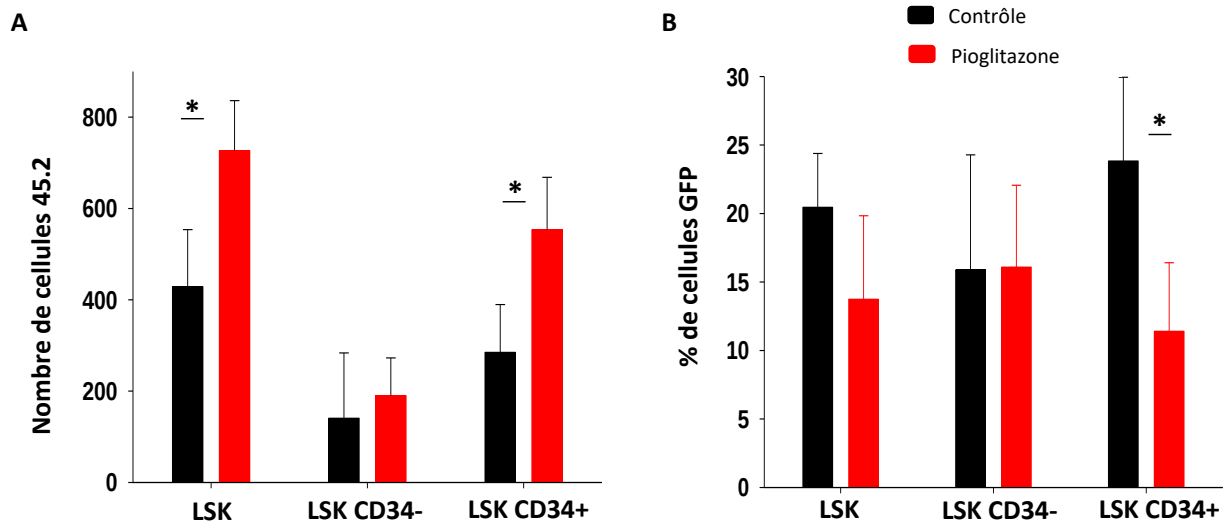


Figure 23 : Effet du traitement par pioglitazone sur les progéniteurs hématopoïétiques médullaires LSK dans le modèle JAK2^{V617F}-GFP.

A) Nombre de cellules CD45.2 LSK vivantes. B) Pourcentage des cellules LSK JAK2^{V617F}-GFP.

LSK: Lin-, Sca+, Kit+. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

4.1.2.2 Effet des ligands de PPAR γ sur le clone malin dans le modèle Calréticuline

Dans le modèle Calréticuline, les progéniteurs hématopoïétiques exprimant la mutation *CALRdel52* ou *CALRWT* expriment également la GFP (**Figure 24, A**). Nous avons traité les animaux par pioglitazone ou non à partir de la semaine 6 post-transplantation et nous avons effectué des prélèvements sanguins aux semaines 5 (avant traitement), 9, 12 et 15 post-transplantation. La proportion de cellules circulantes provenant du clone malin *CALRdel52*-GFP est estimée par cytométrie en flux sur l'expression de la GFP. Dans ce modèle, la proportion de cellules provenant du clone malin augmente avec le temps et le traitement par pioglitazone réduit de façon modeste et non significative la proportion de cellules sanguines *CALRdel52*-GFP provenant du clone (**Figure 24, B**). L'analyse de l'expression de la GFP dans les cellules myéloïdes CD11b+ montre une tendance à la réduction du clone plus marquée mais non significative (**Figure 24, C**). L'effet est visible dès trois semaines de traitement (semaine 9 post-transplantation) et se maintient dans le temps. De façon intéressante, bien que l'effet sur le clone semble modéré, le traitement permet un contrôle de la thrombocytose qui s'estompe avec le temps, avec une réduction du nombre de plaquettes de 49% à la semaine 9 ($p < 0,05$), 40% à la semaine 12 ($p < 0,05$) et de 38% à la semaine 15 (non significatif) (**Figure 24, D**).

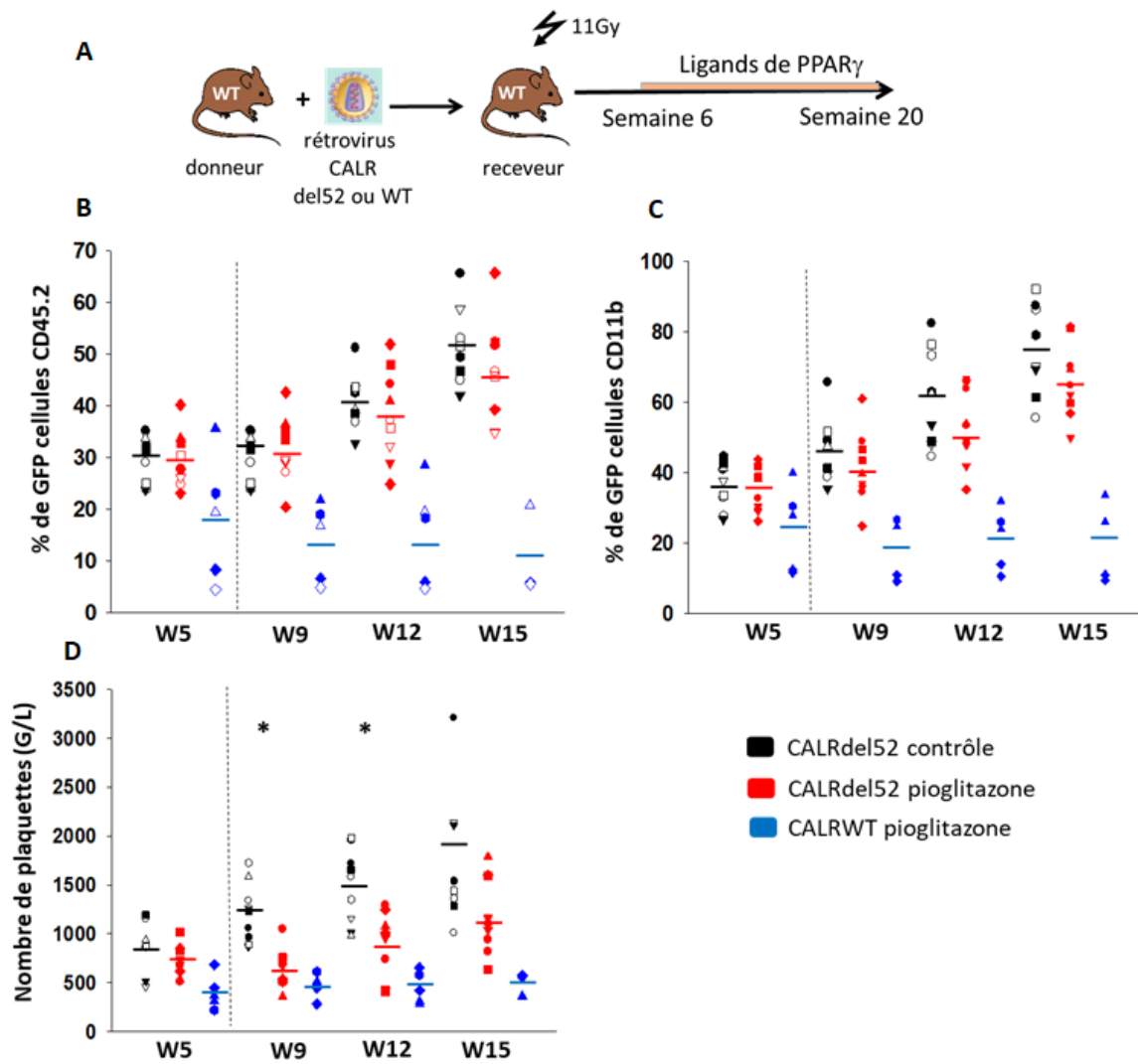


Figure 24 : Effet anti-prolifératif du traitement par pioglitazone dans le modèle murin Calréticuline.

A) Représentation schématique du modèle murin Calréticuline. B) Proportion de cellules circulantes CD45.2+ CALRdel52-GFP en fonction du temps. C) Proportion de cellules circulantes myéloïdes CD11b+ CALRdel52-GFP en fonction du temps. D) Taux de plaquettes en fonction du temps. WT: wild type. W: week (semaine). Gy: gray. La ligne en pointillé indique le début du traitement. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

L'ensemble de ces résultats met en évidence *ex vivo* et *in vivo* l'effet anti-prolifératif des ligands de PPAR γ sur le clone malin et montre que le traitement permet un contrôle partiel de la polyglobulie et de la thrombocytose en fonction du modèle.

4.2 Effet des ligands de PPAR γ sur le stroma médullaire et la fibrose

4.2.1 Effet des ligands de PPAR γ sur la transcription des gènes de la fibrose

Nous avons d'abord étudié l'effet d'un ligand de PPAR γ , la pioglitazone, sur la transcription d'un panel de gènes impliqués dans la fibrose dans trois types cellulaires : les lignées de cellules stromales médullaires murine MS5 et humaine HS5 et des cellules de stroma médullaire primaires. En stimulant les cellules stromales pendant 5h avec du TGF- β 1, nous avons mis en évidence l'induction de la transcription des gènes cibles suivants : *CCN2* (gène du CTGF) (**Figure 25**), *COL1A1* (gène du collagène de type 1 α 1, **Figure 26**, A1 et B1) et *FN1* (gène de la fibronectine, **Figure 26**, A2 et B2). Lorsque les cellules sont stimulées par le TGF- β 1, le taux d'ARNm du CTGF est multipliée par 120 dans les cellules MS5, 9 dans les cellules HS5 et 3 dans les cellules stromales primaires. L'ajout de pioglitazone (10 μ M et 20 μ M) dans le milieu de culture une heure avant la stimulation par le TGF- β 1 contrecarre l'induction des gènes cibles pro-fibrotiques dans les trois types cellulaires et ce avec un effet dose. Ainsi, avec une concentration de pioglitazone à 10 μ M, la réduction de l'induction de la transcription du gène du CTGF est de 67% dans les cellules MS5, 75% dans les cellules HS5 et 58% dans les cellules stromales primaires. L'ajout d'un inhibiteur du récepteur au TGF- β 1, le composé chimique SB431542, inhibe l'induction des gènes cibles du TGF- β 1, démontrant qu'il ne s'agit pas d'un effet hors cible (**Figure 25** et **Figure 26**). Nous avons également montré que la stimulation des cellules stromales par la pioglitazone induit la transcription de *PLIN2*, gène de la périlipine 2 et gène cible de PPAR γ et que l'augmentation du taux d'ARNm de la périlipine 2 n'est pas affecté par la présence de TGF- β 1 (**Figure 26**, A3 et B3).

Ces premiers résultats montrent que, dans les cellules stromales de moelle osseuse, l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ est capable de contrecarrer l'induction de gènes cibles du TGF- β 1 reconnus pour leur action pro-fibrotique. Cette inhibition de la transduction du signal du TGF- β 1 lors de l'activation du récepteur PPAR γ ne semble pas être réciproque puisque la présence de TGF- β 1 n'affecte pas l'induction de la périlipine 2 par PPAR γ .

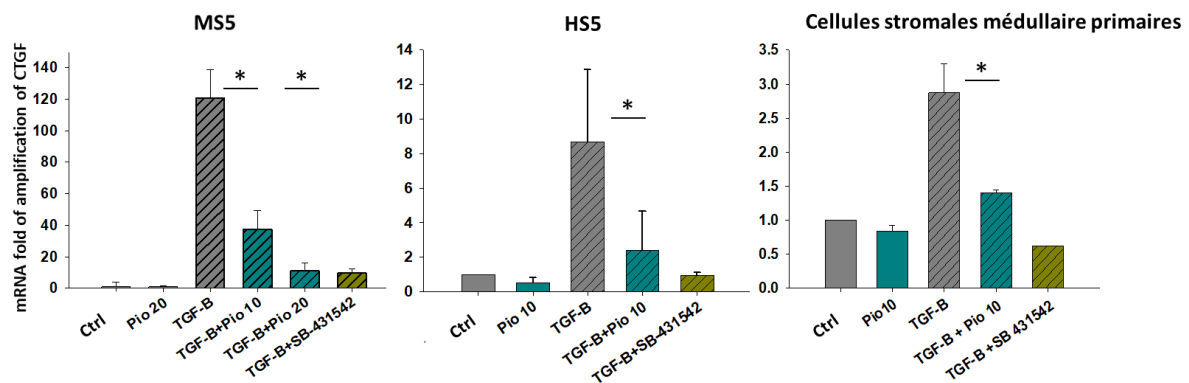


Figure 25 : Effet de l'activation de PPAR γ par la pioglitazone sur l'induction de la transcription du gène du CTGF.

MS5: cellules de lignée de stroma médullaire murin. HS5: cellules de lignée de stroma médullaire humain. CTGF: connective tissue growth factor. Ctrl: contrôle. Pio: pioglitazone. SB431542: inhibiteur du récepteur au TGF- β 1. Les différences statistiquement significatives (p<0,05) sont signifiées par *.

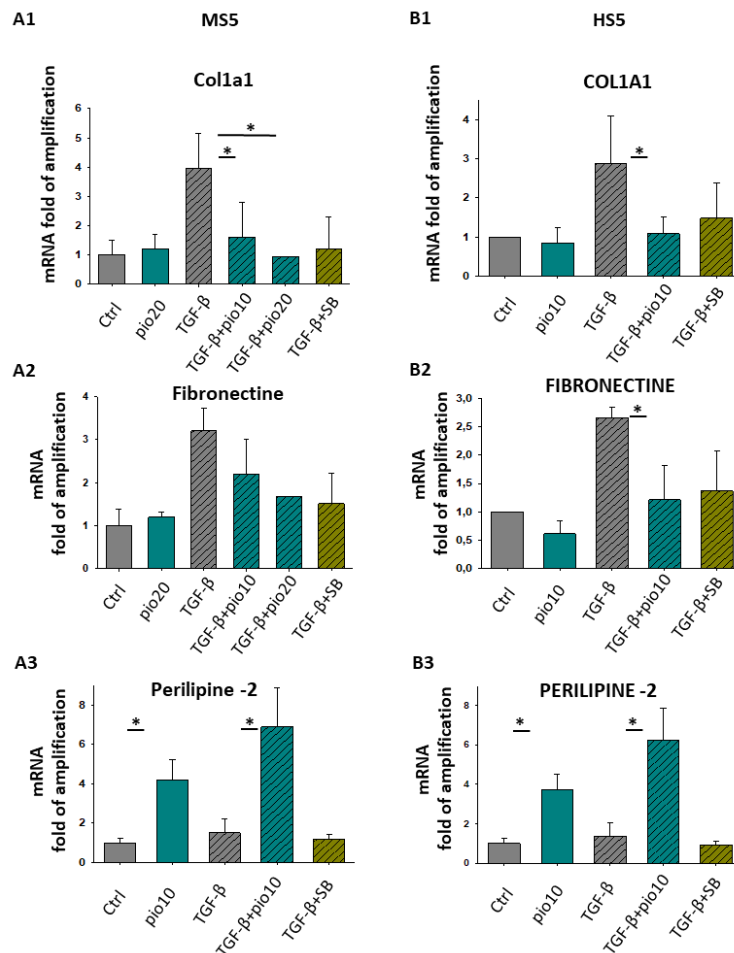


Figure 26 : Effet de l'activation de PPAR γ par la pioglitazone sur l'induction de la transcription des gènes cibles du TGF- β 1 et de PPAR γ .

A) dans les cellules stromales MS5. B) Dans les cellules stromales HS5. A1) B1) gène du collagène type 1 α 1. A2) B2) gène de la fibronectine. A3) B3) gène de la périlipine-2. Ctrl: contrôle. Pio: pioglitazone. SB431542: inhibiteur du récepteur au TGF- β 1. Les différences statistiquement significatives (p<0,05) sont signifiées par *.

4.2.2 Etude de la phosphorylation des Smads dans les cellules stromales

La voie de signalisation canonique du TGF- β 1 passant par les protéines cytoplasmiques Smads, nous avons analysé la phosphorylation de Smad 2/3 par cytométrie en flux après 5h de stimulation par le TGF- β 1 des cellules stromales MS5 et HS5 en présence ou non de pioglitazone (20 μ M). Comme attendu, le taux de phosphorylation de Smad 2/3 augmente après stimulation par le TGF- β 1 et cette augmentation est inhibée par le SB431542 (inhibiteur du récepteur au TGF- β 1). L'ajout de pioglitazone n'a pas d'effet sur le taux de phosphorylation de Smad2/3 induite par le TGF- β 1, suggérant que l'action répressive de la pioglitazone sur la transduction du signal du TGF- β 1 ne s'effectue pas à ce niveau (**Figure 27**).

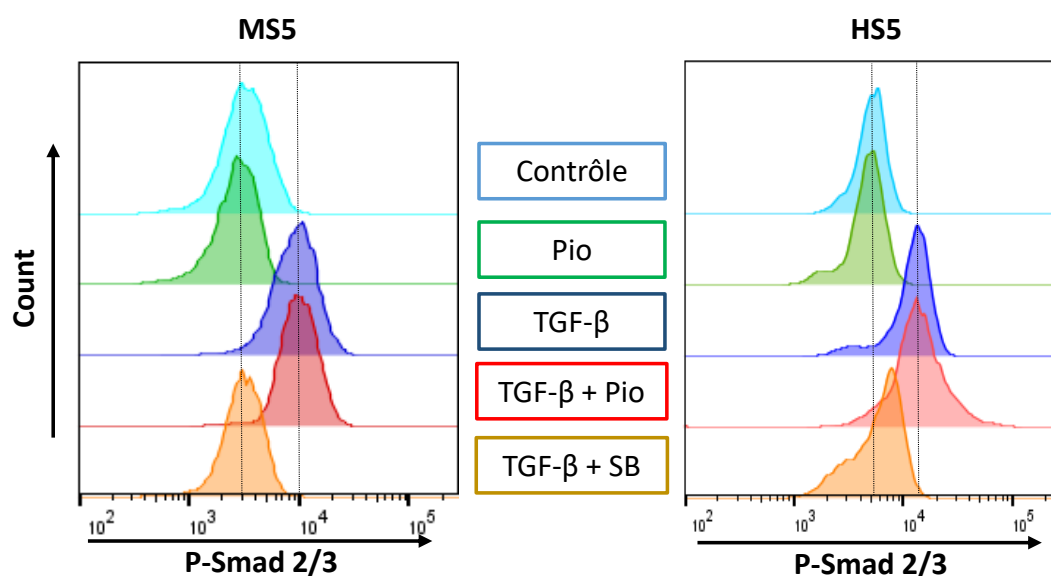


Figure 27 : Effet de la pioglitazone sur la phosphorylation des Smads.

Détection de l'intensité de fluorescence du fluorochrome couplé à l'anticorps anti-Smad2/Smad3 phosphorylé. MS5: cellules de lignée de stroma médullaire murin. HS5: cellules de lignée de stroma médullaire humain. Count: nombre de cellules. P-smad2/3: Smad 2/3 phosphorylé. SB: SB431542 (inhibiteur du récepteur au TGF- β 1). Pio: pioglitazone.

4.2.3 Etude des voies de signalisation du TGF- β 1 par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques

L'effet bloquant de la pioglitazone sur l'induction des gènes cibles de la fibrose par le TGF- β 1 ne passant pas par la phosphorylation des Smads, nous sommes intéressés à d'autres aspects de la voie de signalisation du TGF- β 1, Smad-dépendant (recrutement de co-facteurs) ou Smad-indépendant (voies alternatives). Des études dans les fibroblastes de la peau et dans les hépatocytes ont rapporté que PPAR γ régule négativement le TGF- β 1 par compétition pour le recrutement du co-facteur de transcription p300 au niveau de l'élément de réponse aux Smads^{414,421}. Les voies non-canoniques du TGF- β 1 sont également des acteurs potentiels. Afin d'appréhender l'implication de ces différentes voies dans l'effet répressif de PPAR γ , nous avons stimulé des cellules stromales MS5, HS5 et

primaires par le TGF- β 1 pendant 5h en présence ou non de pioglitazone (10 μ M) et en présence ou non de C646, inhibiteur de l'activité histone acétyltransférase du co-facteur p300, de SP600125, inhibiteur de JNK et d'U0126, inhibiteur de MEK1 et MEK2.

Aucune différence dans la répression des gènes cibles du TGF- β 1 par PPAR γ n'a été retrouvée en présence des inhibiteurs de JNK ou de MEK1 et MEK2, suggérant que ces voies de signalisation ne sont pas impliquées dans le mécanisme de répression de la pioglitazone. La présence d'inhibiteur de l'activité histone acétyltransférase du co-facteur p300, C646, dans le milieu de culture entraîne une diminution de la transcription du gène du CTGF induite par le TGF- β 1 (40 % de réduction dans les cellules MS5, 50% de réduction dans les cellules HS5, comparé à l'induction en l'absence de C646, **Figure 25**) mais est insuffisante pour bloquer totalement cette transcription. En revanche, l'effet répressif de la pioglitazone est totalement abrogé par le C646, suggérant que la fonction histone acétyltransférase du co-facteur p300 est nécessaire à l'action répressive de PPAR γ sur l'induction des gènes cibles du TGF- β 1 (**Figure 28**). L'inhibiteur chimique C646 agit préférentiellement sur l'activité histone acétyltransférase du co-facteur p300, néanmoins on ne peut exclure un effet hors cible et une approche complémentaire a été menée pour conforter ce résultat.

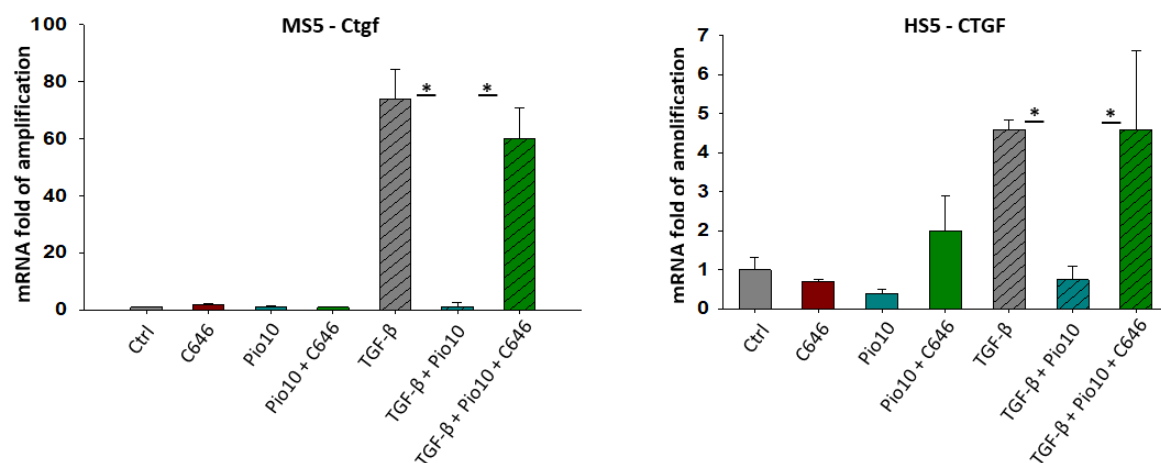


Figure 28 : Effet de l'inhibiteur de la fonction HAT du co-facteur p300 (C646) sur la répression de la transcription du gène du CTGF.

MS5: cellules de lignée de stroma médullaire murin. HS5: cellules de lignée de stroma médullaire humain. HAT: histone acétyltransférase. Ctrl: contrôle. C646: inhibiteur de la fonction HAT du co-facteur p300. Pio: pioglitazone. CTGF: connective tissue growth factor. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

4.2.4 Etude du rôle du co-facteur de transcription p300 dans l'effet répressif de PPAR γ sur les gènes cibles de la fibrose.

Le co-facteur p300 est commun à la voie du TGF- β 1 et à la voie PPAR γ et est disponible en quantité limitée dans les cellules. Notre hypothèse est que la pioglitazone déplace le co-facteur p300 de la voie du TGF- β 1 vers la voie PPAR γ , le rendant de ce fait indisponible pour la transcription TGF- β 1-dépendante des gènes cibles de la fibrose (**Figure 29**).

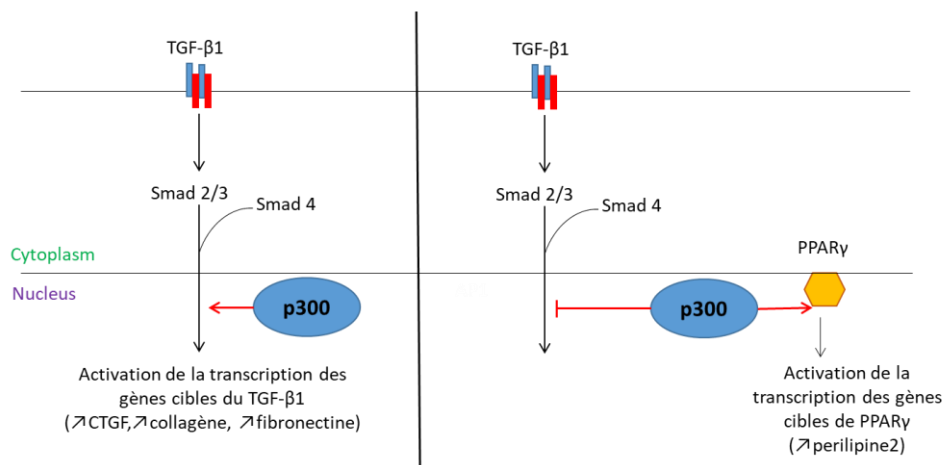


Figure 29 : Représentation schématique de l'hypothèse mécanistique de la compétition entre le TGF- β 1 et PPAR γ pour le recrutement du co-facteur p300.

4.2.4.1 Surexpression du co-facteur de transcription p300 dans les cellules stromales MS5 par stratégie lentivirale

Pour étayer notre hypothèse mécanistique, nous avons utilisé une stratégie lentivirale permettant de surexprimer soit le co-facteur p300 fonctionnel dont l'activité histone acétyltransférase est conservée (HAT+) soit le co-facteur p300 invalidé pour sa fonction histone acétyltransférase (HAT-) dans des cellules de stroma médullaire MS5. Le vecteur lentiviral vide permettant d'exprimer uniquement la GFP a été utilisé comme contrôle et la transduction des cellules par ce vecteur contrôle n'affecte pas l'induction des gènes cibles du TGF- β 1 ni l'effet répressif de la pioglitazone (**Figure 30**, A et D). La surexpression de la forme HAT+ du co-facteur p300 bloque l'effet répressif de PPAR γ sur les gènes cibles du TGF- β 1 (**Figure 30**, B et D), alors que la surexpression de la forme HAT- ne contrecarre pas l'effet de la pioglitazone (**Figure 30**, C et D). Au total, ces résultats montrent que la présence en excès du co-facteur p300 fonctionnel abroge l'effet répressif de PPAR γ sur l'induction des gènes cibles pro-fibrotiques et soutient l'hypothèse que l'activation de PPAR γ capte le co-facteur de transcription p300, empêchant alors son recrutement par Smad2/3 phosphorylés et bloquant ainsi la transduction du signal du TGF- β 1.

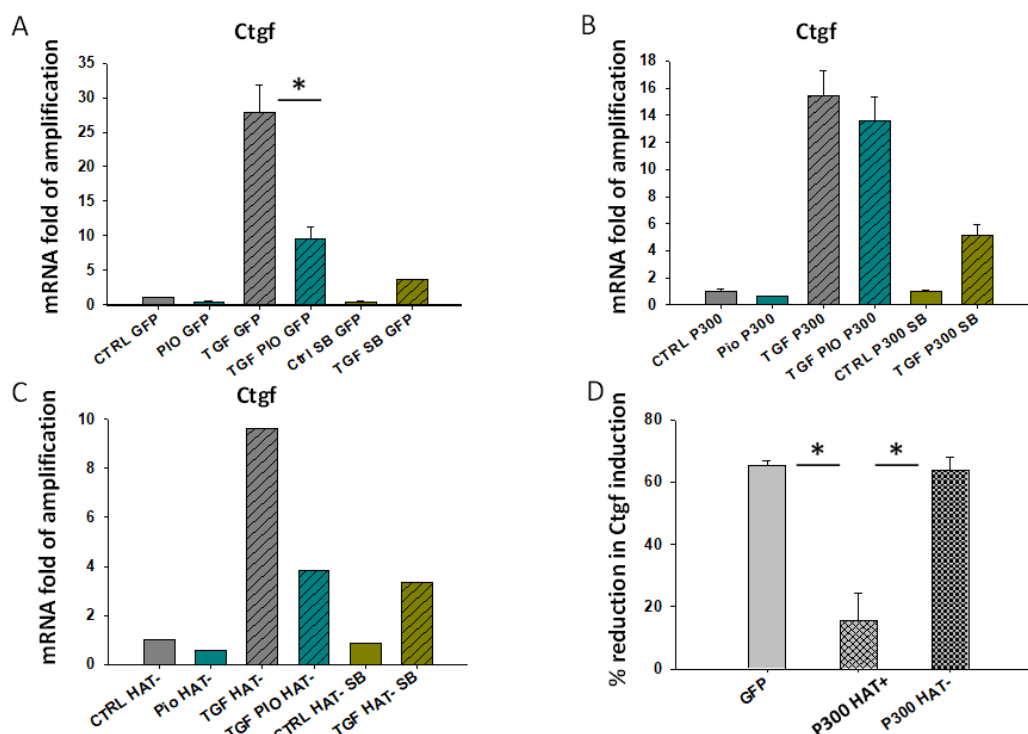


Figure 30 : Etude du rôle du co-facteur p300 par stratégie lentivirale sur l'induction du gène du CTGF. Induction et répression de la transcription du gène du CTGF dans les cellules de lignée de stroma médullaire murin MS5 transduites par A) vecteur lentiviral contrôle-GFP, B) vecteur lentiviral permettant la surexpression du co-facteur p300 HAT+, C) vecteur lentiviral permettant la surexpression du co-facteur p300 HAT-. D) Pourcentage de réduction de l'induction du gène du CTGF dans la condition TGF- β 1+pioglitazone (n=4). CTGF: connective tissue growth factor. CTRL: contrôle. Pio: pioglitazone. SB: SB431542 (inhibiteur du récepteur au TGF- β 1). GFP: vecteur lentiviral contrôle. P300: vecteur lentiviral HAT+. HAT-: vecteur lentiviral HAT-. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

4.2.4.2 Immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules stromales MS5 stimulées par le TGF- β 1

Afin de conforter l'hypothèse d'un déplacement du co-facteur p300, nous avons réalisé une réaction d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) avec un anticorps dirigé contre le co-facteur p300 dans des cellules de lignée de stroma médullaire murin MS5. En parallèle de l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-p300, nous avons réalisé une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la protéine c-jun. La protéine c-jun forme avec la protéine c-fos le co-facteur de transcription AP-1, connu pour être également commun aux voies du TGF- β 1 et de PPAR γ . Les cellules MS5 ont été stimulées par le TGF- β 1 en présence ou non de pioglitazone (20 μ M), réalisant deux conditions de culture : TGF- β 1 seul et TGF- β 1 + pioglitazone. Nous avons comparé la localisation des pics de p300 sur le génome et nous avons identifié trois clusters. Le cluster II (overlap) présente 16077 pics communs, représentant des sites occupés par le co-facteur p300 dans les cellules traitées par le TGF- β 1 seul et dans les cellules traitées par le TGF- β 1 et la pioglitazone. Le cluster I et le cluster III constitués de respectivement 15389 pics et 5917 pics représentent les sites de liaison du co-facteur p300 avec une occupation dynamique lors de l'ajout de pioglitazone. On constate une forte

diminution de l'occupation des sites du cluster I en présence de pioglitazone alors que les sites du cluster III présentent une occupation accrue en présence de pioglitazone. Ces résultats suggèrent fortement que l'activation de PPAR γ induit une re-localisation des sites p300 vers de nouveaux emplacements sur le génome impactant la signalisation du TGF- β 1 (**Figure 31**). Le profil obtenu après immunoprécipitation avec l'anticorps anti-c-jun est inchangé en présence de pioglitazone, suggérant que le co-facteur AP-1 n'est pas impliqué dans les interactions du TGF- β 1 et de PPAR γ (**Figure 31**).

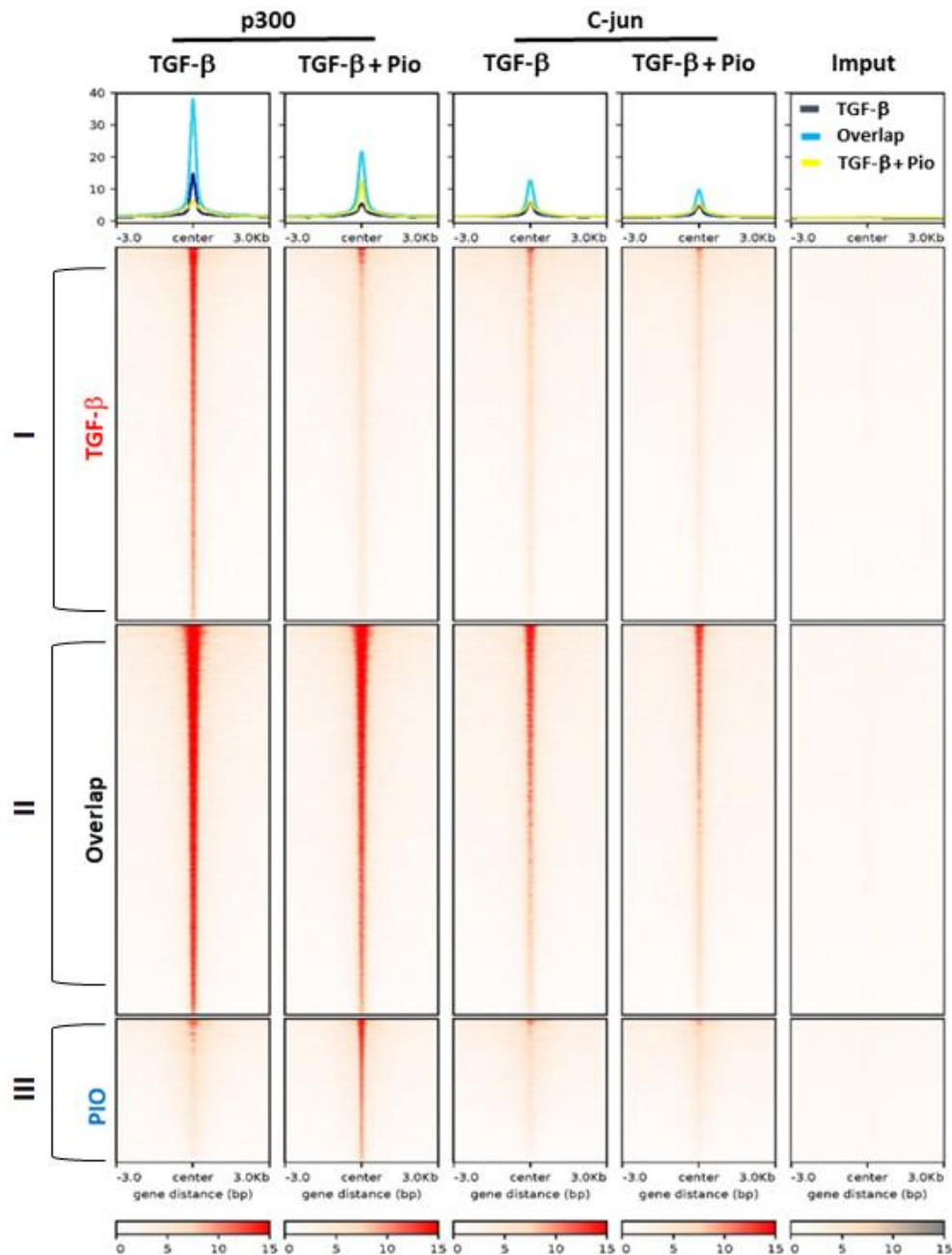


Figure 31 : Analyse de la densité des pics après immunoprécipitation de la chromatine.

A gauche sont indiquées les trois clusters. Cluster I : TGF- β = gènes cibles du TGF- β , Cluster III : Pio=gènes cibles de PPAR γ , cluster II : Overlap=gènes communs. En haut sont indiquées les conditions de culture (TGF- β seul ou TGF- β + pioglitazone) et la cible de l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation (p300 ou c-jun). En bas est indiquée la distance par rapport au centre du gène (center gene distance) en paires de bases. Pio: pioglitazone. bp: base pair (paire de base). Input: piste de normalisation.

Nous avons ensuite assigné des gènes cibles putatifs aux pics de p300 par l'approche du « gène le plus proche ». La comparaison des gènes cibles dans chaque condition, représentée par le diagramme de Venn (**Figure 32**), montre une diminution des gènes associés au TGF- β 1 et l'apparition de 125 nouveaux gènes avec l'addition de la pioglitazone, en accord avec l'importante diminution de l'occupation des sites p300 du cluster I à la faveur de nouveaux sites du cluster III (**Figure 31**).

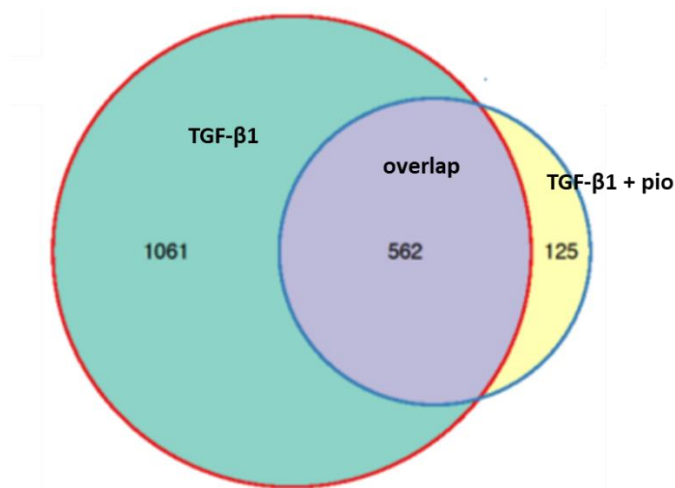


Figure 32 : Diagramme de Venn représentant les groupes de gènes obtenus par immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-p300.

Mise en évidence de trois clusters représentant, en vert, le nombre de gènes associés à la condition TGF- β 1, en jaune, le nombre de gènes associés à la condition TGF- β 1+pioglitazone et en violet, le nombre de gènes communs aux deux conditions (overlap). Pio: pioglitazone.

Afin d'explorer plus spécifiquement le rôle du co-facteur p300 dans l'effet répressif de la pioglitazone sur l'induction des gènes de la fibrose par le TGF- β 1, nous avons analysé la présence du co-facteur p300 sur les promoteurs d'un panel de gènes pro-fibrotiques dans les conditions TGF- β 1 seul et TGF- β 1 + pioglitazone. Lorsque les cellules MS5 sont stimulées par le TGF- β 1, l'immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps dirigé contre le co-facteur p300 montre un enrichissement en gènes pro-fibrotiques des sites d'initiation de la transcription (**Figure 33**, en violet). Cet enrichissement est majoritairement contrecarré par l'ajout de pioglitazone (**Figure 33**, en bleu), confirmant l'effet répressif de l'activation de la voie PPAR γ sur l'induction des gènes pro-fibrotiques par déplacement du co-facteur p300. En revanche, aucun enrichissement en gènes pro-fibrotiques n'a été mis en évidence par immunoprécipitation avec l'anticorps anti-c-jun, suggérant que le co-facteur AP-1 n'est pas impliqué dans l'induction des gènes pro-fibrotiques dépendante du TGF- β 1 (**Figure 33**, en rouge, anticorps anti-c-jun/condition TGF- β 1 seul, et en vert, anticorps anti-c-jun/condition TGF- β 1 + pioglitazone).

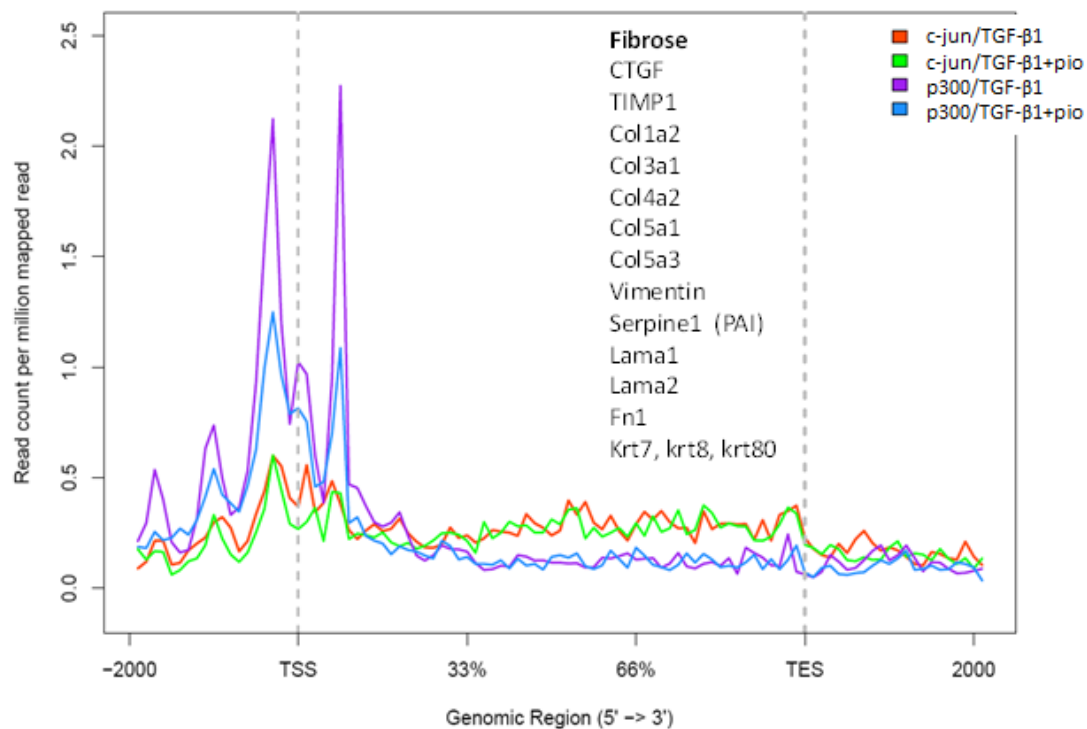


Figure 33 : Enrichissement moyen sur un panel de gènes pro-fibrotiques après immunoprécipitation de la chromatine.

Enrichissement moyen, en rouge : Ac anti-c-jun/condition TGF-β1 seul, en vert : Ac anti-c-jun/condition TGF-β1+ pioglitazone, en violet : Ac anti-p300/condition TGF-β1 seul, en bleu : Ac anti-p300/condition TGF-β1+pioglitazone. TSS: transcription starting site (site d'initiation de la transcription). TES: transcription end site (site de fin de transcription). CTGF: connective tissue growth factor. TIMP: TIMP metalloproteinase inhibitor. Col: collagène. PAI: plasminogen activator inhibitor. Lama: laminine. Fn: fibronectine. Krt: keratine.

4.3 Effet des ligands de PPAR γ sur l'inflammation

L'inflammation est un processus dynamique impliquant de nombreux acteurs cellulaires et cytokiniques rendant difficile sa modélisation *in vitro*. Nous avons donc choisi d'aborder l'effet de l'activation de PPAR γ dans l'inflammation liée à la myélofibrose *ex vivo* et *in vivo*.

4.3.1 Effet des ligands de PPAR γ sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires *ex vivo*

Nous avons d'abord tenté de doser les cytokines de l'inflammation dans différents échantillons de plasma provenant des prélèvements sanguins itératifs des souris du modèle murin JAK2^{V617F} traitées ou non par ligands de PPAR γ . Cependant la technique de détection d'un panel de cytokines par cytométrie en flux de type *cytometric beads array* (CBA) s'est révélée insuffisamment sensible et très hétérogène dans nos échantillons.

Nous avons donc opté secondairement pour une quantification du taux de transcrit de gènes de plusieurs cytokines impliquées dans l'inflammation par RT-qPCR à partir des culots de cellules sanguines nucléées circulantes provenant des échantillons de souris du modèle JAK2^{V617F}-GFP en phase polyglobulie (semaine 8 et semaine 14 post-transplantation) et en phase myélofibrose (semaine 23 post-transplantation) traitées ou non par la pioglitazone à partir de la semaine 6 post-transplantation. Afin de vérifier l'absorption du traitement, nous avons également quantifié le taux de transcrit du gène *Plin2*, gène cible de l'activation de la voie PPAR γ dans les mêmes échantillons. Dès la semaine 14 post-transplantation, l'expression de *Plin2* est significativement augmentée chez les souris traitées comparées aux souris contrôles avec une augmentation progressive de cette expression jusqu'à la semaine 23, témoignant de l'activation du récepteur PPAR γ chez les souris traitées. Concernant la transcription des gènes des cytokines de l'inflammation, aucune différence n'est mise en évidence entre les souris traitées et les souris non traitées pendant la phase de polyglobulie. En revanche, pendant la phase de myélofibrose, il existe une tendance à la diminution des transcrits de deux cytokines pro-inflammatoires le TNF α et l'IL5 et le taux de transcrit du TGF- β 1 est également diminué de manière significative chez les souris traitées. Par ailleurs, les taux de transcrit de deux cytokines anti-inflammatoires, l'inhibiteur de NF- κ B (NF- κ B α ou I κ B α) et le récepteur antagoniste à l'IL1 (IL1RA) sont augmentés de manière significative chez les souris traitées comparées aux souris non traitées. NF- κ B α en bloquant la transduction du signal associée à l'activation de NF- κ B, et l'IL1RA en entrant en compétition avec les cytokines pro-inflammatoires IL1, sont deux acteurs majeurs de la résolution de l'inflammation. L'augmentation de la transcription de ces deux cytokines est donc en faveur du potentiel anti-inflammatoire de la pioglitazone (**Figure 34**).

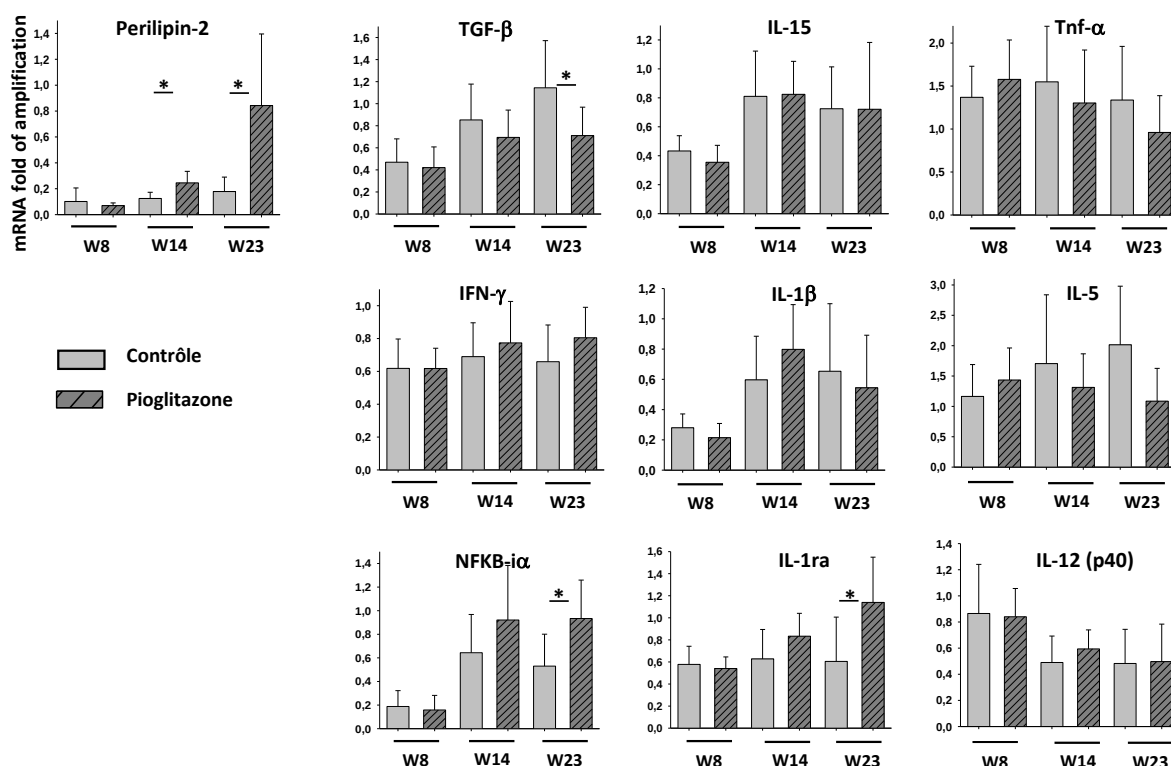


Figure 34 : Quantification des transcrits des gènes de cytokines de l'inflammation et du gène *Plin2*.

La quantification est réalisée à partir de l'ADNc provenant des échantillons de cellules sanguines nucléées circulantes des souris du modèle JAK2^{V617F}-GFP. NF- κ B α : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF- κ B) inhibitor α . IL: interleukine. Tnf: tumor necrosis factor. IFN: interferon. W: week (semaine). Les différences statistiquement significatives (p < 0,05) sont signifiées par *.

4.3.2 Etude des gènes de l'inflammation par immunoprécipitation de la chromatine

Dans la myélofibrose primitive, les cellules hématopoïétiques représentent la principale source de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, il a été rapporté dans des modèles de NMPs que la sécrétion cytokinique pourrait également provenir d'autres cellules du micro-environnement^{250,251}. Afin d'évaluer le rôle des cellules stromales médullaires dans l'inflammation, nous avons comparé l'enrichissement moyen en gènes de l'inflammation dans l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine avec les anticorps anti-p300 et anti-c-jun. Lorsque l'immunoprécipitation est réalisée avec l'anticorps dirigé contre le co-facteur p300, l'enrichissement moyen sur un panel de gènes de l'inflammation est modéré dans les cellules MS5 stimulées par le TGF- β 1 (**Figure 35**, en violet) et cet enrichissement est réduit en présence de pioglitazone (**Figure 35**, en bleu), en faveur d'un effet anti-inflammatoire des ligands de PPAR γ sur les cellules stromales. L'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-c-jun ne montre pas de différence entre les conditions (**Figure 35**, en rouge TGF- β 1 seul, en vert, TGF- β 1 + pioglitazone).

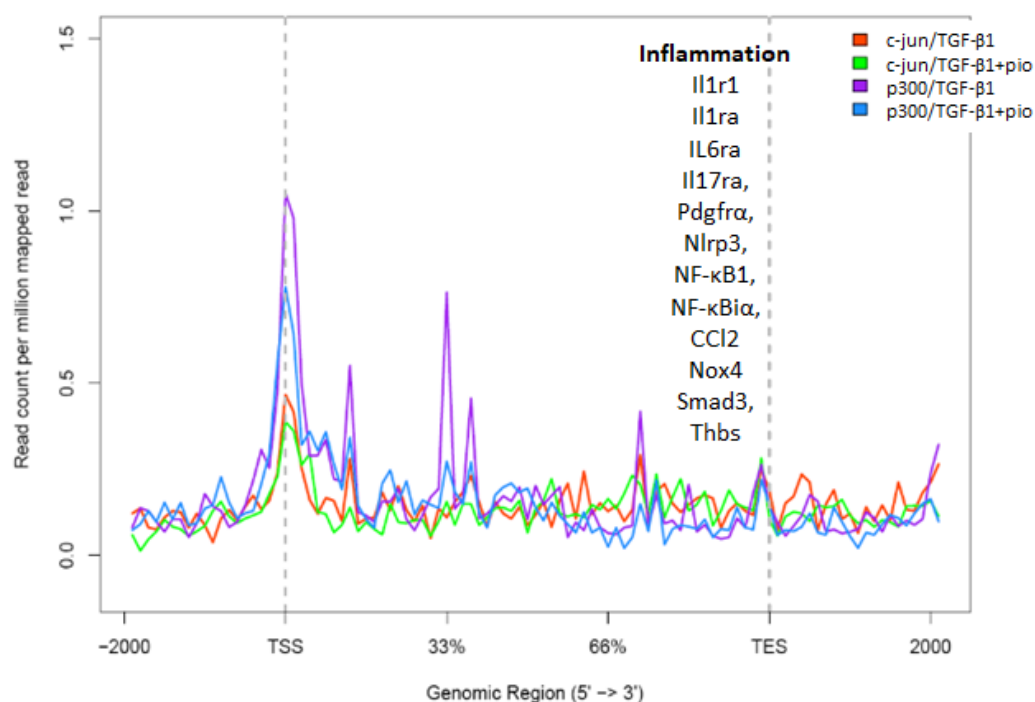


Figure 35 : Enrichissement moyen sur un panel de gènes de l'inflammation après immunoprécipitation de la chromatine.

Enrichissement moyen, en rouge : Ac anti-c-jun/condition TGF- β 1 seul, en vert : Ac anti-c-jun/condition TGF- β 1+ pioglitazone, en violet : Ac anti-p300/condition TGF- β 1 seul, en bleu : Ac anti-p300/condition TGF- β 1+pioglitazone. TSS: transcription starting site (site d'initiation de la transcription). TES: transcription end site (site de fin de transcription). pio: pioglitazne. Il: interleukine. ra: récepteur antagoniste. Pdgfra: platelet-derived growth factor α . NF- κ B1: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell 1. NF- κ B1 α : NF- κ B inhibitor α . Nlrp3: nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat (NLR) family pyrin domain containing 3. CCL2: chemokine ligand 2. Nox4: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAPDH) oxidase 4. Thbs: thrombospondine 1.

4.3.3 Effet des ligands de PPAR γ sur l'inflammation *in vivo*

Les souris des modèles de polyglobulie de Vaquez (PV JAK2^{V617F}-GFP) et de myélofibrose post-polyglobulie de Vaquez JAK2^{V617F} (MF-post PV^{JAK2V617F}) développent une hyperleucocytose modérée et les souris du modèle TPO^{high} développent rapidement une hyperleucocytose majeure. Cette hyperleucocytose est d'origine mixte, en partie liée à la myéloprolifération et en partie liée à l'état inflammatoire induit par le phénotype. Le traitement par ligands de PPAR γ , pioglitazone ou méسالazine, permet un contrôle de l'hyperleucocytose stable dans le temps dans les trois modèles (**Figure 36**, A, B et C). Les souris du modèle Calréticuline ne développent pas d'hyperleucocytose puisque le taux de leucocytes reste inférieur à 15G/L (norme supérieure chez la souris C57BL/6), cependant on constate que les souris transplantées avec les progéniteurs hématopoïétiques CALRdel52 ont un taux de leucocytes supérieur à celui des souris transplantées avec des progéniteurs hématopoïétiques CALRWT. Dans le groupe des souris CALRdel52, le taux de leucocytes des souris traitées par pioglitazone est inférieur à celui des souris non traitées (**Figure 36**, D)

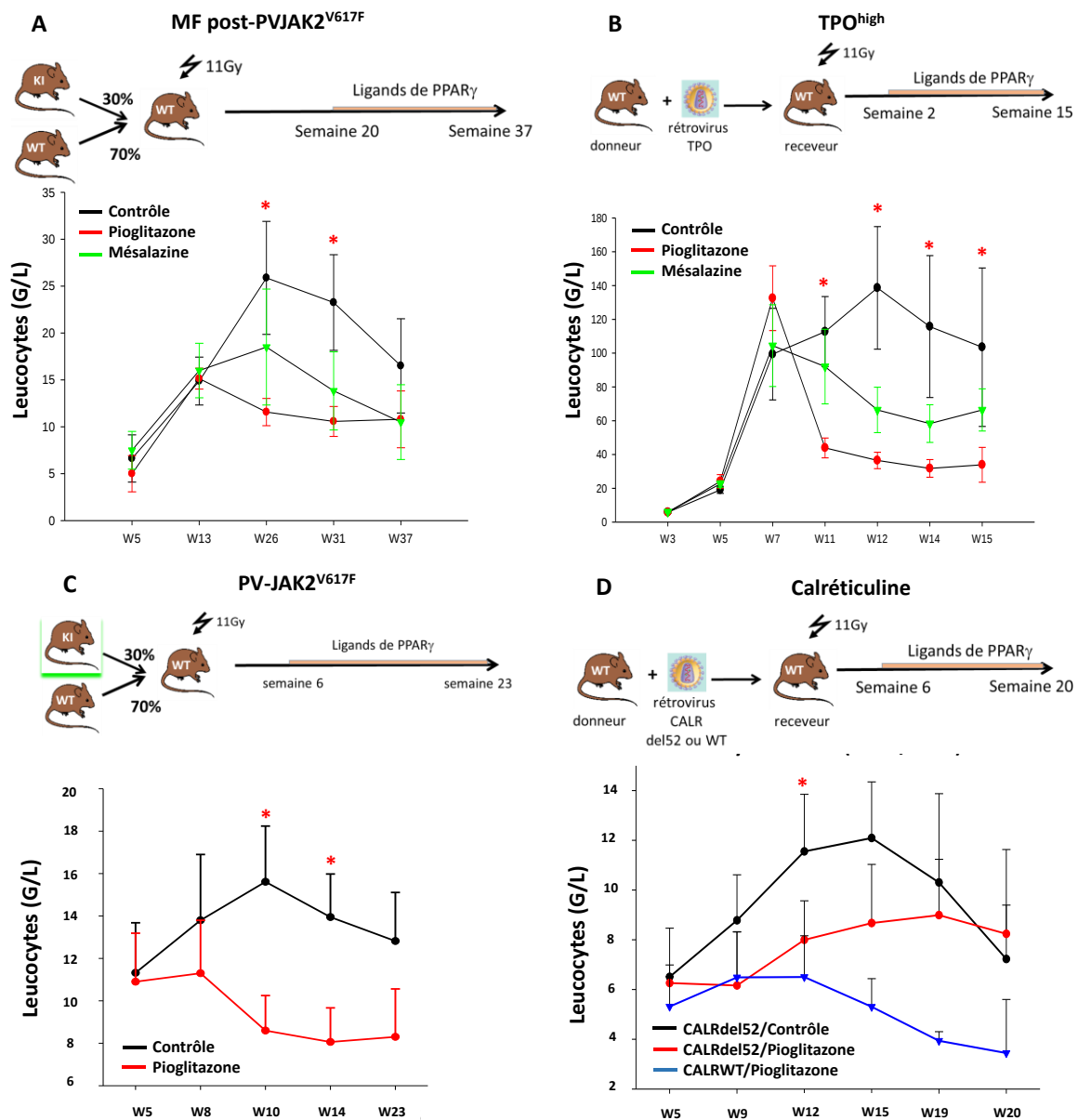


Figure 36 : Effets du traitement par ligands de PPAR γ sur l'hyperleucocytose dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.

A) Modèle MF post-PV^{JAK2^{V617F}}. B) Modèle TPO^{high}. C) Modèle PV JAK2^{V617F}-GFP. D) Modèle Calréticuline. MF: myélofibrose. PV: polyglobulie de Vaquez. WT: wild type. KI: knock-in. W: week (semaine). Gy: gray. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

La réduction du nombre de leucocytes affecte les compartiments lymphoïde (lymphocytes) et myéloïde (granuleux et monocytes) dans tous les modèles (**Figure 37**). Bien que nous ne puissions pas exclure la part de l'action anti-proliférative du traitement sur le contrôle de l'hyperleucocytose, ce résultat associé à la diminution de l'expression transcriptionnelle du TGF- β 1 et à l'augmentation des ARNm de l'IL1RA et de NF- κ B α dans les cellules sanguines nucléées (dans le modèle murin de la PV) ainsi qu'à la réduction du profil d'induction d'un panel de gènes liés à l'inflammation dans les cellules stromales médullaire MS5, suggère tout de même un effet anti-inflammatoire du traitement.

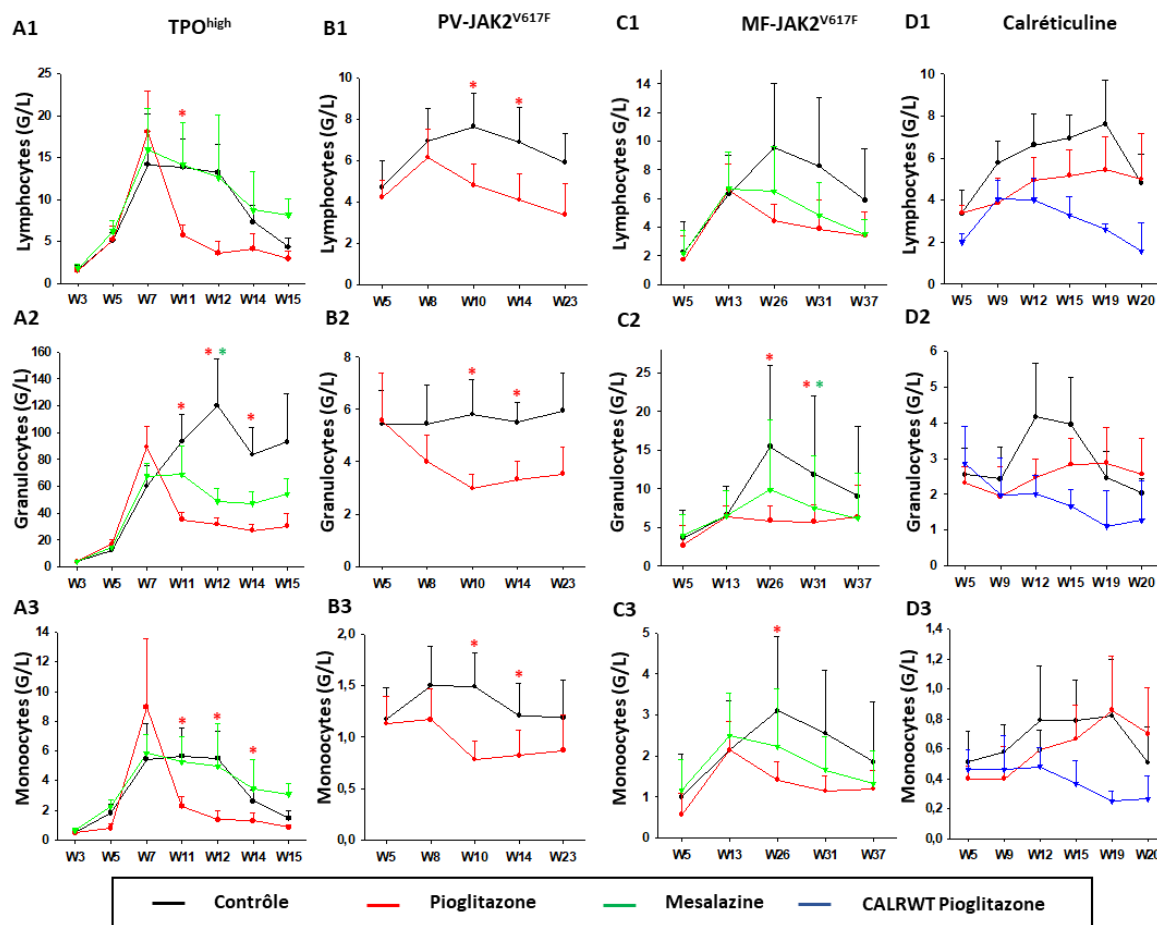


Figure 37 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur les sous-populations leucocytaires dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.

A) Modèle TPO^{high}. B) Modèle de PVJAK2^{V617F}-GFP. C) Modèle de MF post-PVJAK2^{V617F}. D) Modèle Calréticuline. A1), B1), C1), D1) Lymphocytes. A2), B2), C2, D2) Granulocytes. A3), B3), C3), D3) Monocytes. PV: polyglobulie de Vaquez. MF: myélofibrose. WT: wild type. W: week (semaine). Les différences statistiquement significatives (p<0,05) sont signifiées par *.

4.4 Evaluation du potentiel thérapeutique des ligands de PPAR γ dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.

4.4.1 Effet des ligands de PPAR γ sur la chute de l'hémoglobine

Un des premiers signes de fibrose de la moelle osseuse est l'apparition d'une anémie. Nous avons suivi l'évolution de l'hémoglobine dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs. Dans le modèle MF post-PVJAK2^{V617F}, les souris ont une hémoglobine et un hématocrite élevés en rapport avec le phénotype de polyglobulie. Dans ce modèle, chez les souris non traitées, l'hémoglobine chute après la semaine 24 post-transplantation, au moment où la fibrose commence à se développer, avec une aggravation progressive sans réelle anémie puisque les chiffres d'hémoglobine restent supérieurs à 12 g/dL. En revanche, chez les souris traitées par pioglitazone ou mésalazine à partir de la semaine 20 post-transplantation, l'hémoglobine reste élevée, signe indirect d'une fibrose moins importante, et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation à la semaine 37 (**Figure 38, A**). Dans le modèle TPO^{high}, l'hémoglobine des souris non traitées chute à partir de la semaine 12 post-transplantation et ces souris deviennent anémiques avec le temps. Les souris TPO^{high} traitées par pioglitazone ou mésalazine à partir de la semaine 2 post-transplantation ne développent pas d'anémie, et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation, à la semaine 15 (**Figure 38, B**). Enfin, dans le modèle Calréticuline, l'hémoglobine des souris CALRdel52 non traitées chute à la semaine 20 post-transplantation alors que l'hémoglobine des souris CALRdel52 et des souris CALRWT traitées par pioglitazone à partir de la semaine 6 post-transplantation restent dans les normes. Cependant, cette différence est apparue en fin d'expérimentation et nous ne pouvons conclure quant à son évolution dans le temps (**Figure 38, C**).

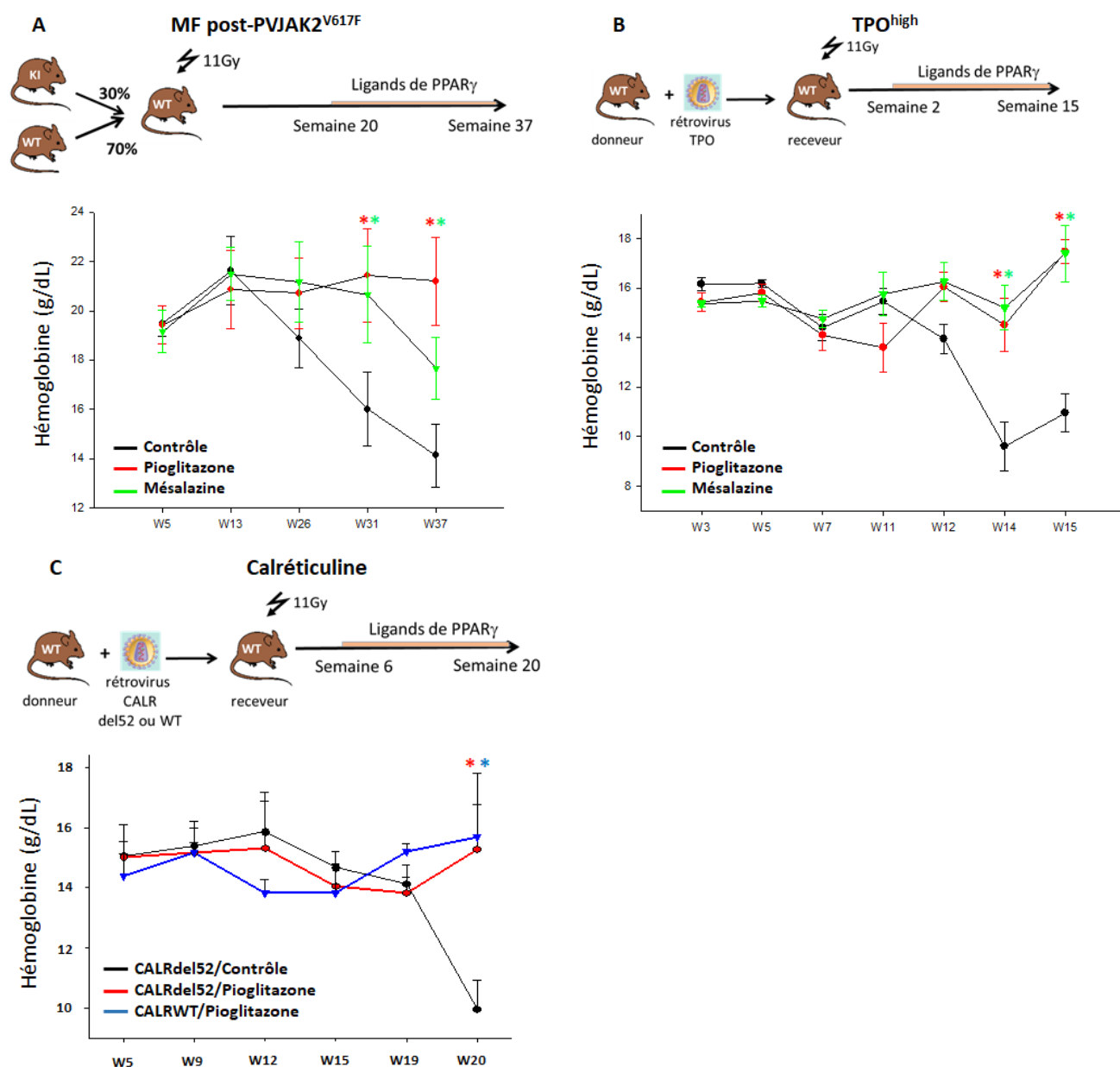


Figure 38 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur l'hémoglobine dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.

A) Modèle MF post-PV^{JAK2V617F}. B) Modèle TPO^{high}. C) Modèle Calréticuline.

MF: myélofibrose. PV: polyglobulie de Vaquez. WT: wild type. KI: knock-in. W: week (semaine). Gy: gray. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

4.4.2 Effet des ligands de PPAR γ sur le taux de plaquettes

Chacun des modèles murins de myélofibrose s'accompagne d'une thrombocytose, en lien avec la myéloprolifération dans les modèles JAK2^{V617F} et Calréticuline et en lien avec la stimulation massive des mégacaryocytes par la TPO dans le modèle TPO^{high}. Le traitement par ligands de PPAR γ réduit significativement le nombre de plaquettes dans le modèle TPO^{high} aux semaines 5, 7 et 11. En fin d'expérimentation, semaines 14 et 15, les plaquettes des souris du groupe contrôle chutent, en rapport

avec le développement de la fibrose médullaire et l'appauvrissement en cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, et il n'y a plus de différence entre les groupes (**Figure 39, B**). Dans le modèle MF post-PVJAK2^{V617F}, le traitement par ligands de PPAR γ semble réduire le nombre de plaquettes, sans que cet effet soit significatif (**Figure 39, A**). L'effet du traitement sur le taux de plaquettes dans le modèle Calréticuline a été montré dans la **Figure 24**.

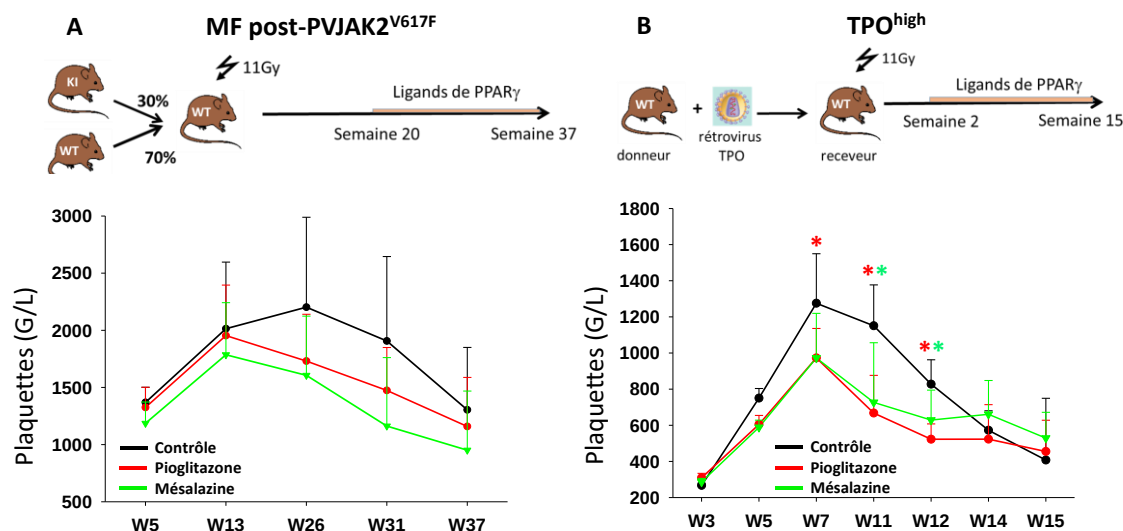


Figure 39 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur le taux de plaquettes dans les modèles murins de néoplasmes myéloprolifératifs.

A) Modèle MF post-PV^{JAK2V617F}. B) Modèle TPO^{high}.

WT: wild type. KI: knock-in. W: week (semaine). Gy: gray. PV: polyglobulie de Vaquez. MF: myélofibrose. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

4.4.3 Effet des ligands de PPAR γ sur la cellularité médullaire et le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques

Au cours de la myélofibrose primitive, la moelle osseuse s'appauvrit en lien avec le développement de plus en plus important des fibres de réticuline au cours du temps et avec la prolifération du clone malin. Après euthanasie, nous avons comparé la cellularité de la moelle osseuse des souris traitées et des souris non traitées. Quel que soit le modèle, le nombre de cellules hématopoïétiques CD45⁺ médullaires est toujours supérieur chez les souris traitées par pioglitazone ou mésalazine comparés aux souris non traitées (**Figure 40, A, B et C**). Bien que cet effet soit significatif dans les trois modèles, dans le modèle Calréticuline, la cellularité médullaire des souris CALRWT traités reste très supérieure à celle des CALRdel52 traités, suggérant que l'effet de la pioglitazone n'est pas suffisant pour contrecarrer complètement l'appauvrissement de la moelle osseuse (**Figure 40, C**).

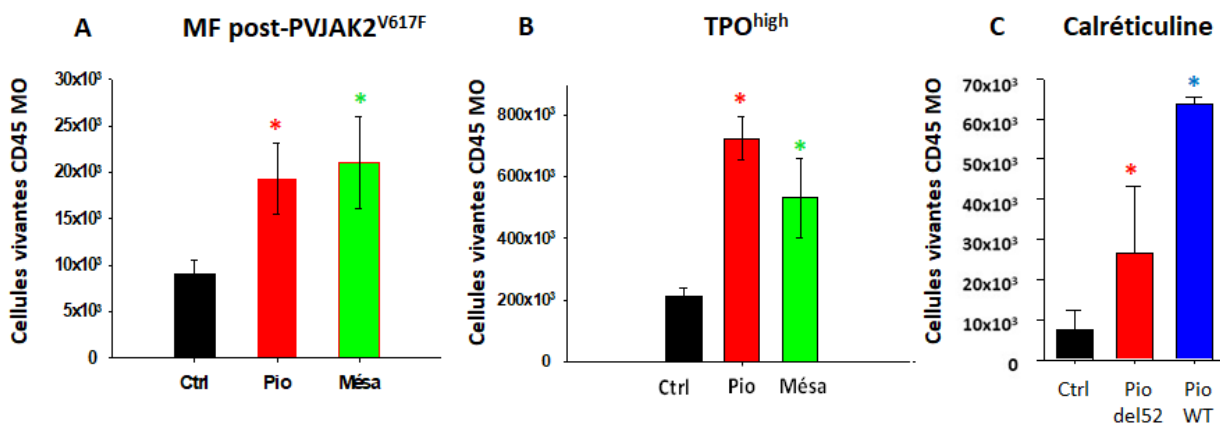


Figure 40 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur la cellularité de la moelle osseuse.

Compte du nombre absolu de cellules hématopoïétiques CD45+ dans un des fémurs de chaque souris.

A) Modèle MF post-PVJAK2^{V617F}. B) Modèle TPO^{high}. Dans ces deux modèles : En noir : Ctrl= souris non traitées. En rouge : Pio= souris traitées par pioglitazone. En vert : Mésa= souris traitées par mésalazine. C) Modèle Calréticuline. En noir : Ctrl= souris non traitées. En rouge : Piodel52= souris porteuses de la mutation CALRdel52 et traitées par pioglitazone. En bleu : PioWT= souris porteuses de la calréticuline sauvage et traitées par pioglitazone. MF: myélofibrose. PV: polyglobulie de Vaquez. Ctrl: contrôle. WT: wild type. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

Le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques médullaires semble également amélioré par le traitement. Le nombre de colonies issues des progéniteurs hématopoïétiques de souris traitées est 2 fois supérieur à celui des souris non traitées dans les modèles MF post-PVJAK2^{V617F} et Calréticuline (Figure 41, A et C, non significatif) et près de 4 fois supérieur dans le modèle TPO^{high} (Figure 41, B, $p < 0,05$).

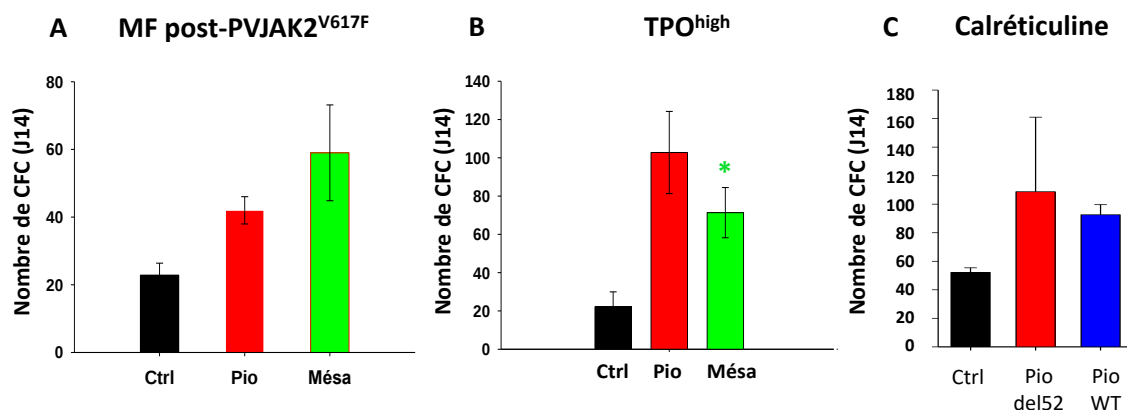


Figure 41 : Effet du traitement par ligands de PPAR γ sur le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques.

Nombre absolu de CFC à J14 de culture. A) Modèle MF post-PVJAK2^{V617F}. B) Modèle TPO^{high}. Dans ces deux modèles : En noir : Ctrl= souris non traitées. En rouge : Pio= souris traitées par pioglitazone. En vert : Mésa= souris traitées par mésalazine. C) Modèle Calréticuline. En noir : Ctrl= souris non traitées. En rouge : Piodel52= souris porteuses de la mutation CALRdel52 et traitées par pioglitazone. En bleu : PioWT= souris porteuse de la calréticuline sauvage et traitées par pioglitazone. MF: myélofibrose. PV: polyglobulie de Vaquez. CFC: colony forming cell (cellule formant des colonies). Ctrl: contrôle. WT: wild type. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont signifiées par *.

4.4.4 Effet des ligands de PPAR γ sur les paramètres histologiques de la myélofibrose dans le modèle MF post-PVJAK2^{V617F}

Après euthanasie à la semaine 37 post-transplantation, nous avons réalisé un examen anatomo-pathologique de la moelle osseuse (fémur) et de la rate des souris traitées et non traitées comprenant une coloration hématoxyline-éosine (HE) qui permet d'appréhender la richesse cellulaire et une coloration argentique ou *silver reticulín* en anglais qui permet de mettre en évidence les fibres de réticuline.

La rate est un des sites préférentiels de l'hématopoïèse extra-médullaire chez l'être humain. Chez la souris, le phénotype de myélofibrose s'accompagne d'un envahissement de la rate par des cellules myéloïdes au détriment des cellules lymphoïde, détruisant l'architecture splénique normale. L'analyse histologique montre que l'architecture de la rate est mieux préservée et que la taille de la rate est moins importante chez les souris traitées. Les fibres de réticuline y sont également moins nombreuses. Enfin le nombre de mégacaryocytes par champs est inférieur chez les souris traitées. Les analyses de la rate de trois souris représentatives de chaque groupe (contrôle, pioglitazone et mésalazine) sont présentées dans le **Tableau 5**.

Rate					
Groupe	N°d'examen	Fibrose	Architecture	Richesse en MKC	Taille
contrôle	961	Grade 2-3	M>>L	+++ (51/4)	grande
contrôle	962	Grade 2-3	M>>L	+++ (54/4)	grande
contrôle	963	Grade 1,75	M>>>L	++ (47/4)	grande
pioglitazone	964	Grade 1,75	M>L	++ (37/4)	grande
pioglitazone	965	Grade 1,5	M>>L	++ (22/4)	petite
pioglitazone	966	Grade 1	quasi-normale	+ (6/4)	petite
mésalazine	967	Grade 1,25	quasi-normale	+ (5/4)	petite
mésalazine	968	Grade 1,75	quasi-normale	+ (5/4)	petite
mésalazine	969	Grade 1,5	quasi-normale	+ (2/4)	petite

Tableau 5 : Analyse histologique des rates.

Analyse des rates de trois souris représentatives par groupe de traitement.

La fibrose splénique est gradée par une note allant de 0 à 3, 3 étant le stade de fibrose le plus élevé. L'architecture de la rate est évaluée par l'envahissement en cellules myéloïdes (M) comparée à la richesse en cellules lymphoïdes (L) normalement présentes dans la rate. Les mégacaryocytes sont comptés par champs et le nombre total de mégacaryocyte pour 4 champs est rapporté dans le tableau. La richesse en mégacaryocytes est estimée de façon semi-quantitative en nombre de croix, allant de 0 à 3 croix. La taille de la rate est estimée « grande » ou « petite ». MKC: mégacaryocyte.

Concernant la moelle osseuse (fémur), la richesse cellulaire estimée par examen histologique est supérieure chez les souris traitées par pioglitazone ou mésalazine comparées aux souris non traitées, concordant avec les résultats du compte cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques CD45+. Il existe une franche diminution de l'accumulation des fibres de réticuline et de l'ostéosclérose dans la moelle osseuse des souris traitées. La richesse en mégacaryocytes semble également moins importante chez les souris traitées, particulièrement dans le groupe pioglitazone. Les analyses de la moelle osseuse de trois animaux représentatifs de chaque groupe (contrôle, pioglitazone et mésalazine) sont présentées dans le **Tableau 6**. Les effets du traitement par ligands de PPAR γ sur la richesse cellulaire médullaire, l'accumulation des fibres de réticuline et l'ostéosclérose sont illustrés dans la **Figure 42**.

Moelle osseuse				
Groupe	N°d'examen	Fibrose	ostéosclérose	Richesse en MKC
contrôle	961	Grade 2/3	++(+)	++ (32/4)
contrôle	962	Grade 3/3	+++	+++ (62/4)
contrôle	963	Grade 1-2/3	+	++ (26/4)
pioglitazone	964	Grade 2-3/3	+(+)	+ (17/4)
pioglitazone	965	Grade 1/3	absence	+ (16/4)
pioglitazone	966	Grade 0/3	absence	+ (16/4)
mésalazine	967	Grade 0/3	absence	+++ (36/4)
mésalazine	968	Grade 0-1/3	absence	+++ (38/4)
mésalazine	969	Grade 0/3	absence	++ (27/4)

Tableau 6 : Analyse histologique de la moelle osseuse.

Analyse d'un fémur de trois souris représentatives par groupe de traitement.

La fibrose médullaire est gradée de 0 à 3, 3 étant le stade de fibrose le plus élevé. L'ostéosclérose est estimée de façon semi-quantitative en nombre de croix allant de 1 à 3, absence dénote l'absence complète d'ostéosclérose. Les mégacaryocytes sont comptés par champs et le nombre total de mégacaryocytes pour 4 champs est rapporté dans le tableau. La richesse en mégacaryocytes est estimée de façon semi-quantitative en nombre de croix, allant de 0 à 3 croix. MKC: mégacaryocyte.

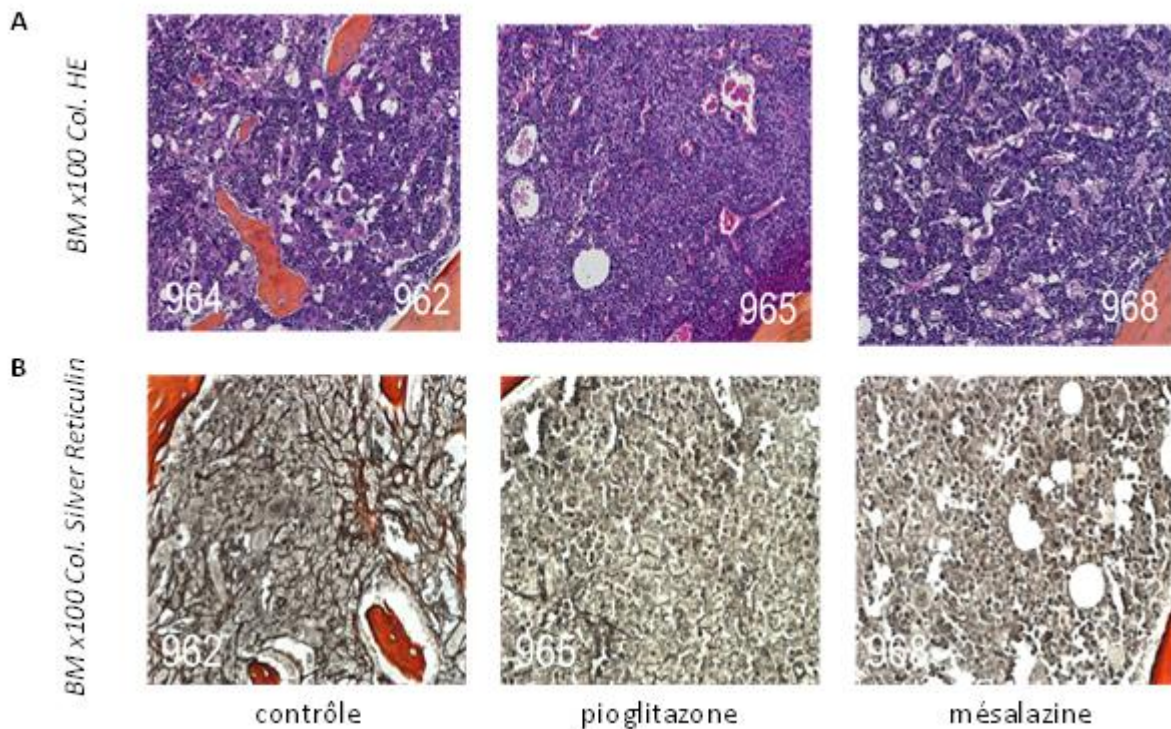


Figure 42 : Coupes histologiques des fémurs.

A) La coloration HE permet d'apprécier la richesse médullaire globale et d'estimer la richesse en mégacaryocytes. Des travées osseuses épaissies, témoignant de l'ostéosclérose, sont visibles sur la coupe du fémur provenant de la souris contrôle.

B) La coloration argentique met en évidence un réseau dense de fibres de réticuline, sur la coupe du fémur provenant de la souris contrôle, alors que seules quelques fibres éparses sont visibles sur les coupes de fémur provenant de la souris traitée par pioglitazone et de la souris traitée par mésalazine.

BM: bone marrow (moelle osseuse). Col: coloration. HE: hématoxyline-éosine. Silver reticulin: coloration argentique.

4.4.5 Effet des ligands de PPAR γ sur les paramètres histologiques de la Myélofibrose dans les modèles TPO^{high} et Calréticuline

Dans le modèle murin de myélofibrose TPO^{high}, la fibrose est d'installation et d'aggravation rapide. Après l'euthanasie à la semaine 15 post-transplantation, les analyses histologiques de la moelle osseuse des fémurs de trois animaux par groupe (contrôle, pioglitazone et mésalazine) n'ont montré aucune différence entre les souris traitées ou non traitées.

Les analyses histologiques des prélèvements des souris du modèle Calréticuline sont en cours.

Cinquième partie : Discussion et perspectives

Ce travail de thèse portait sur l'évaluation de la pertinence de l'activation de la voie PPAR γ dans la prise en charge de la myélofibrose primitive en considérant trois axes majeurs de la physiopathologie : la myéloprolifération, l'inflammation, et le remaniement du micro-environnement médullaire. La myélofibrose primitive est le néoplasme myéloprolifératif au pronostic le plus réservé, avec une médiane de survie à environ 6 ans. En dehors de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, aucun des traitements actuels n'influence l'évolution naturelle de la maladie. Le ruxolitinib est le traitement de référence et permet de réduire les symptômes qui altèrent la qualité de vie tels que la splénomégalie ou les signes généraux mais semble n'avoir qu'une influence mineure sur la survie des patients et de nouveaux axes thérapeutiques sont nécessaires dans cette pathologie. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxydase (PPAR) sont des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par l'interaction avec un ligand spécifique. Les rôles du récepteur nucléaire PPAR γ dans l'adipogénèse et dans l'homéostasie du glucose ont été les premiers étudiés. Depuis, de nombreuses autres fonctions ont été mises en évidence. Nous avons précédemment rapporté que l'activation de PPAR γ induit une diminution de l'expression de STAT5, un acteur clé de l'initiation de la myéloprolifération et de l'évolution des NMPs. Dans la leucémie myéloïde chronique, la modulation de STAT5 par PPAR γ a un impact majeur sur la clonogénicité et la persistance des cellules souches leucémiques¹⁵³. Dans les NMPs non BCR-ABL, l'implication de l'axe PPAR γ /STAT5 reste à caractériser. L'inflammation est un élément majeur de la physiopathologie des NMPs et plus particulièrement de la myélofibrose primitive. Le contexte inflammatoire contribue non seulement à favoriser une expansion sélective du clone néoplasique, mais il participe également au développement de l'anémie et de la fibrose de la moelle osseuse. Le récepteur PPAR γ régule négativement l'expression de nombreuses protéines pro-inflammatoires et induit un contexte anti-inflammatoire dans de nombreux tissus. Enfin, dans plusieurs organes tels que le foie, le rein, l'intestin, la peau ou même l'œil, l'activation du récepteur PPAR γ permet de réprimer l'expression des protéines inductrices de la fibrose. Aucune donnée dans la littérature ne décrit une potentielle action de PPAR γ dans le contexte de myélofibrose primitive, il apparaît donc important d'étudier les mécanismes induits par l'activation de PPAR γ dans le stroma médullaire et d'évaluer leur capacité à prévenir l'expression des protéines fibrotiques.

Pour tenter d'élucider le rôle de PPAR γ dans la prise en charge de la myélofibrose primitive, chacun des axes a été exploré *in vitro* et/ou *ex vivo* sur des lignées cellulaires, des cellules primaires issues de patients et des cellules issues des modèles murins pré-cliniques de polyglobulie de Vaquez, de thrombocythémie essentielle et de myélofibrose. Le potentiel thérapeutique de l'activation de PPAR γ a été testé *in vivo* dans des modèles pré-cliniques de myélofibrose dans lesquels nous avons étudié l'impact d'un traitement par ligands de PPAR γ sur l'histoire naturelle de la maladie, les paramètres

hématologiques et les paramètres histologiques. L'un de nos principaux critères d'évaluation de l'efficacité du traitement est le taux d'hémoglobine. En effet, l'anémie est un symptôme précoce et pronostique chez les patients atteints de myélofibrose primitive. Au diagnostic, 40% des patients ont une hémoglobine inférieure à 10 g/dL et près d'un quart des patients est dépendant des transfusions en concentrés globulaires⁴²². L'anémie est un critère péjoratif dans toutes les classifications clinico-biologiques. Cliniquement, l'anémie entraîne une asthénie et peut aggraver d'autres pathologies comme les maladies cardiaques, altérant la qualité de vie des patients. L'anémie est polyfactorielle dans la myélofibrose primitive, liée à l'inflammation, au remaniement du micro-environnement et à l'hypocellularité de la moelle osseuse.

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer le potentiel thérapeutique d'un traitement par ligand de PPAR γ dans la myélofibrose. Nous avons étudié *in vivo* l'effet d'un traitement activateur de PPAR γ . Cette approche a été développée dans trois modèles murins : le modèle de myélofibrose post-polyglobulie de Vaquez JAK2^{V617F}, le modèle post-thrombocyémie essentielle ou modèle Calréticuline (CALRdel52) et le modèle TPO^{high}. Le modèle MF-post PVJAK2^{V617F} est établi depuis de nombreuses années, la fibrose médullaire se développe quatre à six mois après la phase de myéloprolifération de type PV¹⁵⁵. De même, dans le modèle Calréticuline, plus récent, la fibrose se développe en six à neuf mois après une phase de myéloprolifération proche du phénotype d'une TE. Dans les modèles murins de NMPs par mutation de la calréticuline, seule la mutation *CALRdel52* mène à une myélofibrose secondaire, la mutation *CALRins5* conduisant uniquement à une thrombocytose¹⁵⁹. L'intérêt des modèles murins MF-post PVJAK2^{V617} et Calréticuline réside dans la physiopathologie et l'évolution de la maladie, proches de ce qui est constaté chez l'être humain. Cependant, ces modèles sont longs à établir et il faut plusieurs mois avant que la chute de l'hémoglobine en lien avec la fibrose n'apparaisse. De plus l'évolution vers la fibrose dans le modèle MF-post PVJAK2^{V617} est décrite comme hétérogène¹⁵⁵. Nous avons donc utilisé un modèle murin de myélofibrose plus rapide et très reproductible, nommé TPO^{high}. Dans ce modèle obtenu par transduction rétrovirale des progéniteurs hématopoïétiques murins, le taux de TPO circulante est 1000 à 10 000 fois supérieur au taux physiologique. Les souris développent une fibrose dès 10 semaines post-transplantation, rapidement extensive et létale¹⁹⁹. Le choix des ligands de PPAR γ utilisés pour traiter les souris a été motivé par le contexte de recherche translationnelle de ce travail. Nous avons privilégié des molécules disposant ou ayant disposé d'une autorisation de mise sur le marché et pour lesquelles le recul clinique est important. La pioglitazone a été développé comme anti-diabétique oral dans les années 90, son profil de tolérance a été bien étudié chez les patients diabétiques. De plus, la pioglitazone est le ligand qui a été choisi pour montrer l'impact de l'activation de la voie PPAR γ /STAT5 dans la LMC^{153,380}. La mésalazine est quant à elle un dérivé salicylé très ancien, utilisé depuis les années 70 pour traiter diverses pathologies inflammatoires chroniques.

Comme attendu, nous avons observé une chute de l'hémoglobine dès la semaine 12 pour le modèle TPO^{high} qui est le modèle le plus agressif et à la semaine 20 pour les modèles MF post-PVJAK2^{V617F} et Calréticuline. Dans chacun des modèles, le traitement par ligand de PPAR γ prévient la chute de l'hémoglobine qui accompagne le développement de la fibrose médullaire. Il est à noter qu'un traitement initié même tardivement (semaine 20 dans le cas du modèle de MF-post-PVJAK2^{V617F}) est capable de prévenir la chute de l'hémoglobine. La cellularité médullaire est également supérieure chez les animaux traités, de même que le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques. Dans les modèles MF post-PVJAK2^{V617F} et TPO^{high}, le traitement par ligands de PPAR γ permet de contrôler en partie la splénomégalie. Les analyses histologiques soulignent le potentiel thérapeutique des ligands de PPAR γ puisque la réduction du remodelage du micro-environnement médullaire est franche dans le modèle MF post-PVJAK2^{V617F}. En effet, la moelle osseuse des animaux traités présente une réduction du grade de la fibrose et de l'ostéosclérose ainsi qu'une diminution du nombre de mégacaryocytes. L'analyse des rates montre une architecture mieux préservée chez les animaux traités, un nombre de mégacaryocytes réduits et une fibrose splénique moins importante. Dans le modèle TPO^{high}, nous n'avons pas pu montrer de différence dans les analyses histologiques des rates et des fémurs des souris traitées et non traitées, en dehors d'une architecture splénique qui semble mieux préservé dans le groupe traité. Ce modèle est loin de la physiopathologie des NMPs, et il est possible que la rapidité de progression vers une fibrose extensive ne permette pas de mettre en évidence des différences anatomo-pathologiques. Les analyses du modèle Calréticuline, actuellement en cours, seront d'intérêt pour conforter le rôle de PPAR γ dans le remodelage du micro-environnement médullaire.

L'ensemble de ces résultats soutient fortement le potentiel thérapeutique des ligands de PPAR γ dans la prise en charge de la myélofibrose. Nous avons voulu déterminer si l'activation de PPAR γ a un effet sur le clone hématopoïétique, sur l'inflammation ou sur le développement de la fibrose médullaire, et nous avons abordé chacun de ces points individuellement.

Afin d'évaluer les effets des ligands de PPAR γ sur la myéloprolifération nous avons étudié l'effet d'un traitement précoce (semaine 6 après la transplantation de moelle osseuse) respectivement sur l'hématocrite dans un modèle de PV (JAK2^{V617F}-GFP) et la thrombocytose dans un modèle de TE (CALRdel52-GFP). En explorant l'effet du traitement sur les premiers stades du développement de la PV et de la TE nous espérons nous placer dans des conditions où les effets de l'inflammation restent limités et où la fibrose médullaire n'est pas encore présente. Nous avons observé que l'activation du récepteur PPAR γ réduit de manière significative le pourcentage d'hématocrite dans le modèle PV (réduction supérieure ou égale à 10 points) sans toutefois parvenir à ramener le taux d'hématocrite dans des valeurs normales. Dans le cadre de la TE, les ligands de PPAR γ permettent de ralentir significativement l'augmentation du nombre de plaquettes, cependant à la semaine 15, bien que l'effet

sur les plaquettes soit encore visible, il n'est plus significatif. Ces deux observations montrent que l'activation de PPAR γ contrôle en partie la myéloprolifération dans les modèles pré-cliniques murins de PV et de TE et suggèrent également que l'utilisation d'un agoniste de PPAR γ en monothérapie n'est pas suffisante pour contrecarrer totalement la myéloprolifération. Dans le modèle murin TPO^{high}, la pioglitazone comme la mésalazine, réduisent significativement l'augmentation du nombre de plaquettes (semaine 7, semaine 11) sur les stades qui précèdent l'installation de la fibrose médullaire. La chute du nombre de plaquettes après la semaine 14 est d'interprétation plus délicate puisqu'elle est probablement associée à la défaillance médullaire. Ce modèle est beaucoup moins facilement extrapolable aux néoplasmes myéloprolifératifs que les modèles JAK2^{V617F} et Calréticuline, néanmoins, ces données soutiennent un effet anti-prolifératif des ligands de PPAR γ . Lors de cette approche, l'utilisation des modèles JAK2^{V617F} et CALRdel52 co-exprimant la GFP nous a permis d'évaluer l'effet du traitement sur les cellules exprimant les mutations. Dans le modèle murin de PV JAK2^{V617F}, nous montrons que le traitement par pioglitazone réduit spécifiquement les cellules exprimant la mutation. Dans le modèle murin CALRdel52, nous observons une réduction plus modeste et non significative des cellules GFP-positives. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence. La mutation JAK2V617 apporte un avantage qui est intrinsèque à la cellule mutée alors que dans le cas du modèle CALRdel52 on ne peut pas exclure un effet paracrine de la protéine calréticuline mutée et sécrétée, et donc l'activation de cellules ne portant pas la mutation. La réduction de la thrombocytose dans ce modèle refléterait alors un effet plus général sur l'hématopoïèse. Par ailleurs, dans le modèle CALRdel52, le taux initial de cellules transplantées présentant la mutation est supérieur et l'expansion des cellules mutées (GFP positives) apparaît plus important que dans le modèle JAK2^{V617}, débordant peut-être l'effet de la pioglitazone. Quoi qu'il en soit, la réduction spécifique du clone muté est d'intérêt. Chez l'être humain, une charge allélique JAK2V617F élevée est corrélée au risque de complications thrombotiques et hémorragiques⁴²³, ainsi qu'à une diminution de l'hémoglobine et à une maladie plus agressive^{424,425}, quand bien même l'effet de la réduction de la charge allélique sur la survie des patients n'est pas claire.

Parallèlement aux résultats obtenus dans les modèles murins, nous avons évalué *in vitro* et *ex vivo* l'effet de la pioglitazone sur la prolifération de cellules de lignées hématopoïétiques portant la mutation JAK2V617F (lignées UKE-1 et HEL) et sur la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ issus de patients atteints de NMPs (polyglobulie de Vaquez et myélofibrose primitive ou secondaire). Nous avons montré que la pioglitazone induit une réduction de la viabilité cellulaire et de la clonogénicité des cellules. Cet effet pourrait être dû à l'addiction des cellules malignes de NMPs à la voie JAK-STAT. Toutefois, nos expériences ne sont pas concluantes, le taux de la forme phosphorylée de STAT5 évalué par cytométrie en flux apparaît diminué dans les cellules de lignées UKE-1 et HEL après traitement par la pioglitazone mais nous n'avons pas pu confirmer ce résultat sur les cellules sanguines nucléées du modèle murin JAK2^{V617F}. Cette discordance dans les résultats peut être

expliquée par la grande hétérogénéité des cellules sanguines nucléées avec une importante activation de STAT5 dans les cellules matures et notamment dans les lymphocytes. Des expériences complémentaires ciblant spécifiquement STAT5 dans les sous-populations de progéniteurs et de cellules souches hématopoïétiques, tant dans les modèles murins que dans les progéniteurs CD34+ issus de patients, sont nécessaires pour caractériser l'implication de l'axe PPAR γ /STAT5 dans la myéloprolifération. D'autres mécanismes anti-prolifératifs sont envisageables comme le rôle de la voie Wnt/ β -caténine impliquée dans les mécanismes de prolifération cellulaire⁴²⁶. Les voies PPAR γ et Wnt/ β -caténine sont antagonistes, la régulation positive de l'une entraînant la régulation négative de l'autre. Dans nos modèles, la régulation négative de la voie Wnt/ β -caténine par PPAR γ pourrait expliquer en partie l'effet anti-prolifératif observé. Quelques études ont montré la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine dans la myélofibrose primitive⁴²⁷. Une étude s'intéressant à l'expression histologique de la β -caténine et de PPAR γ dans la moelle osseuse de trente patients atteints de NMPs classiques a mis en évidence une présence plus élevée de la β -caténine chez les patients atteints de PV que chez les patients atteints de MFP et une présence plus importante de PPAR γ dans les mégacaryocytes médullaires de patients atteints de MFP comparés aux patients atteints de PV. Ces résultats montrent le rôle potentiel des deux voies dans les NMPs sans qu'il soit possible d'en tirer des conclusions claires quant à leur régulation⁴²⁸. Par ailleurs, nous montrons que la réduction du nombre de cellules vivantes en présence de pioglitazone est associée à une augmentation de la fréquence des cellules en phase G0/G1 et à une augmentation de l'apoptose. Les voies qui sous-tendent ces deux effets n'ont pas été étudiées de manière extensive, cependant, l'une des hypothèses est la régulation positive de la protéine p21, impliquée dans le cycle cellulaire, par PPAR γ . En effet, des éléments de réponse au PPAR (PPRE) sont présents sur les promoteurs de la protéine p21, et, dans les cellules des lignées UKE-1 et HEL, nous avons trouvé des taux de transcrit de p21 supérieurs dans les cellules traitées par pioglitazone comparés aux taux des cellules non traitées, confortant le rôle de l'arrêt du cycle cellulaire dans l'effet anti-prolifératif. Cet effet des thiazolidinediones a déjà été rapporté dans des cellules de lignée de cancer de la prostate, dans lesquelles la rosiglitazone et la ciglitazone altèrent le cycle cellulaire, en partie en induisant une augmentation de la protéine p21⁴²⁹. Le rôle anti-prolifératif de PPAR γ est également souligné par l'effet délétère d'un dominant négatif de PPAR γ dans un sous-type de cancer de la thyroïde, le carcinome folliculaire. Dans cette forme de cancer, il est retrouvé dans 30 à 35% des cas une fusion des gènes *PAX8* (*paired box gene 8*) et *PPARG*, responsable de la production d'une protéine de fusion PAX8-PPAR γ nommée PPFP. PPFP est une oncoprotéine qui agirait comme un dominant négatif inhibiteur de la forme sauvage de PPAR γ , supprimant alors son action anti-tumorale et notamment son action anti-proliférative dans les cellules de lignées. De plus, dans un modèle murin de cancer de la thyroïde PPFP positif, la pioglitazone diminue de façon significative la taille de la tumeur et prévient l'apparition de métastase en activant l'allèle non muté de *PPARG*⁴³⁰.

L'inflammation a été abordée *ex vivo* et *in vivo*. Nous avons quantifié les transcrits de gènes de l'inflammation dans les cellules nucléées de sang périphérique issues de souris JAK2^{V617F} traitées ou non par la pioglitazone au stade de polyglobulie et au stade précoce de myélofibrose. Au stade de polyglobulie, nous n'avons mis en évidence aucune différence entre les souris traitées et les souris non traitées. En revanche, au stade de myélofibrose, nous avons observé une réduction significative du taux de transcrits du TGF- β 1 et une augmentation significative des taux de l'inhibiteur α de NF- κ B (NF- κ B α ou I κ B α) et du récepteur antagoniste de l'IL1 (IL1RA) chez les souris traitées. Outre son rôle pro-fibrotique, le TGF- β 1 est une cytokine impliquée dans l'inflammation, avec des propriétés pro ou anti-inflammatoires en fonction du contexte. Les taux de TGF- β 1 circulant sont élevés chez les patients atteints de MFP^{194–196} de même que dans les modèles murins²⁰⁰. La réduction de son expression chez les souris traitées par pioglitazone est en faveur d'un meilleur contrôle de l'inflammation et pourrait contribuer à l'effet protecteur de PPAR γ sur le stroma médullaire. Les facteurs I κ B α et IL1RA sont deux acteurs de la réponse anti-inflammatoire et sont des gènes cibles de PPAR γ ^{398,431}. L'IL1RA appartient à la famille de l'IL1 et se lie au récepteur à l'IL1 sans induire de réponse cellulaire, antagonisant ainsi de façon compétitive les effets pro-inflammatoires de l'IL1 α et de l'IL1 β ⁴³². Le facteur I κ B α contrecarre les effets de NF- κ B, facteur de transcription majeur dans l'inflammation, en masquant le signal de localisation nucléaire, induisant sa séquestration dans le cytoplasme⁴³³. PPAR γ est également capable d'interagir directement avec NF- κ B en se comportant comme une ubiquitine ligase sur sa sous-unité p65. L'ubiquitination de la sous-unité p65 entraîne sa dégradation et bloque la transduction du signal associé à NF- κ B³⁰². Nos résultats *ex vivo* suggèrent donc un contrôle de l'inflammation par les ligands de PPAR γ . *In vivo*, les souris traitées par ligands de PPAR γ ont une hyperleucocytose significativement réduite par rapport aux souris non traitées, en faveur d'une inflammation systémique atténuée.

La réduction du nombre de cellules du clone malin peut en partie expliquer une réduction de la fibrose passant par une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. Cependant, il est rapporté un potentiel anti-fibrotique des ligands de PPAR γ dans différents organes, en dehors de tout contexte néoplasique^{405,408,416}. Afin de nous affranchir du rôle du clone malin sur le développement de la fibrose et d'évaluer le potentiel anti-fibrotique de PPAR γ , nous avons utilisé des modèles *in vitro* de cellules de stroma médullaire de lignées humaine ou murine et de cellules de stroma médullaire humain issues de patients. Nous avons cherché à mettre en évidence les mécanismes qui sous-tendent l'effet protecteur de PPAR γ , en nous focalisant sur les interactions avec la voie du TGF- β 1, largement impliquée dans le développement de la fibrose en général et dans le remaniement du micro-environnement médullaire dans la myélofibrose primitive en particulier. En effet, des taux élevés de TGF- β 1 sont retrouvés chez les patients atteints de leucémie mégacaryoblastique avec myélofibrose secondaire¹⁹⁷, chez les patients atteints de myélofibrose primitive^{194–196} et dans les modèles murins de myélofibrose²⁰⁰. De plus, dans les modèles murins TPO^{high} et GATA1^{low}, l'absence

de TGF- β 1 limite considérablement l'apparition de la fibrose médullaire^{200,201}. Par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, par surexpression et par ChIP-seq, nous avons montré que l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ était responsable du déplacement du co-facteur de transcription p300 de la voie du TGF- β 1 vers la voie PPAR γ . Dans ces conditions, l'ajout de pioglitazone bloque l'induction par le TGF- β 1 de gènes cibles directement impliqués dans le développement de la fibrose, contribuant ainsi à restreindre le remodelage tissulaire. Un tel système de compétition au niveau du co-facteur p300 a été précédemment rapporté dans le cadre de l'inhibition de l'induction du gène du collagène de type 1 A2 (*COL1A2*) par le TGF- β en présence d'interféron α . Dans ce cas, la compétition pour le recrutement du co-facteur p300 se fait entre Smad2/3 (voie canonique du TGF- β) et STAT1, facteur de transcription activé par l'IFN α ⁴³⁴. D'autres mécanismes pourraient être mis en jeu dans la réduction de la fibrose par les ligands de PPAR γ . La régulation négative de la voie Wnt/ β -caténine semble également un candidat potentiel dans l'effet protecteur de PPAR γ . Dans un modèle de fibrose de cornée, l'activation de PPAR γ entraîne la régulation négative de la β -caténine et exerce un effet protecteur sur l'induction de gènes pro-fibrotiques⁴¹⁹. Dans un autre modèle de fibrose induit par l'irradiation, l'activation de PPAR γ régule négativement la voie Wnt/ β -caténine, entraînant la régulation négative du TGF- β 1 qui est médié par cette voie et limite le contexte pro-fibrotique⁴²⁰. Concernant plus spécifiquement la fibrose médullaire, il n'existe pas de donnée sur le rôle de la voie Wnt/ β -caténine si ce n'est une étude descriptive montrant la corrélation entre la dérégulation de Wnt et le développement de la fibrose médullaire dans une famille porteuse d'une mutation héréditaire activatrice de WNT1⁴³⁵.

Dans ce travail, nous avons choisi de traiter les souris uniquement par un ligand de PPAR γ sans l'associer aux traitements conventionnels des NMPs. Le choix de la monothérapie est basé sur notre volonté de déterminer le rôle de la voie PPAR γ dans la prise en charge de la myélofibrose primitive. Bien que nous ayons montré une efficacité du traitement dans les modèles murins, ce choix n'est probablement pas le plus pertinent en clinique. En effet, si le traitement par ligand de PPAR γ permet une amélioration des paramètres hématologiques, il ne permet pas la normalisation de l'hématocrite ou du taux de plaquettes. Or, chez les patients, l'obtention d'un hématocrite inférieur à 45% dans la PV et la normalisation du taux de plaquettes dans la TE sont les objectifs du traitement et sont corrélés à une amélioration du risque thromboembolique^{436,437}. Dans la myélofibrose primitive, les objectifs du traitement sont moins bien définis. Chez les patients non éligibles à un traitement intensif par allogreffe de cellules souches hématopoïétique, actuellement, le but recherché est l'amélioration des symptômes qui altèrent la qualité de vie tels que l'anémie, la splénomégalie et les symptômes constitutionnels.

Il semble plus pertinent de s'intéresser à l'apport d'un traitement par ligand de PPAR γ en association avec le traitement conventionnel chez les patients et notamment avec les inhibiteurs de JAK. En effet, ces traitements ont démontré leur efficacité sur les symptômes constitutionnels et la

taille de la rate dans la myélofibrose primitive, en rapport en partie avec leur activité anti-inflammatoire. L'ajout d'un ligand de PPAR γ pourrait avoir un effet additionnel sur le contrôle de l'inflammation, les voies de signalisation mises en jeu étant différentes. Les inhibiteurs de JAK ont peu d'effet sur le développement de la fibrose, l'effet protecteur de PPAR γ sur le stroma pourrait se révéler un atout dans le ralentissement de la progression de la fibrose. Le traitement par ruxolitinib (inhibiteur de JAK1/2) est actuellement le seul autorisé en première intention chez les patients symptomatiques atteints de myélofibrose primitive et pourrait être associé à la pioglitazone. L'association de deux médicaments pose la question des effets secondaires cumulés. Cependant les deux molécules sont utilisées chez les patients depuis de nombreuses années et leurs profils de tolérance et de sécurité sont bien connus. L'un des principaux effets indésirables lors de l'utilisation du ruxolitinib est l'apparition ou l'aggravation d'une anémie. Les ligands de PPAR γ ont également un rôle de frein sur l'érythropoïèse³⁶⁸. Quoiqu'il en soit, chez les patients diabétiques traités par pioglitazone, la réduction de l'hémoglobine induite par le traitement est très modérée et les patients ne développent pas d'anémie⁴³⁸. Dans nos modèles murins, nous n'avons pas non plus constaté d'anémie chez les souris traitées par pioglitazone ou méglazine. Si un effet synergique de l'association du ruxolitinib et des ligands de PPAR γ est mis en évidence, notamment sur l'inflammation, la diminution de la dose de ruxolitinib pourrait être envisagée, limitant ainsi les cytopénies induites par le traitement. Un autre effet indésirable important du ruxolitinib est l'augmentation du risque infectieux en rapport avec l'immunosuppression induite par le traitement. Un tel effet n'a jamais été rapporté avec la pioglitazone. Par ailleurs, l'étude clinique « ACTIM » a déjà testé l'association d'un inhibiteur de tyrosine kinase, l'imatinib, et de la pioglitazone chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique, et le profil de tolérance de cette association s'est révélé excellent³⁸⁰. Enfin, il faut rappeler ici que la pioglitazone n'est plus disponible en France du fait du risque controversé d'apparition de cancer de la vessie sous traitement. Cependant, s'il existe de nombreuses alternatives thérapeutiques aux thiazolidinediones dans le traitement du diabète de type 2, ce n'est pas le cas dans la myélofibrose primitive, où le choix des traitements est limité. Par ailleurs, un suivi par échographie vésicale tous les six mois pendant la phase de traitement et jusqu'à un an après l'arrêt de la pioglitazone n'a mis en évidence aucun cancer de la vessie chez les patients de l'étude « ACTIM ».

Une autre molécule d'intérêt dans la prise en charge des NMPs est l'interféron α (IFN α). Ce traitement est le plus souvent utilisé en deuxième intention et a montré, dans la myélofibrose primitive, une efficacité sur les symptômes constitutionnels et la taille de la rate dans les stades précoces. Cependant, une expérience menée par l'équipe de Jean-Luc Villeval (Gustave Roussy) visant à traiter des souris du modèle de polyglobulie JAK2^{V617F} par IFN α et pioglitazone s'est révélée décevante, l'association des deux molécules annulant la réduction de l'hématocrite constatée avec l'IFN α seul (données non publiées). Cet effet antagoniste pourrait être expliqué par la compétition des deux voies pour le recrutement du-cofacteur p300. La réponse à l'IFN α met en jeu la voie JAK/STAT et active le

facteur de transcription STAT1^{439,440}, et STAT1 va recruter le co-facteur de transcription p300 afin d'activer ses gènes cibles, or STAT1 agit au niveau du même site d'interaction avec p300 que PPAR γ ⁴⁴¹ (**Figure 43**).

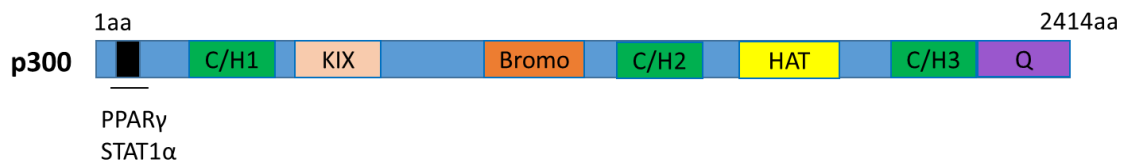


Figure 43 : Domaines fonctionnels du co-facteur de transcription p300.

PPAR γ et STAT1 se fixent au niveau du même site d'interaction sur le co-facteur p300. CH: cysteine/histidine-rich. KIX: kinase inhibitory domain. Bromo: bromodomain. HAT: histone acetyltransferase. Q: glutamine-rich. aa: acide aminé. Adapté de Ghosh, Journal of cellular Physiology, 2007.

Un autre enjeu de taille est de déterminer le moment le plus pertinent pour introduire un traitement par ligand de PPAR γ dans l'histoire de la maladie. Nos résultats montrent que le traitement débuté précocement prévient les symptômes en rapport avec la maladie, quel que soit le modèle murin. Dans le modèle MF-post PVJAK2^{V617F}, le traitement initié plus tardivement permet également de réduire les symptômes. Cependant, il n'est pas certain qu'un traitement initié lorsque la fibrose est déjà installée soit aussi efficace. Nos résultats montrent un effet préférentiel du traitement par ligand de PPAR γ sur le clone malin. Chez les patients atteints initialement de polyglobulie de Vaquez ou de thrombocyémie essentielle et nécessitant un traitement, l'association d'un ligand de PPAR γ pourrait diminuer la charge allélique par son effet anti-prolifératif et retarder l'évolution vers la fibrose par son effet anti-inflammatoire et son effet protecteur sur le stroma médullaire.

Nos hypothèses sur l'intérêt d'une association inhibiteur de JAK/ligands de PPAR γ et sur l'efficacité d'un traitement « curatif », c'est-à-dire initié au moment où la fibrose se déclare, pourront être vérifiées dans les modèles pré-cliniques de NMPs.

Nos résultats concernant les effets de l'activation de PPAR γ sur la myéloprolifération et la fibrose, ainsi que le besoin de caractériser le rôle physiologique de PPAR γ dans les cellules hématopoïétiques, nous ont amené à envisager les effets d'une invalidation de PPAR γ dans l'hématopoïèse. Nous avons choisi d'invalider le gène *Ppar γ* chez la souris C57BL/6 avec un système de recombinaison Cre-Lox dans lequel le gène de l'enzyme Cre est sous dépendance du promoteur hématopoïétique Vav-1, permettant d'invalider le gène *Ppar γ* uniquement dans le système hématopoïétique. Nous avons ainsi obtenu dans un premier temps des souris haplo-insuffisantes pour *Ppar γ* puis le croisement de ces souris a permis d'obtenir des souris invalidées pour *Ppar γ* dans le système hématopoïétique. Des expériences de transplantation de moelle osseuse mettant en compétition les progéniteurs

hématopoïétiques des souris haplo-insuffisantes et les progéniteurs hématopoïétiques de souris sauvages sont en cours afin de préciser l'impact physiologique de *Pparγ* sur la prolifération. Les souris haplo-insuffisantes ou invalidées pour *Pparγ* vont également être soumises à des injections de lipopolysaccharide (LPS) dans le but de préciser l'implication de *Pparγ* dans la réponse inflammatoire. L'ensemble de ces approches constitue un projet d'analyse du rôle de PPAR γ dans l'hématopoïèse non pathologique. Concernant les NMPs, nous souhaitons transplanter des progéniteurs hématopoïétiques issus de souris invalidées pour *Pparγ* et transduits avec un rétrovirus JAK2V617F ou CALRdel52 dans des souris receveuses irradiées de façon létale. L'objectif est ici d'explorer l'impact de l'invalidation de *Pparγ* sur l'histoire naturelle de ces maladies en faisant l'hypothèse que l'évolution de la maladie en l'absence PPAR γ sera plus rapide et plus agressive.

Les mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* et la protéine p53 mutée qui en résulte sont largement impliqués dans l'agressivité et la progression des cancers. En 2003, Nagamine *et al.* ont rapporté que les ligands de PPAR γ (troglitazone) induisent l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose dans une lignée de cancer de l'estomac. De façon intéressante il a été mis en évidence que l'expression de la p53 est régulée positivement, de façon temps-dépendante, en présence de troglitazone. Dans ce modèle, la transfection des cellules par un dominant négatif de p53 abroge l'effet anti-apoptotique des ligands de PPAR γ , suggérant que la p53 est un médiateur de l'apoptose induite par la troglitazone⁴⁴². Depuis, la régulation positive de la p53 et de son effecteur la p21, induite par les ligands de PPAR γ , TZD ou 15d-PGJ2, a été impliquée dans l'effet anti-apoptotique et dans l'arrêt de la croissance cellulaire dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses^{443,444}. Dans les modèles murins de NMPs, l'évolution naturelle ne se fait pas vers la transformation aigue, contrairement à l'être humain, chez lequel la MFP, la PV et la TE peuvent évoluer en leucémie aiguë myéloïde avec un risque respectivement de 20 %, 10 % et moins de 5% par an. Il a été montré que la p53 est rarement mutée dans la phase chronique des NMPs mais que la mutation est présente dans 25 à 30% des LAM secondaires aux NMPs. De plus, la perte de la p53 dans un modèle murin de NMP JAK2V617F, obtenue par transfection de cellules hématopoïétiques provenant de souris KO pour p53 avec un rétrovirus JAK2V617F puis transplantation dans des souris receveuses, entraîne une transformation aigue dans les 3 mois post-transplantation⁴⁴⁵. Ces résultats suggèrent que l'acquisition d'une mutation perte de fonction de la p53 dans le clone hématopoïétique responsable du NMP est suffisante à la transformation aigue. Il serait donc intéressant d'explorer l'effet des ligands de PPAR γ sur la régulation positive de la p53 dans nos modèles de NMPs, et secondairement d'explorer leur capacité à réduire l'évolution vers la transformation aiguë. Comme les modèles de NMPs JAK2^{V617F} et CALRdel52 n'évoluent pas vers la transformation aiguë, leur transposition dans un modèle *Pparγ*^{-/-} dans les cellules hématopoïétiques permettrait d'explorer l'influence de PPAR γ sur la capacité des modèles à évoluer vers une transformation.

Conclusion générale

Au cours de la dernière décennie, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence que le développement et le maintien des néoplasmes myéloprolifératifs dépendent non seulement de la survenue d'une mutation conductrice au sein d'une cellule souche hématopoïétique, mais également d'interactions avec le microenvironnement qui viennent soutenir le clone malin. La myélofibrose primitive est un exemple de ce modèle, avec une interaction étroite entre prolifération du clone malin, installation d'un contexte inflammatoire, et remodelage réactionnel du stroma médullaire.

Dans ce travail, notre objectif principal était d'évaluer le potentiel thérapeutique des ligands de PPAR γ dans la prise en charge de la myélofibrose primitive. Afin d'avoir une approche globale, nous avons utilisé trois modèles murins, le modèle TPO^{high}, rapide et reproductible, et deux modèles murins pré-cliniques JAK2^{V617} et CALRdel52, plus proches de la maladie humaine. Dans ces trois modèles, nous avons pu montrer que les ligands de PPAR γ contrecarrent en partie le phénotype myéloprolifératif et retardent l'apparition de la fibrose. Notre approche *in vitro* et *ex vivo* nous a permis de montrer que les ligands de PPAR γ limitent la prolifération du clone hématopoïétique, réduisent l'inflammation et ont un effet protecteur vis-à-vis du stroma médullaire.

Les perspectives de ce travail se scindent en plusieurs parties. Nous avons établi l'effet anti-prolifératif des ligands de PPAR γ , toutefois les mécanismes qui sous-tendent cet effet ont été peu étudiés. Une étude plus extensive du cycle cellulaire et des voies de signalisation qui le régule, de même que l'étude précise du potentiel rôle de l'axe PPAR γ /STAT5 doivent être envisagées. De plus, étant donné la possibilité d'une régulation positive de p53 sous contrôle de PPAR γ , le rôle de cette protéine dans la phase de myéloprolifération chronique et dans la transformation aiguë en présence de ligand de PPAR γ et dans le système invalidé pour *Ppar γ* mérite d'être étudié. La transposition des modèles murins de NMPs dans le système invalidé pour *Ppar γ* sera également une autre manière d'appréhender le rôle de PPAR γ dans l'agressivité des NMPs. L'impact de l'activation de PPAR γ sur l'inflammation est un autre point qu'il serait intéressant d'approfondir. Nous avons pu montrer une réduction de la leucocytose ainsi qu'une diminution de l'expression du TGF- β 1 et une augmentation des facteurs anti-inflammatoires Il-1ra et I κ B α dans les cellules hématopoïétiques nucléées du modèle JAK2^{V617F} au stade de myélofibrose. Dans ce modèle, notre approche par CBA ne nous a cependant pas permis d'apporter de réponse sur une éventuelle modulation des cytokines plasmatiques pro-inflammatoires. D'autres technologies décrites comme plus sensibles (*multiplex assay*) devront être envisagées. Le modèle JAK2^{V617F} de par son hémocrite très élevé, n'est sans doute pas le modèle murin qui se prête le plus à la collecte du plasma. Cette approche pourrait être envisagée dans le modèle TPO^{high}, qui de par son agressivité plus importante devrait présenter des taux de cytokines inflammatoires plasmatiques plus élevés.

La myélofibrose primitive est une maladie grave, engageant le pronostic vital des patients à moyen terme. Bien que le ruxolitinib soit un traitement efficace sur les symptômes constitutionnels et la taille de la rate, il ne semble pas améliorer de façon majeure le pronostic de la maladie. Toute avancée thérapeutique est d'intérêt dans cette pathologie et nous pensons, au vu de nos résultats, qu'associer les ligands de PPAR γ au traitement conventionnel de la myélofibrose primitive, pourrait constituer une nouvelle combinaison thérapeutique dont il faut étudier l'intérêt sur l'apparition ou l'aggravation de l'anémie, sur les symptômes constitutionnels et la qualité de vie et sur l'évolution du remodelage du microenvironnement médullaire.

Sixième partie : Références bibliographiques

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;6(4):372–375.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. Northwestern University: International Agency for Research on Cancer; 2008.
3. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290–293.
4. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306(5940):277–280.
5. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2001;344(14):1031–1037.
6. Cools J, DeAngelo DJ, Gotlib J, et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med*. 2003;348(13):1201–1214.
7. Griffin JH, Leung J, Bruner RJ, Caligiuri MA, Briesewitz R. Discovery of a fusion kinase in EOL-1 cells and idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003;100(13):7830–7835.
8. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*. 1994;77(2):307–316.
9. Ross TS, Gilliland DG. Transforming properties of the Huntingtin interacting protein 1/ platelet-derived growth factor beta receptor fusion protein. *J. Biol. Chem*. 1999;274(32):22328–22336.
10. Steer EJ, Cross NCP. Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31-35: role of the platelet-derived growth factor receptor Beta. *Acta Haematol*. 2002;107(2):113–122.
11. Kim W-S, Park S-G, Park G, et al. 8p11 myeloproliferative syndrome with t(1;8)(q25;p11.2): a case report and review of the literature. *Acta Haematol*. 2015;133(1):101–105.
12. Reiter A, Walz C, Watmore A, et al. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res*. 2005;65(7):2662–2667.
13. Murati A, Gelsi-Boyer V, Adélaïde J, et al. PCM1-JAK2 fusion in myeloproliferative disorders and acute erythroid leukemia with t(8;9) translocation. *Leukemia*. 2005;19(9):1692–1696.
14. Bousquet M, Quelen C, De Mas V, et al. The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene. *Oncogene*. 2005;24(48):7248–7252.
15. Bain BJ, Ahmad S. Should myeloid and lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2 and other rearrangements of JAK2 be recognized as specific entities? *Br. J. Haematol*. 2014;166(6):809–817.
16. Pardanani A, Lasho TL, Laborde RR, et al. CSF3R T618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia. *Leukemia*. 2013;27(9):1870–1873.

17. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(19):1781–1790.
18. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995;92(23):10560–10564.
19. Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96(4):1609–1614.
20. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005;434(7037):1144–1148.
21. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet Lond. Engl.* 2005;365(9464):1054–1061.
22. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(17):1779–1790.
23. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005;7(4):387–397.
24. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J. Biol. Chem.* 2005;280(24):22788–22792.
25. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* 2002;30(3):229–236.
26. Rotunno G, Pacilli A, Artusi V, et al. Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and postessential thrombocythemia myelofibrosis: A study on 359 patients of the AGIMM group. *Am. J. Hematol.* 2016;91(7):681–686.
27. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(5):459–468.
28. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood.* 2011;117(10):2813–2816.
29. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, et al. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19(8):754–759.
30. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature.* 2009;461(7265):819–822.
31. Liu F, Zhao X, Perna F, et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell.* 2011;19(2):283–294.
32. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J. Biol. Chem.* 1999;274(19):13480–13484.
33. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood.* 2006;108(10):3472–3476.

34. Staerk J, Lacout C, Sato T, et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006;107(5):1864–1871.
35. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008;112(1):141–149.
36. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(25):2391–2405.
37. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(25):2379–2390.
38. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(1):249–252.
39. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(2):431–438.
40. Balligand T, Achouri Y, Pecquet C, et al. Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. *Leukemia*. 2016;30(8):1775–1778.
41. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325–1335.
42. Elf S, Abdelfattah NS, Baral AJ, et al. Defining the requirements for the pathogenic interaction between mutant calreticulin and MPL in MPN. *Blood*. 2018;131(7):782–786.
43. Garbati MR, Welgan CA, Landefeld SH, et al. Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism. *Am. J. Hematol.* 2016;91(2):211–219.
44. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*. 2014;123(22):e123-133.
45. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127(3):333–342.
46. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(3):325–332.
47. Zoi K, Cross NCP. Genomics of Myeloproliferative Neoplasms. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2017;35(9):947–954.
48. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220–2228.
49. Breccqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes. Chromosomes Cancer*. 2012;51(8):743–755.
50. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861–1869.

51. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Eur. J. Haematol.* 2009;82(5):329–338.
52. Tefferi A, Dingli D, Li C-Y, Dewald GW. Prognostic diversity among cytogenetic abnormalities in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer.* 2005;104(8):1656–1660.
53. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia.* 2011;25(1):82–88.
54. Tam CS, Abruzzo LV, Lin KI, et al. The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course. *Blood.* 2009;113(18):4171–4178.
55. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur. J. Haematol.* 2014;92(4):289–297.
56. Srouf SA, Devesa SS, Morton LM, et al. Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br. J. Haematol.* 2016;174(3):382–396.
57. Chaite Y, Brenner B, Aghai E, Tatarsky I. High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in northern Israel. *Leuk. Lymphoma.* 1992;7(3):251–255.
58. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 2005;90(8):1128–1132.
59. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114(5):937–951.
60. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic *BCR/ABL*-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2008;22(5):905–914.
61. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009;113(13):2895–2901.
62. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood.* 2010;115(9):1703–1708.
63. Tefferi A, Jimma T, Gangat N, et al. Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. *Blood.* 2011;118(17):4595–4598.
64. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2011;29(4):392–397.
65. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014;124(7):1062–1069.
66. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, et al. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. *Am. J. Hematol.* 2018;93(3):348–355.

67. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rotunno G, et al. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) for Primary Myelofibrosis: An AGIMM & IWG-MRT Project. *Blood*. 2014;124(21):405–405.
68. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2018;36(4):310–318.
69. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2018;36(17):1769–1770.
70. Tefferi A, Guglielmelli P, Finke C, et al. Integration of Mutations and Karyotype Towards a Genetics-Based Prognostic Scoring System (GPSS) for Primary Myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(21):406–406.
71. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018;32(7):1631–1642.
72. Lekovic D, Gotic M, Perunicic-Jovanovic M, et al. Contribution of comorbidities and grade of bone marrow fibrosis to the prognosis of survival in patients with primary myelofibrosis. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 2014;31(3):869.
73. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. *Am. J. Hematol.* 2016;91(9):918–922.
74. Kröger N, Zabelina T, Alchalby H, et al. Dynamic of bone marrow fibrosis regression predicts survival after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2014;20(6):812–815.
75. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia*. 2015;29(11):2126–2133.
76. Martínez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, et al. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Ann. Hematol.* 2010;89(12):1233–1237.
77. Ianotto J-C, Boyer-Perrard F, Gyan E, et al. Efficacy and safety of pegylated-interferon α -2a in myelofibrosis: a study by the FIM and GEM French cooperative groups. *Br. J. Haematol.* 2013;162(6):783–791.
78. Pizzi M, Silver RT, Barel A, Orazi A. Recombinant interferon- α in myelofibrosis reduces bone marrow fibrosis, improves its morphology and is associated with clinical response. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 2015;28(10):1315–1323.
79. Ianotto J-C, Chauveau A, Boyer-Perrard F, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon- α 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*. 2018;103(3):438–446.
80. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Domingo A, Arellano-Rodrigo E, Montserrat E. Efficacy and tolerability of danazol as a treatment for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: long-term results in 30 patients. *Br. J. Haematol.* 2005;129(6):771–775.

81. Crisà E, Cilloni D, Elli EM, et al. The use of erythropoiesis-stimulating agents is safe and effective in the management of anaemia in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib. *Br. J. Haematol.* 2018;
82. Tefferi A, Al-Ali HK, Barosi G, et al. A randomized study of pomalidomide vs placebo in persons with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis and RBC-transfusion dependence. *Leukemia.* 2017;31(4):896–902.
83. Weinkove R, Reilly JT, McMullin MF, et al. Low-dose thalidomide in myelofibrosis. *Haematologica.* 2008;93(7):1100–1101.
84. Tefferi A, Mesa RA, Nagorney DM, Schroeder G, Silverstein MN. Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood.* 2000;95(7):2226–2233.
85. Elliott MA, Chen MG, Silverstein MN, Tefferi A. Splenic irradiation for symptomatic splenomegaly associated with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* 1998;103(2):505–511.
86. Steensma DP, Hook CC, Stafford SL, Tefferi A. Low-dose, single-fraction, whole-lung radiotherapy for pulmonary hypertension associated with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* 2002;118(3):813–816.
87. Bose P, Verstovsek S. JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms: what is next? *Blood.* 2017;130(2):115–125.
88. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(9):799–807.
89. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica.* 2015;100(4):479–488.
90. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian J-J, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood.* 2013;122(25):4047–4053.
91. Kvasnicka HM, Thiele J, Bueso-Ramos CE, et al. Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2018;11(1):42.
92. Verstovsek S, Gotlib J, Mesa RA, et al. Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2017;10(1):156.
93. Mascarenhas J, Hoffman R, Talpaz M, et al. Pacritinib vs Best Available Therapy, Including Ruxolitinib, in Patients With Myelofibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018;4(5):652–659.
94. Mesa RA, Kiladjian J-J, Catalano JV, et al. SIMPLIFY-1: A Phase III Randomized Trial of Mometinib Versus Ruxolitinib in Janus Kinase Inhibitor-Naïve Patients With Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2017;35(34):3844–3850.
95. Harrison CN, Vannucchi AM, Platzbecker U, et al. Mometinib versus best available therapy in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (SIMPLIFY 2): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2018;5(2):e73–e81.

96. Pardanani A, Harrison C, Cortes JE, et al. Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2015;1(5):643–651.
97. Harrison CN, Schaap N, Vannucchi AM, et al. Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *Lancet Haematol.* 2017;4(7):e317–e324.
98. Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, et al. A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(10):908–919.
99. Verstovsek S, Mesa RA, Foltz LM, et al. Phase 2 Trial of PRM-151, an Anti-Fibrotic Agent, in Patients with Myelofibrosis: Stage 1 Results. *Blood.* 2014;124(21):713–713.
100. Sasaki K, Gotlib JR, Mesa RA, et al. Phase II evaluation of IPI-926, an oral Hedgehog inhibitor, in patients with myelofibrosis. *Leuk. Lymphoma.* 2015;56(7):2092–2097.
101. Kim HJ, Tisdale JF, Wu T, et al. Many multipotential gene-marked progenitor or stem cell clones contribute to hematopoiesis in nonhuman primates. *Blood.* 2000;96(1):1–8.
102. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood.* 1978;51(2):189–194.
103. Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science.* 1997;277(5332):1630–1635.
104. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell.* 2001;8(6):1327–1338.
105. Radtke S, Hermanns HM, Haan C, et al. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J. Biol. Chem.* 2002;277(13):11297–11305.
106. Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J. Biol. Chem.* 2005;280(29):27251–27261.
107. Syed RS, Reid SW, Li C, et al. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature.* 1998;395(6701):511–516.
108. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene.* 2002;21(21):3334–3358.
109. Garcia R, Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J. Biomed. Sci.* 1998;5(2):79–85.
110. Yang J, Liao X, Agarwal MK, et al. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev.* 2007;21(11):1396–1408.
111. Hu X, Dutta P, Tsurumi A, et al. Unphosphorylated STAT5A stabilizes heterochromatin and suppresses tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110(25):10213–10218.
112. Gough DJ, Marié IJ, Lobry C, Aifantis I, Levy DE. STAT3 supports experimental K-RasG12D-induced murine myeloproliferative neoplasms dependent on serine phosphorylation. *Blood.* 2014;124(14):2252–2261.
113. Lee JE, Yang Y-M, Liang F-X, et al. Nongenomic STAT5-dependent effects on Golgi apparatus and endoplasmic reticulum structure and function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2012;302(5):C804–820.

114. Verdier F, Walrafen P, Hubert N, et al. Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J. Biol. Chem.* 2000;275(24):18375–18381.
115. Hitchcock IS, Chen MM, King JR, Kaushansky K. YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood.* 2008;112(6):2222–2231.
116. Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 1995;80(5):729–738.
117. Ram PA, Waxman DJ. Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 1997;272(28):17694–17702.
118. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 2004;117(8):1281–1283.
119. Palvimo JJ. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem. Soc. Trans.* 2007;35(Pt 6):1405–1408.
120. Ward AC, Touw I, Yoshimura A. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood.* 2000;95(1):19–29.
121. Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br. J. Haematol.* 2006;134(4):366–384.
122. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell.* 1993;74(2):227–236.
123. Touw IP, van de Geijn G-JM. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2007;12:800–815.
124. Shimoda K, Feng J, Murakami H, et al. Jak1 plays an essential role for receptor phosphorylation and Stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1997;90(2):597–604.
125. Schmitt-Ney M, Happ B, Ball RK, Groner B. Developmental and environmental regulation of a mammary gland-specific nuclear factor essential for transcription of the gene encoding beta-casein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89(7):3130–3134.
126. Azam M, Lee C, Strehlow I, Schindler C. Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing. *Immunity.* 1997;6(6):691–701.
127. Soldaini E, John S, Moro S, et al. DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(1):389–401.
128. Teglund S, McKay C, Schuetz E, et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell.* 1998;93(5):841–850.
129. Moriggl R, Marine JC, Topham DJ, et al. Differential roles of cytokine signaling during T-cell development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1999;64:389–395.

130. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999;98(2):181–191.
131. Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, et al. Ineffective erythropoiesis in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*. 2001;98(12):3261–3273.
132. Yao Z, Cui Y, Watford WT, et al. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006;103(4):1000–1005.
133. Hoelbl A, Kovacic B, Kerenyi MA, et al. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood*. 2006;107(12):4898–4906.
134. Bunting KD, Bradley HL, Hawley TS, et al. Reduced lymphomyeloid repopulating activity from adult bone marrow and fetal liver of mice lacking expression of STAT5. *Blood*. 2002;99(2):479–487.
135. Wang Z, Li G, Tse W, Bunting KD. Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient nonablative stem cell replacement. *Blood*. 2009;113(20):4856–4865.
136. Wang Z, Bunting KD. STAT5 in hematopoietic stem cell biology and transplantation. *JAK-STAT*. 2013;2(4):e27159.
137. Schuringa JJ, Wu K, Morrone G, Moore MAS. Enforced activation of STAT5A facilitates the generation of embryonic stem-derived hematopoietic stem cells that contribute to hematopoiesis in vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 2004;22(7):1191–1204.
138. Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G, Moore MAS. Constitutive activation of STAT5A promotes human hematopoietic stem cell self-renewal and erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* 2004;200(5):623–635.
139. Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y, et al. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med.* 2005;202(1):169–179.
140. Jang Y-Y, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007;110(8):3056–3063.
141. Casetti L, Martin-Lannerée S, Najjar I, et al. Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Cancer Res.* 2013;73(7):2052–2058.
142. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 2007;128(2):325–339.
143. Ilaria RL, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J. Biol. Chem.* 1996;271(49):31704–31710.
144. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*. 2000;95(6):2118–2125.
145. Scherr M, Chaturvedi A, Battmer K, et al. Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML). *Blood*. 2006;107(8):3279–3287.
146. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood*. 2000;96(6):2269–2276.

147. Walz C, Ahmed W, Lazarides K, et al. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood*. 2012;119(15):3550–3560.
148. Ye D, Wolff N, Li L, Zhang S, Ilaria RL. STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice. *Blood*. 2006;107(12):4917–4925.
149. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2011;117(12):3409–3420.
150. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, et al. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol. Med*. 2010;2(3):98–110.
151. Warsch W, Grundschober E, Berger A, et al. STAT5 triggers BCR-ABL1 mutation by mediating ROS production in chronic myeloid leukaemia. *Oncotarget*. 2012;3(12):1669–1687.
152. Bourgeais J, Ishac N, Medrzycki M, et al. Oncogenic STAT5 signaling promotes oxidative stress in chronic myeloid leukemia cells by repressing antioxidant defenses. *Oncotarget*. 2017;8(26):41876–41889.
153. Prost S, Relouzat F, Spentchian M, et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature*. 2015;525(7569):380–383.
154. Lu X, Huang LJ-S, Lodish HF. Dimerization by a cytokine receptor is necessary for constitutive activation of JAK2V617F. *J. Biol. Chem*. 2008;283(9):5258–5266.
155. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, et al. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108(5):1652–1660.
156. Marty C, Lacout C, Martin A, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood*. 2010;116(5):783–787.
157. Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. *Blood*. 2012;119(15):3539–3549.
158. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
159. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016;127(10):1317–1324.
160. Shide K, Kameda T, Yamaji T, et al. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia*. 2017;31(5):1136–1144.
161. Wang JC, Lang HD, Lichter S, Weinstein M, Benn P. Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol*. 1992;80(2):184–188.
162. Schneider RK, Mullally A, Dugourd A, et al. Gli1+ Mesenchymal Stromal Cells Are a Key Driver of Bone Marrow Fibrosis and an Important Cellular Therapeutic Target. *Cell Stem Cell*. 2017;20(6):785–800.e8.
163. Gleitz HF, Kramann R, Schneider RK. Understanding deregulated cellular and molecular dynamics in the haematopoietic stem cell niche to develop novel therapeutics for bone marrow fibrosis. *J. Pathol*. 2018;245(2):138–146.

164. Verstovsek S, Manshouri T, Pilling D, et al. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J. Exp. Med.* 2016;213(9):1723–1740.
165. Thiele J, Hoepfner B, Zankovich R, Fischer R. Histomorphometry of bone marrow biopsies in primary osteomyelofibrosis/sclerosis (agnogenic myeloid metaplasia)--correlations between clinical and morphological features. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 1989;415(3):191–202.
166. Breton-Gorius J, Bizet M, Reyes F, et al. Myelofibrosis and acute megakaryoblastic leukemia in a child: topographic relationship between fibroblasts and megakaryocytes with an alpha-granule defect. *Leuk. Res.* 1982;6(1):97–110.
167. Breton-Gorius J, Vainchenker W, Nurden A, Levy-Toledano S, Caen J. Defective alpha-granule production in megakaryocytes from gray platelet syndrome: ultrastructural studies of bone marrow cells and megakaryocytes growing in culture from blood precursors. *Am. J. Pathol.* 1981;102(1):10–19.
168. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, et al. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood.* 2000;96(4):1342–1347.
169. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, et al. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice. *Blood.* 2004;104(12):3573–3580.
170. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2006;24(4):928–935.
171. Wen QJ, Yang Q, Goldenson B, et al. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat. Med.* 2015;21(12):1473–1480.
172. Woods B, Chen W, Chiu S, et al. Activation of JAK/STAT Signaling in Megakaryocytes Sustains Myeloproliferation In Vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2019;
173. Ogawa M, Kawamoto M, Yamanaka N. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in human bone marrow tissues-an immunohistochemical study. *J. Nippon Med. Sch. Nippon Ika Daigaku Zasshi.* 2000;67(4):235–241.
174. Bock O, Neuse J, Hussein K, et al. Aberrant collagenase expression in chronic idiopathic myelofibrosis is related to the stage of disease but not to the JAK2 mutation status. *Am. J. Pathol.* 2006;169(2):471–481.
175. Murate T, Yamashita K, Isogai C, et al. The production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in megakaryopoiesis: possible role of platelet- and megakaryocyte-derived TIMPs in bone marrow fibrosis. *Br. J. Haematol.* 1997;99(1):181–189.
176. Wang JC. Importance of plasma matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) in development of fibrosis in agnogenic myeloid metaplasia. *Leuk. Lymphoma.* 2005;46(9):1261–1268.
177. Xu M, Bruno E, Chao J, et al. Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood.* 2005;105(11):4508–4515.
178. Lataillade J-J, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood.* 2008;112(8):3026–3035.

179. Desterke C, Martinaud C, Ruzehaji N, Le Bousse-Kerdilès M-C. Inflammation as a Keystone of Bone Marrow Stroma Alterations in Primary Myelofibrosis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:415024.
180. Dünker N, Kriegelstein K. Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur. J. Biochem.* 2000;267(24):6982–6988.
181. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):217–224.
182. Horiguchi M, Ota M, Rifkin DB. Matrix control of transforming growth factor- β function. *J. Biochem. (Tokyo)*. 2012;152(4):321–329.
183. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 2015;47:54–65.
184. Fink SP, Mikkola D, Willson JKV, Markowitz S. TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. *Oncogene*. 2003;22(9):1317–1323.
185. Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000;14(6):627–644.
186. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF. Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):1–8.
187. Xu P, Liu J, Derynck R. Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1871–1884.
188. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2017;9(2):.
189. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J. Biol. Chem.* 2001;276(20):17058–17062.
190. Holmes A, Abraham DJ, Sa S, et al. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J. Biol. Chem.* 2001;276(14):10594–10601.
191. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J. Cell. Physiol.* 1999;181(1):153–159.
192. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986;83(12):4167–4171.
193. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016;8(5):.
194. Martyré MC, Magdelenat H, Bryckaert MC, Laine-Bidron C, Calvo F. Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br. J. Haematol.* 1991;77(1):80–86.
195. Rameshwar P, Chang VT, Thacker UF, Gascón P. Systemic transforming growth factor-beta in patients with bone marrow fibrosis--pathophysiological implications. *Am. J. Hematol.* 1998;59(2):133–142.

196. Campanelli R, Rosti V, Villani L, et al. Evaluation of the bioactive and total transforming growth factor β 1 levels in primary myelofibrosis. *Cytokine*. 2011;53(1):100–106.
197. Terui T, Niitsu Y, Mahara K, et al. The production of transforming growth factor-beta in acute megakaryoblastic leukemia and its possible implications in myelofibrosis. *Blood*. 1990;75(7):1540–1548.
198. Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, et al. TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *J. Clin. Invest*. 2004;113(5):676–685.
199. Villevall JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood*. 1997;90(11):4369–4383.
200. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, et al. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*. 2002;100(10):3495–3503.
201. Gastinne T, Vigant F, Lavenu-Bombled C, et al. Adenoviral-mediated TGF-beta1 inhibition in a mouse model of myelofibrosis inhibit bone marrow fibrosis development. *Exp. Hematol*. 2007;35(1):64–74.
202. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, et al. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood*. 2002;100(4):1123–1132.
203. Zingariello M, Martelli F, Ciaffoni F, et al. Characterization of the TGF- β 1 signaling abnormalities in the Gata1low mouse model of myelofibrosis. *Blood*. 2013;121(17):3345–3363.
204. Martyré MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br. J. Haematol*. 1994;88(1):9–16.
205. Abbonante V, Di Buduo CA, Gruppi C, et al. Thrombopoietin/TGF- β 1 Loop Regulates Megakaryocyte Extracellular Matrix Component Synthesis. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 2016;34(4):1123–1133.
206. Zingariello M, Ruggeri A, Martelli F, et al. A novel interaction between megakaryocytes and activated fibrocytes increases TGF- β bioavailability in the Gata1(low) mouse model of myelofibrosis. *Am. J. Blood Res*. 2015;5(2):34–61.
207. Wagner-Ballon O, Chagraoui H, Prina E, et al. Monocyte/macrophage dysfunctions do not impair the promotion of myelofibrosis by high levels of thrombopoietin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2006;176(11):6425–6433.
208. Bock O, Loch G, Büsche G, et al. Aberrant expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor-alpha is associated with advanced bone marrow fibrosis in idiopathic myelofibrosis. *Haematologica*. 2005;90(1):133–134.
209. Yan XQ, Brady G, Iscove NN. Overexpression of PDGF-B in murine hematopoietic cells induces a lethal myeloproliferative syndrome in vivo. *Oncogene*. 1994;9(1):163–173.
210. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309–319.
211. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260–1268.
212. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999;13(18):2412–2424.

213. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315–323.
214. Karst M, Gorny G, Galvin RJS, Oursler MJ. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J. Cell. Physiol.* 2004;200(1):99–106.
215. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J. Clin. Invest.* 2014;124(2):466–472.
216. Tang Y, Wu X, Lei W, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat. Med.* 2009;15(7):757–765.
217. Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, et al. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002;277(46):44061–44067.
218. Chagraoui H, Tulliez M, Smayra T, et al. Stimulation of osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO. *Blood*. 2003;101(8):2983–2989.
219. Wang JC, Hemavathy K, Charles W, et al. Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Exp. Hematol.* 2004;32(10):905–910.
220. Bock O, Loch G, Schade U, et al. Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin. *Br. J. Haematol.* 2005;130(1):76–82.
221. Schmidt A, Blanchet O, Dib M, et al. Bone changes in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a histomorphometric and microcomputed tomographic study. *Eur. J. Haematol.* 2007;78(6):500–509.
222. Martinaud C, Desterke C, Konopacki J, et al. Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Cells Contributes to Primary Myelofibrosis. *Cancer Res.* 2015;75(22):4753–4765.
223. Arora B, Mesa R, Tefferi A. Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leuk. Lymphoma*. 2004;45(12):2373–2386.
224. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histol. Histopathol.* 2004;19(4):1245–1260.
225. Ni H, Barosi G, Hoffman R. Quantitative evaluation of bone marrow angiogenesis in idiopathic myelofibrosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006;126(2):241–247.
226. Medinger M, Skoda R, Gratwohl A, et al. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor-receptor expression in myeloproliferative neoplasms: correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status. *Br. J. Haematol.* 2009;146(2):150–157.
227. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2000;96(10):3374–3380.
228. Boveri E, Passamonti F, Rumi E, et al. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br. J. Haematol.* 2008;140(2):162–168.

229. Boiocchi L, Vener C, Savi F, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Pathol.* 2011;64(3):226–231.
230. Lekovic D, Gotic M, Skoda R, et al. Bone marrow microvessel density and plasma angiogenic factors in myeloproliferative neoplasms: clinicopathological and molecular correlations. *Ann. Hematol.* 2017;96(3):393–404.
231. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2005;23(24):5688–5695.
232. Alonci A, Allegra A, Bellomo G, et al. Evaluation of circulating endothelial cells, VEGF and VEGFR2 serum levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Hematol. Oncol.* 2008;26(4):235–239.
233. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA, et al. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. *Leukemia.* 2001;15(6):976–980.
234. Musolino C, Calabro' L, Bellomo G, et al. Soluble angiogenic factors: implications for chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Hematol.* 2002;69(3):159–163.
235. Panteli KE, Hatzimichael EC, Bouranta PK, et al. Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Br. J. Haematol.* 2005;130(5):709–715.
236. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br. J. Cancer.* 1999;81(8):1398–1401.
237. Panteli K, Bai M, Hatzimichael E, et al. Serum levels, and bone marrow immunohistochemical expression of, vascular endothelial growth factor in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Hematol. Amst. Neth.* 2007;12(6):481–486.
238. Arora B, Ho C-L, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A. Bone marrow angiogenesis and its clinical correlates in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Haematologica.* 2004;89(12):1454–1458.
239. Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? *Blood.* 2012;119(14):3219–3225.
240. Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk. Res.* 2013;37(2):214–220.
241. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, et al. Elevated C-reactive protein is associated with shortened leukemia-free survival in patients with myelofibrosis. *Leukemia.* 2013;27(10):2084–2086.
242. Barosi G, Massa M, Campanelli R, et al. Primary myelofibrosis: Older age and high JAK2V617F allele burden are associated with elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein levels and a phenotype of progressive disease. *Leuk. Res.* 2017;60:18–23.
243. Lucijanac M, Cicic D, Stoos-Veic T, et al. Combining information on C reactive protein and serum albumin into the Glasgow Prognostic Score strongly discriminates survival of myelofibrosis patients. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2018;72:14–16.

244. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, et al. Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and pentraxin 3. *Haematologica*. 2011;96(2):315–318.
245. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(12):1117–1127.
246. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 Inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer*. 2014;120(4):513–520.
247. Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC. Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Ann. Hematol.* 1999;78(10):437–444.
248. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, et al. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6392–6398.
249. Sollazzo D, Forte D, Polverelli N, et al. Crucial factors of the inflammatory microenvironment (IL-1 β /TNF- α /TIMP-1) promote the maintenance of the malignant hemopoietic clone of myelofibrosis: an in vitro study. *Oncotarget*. 2016;7(28):43974–43988.
250. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(15):3109–3117.
251. Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, et al. Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene*. 2011;30(8):990–1001.
252. Hoermann G, Cerny-Reiterer S, Herrmann H, et al. Identification of oncostatin M as a JAK2 V617F-dependent amplifier of cytokine production and bone marrow remodeling in myeloproliferative neoplasms. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2012;26(2):894–906.
253. Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, et al. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Discov.* 2015;5(3):316–331.
254. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond. Engl.* 2001;357(9255):539–545.
255. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–867.
256. Kristinsson SY, Landgren O, Samuelsson J, Björkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2010;95(7):1216–1220.
257. Esplin BL, Shimazu T, Welner RS, et al. Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2011;186(9):5367–5375.
258. Zhao JL, Rao DS, Boldin MP, et al. NF-kappaB dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(22):9184–9189.
259. Bjørn ME, Hasselbalch HC. The Role of Reactive Oxygen Species in Myelofibrosis and Related Neoplasms. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:648090.

260. Rossi C, Zini R, Rontautoli S, et al. Role of TGF- β 1/miR-382-5p/SOD2 axis in the induction of oxidative stress in CD34+ cells from primary myelofibrosis. *Mol. Oncol.* 2018;12(12):2102–2123.
261. Marty C, Lacout C, Droin N, et al. A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia.* 2013;27(11):2187–2195.
262. Andersen M, Sajid Z, Pedersen RK, et al. Mathematical modelling as a proof of concept for MPNs as a human inflammation model for cancer development. *PloS One.* 2017;12(8):e0183620.
263. Bourantas KL, Hatzimichael EC, Makis AC, et al. Serum beta-2-microglobulin, TNF-alpha and interleukins in myeloproliferative disorders. *Eur. J. Haematol.* 1999;63(1):19–25.
264. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2011;29(10):1356–1363.
265. Vaidya R, Gangat N, Jimma T, et al. Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *Am. J. Hematol.* 2012;87(11):1003–1005.
266. Pourcelot E, Trocme C, Mondet J, et al. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Exp. Hematol.* 2014;42(5):360–368.
267. Gangemi S, Allegra A, Pace E, et al. Evaluation of interleukin-23 plasma levels in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Cell. Immunol.* 2012;278(1–2):91–94.
268. Wang JC, Sindhu H, Chen C, et al. Immune derangements in patients with myelofibrosis: the role of Treg, Th17, and sIL2R α . *PloS One.* 2015;10(3):e0116723.
269. Mondet J, Hussein K, Mossuz P. Circulating Cytokine Levels as Markers of Inflammation in Philadelphia Negative Myeloproliferative Neoplasms: Diagnostic and Prognostic Interest. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:670580.
270. Tyner JW, Bumm TG, Deininger J, et al. CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010;115(25):5232–5240.
271. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–899.
272. Rameshwar P, Narayanan R, Qian J, et al. NF-kappa B as a central mediator in the induction of TGF-beta in monocytes from patients with idiopathic myelofibrosis: an inflammatory response beyond the realm of homeostasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2000;165(4):2271–2277.
273. Komura E, Tonetti C, Penard-Lacronique V, et al. Role for the nuclear factor kappaB pathway in transforming growth factor-beta1 production in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FK506 binding protein 51 overexpression. *Cancer Res.* 2005;65(8):3281–3289.
274. Wagner-Ballon O, Pisani DF, Gastinne T, et al. Proteasome inhibitor bortezomib impairs both myelofibrosis and osteosclerosis induced by high thrombopoietin levels in mice. *Blood.* 2007;110(1):345–353.
275. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J. Exp. Med.* 2008;205(3):585–594.

276. Wang L, Zhang H, Rodriguez S, et al. Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF- κ B-dependent manner. *Cell Stem Cell*. 2014;15(1):51–65.
277. Fisher D a. C, Malkova O, Engle EK, et al. Mass cytometry analysis reveals hyperactive NF Kappa B signaling in myelofibrosis and secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(9):1962–1974.
278. Kleppe M, Koche R, Zou L, et al. Dual Targeting of Oncogenic Activation and Inflammatory Signaling Increases Therapeutic Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell*. 2018;33(1):29-43.e7.
279. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992;359(6397):693–699.
280. Kulkarni AB, Ward JM, Yaswen L, et al. Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders. *Am. J. Pathol*. 1995;146(1):264–275.
281. Ihara S, Hirata Y, Koike K. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *J. Gastroenterol*. 2017;52(7):777–787.
282. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645–650.
283. Dreyer C, Krey G, Keller H, et al. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992;68(5):879–887.
284. Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. 1993;32(21):5598–5604.
285. Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, et al. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*. 1996;35(3):637–638.
286. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*. 1995;4(4–5):281–299.
287. Bruedigam C, Koedam M, Chiba H, Eijken M, van Leeuwen JPTM. Evidence for multiple peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcripts in bone: fine-tuning by hormonal regulation and mRNA stability. *FEBS Lett*. 2008;582(11):1618–1624.
288. Nwankwo JO, Robbins ME. Peroxisome proliferator-activated receptor- gamma expression in human malignant and normal brain, breast and prostate-derived cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2001;64(4–5):241–245.
289. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev*. 1999;20(5):649–688.
290. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, et al. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J. Biol. Chem*. 1997;272(32):20230–20235.
291. Hsu MH, Palmer CN, Song W, Griffin KJ, Johnson EF. A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J. Biol. Chem*. 1998;273(43):27988–27997.

292. Iwamoto F, Umemoto T, Motojima K, Fujiki Y. Nuclear transport of peroxisome-proliferator activated receptor α ; *J. Biochem. (Tokyo)*. 2011;149(3):311–319.
293. Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, et al. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPAR γ . *J. Biol. Chem.* 1998;273(47):31108–31112.
294. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 2006;58(4):726–741.
295. Oberfield JL, Collins JL, Holmes CP, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96(11):6102–6106.
296. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98(24):13919–13924.
297. Waku T, Shiraki T, Oyama T, et al. Structural insight into PPAR γ activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J. Mol. Biol.* 2009;385(1):188–199.
298. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137–143.
299. Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann. Med.* 1999;31(5):342–351.
300. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet Lond. Engl.* 1999;354(9173):141–148.
301. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(13):4699–4707.
302. Hou Y, Moreau F, Chadee K. PPAR γ is an E3 ligase that induces the degradation of NF κ B/p65. *Nat. Commun.* 2012;3:1300.
303. Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J. Exp. Med.* 2001;193(7):827–838.
304. Burgermeister E, Seger R. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPAR γ . *Cell Cycle Georget. Tex.* 2007;6(13):1539–1548.
305. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, et al. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*. 1998;396(6709):377–380.
306. Chang AJ, Song DH, Wolfe MM. Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) mediates gastrin-stimulated colorectal cancer cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 2006;281(21):14700–14710.
307. Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, et al. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(3):803–817.
308. Seeler J-S, Dejean A. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(9):690–699.

309. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. 2005;437(7059):759–763.
310. Bailey ST, Ghosh S. 'PPAR'ing ways with inflammation. *Nat. Immunol.* 2005;6(10):966–967.
311. Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89(10):4653–4657.
312. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 1995;83(5):803–812.
313. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, et al. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995;83(5):813–819.
314. Powell WS. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2: endogenous PPARgamma ligand or minor eicosanoid degradation product? *J. Clin. Invest.* 2003;112(6):828–830.
315. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93(2):229–240.
316. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, et al. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100(1):131–136.
317. Heim M, Johnson J, Boess F, et al. Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2002;16(7):718–720.
318. Fujita T, Sugiyama Y, Taketomi S, et al. Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent. *Diabetes*. 1983;32(9):804–810.
319. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J. Med. Chem.* 2000;43(4):527–550.
320. Camp HS, Li O, Wise SC, et al. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. *Diabetes*. 2000;49(4):539–547.
321. Filipova E, Uzunova K, Kalinov K, Vekov T. Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetes Ther. Res. Treat. Educ. Diabetes Relat. Disord.* 2017;8(4):705–726.
322. Yan H, Xie H, Ying Y, et al. Pioglitazone use in patients with diabetes and risk of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag. Res.* 2018;10:1627–1638.
323. Tang H, Shi W, Fu S, et al. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2018;7(4):1070–1080.
324. Mehtälä J, Khanfir H, Bennett D, et al. Pioglitazone use and risk of bladder cancer: a systematic literature review and meta-analysis of observational studies. *Diabetol. Int.* 2019;10(1):24–36.
325. Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature*. 2011;477(7365):477–481.
326. Wright MB, Bortolini M, Tadayyon M, Bopst M. Minireview: Challenges and opportunities in development of PPAR agonists. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 2014;28(11):1756–1768.

327. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Exp. Med.* 2005;201(8):1205–1215.
328. Puhl AC, Milton FA, Cvaro A, et al. Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor γ regulation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nucl. Recept. Signal.* 2015;13:e004.
329. Suh N, Wang Y, Honda T, et al. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res.* 1999;59(2):336–341.
330. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry.* 2002;41(21):6640–6650.
331. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8(10):1224–1234.
332. Teboul L, Gaillard D, Staccini L, et al. Thiazolidinediones and fatty acids convert myogenic cells into adipose-like cells. *J. Biol. Chem.* 1995;270(47):28183–28187.
333. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell.* 1999;4(4):585–595.
334. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell.* 1999;4(4):611–617.
335. Wu Z, Rosen ED, Brun R, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell.* 1999;3(2):151–158.
336. Semple RK, Chatterjee VKK, O’Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 2006;116(3):581–589.
337. Cariou B, Charbonnel B, Staels B. Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 2012;23(5):205–215.
338. Ciaraldi T, Henry RR. Thiazolidinediones and their effects on glucose transporters. *Eur. J. Endocrinol.* 1997;137(6):610–612.
339. Liao W, Nguyen MTA, Yoshizaki T, et al. Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007;293(1):E219–227.
340. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 1998;47(4):507–514.
341. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* 2013;19(5):557–566.
342. Astapova O, Leff T. PPAR γ mutations, lipodystrophy and diabetes. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2014;20(2):63–70.
343. Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 2004;45(12):2161–2173.
344. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell.* 2001;7(1):161–171.

345. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation*. 2000;101(3):235–238.
346. Law RE, Goetze S, Xi XP, et al. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2000;101(11):1311–1318.
347. Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1998;83(11):1097–1103.
348. Loke YK, Singh S, Furberg CD. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 2009;180(1):32–39.
349. Kahn SE, Zinman B, Lachin JM, et al. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an Analysis from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). *Diabetes Care*. 2008;31(5):845–851.
350. Zhu Z-N, Jiang Y-F, Ding T. Risk of fracture with thiazolidinediones: an updated meta-analysis of randomized clinical trials. *Bone*. 2014;68:115–123.
351. Li Y, Jin D, Xie W, et al. PPAR- γ and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2018;13(3):185–192.
352. Stechschulte LA, Lecka-Czernik B. Reciprocal regulation of PPAR γ and RUNX2 activities in marrow mesenchymal stem cells: Fine balance between p38 MAPK and Protein Phosphatase 5. *Curr. Mol. Biol. Rep.* 2017;3(2):107–113.
353. Brusotti G, Montanari R, Capelli D, et al. Betulinic acid is a PPAR γ antagonist that improves glucose uptake, promotes osteogenesis and inhibits adipogenesis. *Sci. Rep.* 2017;7(1):5777.
354. Wan Y, Chong L-W, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat. Med.* 2007;13(12):1496–1503.
355. Kanda J, Izumo N, Kobayashi Y, et al. Effect of the antidiabetic agent pioglitazone on bone metabolism in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 2017;135(1):22–28.
356. Cho E-S, Kim M-K, Son Y-O, et al. The effects of rosiglitazone on osteoblastic differentiation, osteoclast formation and bone resorption. *Mol. Cells*. 2012;33(2):173–181.
357. Chan BY, Gartland A, Wilson PJM, et al. PPAR agonists modulate human osteoclast formation and activity in vitro. *Bone*. 2007;40(1):149–159.
358. Kasonga A, Kruger MC, Coetzee M. Activation of PPARs Modulates Signalling Pathways and Expression of Regulatory Genes in Osteoclasts Derived from Human CD14⁺ Monocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(7):.
359. Zou W, Rohatgi N, Chen TH-P, et al. PPAR- γ regulates pharmacological but not physiological or pathological osteoclast formation. *Nat. Med.* 2016;22(11):1203–1205.
360. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94(1):237–241.
361. Konopleva M, Andreeff M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in hematologic malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* 2002;9(4):294–302.

362. Yousefnia S, Momenzadeh S, Seyed Forootan F, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH. The influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands on cancer cell tumorigenicity. *Gene*. 2018;649:14–22.
363. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr*. 1995;4(4–5):281–299.
364. Greene ME, Pitts J, McCarville MA, et al. PPARgamma: observations in the hematopoietic system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2000;62(1):45–73.
365. Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, et al. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood*. 2004;104(5):1361–1368.
366. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Mol. Pharmacol*. 1996;50(5):1087–1094.
367. Parulkar AA, Pendergrass ML, Granda-Ayala R, Lee TR, Fonseca VA. Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. *Ann. Intern. Med*. 2001;134(1):61–71.
368. Nagasawa E, Abe Y, Nishimura J, et al. Pivotal role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in regulation of erythroid progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp. Hematol*. 2005;33(8):857–864.
369. Abbasi P, Shamsasenjan K, Movassaghpour Akbari AA, et al. The Effect of Baicalin as A PPAR Activator on Erythroid Differentiation of CD133(+)Hematopoietic Stem Cells in Umbilical Cord Blood. *Cell J*. 2015;17(1):15–26.
370. Otake K, Omoto S, Yamamoto T, et al. HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS Lond. Engl*. 2004;18(2):189–198.
371. Prost S, Le Dantec M, Augé S, et al. Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *J. Clin. Invest*. 2008;118(5):1765–1775.
372. Sertorio M, Du W, Amarachintha S, Wilson A, Pang Q. In Vivo RNAi Screen Unveils PPAR γ as a Regulator of Hematopoietic Stem Cell Homeostasis. *Stem Cell Rep*. 2017;8(5):1242–1255.
373. Li Y, Zhu S, Zhang Y, et al. High fat diet-induced obesity exacerbates hematopoiesis deficiency and cytopenia caused by 5-fluorouracil via peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Exp. Hematol*. 2018;60:30-39.e1.
374. Guo B, Huang X, Lee MR, Lee SA, Broxmeyer HE. Antagonism of PPAR- γ signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. *Nat. Med*. 2018;24(3):360–367.
375. Simpson-Haidaris PJ, Pollock SJ, Ramon S, et al. Anticancer Role of PPARgamma Agonists in Hematological Malignancies Found in the Vasculature, Marrow, and Eyes. *PPAR Res*. 2010;2010:814609.
376. Ryu S, Kim DS, Lee MW, et al. Anti-leukemic effects of PPAR γ ligands. *Cancer Lett*. 2018;418:10–19.

377. Rousselot P, Huguet F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood*. 2007;109(1):58–60.
378. Jiang X, Zhao Y, Smith C, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia*. 2007;21(5):926–935.
379. Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, et al. Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood*. 2017;129(7):846–854.
380. Rousselot P, Prost S, Guilhot J, et al. Pioglitazone together with imatinib in chronic myeloid leukemia: A proof of concept study. *Cancer*. 2017;123(10):1791–1799.
381. Dew MJ, Evans BK, Rhodes J. 5-Aminosalicylic acid for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1984;87(2):480–481.
382. Symmons DP, Salmon M, Farr M, Bacon PA. Sulfasalazine treatment and lymphocyte function in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol*. 1988;15(4):575–579.
383. Lewis JD, Lichtenstein GR, Deren JJ, et al. Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2008;134(3):688–695.
384. Mwinyi J, Grete-Wenger C, Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. The Impact of PPAR γ Genetic Variants on IBD Susceptibility and IBD Disease Course. *PPAR Res*. 2012;2012:349469.
385. Chang W-C, Jan Wu Y-J, Chung W-H, et al. Genetic variants of PPAR-gamma coactivator 1B augment NLRP3-mediated inflammation in gouty arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl*. 2017;56(3):457–466.
386. Su CG, Wen X, Bailey ST, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J. Clin. Invest*. 1999;104(4):383–389.
387. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998;391(6662):79–82.
388. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998;391(6662):82–86.
389. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*. 2007;447(7148):1116–1120.
390. Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity*. 2010;33(5):699–712.
391. Cuaranta-Monroy I, Kiss M, Simandi Z, Nagy L. Genomewide effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in macrophages and dendritic cells--revealing complexity through systems biology. *Eur. J. Clin. Invest*. 2015;45(9):964–975.
392. Yang XY, Wang LH, Mihalic K, et al. Interleukin (IL)-4 indirectly suppresses IL-2 production by human T lymphocytes via peroxisome proliferator-activated receptor gamma activated by macrophage-derived 12/15-lipoxygenase ligands. *J. Biol. Chem*. 2002;277(6):3973–3978.

393. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, et al. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2009;206(10):2079–2089.
394. Garcia-Bates TM, Bagloli CJ, Bernard MP, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands enhance human B cell antibody production and differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2009;183(11):6903–6912.
395. Setoguchi K, Misaki Y, Terauchi Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J. Clin. Invest.* 2001;108(11):1667–1675.
396. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2007;28(12):551–558.
397. Straus DS, Pascual G, Li M, et al. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97(9):4844–4849.
398. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature.* 2000;403(6765):103–108.
399. Marra F, Efsen E, Romanelli RG, et al. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2000;119(2):466–478.
400. Miyahara T, Schrum L, Rippe R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J. Biol. Chem.* 2000;275(46):35715–35722.
401. da Rocha Junior LF, Dantas AT, Duarte ALBP, et al. PPAR γ Agonists in Adaptive Immunity: What Do Immune Disorders and Their Models Have to Tell Us? *PPAR Res.* 2013;2013:519724.
402. McVicker BL, Bennett RG. Novel Anti-fibrotic Therapies. *Front. Pharmacol.* 2017;8:318.
403. del Río C, Navarrete C, Collado JA, et al. The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CB2 pathways. *Sci. Rep.* 2016;6:21703.
404. Kapoor M, McCann M, Liu S, et al. Loss of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mouse fibroblasts results in increased susceptibility to bleomycin-induced skin fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2822–2829.
405. Musso G, Cassader M, Paschetta E, Gambino R. Thiazolidinediones and Advanced Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: A Meta-analysis. *JAMA Intern. Med.* 2017;177(5):633–640.
406. Ruzehaji N, Frantz C, Ponsoye M, et al. Pan PPAR agonist IVA337 is effective in prevention and treatment of experimental skin fibrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2016;75(12):2175–2183.
407. Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, et al. PPAR γ downregulation by TGF β in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis. *PLoS One.* 2010;5(11):e13778.
408. Wei J, Bhattacharyya S, Jain M, Varga J. Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ : A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. *Open Rheumatol. J.* 2012;6:103–115.

409. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Lakos G, et al. Disruption of transforming growth factor beta signaling and profibrotic responses in normal skin fibroblasts by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum.* 2004;50(4):1305–1318.
410. Sun K, Wang Q, Huang X-H. PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta Pharmacol. Sin.* 2006;27(6):715–723.
411. Zhang G-Y, Cheng T, Zheng M-H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits transforming growth factor-beta1 induction of connective tissue growth factor and extracellular matrix in hypertrophic scar fibroblasts in vitro. *Arch. Dermatol. Res.* 2009;301(7):515–522.
412. Ghosh AK, Wei J, Wu M, Varga J. Constitutive Smad signaling and Smad-dependent collagen gene expression in mouse embryonic fibroblasts lacking peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;374(2):231–236.
413. Zhao C, Chen W, Yang L, et al. PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;350(2):385–391.
414. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Wei J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2009;23(9):2968–2977.
415. Bhattacharyya S, Ghosh AK, Pannu J, et al. Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* 2005;52(4):1248–1258.
416. Ryu S-H, Park E-Y, Kwak S, et al. Protective effect of α -lipoic acid against radiation-induced fibrosis in mice. *Oncotarget.* 2016;7(13):15554–15565.
417. Lee SJ, Yang EK, Kim SG. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoic acid X receptor alpha represses the TGFbeta1 gene via PTEN-mediated p70 ribosomal S6 kinase-1 inhibition: role for Zf9 dephosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 2006;70(1):415–425.
418. Carthy JM, Garmaroudi FS, Luo Z, McManus BM. Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF- β signaling through SMAD2 in a β -catenin-dependent manner. *PloS One.* 2011;6(5):e19809.
419. Jeon K-I, Phipps RP, Sime PJ, Huxlin KR. Antifibrotic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Ligands in Corneal Fibroblasts Are Mediated by β -Catenin-Regulated Pathways. *Am. J. Pathol.* 2017;187(8):1660–1669.
420. Vallée A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallée J-N. Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget.* 2017;8(52):90579–90604.
421. Gressner OA, Lahme B, Rehbein K, et al. Pharmacological application of caffeine inhibits TGF-beta-stimulated connective tissue growth factor expression in hepatocytes via PPARgamma and SMAD2/3-dependent pathways. *J. Hepatol.* 2008;49(5):758–767.
422. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the mayo clinic experience. *Mayo Clin. Proc.* 2012;87(1):25–33.
423. Bertozzi I, Bogoni G, Biagetti G, et al. Thromboses and hemorrhages are common in MPN patients with high JAK2V617F allele burden. *Ann. Hematol.* 2017;96(8):1297–1302.

424. Gángó A, Mózes R, Boha Z, et al. Quantitative assessment of JAK2 V617F and CALR mutations in Philadelphia negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk. Res.* 2018;65:42–48.
425. Barosi G, Massa M, Campanelli R, et al. Primary myelofibrosis: Older age and high JAK2V617F allele burden are associated with elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein levels and a phenotype of progressive disease. *Leuk. Res.* 2017;60:18–23.
426. Baba Y, Garrett KP, Kincade PW. Constitutively active beta-catenin confers multilineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors. *Immunity.* 2005;23(6):599–609.
427. Lucijanic M, Livun A, Tomasovic-Loncaric C, et al. Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway Is Dysregulated in Patients With Primary and Secondary Myelofibrosis. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016;16(9):523–526.
428. Subotički T, Mitrović Ajtić O, Mičić M, et al. β -catenin and PPAR- γ levels in bone marrow of myeloproliferative neoplasm: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastruct. Pathol.* 2018;42(6):498–507.
429. Lyles BE, Akinyeke TO, Moss PE, Stewart LV. Thiazolidinediones regulate expression of cell cycle proteins in human prostate cancer cells via PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent pathways. *Cell Cycle Georget. Tex.* 2009;8(2):268–277.
430. Raman P, Koenig RJ. Pax-8-PPAR- γ fusion protein in thyroid carcinoma. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014;10(10):616–623.
431. Meier CA, Chicheportiche R, Juge-Aubry CE, Dreyer MG, Dayer J-M. Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cytokine.* 2002;18(6):320–328.
432. Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett.* 2006;580(27):6289–6294.
433. Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell.* 1998;95(6):749–758.
434. Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, et al. Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology. Baltim. Md.* 2003;38(4):890–899.
435. Mäkitie RE, Niinimäki R, Kakko S, et al. Defective WNT signaling associates with bone marrow fibrosis—a cross-sectional cohort study in a family with WNT1 osteoporosis. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA.* 2018;29(2):479–487.
436. Griesshammer M, Kiladjian J-J, Besses C. Thromboembolic events in polycythemia vera. *Ann. Hematol.* 2019;98(5):1071–1082.
437. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 2019;94(1):133–143.
438. Berria R, Glass L, Mahankali A, et al. Reduction in hematocrit and hemoglobin following pioglitazone treatment is not hemodilutional in Type II diabetes mellitus. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007;82(3):275–281.
439. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell.* 1996;84(3):431–442.

- 440. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93(15):7673–7678.
- 441. Ghosh AK, Varga J. The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 2007;213(3):663–671.
- 442. Nagamine M, Okumura T, Tanno S, et al. PPAR gamma ligand-induced apoptosis through a p53-dependent mechanism in human gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 2003;94(4):338–343.
- 443. Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, et al. PPARgamma ligands inhibit cholangiocarcinoma cell growth through p53-dependent GADD45 and p21 pathway. *Hepatol. Baltim. Md.* 2003;38(1):167–177.
- 444. Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 2006;20(12):3083–3092.
- 445. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(50):E5401–5410.

Septième partie : Annexes

7.1 Annexe 1 : Manuscrit de l'article

PPAR- γ agonists in resolving Myelofibrosis

J.Lambert^{1,2}, J. Saliba¹, C. Calderon¹, K. Sii-Felice¹, M. Salma^{5,6}, C. Marty³, I. Plo³, J. J. Kiladjian⁴, E. Soler^{5,6}, W. Vainchenker³, J. L. Villeval³, P. Rousselot^{2,7} and S. Prost^{1,a}.

1 Department of Innovative Therapies, CEA/DRF/IbFJ, UMR-007, University Paris-Saclay, Fontenay-aux-Roses, France.

2 Department of Hematology and Oncology, Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France.

3 INSERM, UMR1170, Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, Villejuif, France.

4 Center of Clinical Investigation, INSERM UMRS-1131, IUH, Université Paris-Diderot, Hopital Saint-Louis, Paris, France.

5 Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France

6 Université de Paris, Laboratory of excellence GR-Ex, Paris, France

7 Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Université Paris Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France.

^a To whom correspondence should be addressed. E-mail : stephane.prost@cea.fr

SUMMARY

Myelofibrosis (MF) are a non-BCR-ABL myeloproliferative neoplasms (NMPs) associated with poor outcomes in patients. Current treatment has little effect on the natural history of the disease. MF results from complex interactions between 1) the neoplastic clone, 2) an inflammatory context, and 3) remodeling of the bone marrow (BM) microenvironment. Each of these points is a potential target of PPAR- γ activation. Here, we demonstrate the therapeutic potential of PPAR- γ agonists in resolving MF in three mouse models. We show that PPAR- γ agonists reduce myeloproliferation, modulate inflammation, and protect the BM stroma *in vitro* and *ex vivo*. Activation of PPAR- γ constitutes a relevant therapeutic target in MF and our data support the possibility of using PPAR- γ agonists in clinical practice.

INTRODUCTION

BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) arise from mutated hematopoietic stem cells (HSCs) that clonally expand and include polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF) (Tefferi and Vardiman, 2008). They are driven by the acquisition of somatic mutations, mainly in the *JAK2*, *MPL*, and *CALR* genes (James et al., 2005; Klampfl et al., 2013) in a founding hematopoietic stem cell (HSC), all leading to constitutive activation of the JAK-STAT

signaling pathway. A common feature of MPNs is an initial hypercellular phase with clonal expansion of the myeloid lineages, followed at a later phase, by megakaryocyte hyperplasia and bone marrow (BM) fibrosis, two main characteristics of myelofibrosis (MF). Either presenting as primary or secondary evolving from PV or ET, MF leads to BM and blood cell production failure revealed by severe anemias and cytopenias and associated with an extramedullary hematopoiesis, inflammation, and splenomegaly. Patients with severe MF have a poor prognosis with disease-related morbidity due to complications, such as thrombosis, hemorrhaging, infections, and transformation to acute leukemia (Tefferi, 2000). This results in a poor quality of life with a short median survival of approximately six years (Cervantes et al., 2012). Histopathological examination shows MF to be characterized by the gradually increasing deposition of reticulin and collagen fibers, thickening and distortion of bone trabeculae and megakaryocytic hyperplasia with atypical features (Tabarrokhi and Tiu, 2014). The role of increased JAK/STAT signaling in the proliferation of the neoplastic clone and, the role of deregulated pro-inflammatory cytokine expression in driving fibrosis, appear to be two major pathogenic processes and putative therapeutic targets that contribute to the initiation and progression of MF. Although allogenic stem-cell transplantation leads to remission, it is associated with substantial treatment-related morbidity and mortality and is essentially restricted to younger patients (Vannucchi et al., 2015). Currently, treatment options are mainly palliative and directed toward improvement of disease symptoms such as splenomegaly, constitutional symptoms and anemia (Cervantes et al., 2016). The emergence of JAK2 inhibitors has provided clinical benefit for splenomegaly and constitutional symptoms. However, MF patients enrolled in the pivotal phase III COMFORT study testing Ruxolitinib failed to show improvement in histopathological abnormalities after six and 12 months of therapy or incidence of leukemic transformation (Harrison et al., 2012; Passamonti and Maffioli, 2018; Verstovsek et al., 2012). Long-term follow-up showed some survival advantage for patients treated with ruxolitinib, but anemia and thrombocytopenia might be worsened by the treatment and are still a challenge in the management of MF (Verstovsek et al., 2017) and around 50% of patients stopped treatment because of cytopenia (Mead et al., 2015; Verstovsek et al., 2017). Pegylated interferon alpha (IFN- α) appears to be potential alternative therapy, with a reduction of allele burden by more than 50% in 58.8% of patients and a significant increase in survival, which correlates with the duration of pegylated interferon therapy (Ilanotto et al., 2018). Unmet needs include novel therapeutics or combining anti-fibrogenic strategies with currently available treatments to modify the effects of the natural history of MF. The complex pathogenesis of myelofibrosis cannot be modelled *in vitro*, but the availability of MPN mouse models is an invaluable tool for further characterization of the disease mechanisms, as well as for testing

novel therapeutic agents (Dunbar et al., 2017; Hasan et al., 2013; Marty et al., 2016; Villeval et al., 1997).

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ , NR1C3) is a member of the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors. Its pivotal role has been demonstrated in glucose homeostasis, lipid metabolism, cell growth, and, posteriorly, inflammation and the regulation of connective tissue biology (Lehrke and Lazar, 2005). We previously reported that PPAR- γ is a negative regulator of the STAT5 pathway, impairing stress-induced hematopoiesis (Prost et al., 2008) and eroding the chronic myeloid leukemia stem-cell pool in biological and clinical assays (Prost et al., 2015; Rousselot et al., 2017). In addition, PPAR- γ agonists play an important role in dampening inflammation (Daynes and Jones, 2002) and attenuate synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages (Ricote et al., 1998)/monocyte (Jiang et al., 1998) and megakaryocyte (Akbiyik et al., 2004). An inverse relationship between fibrosis and PPAR- γ expression/function has been reported in multiple human fibrosing disorders and animal models of fibrosis (Dantas et al., 2015). However, mechanistic insights are still needed and there has been no study on the anti-fibrotic potential of PPAR- γ in MF. As PPAR- γ may act on both myeloproliferation and, inflammation, as well as fibrosis, we focused on these three master components of the pathophysiology of the disease, with an emphasis on the therapeutic potential of PPAR- γ agonists in MF.

Transforming growth factor- β (TGF- β) is the main regulator of physiological fibrogenesis and pathological fibrosis (Agarwal et al., 2016; Biernacka et al., 2011; Pardali et al., 2017), and has emerged as a major therapeutic target in fibrotic diseases (Biernacka et al., 2011), especially MF (Yue et al., 2017). TGF- β is found in three isoforms: TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3. TGF- β 1 is the most abundant of the three and platelets, megakaryocytes, and BM are the major sources of TGF- β 1 (Dong and Blobel, 2006). The involvement of TGF- β levels were first described in patients with acute megakaryoblastic leukemia, which is a particular form of leukemia associated with BM fibrosis (Terui et al., 1990), and similar observations were then reported in MF patients (Martyre et al., 1991). Mouse models of MF, including the TPO^{high} and GATA1^{low} models, have provided important insights into the major role of TGF- β in the pathogenesis of fibrosis (Chagraoui et al., 2002; Zingariello et al., 2013).

Here, we show that treatment with PPAR- γ agonists (including pioglitazone) counteracts myelofibrosis-related anemia, represses leukocytosis, and improves BM and splenic changes related to the disease in three preclinical mouse models of MF. We demonstrate that PPAR- γ activation represses the survival and clonogenicity of cells from cell lines and PV/MF-patients and slows cell proliferation *in vitro* and in PV (JAK2^{V617F}) and TE (CALRdel52) mouse models. We also assess the potential effect of PPAR- γ agonists on TGF- β 1-driven fibrosis by antagonizing regulation of the TGF-

β signaling pathway. Using genome-wide assays, we shows that the effect of PPAR- γ agonists is mainly mediated via a competition for the transcriptional cofactor p300. Overall, these results establish that PPAR- γ agonists may be novel therapeutic candidates for MPNs with myelofibrosis.

RESULTS

PPAR- γ activation counteracts myelofibrosis and prevents anemia, cytopenia, and BM hypocellularity in mouse MF models.

We investigated the ability of PPAR- γ agonists to counteract myelofibrosis and myelofibrosis-related symptoms by treating, or not, three different mouse models of MF with pioglitazone (Actos®) or mesalazine (Pentasa®). Mice of the TPO^{high} model show a plasma-TPO level approximately 10,000 fold higher than that in wild-type mice or lethally-irradiated recipients transplanted with BM from wild type mice (data not shown). Mice develop a myeloproliferative syndrome with the proliferation of megakaryocytes, extramedullary hematopoiesis, osteosclerosis, and severe MF approximately three months after transplantation [17] (Figure 1-Ci). Mice of the JAK2^{V617F} model develop a disease that mimics human PV, evolving into severe MF post-JAK2^{V617F} five months after transplantation [15] (Figure 1-Di). In the CALRdel52 retroviral model, mice develop an ET-like phenotype, evolving to MF after five months (Figure 1-Ei).

First, JAK2^{V617F} mice were treated with the PPAR- γ agonist pioglitazone (Actos®) or mesalazine (Pentasa®). Histology of the organs by hematoxylin-eosin (HE) staining at W37 post-transplantation showed treatment with PPAR- γ agonists to preserve BM cellularity (Figure 1A) and reduce myeloid invasion of the spleen, which retained a nearly normal architecture (white pulp) (Table 1b). Silver staining showed a reduction of reticular fibers in femoral BM (Figure 1B), which was illustrated by a decrease of fibrosis graduation in both BM and spleen (Table 1a, b). Osteosclerosis was almost abolished by the PPAR- γ agonists and the number of megakaryocytes was strikingly reduced in both the BM and spleen (Table 1a, b). The treated mice also had smaller spleens (Table 1b).

Second, we monitored the hemoglobin level in the three mouse models of MF, TPO^{high} (Figure 1Ci), post-PV (JAK2^{V617F}, Figure 1Di) and post-TE (CALRdel52, Figure 1Ei) treated or not with pioglitazone or mesalazine. The PPAR- γ agonists abrogated the MF-driven decrease of hemoglobin in all three models, despite differences in the kinetics of MF (Figures 1Ci, 1Di, and 1Ei). We observed this effect even if the treatment is initiated during disease progression, as in the MF-JAK2^{V617F} model treated at week 20 post-transplantation (Figure 1-Di). We also observed a reduction of thrombocytosis in the treated mice of the three MF models (Supplemental Figures 1Aiii, 1Biii, 1Ciii) and significant prevention of the reduction of femoral BM cellularity, with a more than two-fold increase in the total number of CD45.2 hematopoietic cells after treatment over that of the untreated control mice

(Figures 1Cii, 1Dii, 1Eii). Notably, although hemoglobin levels were preserved in the presence of pioglitazone in the MF post-CALRdel52 model, BM cellularity was significantly lower than that of CALRWT littermates, suggesting that PPAR- γ activation does not completely counteract MF development (Figure 1Eii). Given the decrease in BM cellularity, the clonogenic potential in myeloid progenitors was better in treated mice. The number of CFCs from treated mice was twofold higher in the MF post-JAK2^{V617F} (Figure 1Diii) and MF post-CALRdel52 (Figure 1Eiii) models and more than fourfold higher in the TPO^{high} model than that of untreated mice (Figure 1Ciii; $p < 0.05$).

Overall, these results strongly support the therapeutic effect of PPAR- γ ligands in the control of MF. We next assessed the impact of PPAR- γ on neoplastic clone proliferation, the control of inflammation, and the induction of BM stromal fibrosis to decipher the mechanisms by which PPAR- γ may affect MF-development.

PPAR- γ agonists slow the myeloproliferative effect driven by the neoplastic clone.

It has become increasingly clear over the last couple of years that at least two distinct pathogenic processes contribute to the initiation and progression of MF: 1) stem cell-derived clonal myeloproliferation and 2) reactive cytokine-driven fibrosis. We assessed whether PPAR- γ activation affects myeloproliferation driven by the malignant hematopoietic clone *in vivo*, by analyzing the effect of pioglitazone treatment in PV-JAK2^{V617F}-GFP and ET-CALRdel52-GFP mouse models. We focused on the first stages of diseases to avoid the potential impact of BM fibrosis on our results. Under these conditions, pioglitazone-treatment initiated at W6 after transplantation significantly reduced the JAK2^{V617F}-driven polycythemia, with a reduction of the hematocrit: 82% vs 73% at W10 ; 86% vs 76% at W14, and 86% vs 75% at W23 in treated vs untreated mice, respectively ($p \leq 0.05$, Figure 2Ai). Pioglitazone also limited CALRdel52-driven thrombocytosis, with a reduction in platelet number of 49% at W9 and 40% at W12 ($p \leq 0.05$) and 38% at W15 (ns, Figure 2Bi). However, the anti-myeloproliferative effect failed to completely normalize the hematocrit in the PV-model or the platelet count in the ET-model (Figures 2Ai and 2Bi). Similarly, the PPAR- γ agonists significantly reduced the platelet count in the first stages of the TPO^{high} model (W7 to W12) (Figure S1Aiii).

We assessed the effect of pioglitazone on expansion of the mutated clone, by quantifying the proportion of GFP cells. There was a slight reduction in the number of CALRdel52-GFP cells in the CD45.2 hematopoietic compartment (Figure 2Bii). This effect was more visible for myeloid cells (CD11b cells, Figure 2Biii) but it failed to reach significance. Pioglitazone was able to significantly reduce the proportion of JAK2^{V617F}-GFP cells in the PV mouse model, both in the CD45.2 peripheral blood cells (Figure 2Aii) and the CD11b population, with greater effect, due to the enrichment of JAK2^{V617F} in the myeloid compartment (Figure 2Aiii). In the BM, treated animals showed an increase in the

number of stem cell (Lin⁻ Sca⁺ Kit⁺, LSK), notably in the short-term stem-cell compartment (ST-HSC, LSK-CD34⁺)(Figure S2A) and this effect was associated with a decrease in the proportion of JAK2^{V617F}-GFP cells in the LSK compartment, more particularly in the ST-HSC (Figure S2B).

We assessed the effect of the PPAR- γ agonists on human neoplastic cells in *in vitro* cultures of JAK2^{V617F} cells from human cell lines or primary CD34⁺ progenitors from PV and MF patients, with or without pioglitazone. First, we carried out a dose-response experiment and established that a concentration of 10 μ M pioglitazone was relevant to decrease JAK2^{V617F} cells in culture (Figures 3A and 3B). Under these conditions, pioglitazone treatment had a mild effect on the proliferation, survival and clonogenicity of CD34⁺ progenitors from umbilical cord blood (Figure 3C and 3G) as we previously reported (Prost et al., 2008; Prost et al., 2015). This PPAR- γ agonist-mediated defect of hematopoiesis in myeloid progenitors was largely compensated for patients with otherwise normal hematopoiesis (Berria et al., 2007). Here, pioglitazone was more effective on JAK2^{V617F} cells, with a fourfold reduction in the number of living cells (at day 10) for the UKE-1 and HEL cell lines and a more than threefold reduction for CD34⁺ progenitors from PV and MF patients (Figures 3A, 3B, 3D, and 3E). We observed a similar trend in the clonogenic assay, with an inhibitory-effect of pioglitazone of more than two fold in JAK2^{V617F} cells from the cell lines (Figure 3F) and cells from PV (Figure 3H) and MF patients (Figure 3I).

We then investigated the possible mechanisms that mediate pioglitazone activity against the JAK2^{V617F} cell lines. Apoptosis increased by more than 2.5-fold (Figures S3Ai and S3Bi) and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation largely decreased in the presence of pioglitazone (Figures S3Aii and S3Bii). This reduction in proliferation correlated with an increase in the proportion of cells in the G0/G1 stage of the cell cycle (Figures S3Aiii and S3Biii). These results strongly suggest that pioglitazone promotes apoptosis and decreases proliferation of JAK2^{V617F} cells.

Overall, these results highlight a PPAR γ -related anti-myeloproliferative effect on the neoplastic clone.

PPAR- γ activation in the resolution of MPN-related inflammation.

MPNs represent a unique model of the relationship between the clonal development of a hematological malignancy and chronic inflammation. The PPAR- γ agonists (pioglitazone, mesalazine) potently reduced the WBC count in the mouse models, both in the PV or ET stage and MF (MF TPO^{high}, MF post-PV, or MF post-TE) (Figure 4A). In the very aggressive mouse model MF-TPO^{high}, treatment dramatically reduced WBC count, but failed to completely normalize leukocytosis. Nevertheless, pioglitazone (and mesalazine to a lesser degree) counteracted MF-JAK2^{V617F}-related leukocytosis and controlled the CALRdel52-related WBC increase. This regulation of WBC number affects both myeloid

and lymphoid compartments suggesting not only an effect on myeloproliferation but also an anti-inflammatory effect (Figure S4).

We then investigated the possible actors that mediate this PPAR- γ anti-inflammatory activity in JAK2^{V617F} mice, treated or not with pioglitazone (W6 post transplantation), by assessing mRNA levels for nine putative inflammatory-mediators (Mondet et al., 2015) in nucleated blood cells (W8, W14 and W23 after transplantation). Perilipin-2, known to be upregulated by PPAR- γ agonists *in vivo* (Dalen et al., 2004) was used as a positive control and confirmed the progressive uptake of pioglitazone by blood cells (Figure 4B). There was no difference in the mRNA levels of *IL-15*, *IFN- γ* , *IL-18* or *IL-12 (p40)* between treated and untreated mice. There was a trend towards a reduction for *Tnf- α* and *IL-5* gene expression. Seventeen weeks after the initiation of pioglitazone treatment (W23 post transplantation), TGF- β mRNA levels were significantly lower in treated than untreated mice and there was a concomitant significant increase in NF-kappa-B inhibitor alpha (NF-kB- α or I κ B α) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) mRNA levels (Figure 4B). IL-1ra belongs to the IL-1 family and binds to IL-1 receptors without inducing a cellular response, thereby behaving as a decoy receptor for IL-1 α and IL-1 β (Perrier et al., 2006). In addition, JAK2^{V617F} mice treated with PPAR- γ agonists had smaller spleens (Table 1b), which suggests better control of MF-related inflammation. Overall, these results support an anti-inflammatory role of PPAR γ in MF.

PPAR- γ abrogates TGF- β 1 signaling by trapping the p300 co-factor in BM stromal cells.

The fibrotic process induced by TGF- β 1 is driven by a combination of increased matrix biosynthesis, including collagen (types I, III, and IV) and the deposition of fibronectin, accompanied by decreased matrix degradation (particularly by increasing the tissue inhibitors of metalloproteinase TIMP-1) (Agarwal et al., 2016). Importantly, certain TGF- β -related profibrotic-effects are mediated through upregulation of its downstream effector, connective tissue growth factor (CTGF). Like collagen and fibronectin, CTGF is induced by the canonical TGF- β /Smad pathway, stimulates fibroblast differentiation and collagen synthesis (Duncan et al., 1999), and potentiates TGF- β -mediated fibrogenesis (Mori et al., 1999).

Stimulation by TGF- β 1 induced an increase of CTGF mRNA levels in murine (MS5) and human (HS5) BM stromal cell lines and human primary BM stromal cells by 120, 9, and 3 fold respectively (Figures 5Ai, 5Aii, and 5Aiii). This effect was TGF- β type 1 receptor (Alk5) dependent, as it was abrogated by a specific inhibitor of activin receptor-like kinase (Alk) (SB-431542). The addition of pioglitazone significantly counteracted the TGF- β 1 related induction of CTGF, with a reduction of 67, 75 and 58% in MS5, HS5, and primary BM stromal cells, respectively (Figures 5Ai, 5Aii, and 5Aiii). We also obtained similar results for other TGF- β 1 target genes: *Collagen 1 alpha 1* (COL1- α 1) and *Fibronectin*

(Figures S5Ai, S5Bi, S5Aii and S5Bii). This inhibitory effect of PPAR- γ agonists on TGF- β 1 transcriptional activity was not reciprocal, as expression of the PPAR- γ target gene *Perilipin-2* (PLIN-2) was not affected by the presence of TGF- β 1 (Figures S5Aiii and S5Biii).

We analyzed the canonical TGF- β /Smad signaling pathway to decipher the molecular mechanisms that govern interaction between PPAR- γ and TGF- β pathways. Upon phosphorylation by the activated type 1 TGF- β receptor, cytoplasmic Smad2 and Smad3 heterodimerize with Smad4 and accumulate in the nucleus, where they recruit cofactors to genomic Smad-binding elements. The addition of pioglitazone did not affect the phosphorylation of Smad2/3 induced by TGF- β 1 stimulation (Figures S5Aiii, S5Biii), suggesting that the initial steps of the TGF- β pathway activation remain unaltered. Several studies have reported that activation of PPAR- γ negatively regulates canonical TGF- β signaling in skin fibroblast and lung smooth-muscle cells, likely by competing with Smad proteins for the recruitment of the p300 acetyltransferase cofactor to the Smad responsive elements (Ghosh et al., 2009; Zhu et al., 2011). We hypothesized that a similar mechanism may be present in stromal BM cells (Figure 6A) and first assessed the effect of an inhibitor of histone acetyltransferase (C646) that is preferentially selective for p300 *versus* other acetyltransferases. C646 disrupted TGF- β signaling by reducing the increase of CTGF mRNA levels by 40 and 50% in the MS5 and HS5 cell lines, respectively, and abrogated the repressive effect of pioglitazone on TGF- β signal transduction (Figures 5Bi and Bii). Under the same conditions, the MEK1-2 inhibitor U0126 and the c-Jun N-terminal kinases (JNK 1-3) inhibitor SP600125, which target TGF- β 1-dependent non-Smad signaling MKK6-p38, MEK-ERK, and JNK/MAPK had no effect (data not shown), suggesting that the repressive effect of pioglitazone is mainly mediated by the Smad/histone acetyltransferase p300 pathway. We overexpressed wild-type p300 (p300 HAT) or a mutant form of p300 lacking functional histone acetyltransferase activity (p300 HAT-) or the empty GFP-lentiviral vector in MS5 BM stromal cells to clarify the role of p300. Comparatively to control GFP-lentiviral vector, in MS5 cells stimulated by TGF- β 1, p300 HAT-overexpression had no effect on the repressive activity of pioglitazone, whereas functional p300 HAT abrogated the repressive effect related to PPAR- γ activation (Figures 5Ci, 5Cii, 5Ciii and 5Ciiii).

We hypothesized that activation of PPAR- γ could repress the TGF- β -dependent transcriptional induction of fibrosis genes by trapping p300 in BM stromal cells (Figure 6A). We thus performed ChIP-Seq analysis using a specific antibody directed against p300 in the MS5 BM stromal cell line stimulated with TGF- β 1, with or without pioglitazone. We also performed parallel ChIP-Seq experiments with a c-Jun specific antibody because AP-1 sites and their cognate transcription factors also play important roles in the gene regulatory activities of TGF- β . We compared the genome-wide localization of p300 ChIP-Seq peaks between various conditions (*i.e.* TGF- β 1 vs TGF- β 1 + pioglitazone) and observed three clusters (Figure 6B), which we called clusters I, II, and III. Cluster II was composed

of 16077 common peaks, representing sites that were similarly occupied by p300 in both the TGF- β 1 and TGF- β 1 + pioglitazone-treated cells. Conversely, clusters I and III, which consisted of 15389 and 5917 peaks, respectively, represent p300 binding sites showing dynamic occupancy upon pioglitazone addition. The sites of cluster I showed a large decrease in p300 occupancy in the presence of pioglitazone, whereas those of cluster III showed an opposite trend, with either increased or *de novo* occupancy in the presence of pioglitazone. These results strongly suggest that PPAR- γ activation induces re-localization of p300 sites to novel genomic locations, thus altering the TGF- β 1 regulatory landscape. This large re-organization of the genome-wide occupancy was specific for p300, as the c-Jun profiles remained unchanged upon pioglitazone addition (Figure 6B), suggesting that AP1 is not involved in the interactions between TGF- β 1 and PPAR- γ signaling. We then assigned putative target genes to the various p300 peaks using the nearest gene approach. Comparison of the target genes in each condition showed a large decrease in TGF- β 1-associated genes, with the appearance of 125 novel target genes, upon pioglitazone addition (Figure 6C). This is consistent with substantial decreased in p300 occupancy observed in the cluster I sites and *de novo* occupancy observed in cluster III (Figure 6B). These results demonstrate the ability of PPAR- γ activation to inhibit TGF- β /Smads signal transduction by trapping of the p300 co-factor, thus likely preventing p300 recruitment by phosphorylated Smads to key genomic sites. We performed a gene ontology (GO) enrichment analysis of the three clusters to obtain functional information and confirmed a reduction in the regulation of TGF- β production and the TGF- β signaling pathways in the presence of pioglitazone (Figure S6A). We next focused on myelofibrosis, by analyzing the average enrichment of a panel of genes directly associated with fibrosis and showed, by p300 immunoprecipitation, that the addition of pioglitazone potently reduces the ability of TGF- β to induce the transcription of fibrosis genes (Figure S6B). We observed no enrichment by c-Jun immunoprecipitation (Figure S6B). We also observed enrichment of a panel of inflammatory genes that was reduced in the presence of pioglitazone, shown by p300 immunoprecipitation (Figure S6C). We did not detect any enrichment in a panel of genes involved in cell proliferation and survival under the same conditions (Figure S6D). These data argue that PPAR- γ agonists play a role in limiting fibrosis, mainly via the inhibition of TGF- β /Smad signal transduction by trapping the co-factor p300.

DISCUSSION

Cumulative evidence indicates that the survival and proliferation of hematological neoplasms are dependent not only on the cell-intrinsic functional properties of the driver mutations present within the cancer stem cell, but also on the ability of surrounding cells to nurture the malignancy. This observation is particularly relevant to MPNs, especially in MF, which is the prototypical example of

interactions between a clonal disorder arising in the hematopoietic stem-cell and pro-inflammatory cytokines that activate stromal cells in the BM, support their fibrotic activity, and reduce their capacity to support hematopoiesis. MF is a life-threatening disease with significantly shortened survival (Tefferi, 2000). Despite our advanced understanding of the molecular pathogenesis of MPNs, currently available treatments are mainly palliative. JAK inhibitor monotherapy has little effect on BM fibrosis development (Harrison et al., 2012; Passamonti and Maffioli, 2018; Verstovsek et al., 2012). Nevertheless, curbing or reversing BM fibrosis is a clinically achievable goal as demonstrated in MF patients after stem cells transplantation (Hussein et al., 2016; Kroger et al., 2015). The potential therapeutic approaches for MF can be divided into three aims: 1) restricting the expansion of the malignant clone, 2) dampening inflammation, and 3) targeting BM fibrosis. Here, we demonstrate that PPAR- γ agonists show therapeutic potential in MF in three different mouse models of MF by acting on each of these axes.

We previously reported that PPAR- γ agonists differentially repress normal and pathological hematopoiesis (Prost et al., 2008; Prost et al., 2015; Rousselot et al., 2017) and recently the invalidation of PPAR- γ signaling has been associated with the expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells (Guo et al., 2018; Sertorio et al., 2017). Here, we show that pioglitazone can reduce the myeloproliferative state by significantly reducing hematocrit levels and thrombocytosis in preclinical mouse models of PV (JAK2^{V617F}) and ET (CALRdel52). In the mouse model of PV, this effect was associated with a decrease in the proportion of JAK2^{V617F}-GFP cells, both in the mature hematopoietic cell and in the HSC (LSK) compartments. Nonetheless, this effect appears to be restricted to cells with a short-term capacity of repopulation (LSK-CD34⁺). In the mouse model of ET, the reduction of platelet counts was not associated with a significant reduction in the proportion of CALRdel52-GFP cells, suggesting that pioglitazone activity is not limited to the mutated CALRdel52 cells. This result can be partially explained by activation of the CALRdel52-negative cells through a paracrine mechanism mediated by mutated CALR (Garbati et al., 2016). We showed that pioglitazone is more effective in mutated JAK2^{V617F} hematopoietic progenitor cells than in normal hematopoietic progenitors *in vitro* and *ex vivo*. This repressive effect affected both the clonogenic and proliferative potential of the JAK2^{V617F} cells and was associated with an increase in the proportion of apoptotic cells and cells in the G0/G1 stage of the cell cycle. In MPNs the three driver-mutations, JAK2^{V617F} (~70% of MPNs) and mutated CALR and MPL (~20% of MPNs) and a large proportion of the remaining MPNs called triple-negative are associated with increased JAK2/STAT5 signaling (Rampal et al., 2014). We previously reported that PPAR- γ is a negative regulator of the STAT5 pathway in hematopoietic progenitor cells (Prost et al., 2008; Prost et al., 2015; Rousselot et al., 2017). The down regulation of Stat5 mRNA levels by PPAR- γ agonists may partially explain the anti-myeloproliferative effect of

pioglitazone and mesalazine. Indeed, Stat5 is absolutely required for the pathogenesis of PV in JAK2^{V617F} mouse model (Yan et al., 2012). PPAR- γ agonists may also act by counteracting the Wnt/ β -catenin pathway, which is involved in hematopoietic-cell proliferation and aberrantly activated in MPNs (Geduk et al., 2015; Suboticki et al., 2018). Further studies are needed to decipher the mechanisms by which the activation of PPAR- γ affects myeloproliferation in MPNs.

Chronic inflammation is a driver of clonal evolution in MPN (Heaton et al., 2018). It is responsible for debilitating symptoms and there is growing evidence suggesting an association between leukocytosis and bleeding, both in PV and ET (Carobbio et al., 2019). In the clinic, leukocytosis is frequently found in PV or early MF and a small increase in white blood cell (WBC) counts is commonly described in ET (Rumi and Cazzola, 2017). Similar observations have been reported in preclinical mouse models of these diseases (Dunbar et al., 2017; Hasan et al., 2013; Marty et al., 2016). The neoplastic clone appears to be the main driver of the inflammatory microenvironment of MPNs with the continuous release of inflammatory molecules from activated leukocytes and platelets (Falanga et al., 2007). It has been shown in animal models that cells of both innate and adaptive immunity are involved in the pathogenesis of MPN, suggesting that the observed strong inflammation is not only due to the MPN clone, but also to an inflammatory reaction of non-malignant cells (Fleischman, 2015). Given the importance of inflammatory cytokines in the emergence and evolution of MPNs (Heaton et al., 2018) and fibrotic BM niche remodeling in mouse models (Schepers et al., 2013), it is crucial to dampen inflammation in MF. PPAR- γ activation has long been studied for its anti-inflammatory properties and certain agonists (for example mesalazine) have been used for over 30 years in the treatment of chronic inflammatory diseases, including inflammatory bowel diseases (IBD) (Williams et al., 2011) and rheumatoid arthritis (Palma et al., 2012). The resolution of inflammation is an active and dynamic process that represents not only an increase in anti-inflammatory actions, but also a shift in immune-cell functions to restore homeostasis. PPAR- γ can shift production from pro to anti-inflammatory mediators by neutrophils platelets, macrophages (Croasdell et al., 2015) and megakaryocytes (Akbiyik et al., 2004). Among the inflammatory cytokines associated with the development of MF, pioglitazone has been shown to extensively and specifically affect the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in a wide range of inflammatory models including sepsis, ischemia/reperfusion, colitis and spinal trauma models (Celinski et al., 2011; Cuzzocrea et al., 2003; Zhang et al., 2010). Additionally, PPAR- γ and TGF- β repress each other's expression in fibroblasts (Lakshmi et al., 2017; Lee et al., 2006). Transcriptional control of the vast majority of genes involved in inflammation requires NF- κ B activation, and the broad ranging effects of PPAR- γ agonists on pro-inflammatory cytokines may be mediated by the regulation of NF- κ B activation. PPAR- γ could repress NF- κ B signaling by physically interacting with NF- κ B/p65 and inducing its degradation (Hou et al., 2012), or

by upregulating I κ B α , a negative regulator of NF- κ B (Scirpo et al., 2015). By masking the NF- κ B nuclear localization signal, the inhibitory protein NF- κ B- α sequesters NF- κ B as an inactive complex in the cytoplasm (Jacobs and Harrison, 1998). Pioglitazone treatment induced a significant decrease in TGF- β mRNA levels and a trend towards decreased TNF- α mRNA levels, associated with a significant increase in I κ B α and IL-1ra gene expression in nucleated blood cells in the MF-post PV JAK2^{V617F} model. IL-1ra competitively antagonizes the inflammatory effects of IL-1 α and IL-1 β (Perrier et al., 2006) and its expression has also been reported to be regulated by pioglitazone in ischemic brain (Glatz et al., 2010). Neutrophils are the first responders to most inflammatory stimuli and neutrophilia is a hallmark of many inflammatory diseases. The effect of pioglitazone on neutrophil function and counts has been summarized by Croasdell *et al* (Croasdell et al., 2015). PPAR- γ activation has been shown to decrease neutrophil numbers and myeloperoxidase (MPO) activity in various models of inflammation (lipopolysaccharide (LPS) challenges, high-fat diet, ischemia/ reperfusion, colitis and gastric injury), (Croasdell et al., 2015). In our mouse models of MPN, we demonstrate that PPAR γ ligands- γ agonists (pioglitazone and mesalazine) can potently reduce the WBC count. We also show that PPAR- γ agonists help to reduce spleen size. Overall, these observations argue for an anti-inflammatory role of PPAR- γ in MF.

Prevention or limitation of the development of BM fibrosis could help to restore normal hematopoiesis and disrupt the malignant self-reinforcing niche. PPAR- γ agonists have shown anti-fibrotic effects in many organs, including the lungs, skin, kidneys, eyes, heart, liver, and bowel (Vetuschi et al., 2018). Fibrosis is associated with reduced tissue levels of PPAR- γ in certain organ-specific human fibrotic diseases (kidney, liver, lung and the cutaneous lesions of scarring (cicatricial alopecia)(Wei et al., 2012) and in various mouse models of fibrotic diseases (Wei et al., 2010). Furthermore, genetic deletion of PPAR- γ in the liver (Yang et al., 2006) and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Ghosh et al., 2008) exacerbates fibrogenesis after organ injury. PPAR- γ -null MEFs show evidence of autocrine TGF- β stimulation with enhanced TGF- β production, constitutive activation of Smad2/3 and upregulation of collagen synthesis, whereas reconstitution of these cells with ectopic PPAR- γ resulted in their normalization (Ghosh et al., 2008). Here, we demonstrate, for the first time, that profibrotic signaling triggered by TGF- β 1 is counteracted by PPAR- γ agonists in murine and human BM stromal cell lines and in primary BM stromal cells from patients. The mechanisms reported to be involved in blockage of the canonical Smad signaling pathway by PPAR- γ activation appear to be tissue-dependent, with reduced Smad3 phosphorylation in hepatic stellate cells (Zhao et al., 2006) and involvement of the p300 cofactor in fibroblasts (Zhu et al., 2011). We demonstrated that the presence of pioglitazone does not prevent Smad2/3 phosphorylation in BM stromal cells but counteracts TGF- β profibrotic signaling in a p300 dependent manner. We observed

a competitive shift of the p300 cofactor from TGF- β transcriptional signaling to PPAR- γ transcriptional signaling in the presence of pioglitazone by ChIP-Seq analysis. Such trapping of p300 by activated PPAR- γ potentially represses the ability of TGF- β to induce profibrotic genes. Moreover, PPAR- γ activation may also restrict osteosclerosis associated with MF (Tefferi, 2000), as observed in the histopathological analysis of BM from the MF post-JAK2^{V617F} mouse models. Indeed, there is transcriptional antagonism between Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and PPAR- γ , the two key regulators of mesenchymal differentiation, to orient differentiation towards osteoblasts or adipocytes, respectively (Ge et al., 2016) and activation of PPAR- γ promotes adipocyte differentiation to the detriment of osteoblast formation.

Our results show that PPAR- γ agonists may be effective on the three components of MF pathophysiology. As a final demonstration, we showed that PPAR- γ agonists reduce the development of both reticulin fibers and osteosclerosis in BM and help to reduce spleen size in the JAK2^{V617F} mouse model. We anticipate that the addition of PPAR- γ agonists to anti-JAK2 therapy, such as ruxolitinib, may have synergistic effects on both constitutional symptoms and BM fibrosis in MF patients. Further clinical trials in MF patients may help to determine the best way to use PPAR- γ agonists in clinical practice.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Kouroupi for her clinical contribution. We thank Catherine Lacout and Milena Kohn for their experimental contributions. This work was supported by the “Association Laurette Fugain”, Paris, France, to S.P., P.R., and J.-L.V., by the “Association pour la Recherche sur le Cancer”, Villejuif, France to S.P., by Action Leucémies, Boulogne-Billancourt, France to J.L. and by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) to S.P. ES was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20180339221), the ATIP-AVENIR program (Plan Cancer), and the Labex EpiGenMed (« Investissements d’avenir » program, reference ANR-10-LABX-12-01). All authors approved the paper.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.L., J.S. and S.P. lead the project, designed and performed experiments, and analyzed data. W.V., I.P., J.-L.V., C.M., M.S. and E.S. analyzed data. C.C. and K.S.F. contributed experimentally. P.R. and J.-J.K. analyzed data and contributed clinically. J.L. and S.P. wrote the paper.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Treatment with PPAR- γ agonists prevents myelofibrosis in three mouse models of MPN.

Images present the histological examination of the BM (femur) of one representative mouse per treatment group in the MF post-JAK2^{V617F} model (W37). A) Hematoxylin-Eosin (HE) coloration shows BM cellularity. B) Silver reticulin coloration shows a dense network of reticulin fibers in the BM of untreated animals, whereas only scattered fibers are seen in the BM of mice treated with pioglitazone or mesalazin.

PPAR- γ agonists counteract the decrease of hemoglobin levels related to the development of BM fibrosis in the (Ci) MF TPO^{high} model, (Di) MF post-JAK2^{V617F} model and (Ei) MF post-CALRdel52 model. The black vertical dotted line indicates initiation of treatment.

TBI: total body irradiation, Gy: Gray, BM: bone marrow, BMT: bone marrow transplantation, WT: wild type, W: week.

PPAR- γ agonists prevent BM hematopoietic cells depletion in the (Cii) MF TPO^{high} model, (Dii) MF post-JAK2^{V617F} model, and (Eii) MF post-CALRdel52 model and preserve the clonogenic potential of BM hematopoietic progenitors in the (Ciii) MF TPO^{high} model, (Diii) MF post-JAK2^{V617F} model, and (Eiii) MF post-CALRdel52 model. The star denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$).

Un: untreated, Pio: pioglitazone, Mes: mesalazine, d52: CALRdel52, WT: CALRWT.

Figure 2. Treatment with PPAR- γ agonists reduces myeloproliferation in PV JAK2^{V617F} and ET CALRdel52 mice.

Pioglitazone decreases the hematocrit of the PVJAK2^{V617F}-GFP mice (Ai) and the platelet count of TE CALRdel52 mice (Bi).

Pioglitazone reduces the proportion of the malignant JAK2^{V617F}-GFP clone in the hematopoietic (CD45.2) cells of peripheral blood (Aii), especially in myeloid (CD11b) cells (Aiii). Pioglitazone limits expansion of the malignant CALRdel52-GFP clone in the hematopoietic (CD45.2) cells of peripheral blood (Bii) and the effect is greater in myeloid (CD11b) cells (Biii). The black vertical dotted line indicates initiation of treatment. The star denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$).

MPN: myeloproliferative neoplasm, TBI: total body irradiation, Gy: Gray, BMT: bone marrow transplantation, WT: wildtype, W: week.

Figure 3. Anti-proliferative effect of pioglitazone on human JAK2^{V617F} cell lines and hematopoietic progenitors from PV and MF patients.

Pioglitazone reduces the number of living cells in A) UKE-1 and HEL cell lines ($n = 4$), B) hematopoietic progenitors from a PV patient ($n = 1$) in a dose-dependent manner.

Pioglitazone significantly reduces the number of living cells in D) hematopoietic progenitors from PV patients (n = 6) and E) hematopoietic progenitors from MF patients (n = 8). Pioglitazone slightly reduces the number of living UCB cells (C, n = 3).

Pioglitazone reduces the clonogenic potential of (F) UKE-1 and HEL cells (n = 3), G) hematopoietic progenitors from UCB, H) hematopoietic progenitors from PV patients (n = 5) and I) hematopoietic progenitors from MF patients (n = 6). The star denotes a statistically significant difference (p < 0.05). Pio: pioglitazone, PV: Polycythemia Vera, MF: Myelofibrosis, UCB: umbilical cord blood, D: day, CFC: colony forming cell.

Figure 4. Resolution of inflammation with PPAR- γ agonists in mouse models of MPN.

A) PPAR- γ agonists decrease leukocytosis related to the MPN phenotype. MPN: myeloproliferative neoplasm. B) Quantification of mRNA transcript levels of inflammation-related genes in nucleated cells from the peripheral blood shows an anti-inflammatory profile in treated JAK2^{V617F} mice (hatched grey) relative to that in untreated JAK2^{V617F} mice (light grey). The star denotes a statistically significant difference (p < 0.05). WBC: white blood cell, TBI: total body irradiation, Gy: Gray, BMT: bone marrow transplantation, WT: wild type, W: week.

Figure 5. Pioglitazone reduces induction of the TGF- β 1 pro-fibrotic target gene CTGF in a p300-dependent manner.

Pioglitazone decreases the induction of transcription of the CTGF gene induced by TGF- β 1 in Ai) MS5 BM stromal cells, Aii) HS5 BM stromal cells, and Aiii) primary BM stromal cells.

The inhibitory effect of pioglitazone is abrogated by the chemical inhibitor of the HAT activity of the p300 cofactor, C646, in Bi) MS5 BM stromal cells, and Bii) HS5 BM stromal cells.

Overexpression of the efficient p300 protein (HAT+) in MS5 BM stromal cells abrogates the inhibitory effect of pioglitazone on the induction of CTGF related to TGF- β 1 stimulation Cii) relative to control transduction with an empty lentivirus Ci) whereas overexpression of the deficient p300 protein (HAT-, Ciii) has no effect (Graphs are representative of one experiment). Ciiii) Percentage of reduction in cumulative analysis (n=4). The star denotes a statistically significant difference (p < 0.05).

BM: bone marrow, CTGF: connective tissue growth factor, HAT: histone acetyltransferase, Pio: pioglitazone, SB: SB431542 (inhibitor of TGF- β 1 receptor).

Figure 6. PPAR- γ activation counteracts the induction of TGF- β 1 target genes by sequestering the p300 transcription co-factor.

A) Schematic representation of the mechanistic hypothesis. Activation of the PPAR- γ nuclear receptor by its ligand (pioglitazone) leads to the recruitment of the p300 co-factor for the transcription of PPAR- γ target genes to the detriment of the transcription of TGF- β 1 target genes.

B) Heatmap representation of the genome-wide localization of p300 ChIP-Seq peaks. At the left of the figure: the three clusters of genes I, II and III: I (TGF- β) = target genes of TGF- β 1, III (PIO) = target genes of PPAR- γ , II (Overlap) = common genes. At the top: stimulation condition (TGF- β alone or TGF- β + pioglitazone) and Ab target for immunoprecipitation (p300 or c-jun). At the bottom: center gene distance. Cluster I sites show a large decrease of p300 occupancy in the presence of pioglitazone, whereas cluster III sites show the opposite trend, with increased or *de novo* occupancy in the presence of pioglitazone. C) Venn diagram for target genes associated with detected peaks (p300). The presence of pioglitazone lead to a decrease in the number of TGF- β 1 genes and the appearance of 125 novel target genes related to PPAR- γ . Pio: pioglitazone, bp: base pair, Ab: antibody, TSS: transcription starting site, TES: transcription end site.

Table 1: Histopathological analysis of the BM (femur) and spleen in the MF post-JAK2^{V617F} mouse model.

Table recapitulates the histopathological examination of a) BM (femur) and b) spleen, of three representative mice per treatment group (W37 post transplantation).

BM and spleen fibrosis were graded from 0 to 3, 3 being the highest grade of fibrosis. Osteosclerosis was estimated using a semi-quantitative scale from + to +++. Absence denotes no osteosclerosis. Megakaryocytes (MKC) were counted per field and the total number of MKC in four fields is reported in the table. MKC enrichment was estimated using a semi-quantitative scale from 0 to +++. Spleen architecture was assessed by myeloid cell invasion (M) to the detriment of lymphoid cells (L). The size of the spleen was designated as large or small.

METHODS

Mice. Animal experiments were approved by the Commissariat à l’Energie Atomique / Direction de la Recherche Fondamentale review board, protocol no. 16_032. The JAK2^{V617F} knock-in (KI) mice have been previously described (Hasan et al., 2013). Our PV and MF post-PV models were generated by transplanting lethally irradiated recipients (11Gy) with a mixture of JAK2^{V617F} KI (Ly5.2; 1/3) and wild type (WT) (Ly5.1; 2/3) BM cells as previously described (Hasan et al., 2013). The CALRdel52 and wild-

type CALR (CALRWT) retroviral mouse models have been previously described (Marty et al., 2016), and were used to generate ET and MF post-ET. Briefly, four days after 5-fluorouracil (5-FU) treatment (150mg/kg), BM cells from WT C57Bl/6 mice were co-cultivated for 4 days with pMSCV-CALRwt-IRES-GFP or pMSCV-CALRdel52-IRES-GFP virus-producing Plate-E cells in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing IL3, SCF, TPO, and 20% fetal calf serum (FCS) and transplanted into lethally irradiated recipients. The previously described TPO^{high} mice (Villeval et al., 1997) were used to generate the MF TPO^{high} model. Briefly, 5-fluorouracil (5-FU) treated BM cells from WT C57Bl/6 mice were co-cultivated for three days with MPZenTPO virus-producing GP/E-86 cells in DMEM containing IL3, SCF, TPO, and 20% non-adherent cells were transplanted into lethally irradiated recipients (see Figure 1 for details).

Patient samples and cell lines. All patient samples were obtained with informed consent.

CD34⁺ hematopoietic progenitors. CD34⁺ cells from patients with PV or MF and umbilical cord blood (UCB) were immunoselected (CD34 microBead Kit, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Enrichment for CD34⁺ cells was ascertained by flow cytometry using an anti-CD34 monoclonal antibody (clone 581; BD Pharmingen). CD34⁺ cells were cultured in serum-free medium (SFM) StemSpan (StemCell Technologies) with stem-cell factor at 20 ng/ml (SCF, StemCell Technologies).

Primary bone marrow stromal cells. Primary BM stromal cells were obtained from the BM of patients with chronic myelogenous leukemia (CML). Briefly, after immunoselection of the CD34⁺ population, the CD34⁻ population was cultured in DMEM glutamax 10% FBS without cytokines. Non-adherent cells were removed by successive passages.

Cell lines for proliferation assays. UKE-1 (CVCL_0104) and HEL (CVCL_0001) cells carrying the JAK2^{V617F} mutation were used for proliferation assay and were cultured in RPMI glutamax, 10% FBS.

Bone marrow stromal cell lines. The murine BM stromal cell line MS5 (CVCL_2128) and human BM stromal cell line HS5 (CVCL_3720) were used to test the anti-fibrotic effect of PPAR- γ agonists *in vitro* and were cultured in DMEM glutamax, 10% FBS.

Reagents. For *in vitro* assays, PPAR- γ agonists were provided by Cayman Chemical (PPAR γ PAK; Bertin-pharma, France). The specific inhibitor of activin receptor-like kinase (Alk) SB-431542 ((4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide) was provided by Sigma-Aldrich, (France) and used at a final concentration of 1 μ M. The p300 HAT inhibitor C646 (4-[4-[[5-(4,5-Dimethyl-2-nitrophenyl)-2-furanyl]methylene]-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-pyrazol-1-yl]benzoic acid) was provided by Sigma-Aldrich, (France) and used at a final concentration of 20 μ M. The MEK1-2 inhibitor U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio)-butadiene, was provided by

InvivoGen (France) and used at a final concentration of 10 μ M. The JNK inhibitor SP600125 was provided by MedChemExpress, (CliniSciences, France) and used at a final concentration of 20 μ M. Recombinant TGF β -1 was provided by R&D Systems and used at 5 ng/mL.

Proliferation assays. CD34⁺ cells from patients with PV or MF and umbilical cord blood and UKE-1 and HEL cells were cultured with or without pioglitazone (10 or 20 μ M). Cell viability and absolute count were assessed by flow cytometry at days 3, 6, and 10 of culture.

Induction of TGF- β 1 target genes in bone marrow stromal cells. BM stromal cells were stimulated with TGF- β 1 (5ng/ml) with or without pioglitazone (10 or 20 μ M) and with or without chemical inhibitors (SB431542, C646, SP600125 or U0126). After five hours at 37°C in 5% CO₂, cells were harvested and suspended in an appropriate lysis buffer for RNA extraction.

Production of the p300HAT and p300HAT- lentiviral vectors. The cDNA encoding p300HAT and p300HAT- (mutation: H1415A E1423A Y1424A L1428S Y1430A H1434A) were obtained from Addgene (www.addgene.org, , Plasmid #23252 and Plasmid #23254 respectively) and subcloned into the pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro lentiviral vector provided by Applied Biological Materials, Inc. Lentiviral particle production was performed as previously described (Prost et al., 2015) and the particles concentrated by centrifugation using Vivaspin® 20 Ultrafiltration Units (Sartorius).

RNA extraction and RT-qPCR analysis. RNA was extracted from 2×10^5 cells using RNAqueous-4PCR (Ambion). Reverse transcription was carried out for 1 h at 42°C using the SuperScript® Vilo™ cDNA Synthesis kit (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed in an iCycler thermocycler (CFX, Bio-Rad) using iQ Supermix SYBR GRN (Bio-Rad). The primer pairs targeting the human and murine cDNA are listed in Sup. Material 1. The comparative CT method ($\Delta\Delta$ CT) was used to compare gene expression levels between the various culture conditions (relative to GAPDH).

Treatment and analysis of mice.

Treatment with PPAR- γ agonists. Each treatment group was comprised 8 to 10 female mice (C57BL/6J, from Charles River Laboratories, France), regardless of the mouse model. Mice were randomly assigned to the treatment group after transplantation (www.randomization.com). Treatment was given orally in pellets containing pioglitazone (Actos®, Takeda) at a dose of 250 mg/kg of food, pellets containing mesalazine (Sigma-Aldrich) at a dose of 2500 mg/kg of food or control pellets (C1000). All pellets came from Genestil (France). Mice of the TPO^{high} model were treated from

week 2 until euthanasia at week 15. MF post-JAK2^{V617F} mice were treated from week 20 until euthanasia at week 37. JAK2^{V617F}-GFP mice were treated from week 6 until euthanasia at week 23. CALRdel52/CALRWT mice were treated from week 6 until euthanasia at week 20.

Blood samples. Iterative venous blood samples (100 to 200 µL) were taken either from the retro-orbital sinus or the mandibular vein. All blood counts were performed on a scil Vet abc® device (scil). A portion of the cells from the peripheral blood samples were lysed in an appropriate buffer for RNA extraction.

Bone marrow samples. The BM cavity of one femur per mouse was rinsed in a constant volume (100 µL). Part of the BM cell suspension was labeled with a mixture of monoclonal antibodies and counted by flow cytometry using BD Trucount™ (BD Biosciences) tubes. Another portion of the BM cells (1.10⁵ cells) was suspended in 3 ml of alpha-MEM based methylcellulose medium (MethoCult™ GF M4434, StemCell™ Technologies). Cells were scored and collected after 14 days of incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. A portion of the BM cells was depleted of mature cells with a mixture of biotinylated anti-CD5, anti-CD45R (B220), anti-CD11b, anti-Gr1 (Ly-6G / C), antiCD7-4, and anti-Ter119 antibodies according to the manufacturer's recommendations ("Lineage Cell depletion Kit, Mouse", Miltenyi Biotec). The Lin⁻ cells were then labeled with an anti-Sca.1 antibody and an anti-CD117 antibody to identify the so-called LSK fraction. Additional labeling with an anti-CD34 antibody differentiated LSK⁻CD34⁺ cells corresponding to short-term hematopoietic stem cells (ST-HSC) from LSK⁻CD34⁻ cells corresponding long-term hematopoietic stem cells (LT-HSC).

Histopathological analysis of bone marrow and spleen. Organs were maintained in PFA 4%. Sections of femur and spleen were stained by hematoxylin-eosin (HE) and silver reticulin coloration. Histopathological sections and coloration were performed by the histopathological platform of the Institute Gustave Roussy, Villejuf, France.

Progenitor cell study. For CFC assays, 1 × 10⁴ CD34⁺ cells or 500 cells from the cell lines (UKE-1 or HEL) were suspended in 3 ml alpha-MEM based methylcellulose medium (GF H4434, Stemcell Technologies). Cells were scored and collected after 14 days incubation at 37°C and 5% CO₂.

Flow cytometry.

Antibodies. All antibodies used for flow cytometry were purchased from BD Pharmingen and included anti-human CD45 (clone 2D1), CD34 (clone 581), Annexin V, and Smad2(pS465/pS467)/Smad3(pS423/pS425) (clone O72-670, BD Phosflow™ Smad Monoclonal Antibodies) and anti-mouse CD45 (clone 30-F11), CD45.1 (clone A20), CD45.2 (clone 104), CD34 (clone RAM34), Sca.1 (Ly-6A/E) (clone D7), and CD117 (Kit) (ACK45). Lineage-negative cell

populations from mouse BM samples (Lin⁻) were obtained by depletion of mature hematopoietic cells with the « Lineage cell depletion kit » (Miltenyi Biotec).

Detection of apoptosis by Annexin V staining. Cells (1.10^5) were washed and suspended in binding buffer (0.01 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl₂) before incubation with 5 µL anti-Annexin V-APC for 15 min at RT (25°C) in the dark. Then, 400 µL binding buffer and 5 µL Propidium Iodide (PI) (component no. 51-66211E, BD) were added 10 min before performing the analysis. The apoptotic population was defined as Annexin V-positive and PI-negative cells.

DNA synthesis assay. The cell proliferation rate was measured by incorporation of 5- ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), a thymidine nucleoside analog, into DNA during active DNA synthesis (2 h). Staining was performed according to the manufacturer's protocol (Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit, Invitrogen).

Cell cycle analysis. Cells previously stained for the DNA synthesis assay were incubated with Hoechst 33342 (10 µg/ml) for 15 min at 37°C and then centrifuged at 1000 rpm for 5 min and washed two times in PBS. Cells were analyzed by flow cytometry using violet excitation and collecting the emitted Hoechst fluorescence between 390 and 480 nm.

IntracellularSmads2/3 phosphorylation assays. Briefly, MS5 and HS5 cells cultured in DMEM with 10% FCS were incubated with or without pioglitazone (10 µM) and TGF-β1 (5 ng/mL) at 37°C in 5% CO₂ for 2 h. Cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm 4 (BD Pharmingen) and stained with anti-phosphoSmad2/3 for 30 min in the dark according to the manufacturer's protocol. Analysis was carried out on a minimum of 20,000 events in the viable-cell gate.

For all experiments (except Annexin V-based detection of apoptosis and cell cycle analysis), cell viability was assessed using SYTOX® Blue dead cell stain (Invitrogen Life Technologies). All analyses were carried out on a BD FACS Canto2 Flow Cytometer.

Chromatin Immuno-Precipitation assays. ChIP analysis was performed on BM MS5 cell line after 5 h of TGF-β1 stimulation (10 ng/mL), with or without pioglitazone (20 ng/mL). Technical details information are provided in Sup. Material 2. Nucleotide sequences were mapped using Bowtie (v2.3.4.3) against the mouse genome mm9 (UCSC Genome Browser on Mouse July 2007 (NCBI37/mm9) Assembly) downloaded from the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). Then sam files were converted into bam format using Samtools (v1.9). Mapped reads (sequences) were transformed into a genome-wide read density (coverage), in two steps: (1) by using makeUCSCfile from Homer suite (v4.10,5-16-2018) using the parameter -norm 20000000 to normalize the number of reads, (2) by using bedGraphToBigWig (v4) from UCSC. Peak calling was performed with Homer (v4.10,5-16-2018) with default parameters.

Statistical analysis. For culture assays and quantitative real-time PCR, values were calculated as the mean $\pm$ standard deviation for at least three separate experiments performed in triplicate. Paired and unpaired comparisons were performed using the nonparametric Wilcoxon rank test and Mann & Whitney test, respectively. All statistical analyses were carried out using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

REFERENCES

- Agarwal, A., Morrone, K., Bartenstein, M., Zhao, Z. J., Verma, A., and Goel, S. (2016). Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF-beta. *Stem cell investigation* 3, 5.
- Akbiyik, F., Ray, D. M., Gettings, K. F., Blumberg, N., Francis, C. W., and Phipps, R. P. (2004). Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood* 104, 1361-1368.
- Berria, R., Glass, L., Mahankali, A., Miyazaki, Y., Monroy, A., De Filippis, E., Cusi, K., Cersosimo, E., Defronzo, R. A., and Gastaldelli, A. (2007). Reduction in hematocrit and hemoglobin following pioglitazone treatment is not hemodilutional in Type II diabetes mellitus. *Clinical pharmacology and therapeutics* 82, 275-281.
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N. G. (2011). TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth factors* 29, 196-202.
- Carobbio, A., Ferrari, A., Masciulli, A., Ghirardi, A., Barosi, G., and Barbui, T. (2019). Leukocytosis and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: a systematic review and meta-analysis. *Blood advances* 3, 1729-1737.
- Celinski, K., Dworzanski, T., Korolczuk, A., Piasecki, R., Slomka, M., Madro, A., and Fornal, R. (2011). Effects of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma ligands on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 62, 347-356.
- Cervantes, F., Correa, J. G., and Hernandez-Boluda, J. C. (2016). Alleviating anemia and thrombocytopenia in myelofibrosis patients. *Expert review of hematology* 9, 489-496.
- Cervantes, F., Dupriez, B., Passamonti, F., Vannucchi, A. M., Morra, E., Reilly, J. T., Demory, J. L., Rumi, E., Guglielmelli, P., Roncoroni, E., *et al.* (2012). Improving survival trends in primary myelofibrosis: an international study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 2981-2987.
- Chagraoui, H., Komura, E., Tulliez, M., Giraudier, S., Vainchenker, W., and Wendling, F. (2002). Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 100, 3495-3503.
- Croasdell, A., Duffney, P. F., Kim, N., Lacy, S. H., Sime, P. J., and Phipps, R. P. (2015). PPARgamma and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation. *PPAR research* 2015, 549691.
- Cuzzocrea, S., Pisano, B., Dugo, L., Ianaro, A., Patel, N. S., Di Paola, R., Genovese, T., Chatterjee, P. K., Di Rosa, M., Caputi, A. P., and Thiemermann, C. (2003). Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *British journal of pharmacology* 140, 366-376.
- Dalen, K. T., Schoonjans, K., Ulven, S. M., Weedon-Fekjaer, M. S., Bentzen, T. G., Koutnikova, H., Auwerx, J., and Nebb, H. I. (2004). Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 53, 1243-1252.

Dantas, A. T., Pereira, M. C., de Melo Rego, M. J., da Rocha, L. F., Jr., Pitta Ida, R., Marques, C. D., Duarte, A. L., and Pitta, M. G. (2015). The Role of PPAR Gamma in Systemic Sclerosis. *PPAR research* 2015, 124624.

Daynes, R. A., and Jones, D. C. (2002). Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature reviews Immunology* 2, 748-759.

Dong, M., and Blobel, G. C. (2006). Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood* 107, 4589-4596.

Dunbar, A., Nazir, A., and Levine, R. (2017). Overview of Transgenic Mouse Models of Myeloproliferative Neoplasms (MPNs). *Current protocols in pharmacology* 77, 14 40 11-14 40 19.

Duncan, M. R., Frazier, K. S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X., and Grotendorst, G. R. (1999). Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 1774-1786.

Garbati, M. R., Welgan, C. A., Landefeld, S. H., Newell, L. F., Agarwal, A., Dunlap, J. B., Chourasia, T. K., Lee, H., Elferich, J., Traer, E., *et al.* (2016). Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism. *American journal of hematology* 91, 211-219.

Ge, C., Cawthorn, W. P., Li, Y., Zhao, G., Macdougald, O. A., and Franceschi, R. T. (2016). Reciprocal Control of Osteogenic and Adipogenic Differentiation by ERK/MAP Kinase Phosphorylation of Runx2 and PPARgamma Transcription Factors. *Journal of cellular physiology* 231, 587-596.

Geduk, A., Atesoglu, E. B., Tarkun, P., Mehtap, O., Hacıhanefioglu, A., Demirsoy, E. T., and Baydemir, C. (2015). The Role of beta-Catenin in Bcr/Abl Negative Myeloproliferative Neoplasms: An Immunohistochemical Study. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 15, 785-789.

Ghosh, A. K., Bhattacharyya, S., Wei, J., Kim, S., Barak, Y., Mori, Y., and Varga, J. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 2968-2977.

Ghosh, A. K., Wei, J., Wu, M., and Varga, J. (2008). Constitutive Smad signaling and Smad-dependent collagen gene expression in mouse embryonic fibroblasts lacking peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Biochemical and biophysical research communications* 374, 231-236.

Glatz, T., Stock, I., Nguyen-Ngoc, M., Gohlke, P., Herdegen, T., Culman, J., and Zhao, Y. (2010). Peroxisome-proliferator-activated receptors gamma and peroxisome-proliferator-activated receptors beta/delta and the regulation of interleukin 1 receptor antagonist expression by pioglitazone in ischaemic brain. *Journal of hypertension* 28, 1488-1497.

Guo, B., Huang, X., Lee, M. R., Lee, S. A., and Broxmeyer, H. E. (2018). Antagonism of PPAR-gamma signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. *Nature medicine* 24, 360-367.

Harrison, C., Kiladjian, J. J., Al-Ali, H. K., Gisslinger, H., Waltzman, R., Stalbovskaya, V., McQuitty, M., Hunter, D. S., Levy, R., Knoop, L., *et al.* (2012). JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 366, 787-798.

Hasan, S., Lacout, C., Marty, C., Cuingnet, M., Solary, E., Vainchenker, W., and Villeval, J. L. (2013). JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNalpha. *Blood* 122, 1464-1477.

Heaton, W. L., Senina, A. V., Pomictier, A. D., Salama, M. E., Clair, P. M., Yan, D., Bell, R. N., Gililand, J. M., Prchal, J. T., O'Hare, T., and Deininger, M. W. (2018). Autocrine Tnf signaling favors malignant cells in myelofibrosis in a Tnfr2-dependent fashion. *Leukemia* 32, 2399-2411.

Hou, Y., Moreau, F., and Chadee, K. (2012). PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65. *Nature communications* 3, 1300.

Hussein, K., Stucki-Koch, A., Alchalby, H., Trivai, I., Kroger, N., and Kreipe, H. (2016). Cytokine Expression Pattern in Bone Marrow Microenvironment after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Primary Myelofibrosis. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 22, 644-650.

Ianotto, J. C., Chauveau, A., Boyer-Perrard, F., Gyan, E., Laribi, K., Cony-Makhoul, P., Demory, J. L., de Renzis, B., Dosquet, C., Rey, J., *et al.* (2018). Benefits and pitfalls of pegylated interferon-alpha2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica* 103, 438-446.

Jacobs, M. D., and Harrison, S. C. (1998). Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 95, 749-758.

James, C., Ugo, V., Le Couedic, J. P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., *et al.* (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144-1148.

Jiang, C., Ting, A. T., and Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391, 82-86.

Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A. S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J. D., Them, N. C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., *et al.* (2013). Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *The New England journal of medicine* 369, 2379-2390.

Kroger, N., Giorgino, T., Scott, B. L., Ditschkowski, M., Alchalby, H., Cervantes, F., Vannucchi, A., Cazzola, M., Morra, E., Zabelina, T., *et al.* (2015). Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. *Blood* 125, 3347-3350; quiz 3364.

Lakshmi, S. P., Reddy, A. T., and Reddy, R. C. (2017). Transforming growth factor beta suppresses peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression via both SMAD binding and novel TGF-beta inhibitory elements. *The Biochemical journal* 474, 1531-1546.

Lee, S. J., Yang, E. K., and Kim, S. G. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoic acid X receptor alpha represses the TGFbeta1 gene via PTEN-mediated p70 ribosomal S6 kinase-1 inhibition: role for Zf9 dephosphorylation. *Molecular pharmacology* 70, 415-425.

Lehrke, M., and Lazar, M. A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell* 123, 993-999.

Marty, C., Pecquet, C., Nivarthi, H., El-Khoury, M., Chachoua, I., Tulliez, M., Villeval, J. L., Raslova, H., Kralovics, R., Constantinescu, S. N., *et al.* (2016). Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* 127, 1317-1324.

Martyre, M. C., Magdelenat, H., Bryckaert, M. C., Laine-Bidron, C., and Calvo, F. (1991). Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 77, 80-86.

Mead, A. J., Milojkovic, D., Knapper, S., Garg, M., Chacko, J., Farquharson, M., Yin, J., Ali, S., Clark, R. E., Andrews, C., *et al.* (2015). Response to ruxolitinib in patients with intermediate-1-, intermediate-2-, and high-risk myelofibrosis: results of the UK ROBUST Trial. *British journal of haematology* 170, 29-39.

Mondet, J., Hussein, K., and Mossuz, P. (2015). Circulating Cytokine Levels as Markers of Inflammation in Philadelphia Negative Myeloproliferative Neoplasms: Diagnostic and Prognostic Interest. *Mediators of inflammation* 2015, 670580.

Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T., and Takehara, K. (1999). Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *Journal of cellular physiology* 181, 153-159.

Palma, A., Sainaghi, P. P., Amoroso, A., Fresu, L. G., Avanzi, G., Pirisi, M., and Brunelleschi, S. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocytes/macrophages from rheumatoid arthritis patients: relation to disease activity and therapy efficacy--a pilot study. *Rheumatology* 51, 1942-1952.

Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., Gomez-Puerto, M. C., and Ten Dijke, P. (2017). TGF-beta-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases. *International journal of molecular sciences* 18.

Passamonti, F., and Maffioli, M. (2018). The role of JAK2 inhibitors in MPNs 7 years after approval. *Blood* 131, 2426-2435.

Perrier, S., Darakhshan, F., and Hajduch, E. (2006). IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS letters* 580, 6289-6294.

Prost, S., Le Dantec, M., Auge, S., Le Grand, R., Derdouch, S., Auregan, G., Deglon, N., Relouzat, F., Aubertin, A. M., Maillere, B., *et al.* (2008). Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *The Journal of clinical investigation* 118, 1765-1775.

Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J. P., Verhoeyen, E., Raggueneau, V., Maneglier, B., *et al.* (2015). Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARgamma agonists. *Nature* 525, 380-383.

Rampal, R., Al-Shahrour, F., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P., Brunel, J. P., Mermel, C. H., Bass, A. J., Pretz, J., Ahn, J., Hricik, T., *et al.* (2014). Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 123, e123-133.

Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J., and Glass, C. K. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79-82.

Rousselot, P., Prost, S., Guilhot, J., Roy, L., Etienne, G., Legros, L., Charbonnier, A., Coiteux, V., Cony-Makhoul, P., Huguette, F., *et al.* (2017). Pioglitazone together with imatinib in chronic myeloid leukemia: A proof of concept study. *Cancer* 123, 1791-1799.

Schepers, K., Pietras, E. M., Reynaud, D., Flach, J., Binnewies, M., Garg, T., Wagers, A. J., Hsiao, E. C., and Passegue, E. (2013). Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell stem cell* 13, 285-299.

Scirpo, R., Fiorotto, R., Villani, A., Amenduni, M., Spirli, C., and Strazzabosco, M. (2015). Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma limits NF-kappaB-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatology* 62, 1551-1562.

Sertorio, M., Du, W., Amarachintha, S., Wilson, A., and Pang, Q. (2017). In Vivo RNAi Screen Unveils PPARgamma as a Regulator of Hematopoietic Stem Cell Homeostasis. *Stem cell reports* 8, 1242-1255.

Suboticki, T., Mitrovic Ajtic, O., Micic, M., Kravic Stevovic, T., Dikic, D., Diklic, M., Lekovic, D., Gotic, M., and Cokic, V. P. (2018). beta-catenin and PPAR-gamma levels in bone marrow of myeloproliferative neoplasm: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastructural pathology* 42, 498-507.

Tabarrok, A., and Tiu, R. V. (2014). Molecular genetics of myelofibrosis and its associated disease phenotypes. *Translational medicine @ UniSa* 8, 53-64.

Tefferi, A. (2000). Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *The New England journal of medicine* 342, 1255-1265.

Tefferi, A., and Vardiman, J. W. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, 14-22.

Terui, T., Niitsu, Y., Mahara, K., Fujisaki, Y., Urushizaki, Y., Mogi, Y., Kohgo, Y., Watanabe, N., Ogura, M., and Saito, H. (1990). The production of transforming growth factor-beta in acute megakaryoblastic leukemia and its possible implications in myelofibrosis. *Blood* 75, 1540-1548.

Vannucchi, A. M., Barbui, T., Cervantes, F., Harrison, C., Kiladjian, J. J., Kroger, N., Thiele, J., Buske, C., and Committee, E. G. (2015). Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 26 Suppl 5, v85-99.

Verstovsek, S., Gotlib, J., Mesa, R. A., Vannucchi, A. M., Kiladjian, J. J., Cervantes, F., Harrison, C. N., Paquette, R., Sun, W., Naim, A., *et al.* (2017). Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. *Journal of hematology & oncology* 10, 156.

Verstovsek, S., Mesa, R. A., Gotlib, J., Levy, R. S., Gupta, V., DiPersio, J. F., Catalano, J. V., Deininger, M., Miller, C., Silver, R. T., *et al.* (2012). A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 366, 799-807.

Vetuschi, A., Pompili, S., Gaudio, E., Latella, G., and Sferra, R. (2018). PPAR-gamma with its anti-inflammatory and anti-fibrotic action could be an effective therapeutic target in IBD. *European*

review for medical and pharmacological sciences 22, 8839-8848.

Villeval, J. L., Cohen-Solal, K., Tulliez, M., Giraudier, S., Guichard, J., Burstein, S. A., Cramer, E. M., Vainchenker, W., and Wendling, F. (1997). High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* 90, 4369-4383.

Wei, J., Bhattacharyya, S., Jain, M., and Varga, J. (2012). Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma: A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. *The open rheumatology journal* 6, 103-115.

Wei, J., Bhattacharyya, S., and Varga, J. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: innate protection from excessive fibrogenesis and potential therapeutic target in systemic sclerosis. *Current opinion in rheumatology* 22, 671-676.

Williams, C., Panaccione, R., Ghosh, S., and Rioux, K. (2011). Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in gastroenterology* 4, 237-248.

Yan, D., Hutchison, R. E., and Mohi, G. (2012). Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. *Blood* 119, 3539-3549.

Yang, L., Chan, C. C., Kwon, O. S., Liu, S., McGhee, J., Stimpson, S. A., Chen, L. Z., Harrington, W. W., Symonds, W. T., and Rockey, D. C. (2006). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 291, G902-911.

Yue, L., Bartenstein, M., Zhao, W., Ho, W. T., Han, Y., Murdun, C., Mailloux, A. W., Zhang, L., Wang, X., Budhathoki, A., *et al.* (2017). Efficacy of ALK5 inhibition in myelofibrosis. *JCI insight* 2, e90932.

Zhang, Q., Hu, W., Meng, B., and Tang, T. (2010). PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic spinal cord injury via anti-inflammatory in adult rats. *Neurological research* 32, 852-859.

Zhao, C., Chen, W., Yang, L., Chen, L., Stimpson, S. A., and Diehl, A. M. (2006). PPARgamma agonists prevent TGFbeta1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells. *Biochemical and biophysical research communications* 350, 385-391.

Zhu, M., Flynt, L., Ghosh, S., Mellema, M., Banerjee, A., Williams, E., Panettieri, R. A., Jr., and Shore, S. A. (2011). Anti-inflammatory effects of thiazolidinediones in human airway smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45, 111-119.

Zingariello, M., Martelli, F., Ciaffoni, F., Masiello, F., Ghinassi, B., D'Amore, E., Massa, M., Barosi, G., Sancillo, L., Li, X., *et al.* (2013). Characterization of the TGF-beta1 signaling abnormalities in the Gata1low mouse model of myelofibrosis. *Blood* 121, 3345-3363.

FIGURES

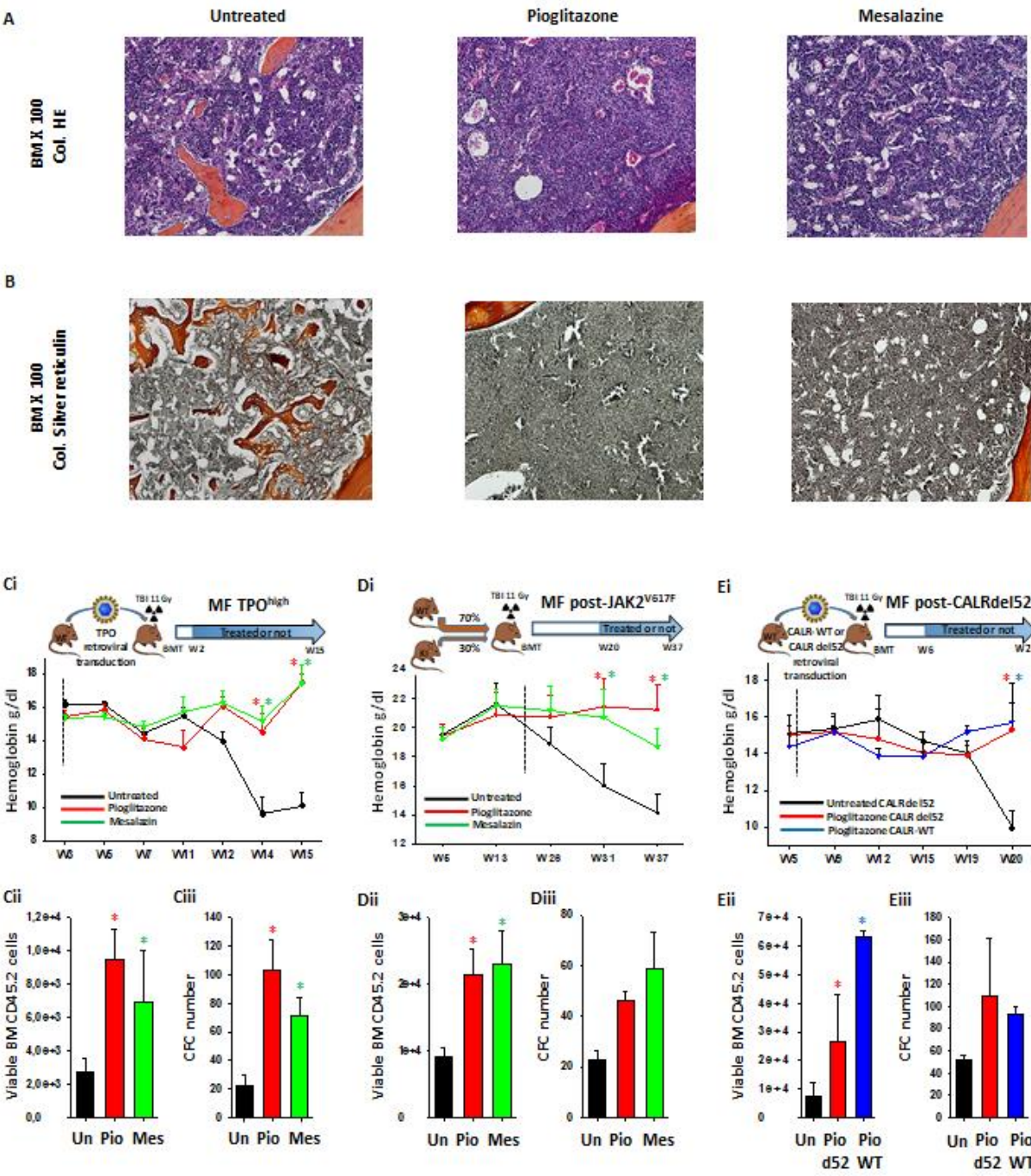


Figure 1

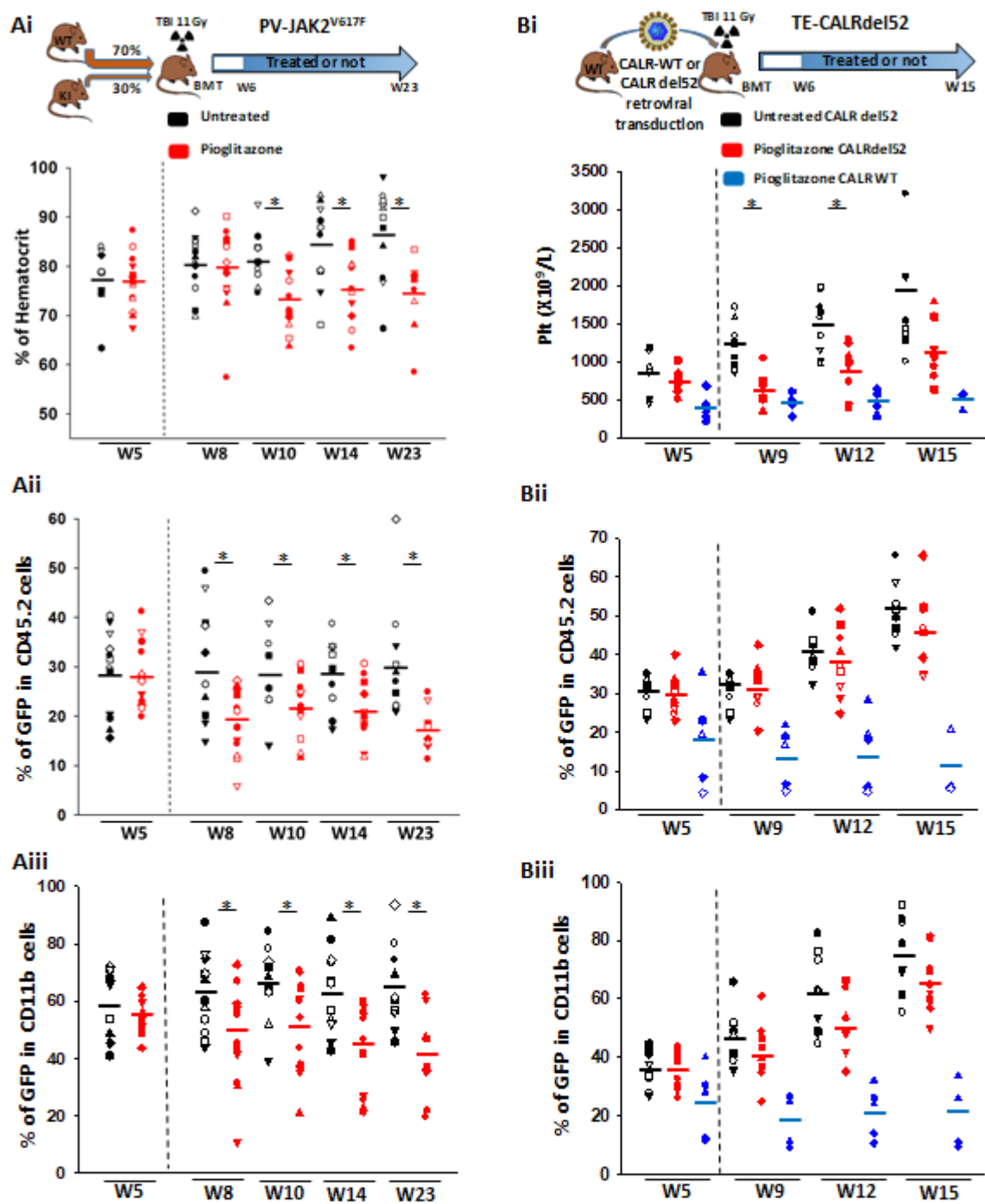


Figure 2

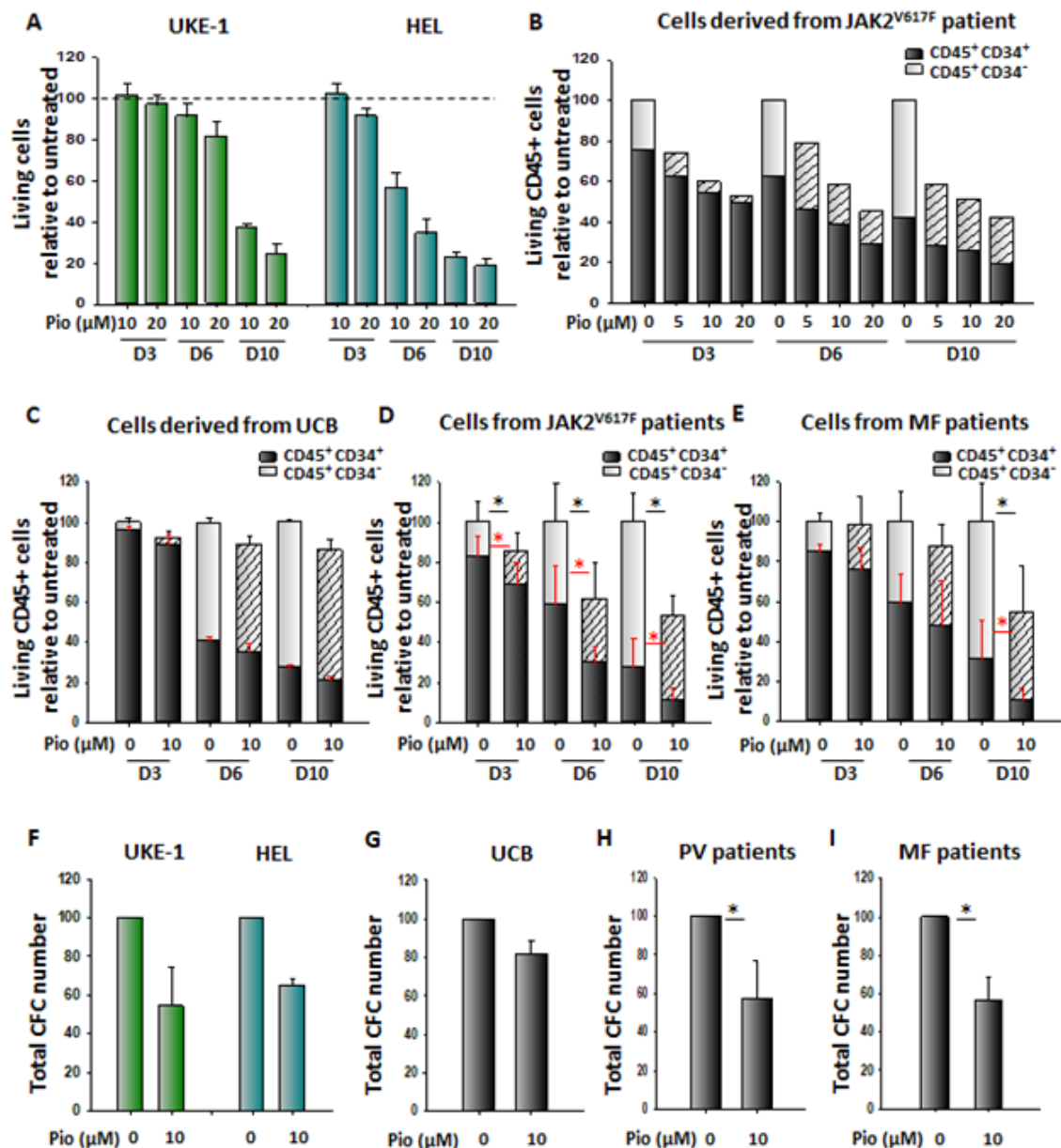


Figure 3

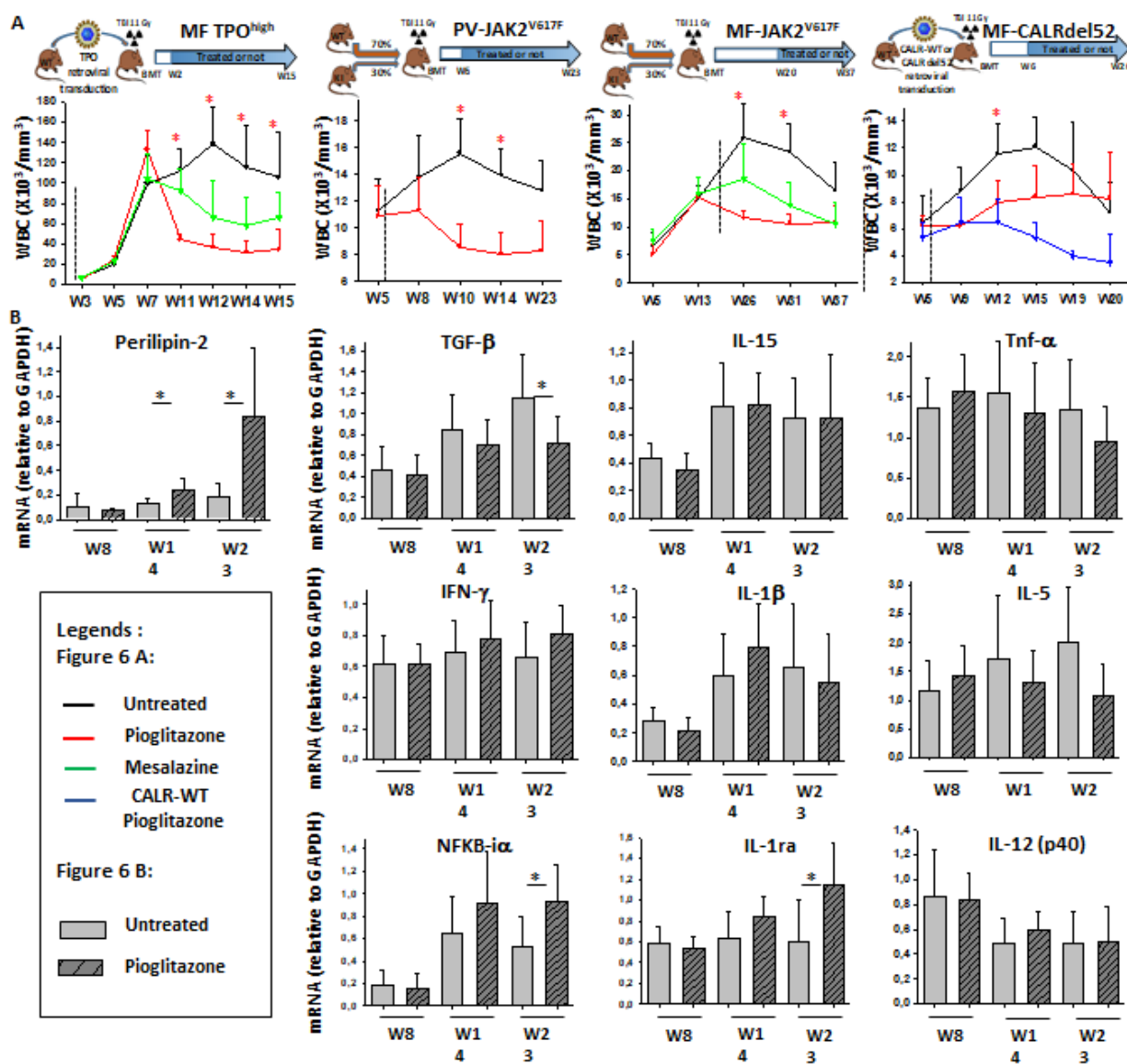


Figure 4

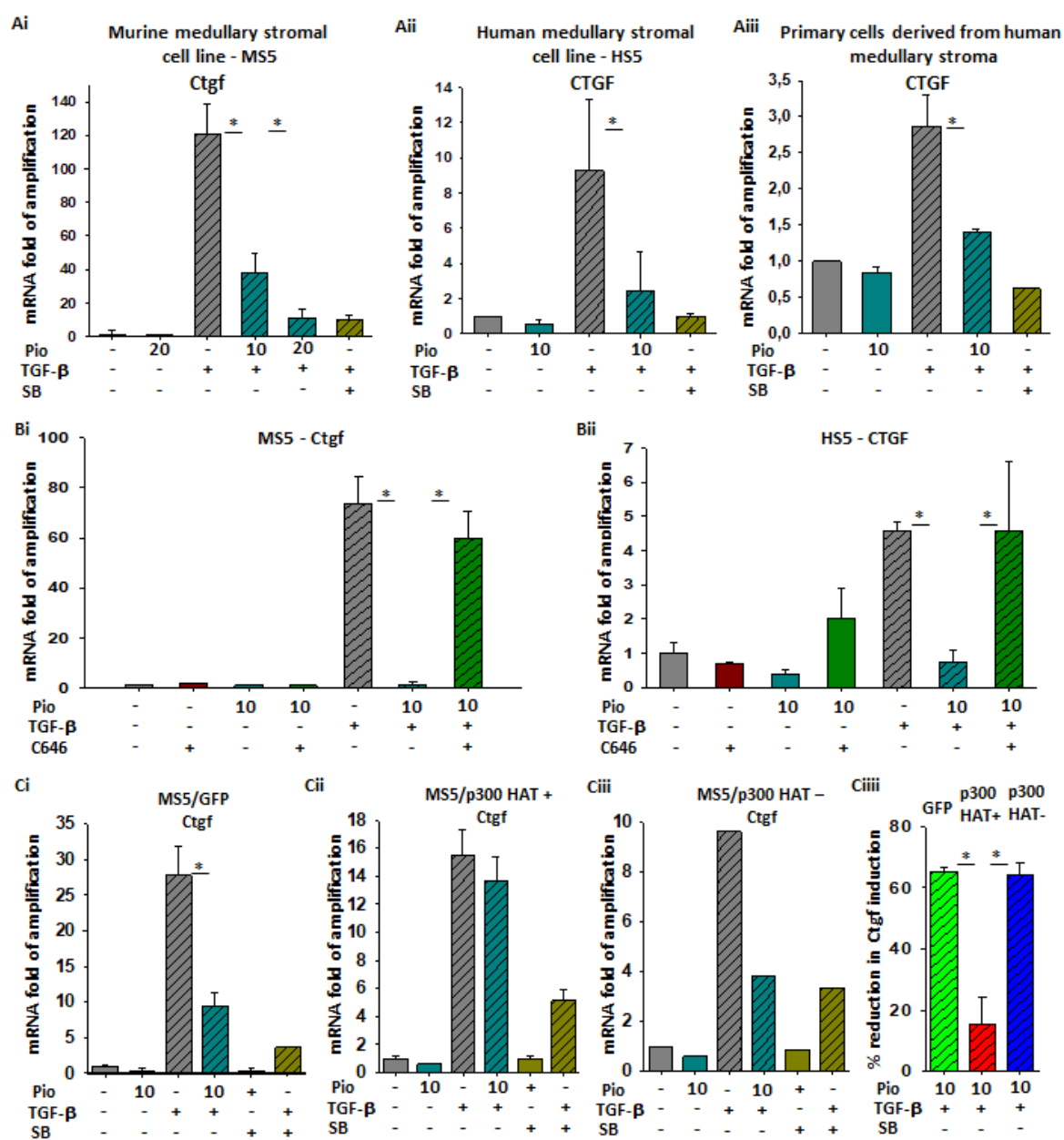


Figure 5

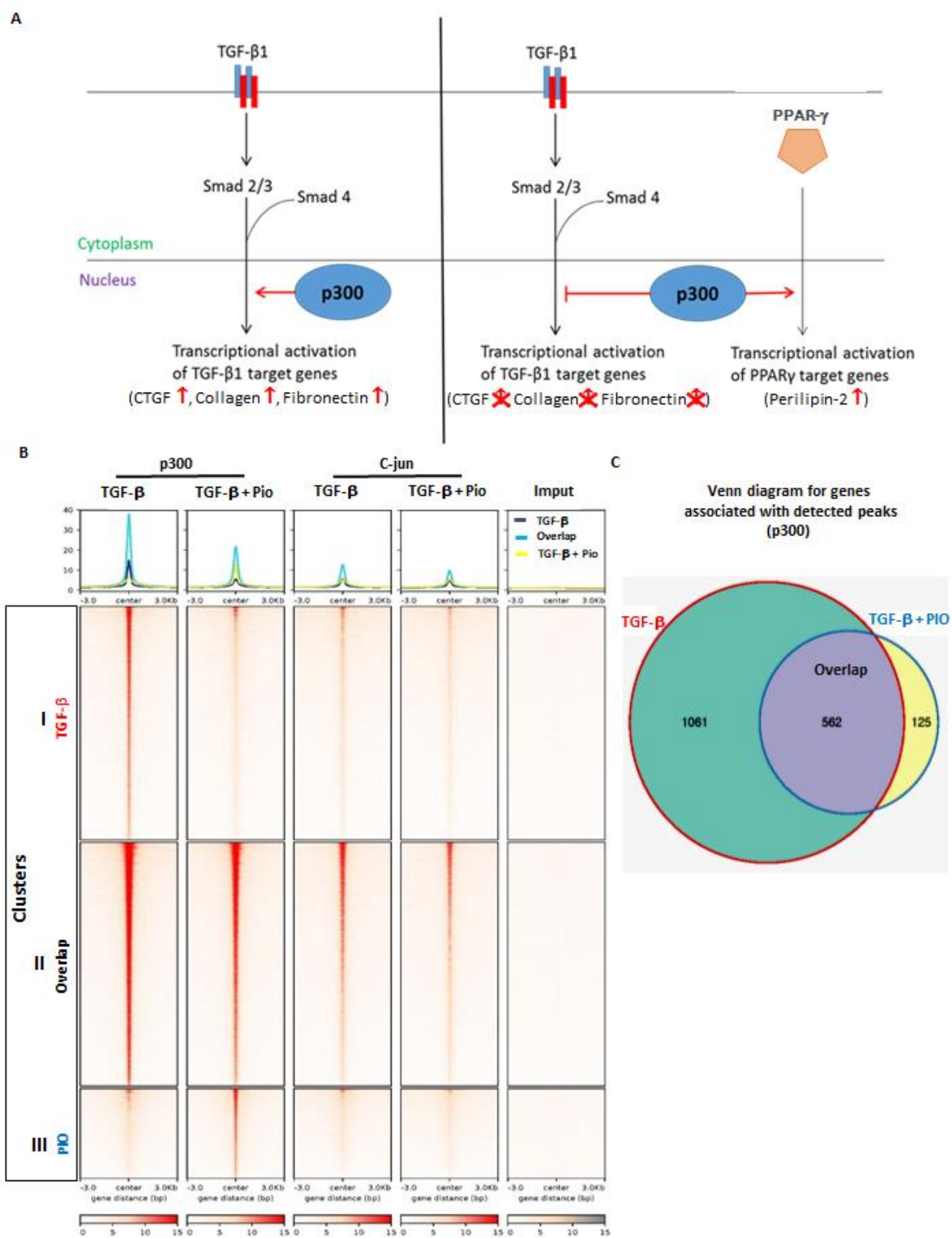


Figure 6

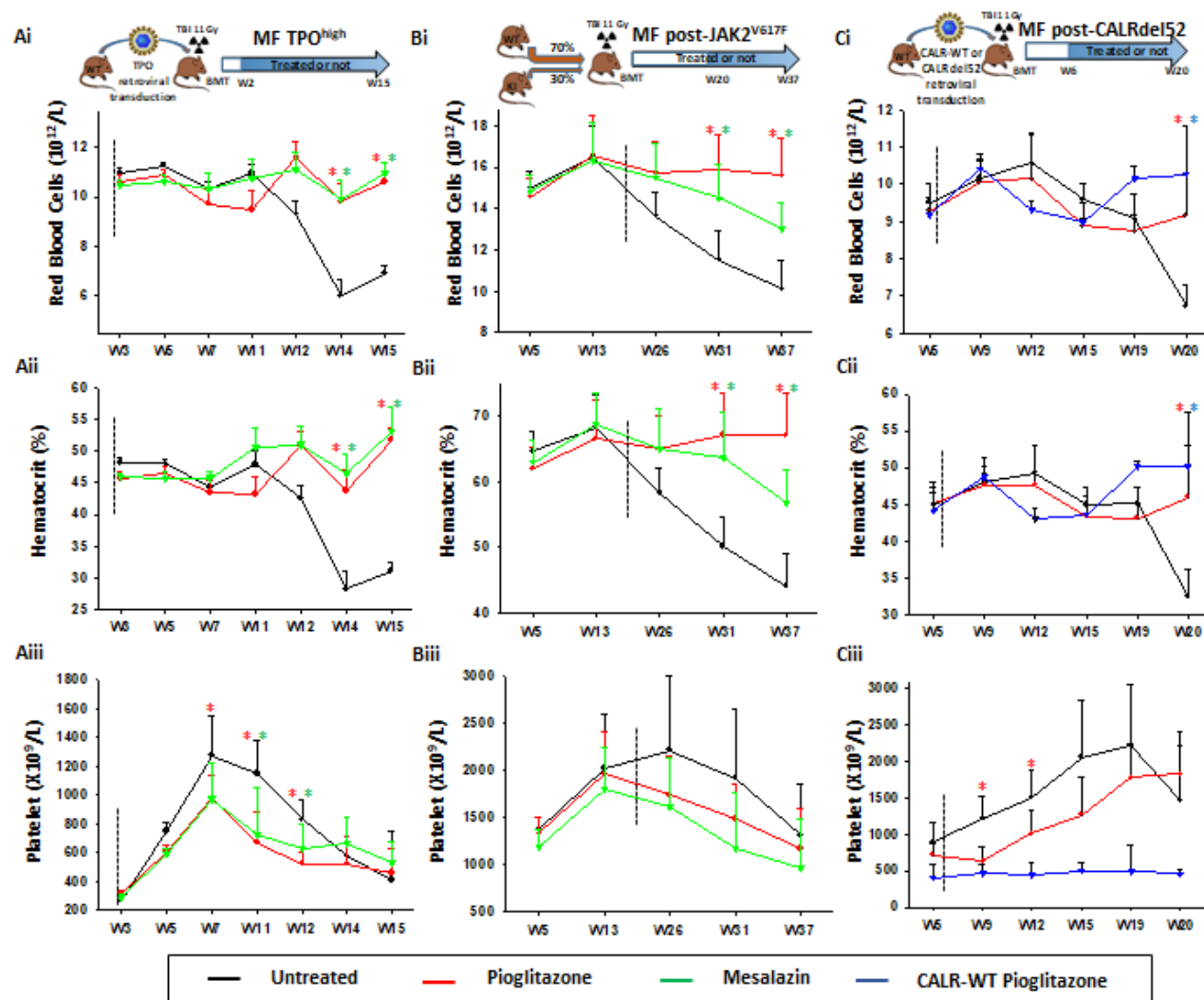
TABLE

BM analysis (MF-post-JAK2 V617F ; W37)				
a	Number	Fibrosis	Osteosclerosis	MKC/Field
Untreated	961	Grade 2/3	++(+)	+++ (32/4)
	962	Grade 3/3	+++	+++ (62/4)
	963	Grade 1-2/3	+	++ (26/4)
Pioglitazone	964	Grade 2-3/3	+(+)	+(17/4)
	965	Grade 1/3	absence	+(16/4)
	966	Grade 0/3	absence	+ (16/4)
Mesalazin	967	Grade 0/3	absence	+++ (36/4)
	968	Grade 0-1/3	absence	+++ (38/4)
	969	Grade 0/3	absence	++ (27/4)

Spleen analysis (MF-post-JAK2 V617F ; W37)					
b	Number	Fibrosis	Structure	MKC/Field	Size
Untreated	961	Grade 2-3/3	M>>L	+++ (51/4)	Large
	962	Grade 2-3/3	M>>L	+++ (54/4)	Large
	963	Grade 1.75/3	M>>>L	++ (47/4)	Large
Pioglitazone	964	Grade 1.75/3	M>L	++ (37/4)	Large
	965	Grade 1.5/3	M>>L	++ (22/4)	Small
	966	Grade 1/3	≈ Normal	+ (6/4)	Small
Mesalazin	967	Grade 1.25/3	≈ Normal	+ (5/4)	Small
	968	Grade 1.75/3	≈ Normal	+ (5/4)	Small
	969	Grade 1.5/3	≈ Normal	+ (2/4)	Small

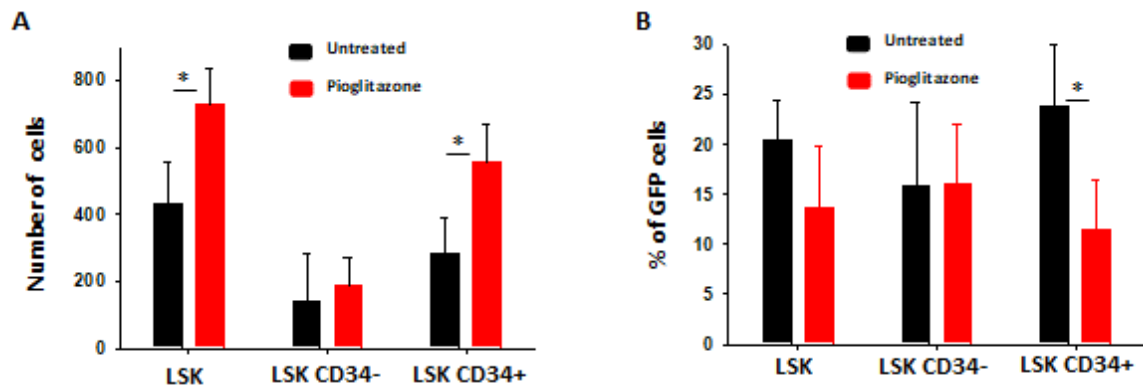
Table 1

SUPPLEMENTAL INFORMATIONS

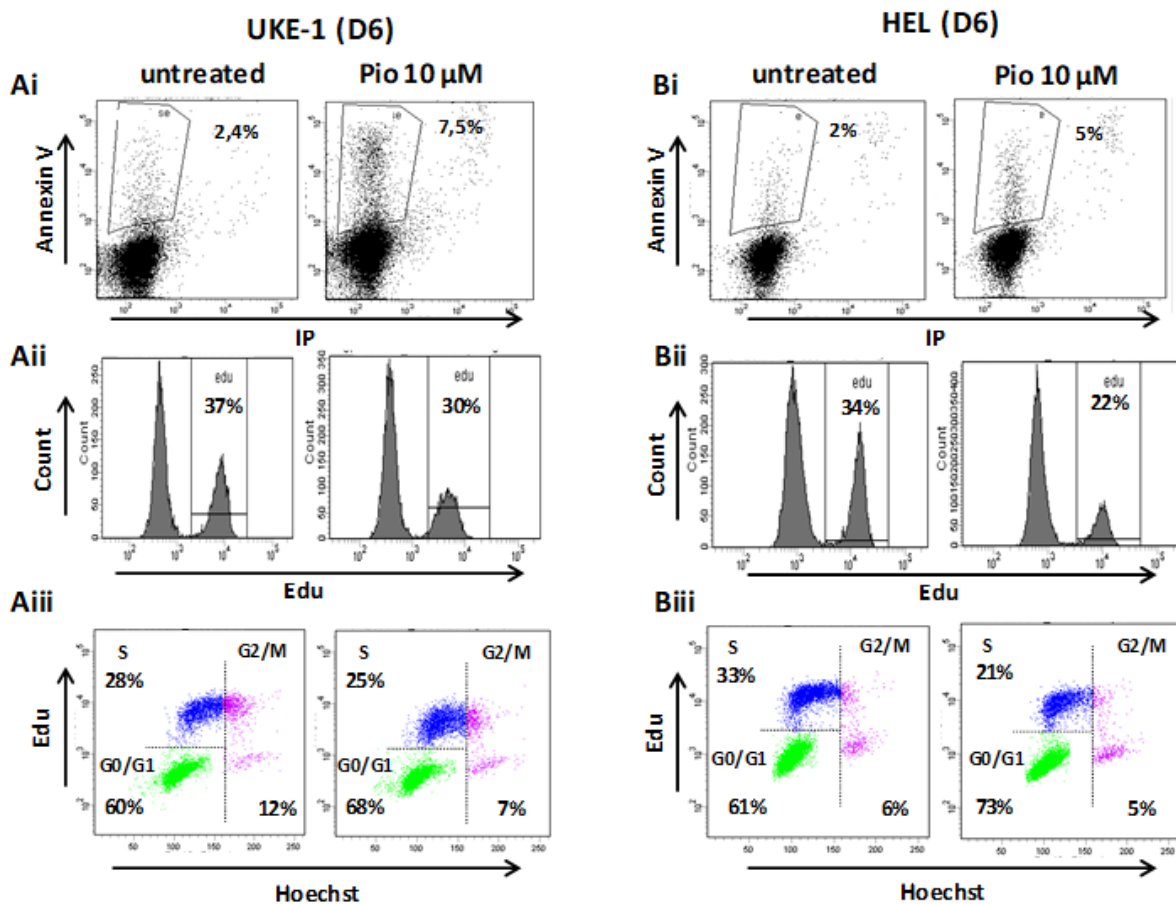


Supplemental Figure 1. Effect of PPAR- γ agonists on red blood cell count, hematocrit, and platelet count in the three mouse models of Myelofibrosis. PPAR- γ agonists counteract the decrease in red blood cell counts and hematocrit related to the development of BM fibrosis in the (Ai and Aii) MF TPO^{high} model, (Bi and Bii) MF post-JAK2V617F model, and (Ci and Cii) MF post-CALRdel52 model. PPAR- γ agonists help to decrease the high platelet count in the Aiii) MF TPO^{high} model, Biii) MF post-JAK2V617F model, and Ciii) MF post-CALRdel52 model. The black vertical dotted line indicates the initiation of treatment. The star denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$).

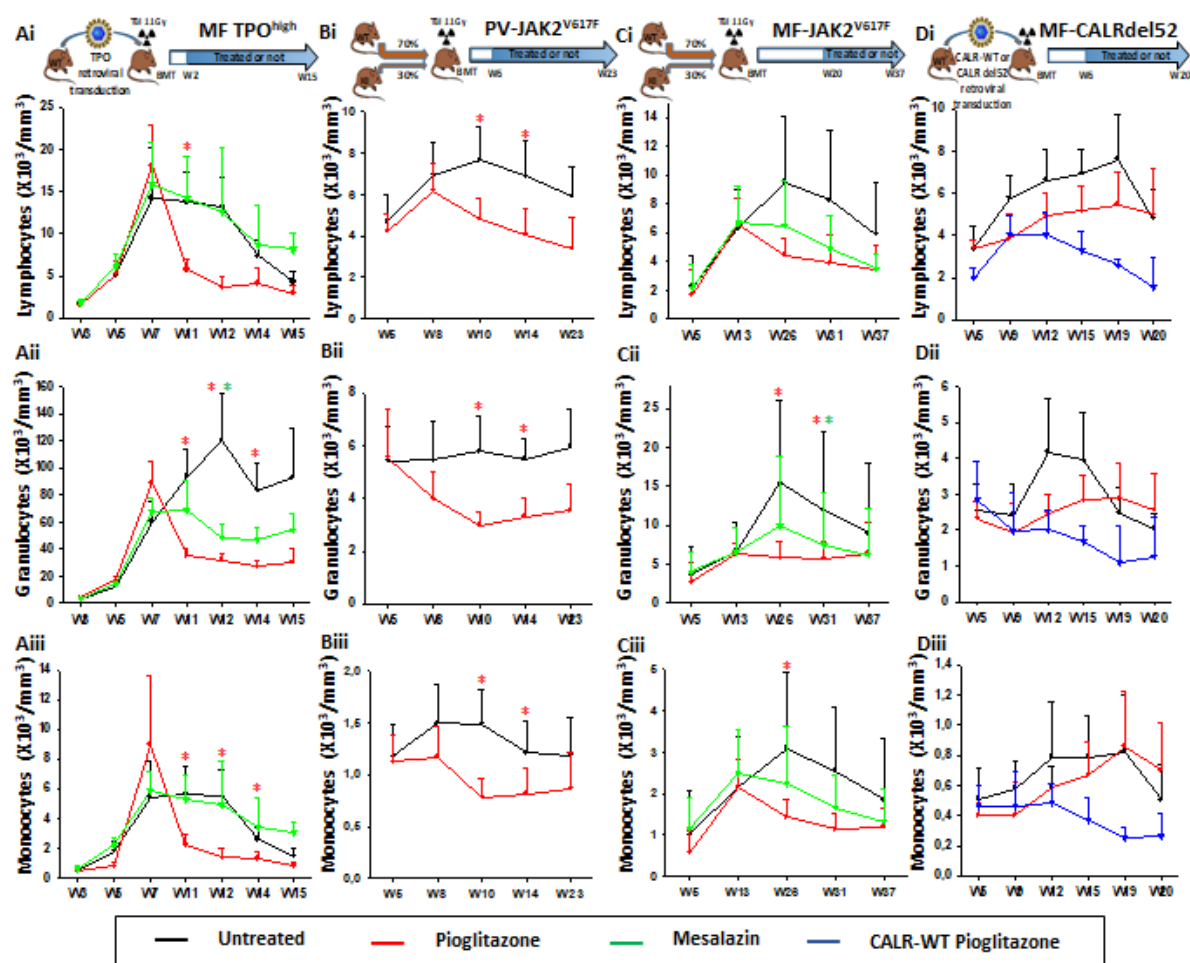
TBI: total body irradiation, Gy: Gray, BMT: bone marrow transplantation, W: week, WT: wild type



Supplemental Figure 2. Effect of pioglitazone on the LSK population in JAK2^{V617F} mice (W23). A) The LSK (Lin⁻, Sca⁺, Kit⁺) hematopoietic population is greater in the BM of treated mice, especially the short-term progenitors (LSK CD34⁺). B) The frequency of JAK2^{V617F}-GFP cells is lower in the LSK population from the BM of treated mice, especially in the short-term progenitors (LSK CD34⁺). The star denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$).

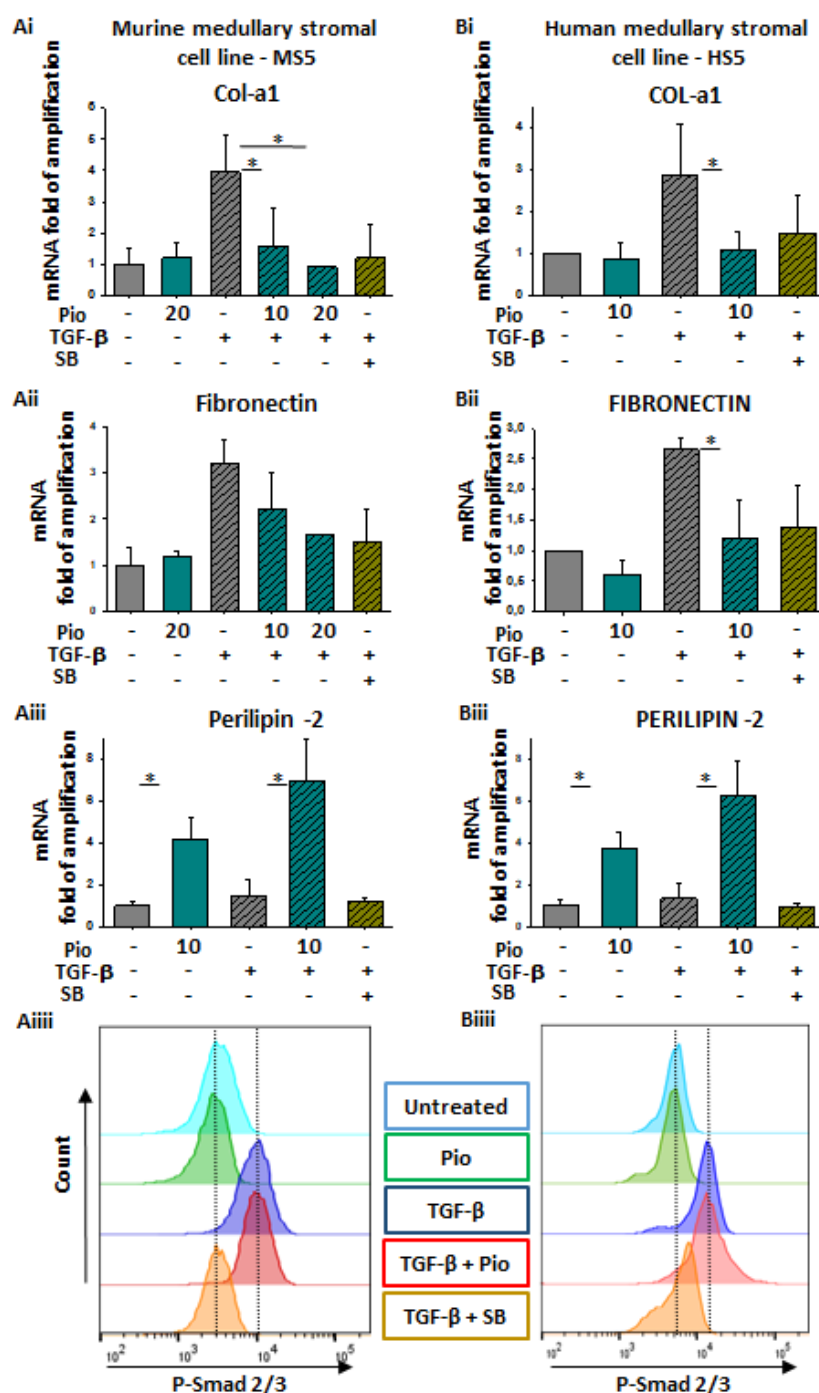


Supplemental Figure 3. Pioglitazone promotes apoptosis and impairs the cell cycle of JAK2^{V617F} cells. Pioglitazone increases the proportion of apoptotic cells of Ai) UKE-1 cells and Bi) HEL cells. Pioglitazone decreases the proliferation of Aii) UKE-1 and Bii) HEL cells, with an increased proportion of Aiii) UKE-1 and Biii) HEL cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. (Representative of five independent experiments).

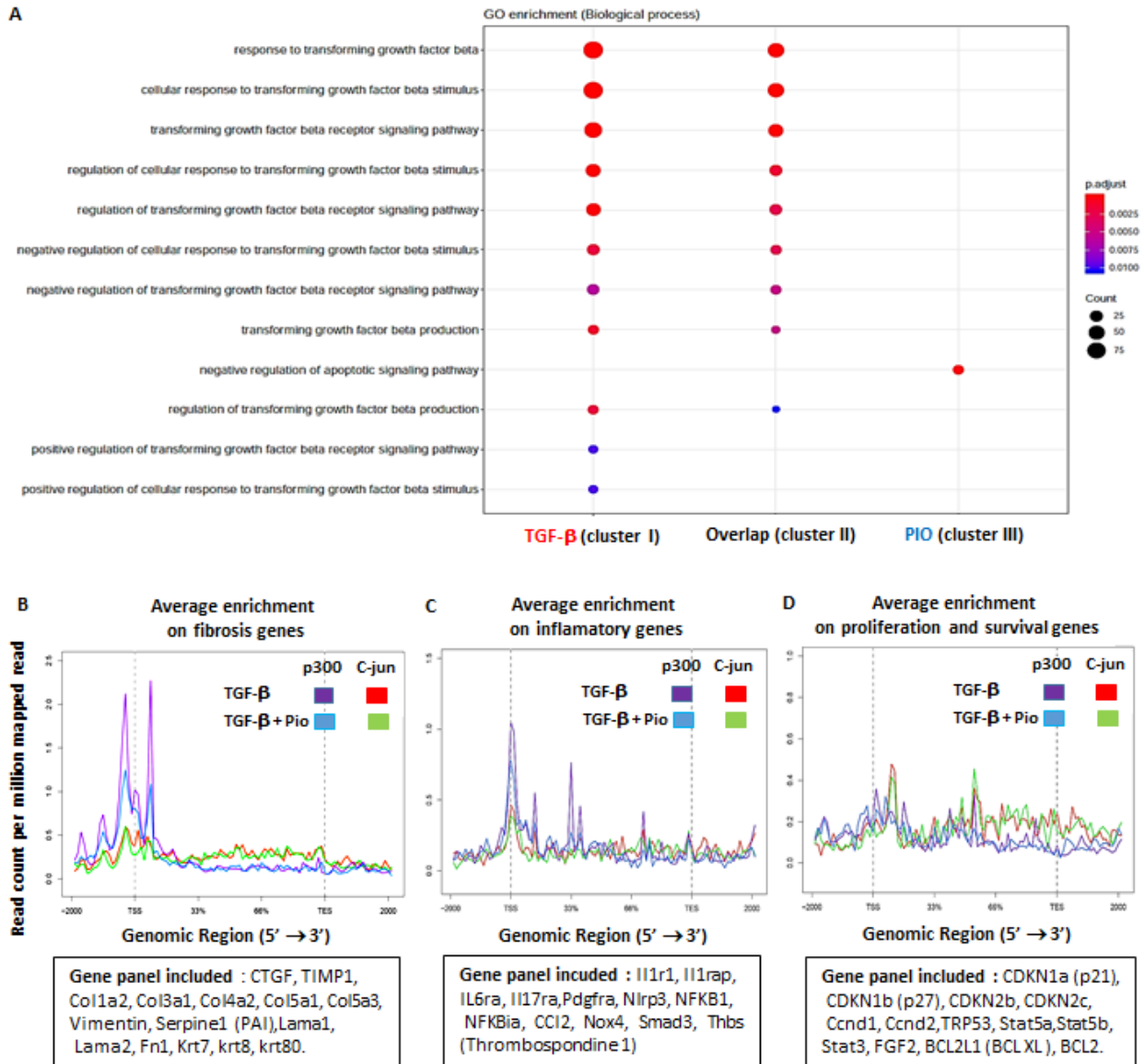


Supplemental Figure 4. PPAR- γ agonists decrease leukocytosis related to MF in all leukocyte subpopulations. Reduction in lymphocyte counts in the (Ai) MF TPO^{high} model, (Bi) PVJAK2V617F model, (Ci) MF post-JAK2V617F model, and (Di) MF post-CALRdel52 model. Reduction in granulocyte counts in the (Aii) MF TPO^{high} model, (Bii) PVJAK2V617F model, (Cii) MF post-JAK2V617F model, and (Dii) MF post-CALRdel52 model. Reduction in monocyte counts in the (Aiii) MF TPO^{high} model, (Biii) PVJAK2V617F model, (Ciii) MF post-JAK2V617F model, and (Diii) MF post-CALRdel52 model. The star denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$).

PV: Polycythemia Vera, MF: Myelofibrosis, TBI: total body irradiation, Gy: Gray, BMT: bone marrow transplantation, WT: wild type, W: week



Supplemental Figure 5. Repression of TGF- β 1 pro-fibrotic target gene expression by pioglitazone is not dependent on Smad phosphorylation. Pioglitazone counteracts the induction of transcription of collagen a1 and fibronectin genes by TGF- β 1 in MS5 BM stromal cells (Ai and Aii), and HS5 BM stromal cells (Bi and Bii). Transcriptional induction of the PPAR- γ target gene, perilipin 2, with pioglitazone is not counteracted by TGF- β 1 in MS5 BM stromal cells Aiii) or HS5 BM stromal cells Biii). The antagonist effect of pioglitazone on the induction of fibrotic-genes by TGF- β 1 is not dependent on Smad2/3 phosphorylation in MS5 BM stromal cells Aiiii) or HS5 BM stromal cells Biiii). The star denotes a statistically significant difference ($p < 0.05$). COL-a1: collagen1a1, Pio: pioglitazone, SB: SB431542 (inhibitor of TGF- β 1 receptor)



Supplemental Figure 6. Additional results of ChIP-seq performed on MS5 BM stromal cells stimulated by TGF- β 1, with or without pioglitazone. A) GO enrichment analysis of the three clusters of genes with the anti-p300 Ab. The size of the circle represents the number of peaks and the color the adjusted p-value. Pioglitazone reduces TGF- β production and TGF- β signaling pathways. Analysis of the average enrichment after ChIP with anti-p300 or anti c-Jun Abs on a panel of genes involved in B) fibrosis, C) inflammation, or D) proliferation and survival. ChIP with anti-p300 Ab shows that the addition of pioglitazone (in blue) decreases the average enrichment in fibrosis-related genes and, to a lesser extent, inflammation-related genes relative to TGF- β 1 alone (in purple). Pioglitazone has no effect on proliferation- and survival-related genes. ChIP with anti-c-jun Ab shows no difference between TGF- β 1 alone (in red) and TGF- β 1 + pioglitazone (in green) stimulation on fibrosis-, inflammation-, or proliferation/survival-related genes..

GO: gene ontology, Pio: pioglitazone, Ab: antibody, TSS: transcription start site, TES: transcription end site

Human Primers			
Gene	Protein	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
<i>CCN2</i>	Connective tissue growth factor	CGA GGA GTG GGT GTG TGA C	CAG GCA GTT GGC TCT AAT CAT AG
<i>COL1A1</i>	Collagen type 1 $\alpha 1$	GGC AAA GAA GGC GGC AAA G	GCA CCA GCA GGA CCA TCA G
<i>FN1</i>	Fibronectin 1	AGA CCA GCA GAG GCA TAA GG	ACT CAT CTC CAA CGG CAT AAT G
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectin	GCC TAC CAC ATC ACA GTC TAT ATG	AGT CCA TTA CGC TCT CCT TCC
<i>PUN2</i>	Adipophilin	TGC TGT GAC GAC TAC TGT GAC TG	GAC TGT GTT AAT GCT GCC ACT GAC
<i>LAMA1</i>	Laminin $\alpha 1$	AAG GAG TCG GAA GCG GAA G	CTG AAG CGG AGA CAC TGA ATC
<i>PAI 1</i>	Plasminogen Activator Inhibitor 1	GGC TGG TGC TGG TGA ATG	GGC GTG GTG AAC TCA GTA TAG
<i>EP300</i>	Histone Acetyltransferase P300	GAC ACC TAC ACC ACC AAC AAC	AGA GCG TGC TGT GCT CTG
<i>TGFβ1</i>	Transforming Growth Factor $\beta 1$	GGA CAT CAA CGG GTT CAC TAC	GCA CGC AGC AGT TCT TCT C
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	TGC TCC AAT GCC ACA GTT C	ATC GGT TGT TGA GGC TAT CG
<i>TIMP1</i>	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1	TGT TGT TGC TGT GGC TGA TAG	ACG CTG GTA TAA GGT GGT CTG
<i>FOS</i>	Fos Proto-Oncogene	GGC AAG GTG GAA CAG TTA TCT C	CTT CAG CAG GTT GGC AAT CTC
<i>JUN</i>	Jun Proto-Oncogene	CGA GAG CGG ACC TTA TGG	CGT TGC TGG ACT GGA TTA TC
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GTA TCG TGG AAG GAC TCA TGA CC	GTT CAG CTC AGG GAT GAC CTT
Murine Primers			
Gene	Protein	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
<i>Ccn2</i>	Connective tissue growth factor	AGG ACC GCA CAG CAG TTG	GCA GTT GGC TCG CAT CAT AG
<i>Col1a1</i>	Collagen type 1 $\alpha 1$	CAG TGG CGG TTA TGA CTT CAG	GGC TGC GGA TGT TCT CAA TC
<i>Fn1</i>	Fibronectin 1	AGT CAG TGT CTC CAG TGT CTA C	CAG AAT GCT CGG CGT GAT G
<i>Adipoq</i>	Adiponectin	GCT CTC CTG TTC CTC TTA ATC	TGC CAT CTC TGC CAT CAC
<i>Plin2</i>	Perilipin 2	GTG CCA GAG GTG CCG	AAC TGT ATT GAT GCT GCC ATT GAC
<i>Lama1</i>	Laminin $\alpha 1$	CGT GGA TGG CGT CAA GTT C	TTC GTT GTC TGC TCT GTA AGT G
<i>Pal1</i>	Plasminogen Activator Inhibitor 1	CTC CTC ATC CTG CCT AAG TTC	GTC CCG CTC TCG TTT ACC
<i>Ep300</i>	Histone Acetyltransferase P300	AAC CAC CAC CAG CAA CAG	CAG AAG GAG CAG CAG GAA G
<i>Tgfb1</i>	Transforming Growth Factor $\beta 1$	AGC AAC AAT TCC TGG CGT TAC	GTA TTC CGT CTC CTT GGT TCA G
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	CAT CTT CCT GGC TTC CTT GAG	TCC TCC ACT GAC ACC ACT TG
<i>Timp1</i>	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1	ATC TCT GGC ATC TGG CAT CC	ACG CTG GTA TAA GGT GGT CTC
<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma proto-oncogene	CCG ATG ACC TTG GCT TCC	CGT TGC TGA TGC TCT TGA C
<i>Jun</i>	Jun proto-oncogene	GCC AAG AAC TCG GAC CTT C	GTC GGT GTA GTG GTG ATG TG
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GCA TTG TGG AAG GGC TCA TGA CC	GTT CAG CTC TGG GAT GAC CTT G
<i>Il15</i>	Interleukin 15	TTT GGG CTG TGT CAG TGT AGG	ATT CCA GGA GAA AGC AGT TCA TTG
<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	CTC CAG GCG GTG CCT ATG T	GA GAG CGT GGT GGC CC
<i>Ifng</i>	Interferon γ	CTC AAG TGG CAT AGA TGT GGA AG	AGG TGT GAT TCA ATG ACG CTT ATG
<i>Il1b</i>	Interleukin 1 β	GCA GCA GCA CAT CAA CAA GAG	CAC CAG CAG CAG GTT ATC ATC ATC
<i>Il5</i>	Interleukin 5	CGC TCA CCG AGC TCT GTT G	CCA ATG CAT AGC TGG TGA TTT TT
<i>Nfkb1</i>	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cell	ACG ACA GAA TCC TCA GCA TCC	CCA CCA GCA GCA GCA GAC
<i>Nfkb1a</i>	NF- κ B inhibitor α	TGA CCT GGT TTC GCT CTT GTT G	GCT CTC CTC ATC CTC GCT CTC
<i>Il1ra</i>	Interleukin 1 receptor antagonist	TGT CTT GTG CCA AGT CTG GAG ATG	GAC GGT CAG CCT CTA GTG TTG TG
<i>Il12b</i>	Interleukin 12b	CTC AGG ATC GCT ATT ACA ATT CCT C	TTC CAA CGT TGC ATC CTA GGA TC
<i>Il6</i>	Interleukin 6	AGA GGA GAC TTC ACA GAG GAT ACC	CAT TTC CAC GAT TTC CCA GAG AAC

Supplemental material 1: Human and murine qPCR primers.

Sample	Ab Target	Ab Vendor	Ab Cat No.	Ab Lot No.	Ab Volume	Chromatin amount
TGF- β 1	c-Jun	Santa Cruz	sc-1694	A2413	20 μ L	30 μ g
TGF- β 1 + Pioglitazone	c-Jun	Santa Cruz	sc-1694	A2413	20 μ L	30 μ g
TGF- β 1	p300	Santa Cruz	sc-585	B0211	20 μ L	30 μ g
TGF- β 1 + Pioglitazone	p300	Santa Cruz	sc-585	B0211	20 μ L	30 μ g

Supplemental material 2: CHIP, reaction data and technical details.

7.2 Annexe 2 : Référence des anticorps couplés aux fluorochromes

Anticorps anti-souris				
Cible	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
CD45	PerCP	30-F11	BD pharmingen	557235
CD45.1	PE	A20	BD pharmingen	561872
CD45.2	APC	104	BD pharmingen	561875
CD34	AlexaFluor®700	RAM34	BD pharmingen	560518
Sca.1 (Ly-6A/E)	PE-Cy™7	D7	BD pharmingen	558162
CD117 (Kit)	PE	ACK45	BD pharmingen	553869

Anticorps anti-humain				
Cible	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
CD45	PerCP	2D1	BD pharmingen	345809
CD34	APC	581	BD pharmingen	555824
Annexin V	APC	-	BD pharmingen	550474

Tableau 7 : Référence des anticorps couplés aux fluorochromes.

PerCP: peridinin chlorophyll protein complex. PE: phycoerythrin. APC: allophycocyanin. Cy=cyanin.

7.3 Annexe 3 : Séquence des amorces utilisées en RT-qPCR

Amorces humaines			
Gène	Protéine	Amorce sens 5'-3'	Amorce anti-sens 5'-3'
<i>CCN2</i>	CTGF	CGA GGA GTG GGT GTG TGA C	CAG GCA GTT GGC TCT AAT CAT AG
<i>COL1A1</i>	Collagène type 1 α 1	GGC AAA GAA GGC GGC AAA G	GCA CCA GCA GGA CCA TCA G
<i>FN1</i>	Fibronectine 1	AGA CCA GCA GAG GCA TAA GG	ACT CAT CTC CAA CGG CAT AAT G
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectine	GCC TAC CAC ATC ACA GTC TAT ATG	AGT CCA TTA CGC TCT CCT TCC
<i>PLIN2</i>	Adipophiline	TGC TGT GAC GAC TAC TGT GAC TG	GAC TGT GTT AAT GCT GCC ACT GAC
<i>LAMA1</i>	Laminine α 1	AAG GAG TCG GAA GCG GAA G	CTG AAG CGG AGA CAC TGA ATC
<i>PAI 1</i>	Plasminogen Activator Inhibitor 1	GGC TGG TGC TGG TGA ATG	GGC GTG GTG AAC TCA GTA TAG
<i>EP300</i>	Histone Acétyltransferase P300	GAC ACC TAC ACC ACC AAC AAC	AGA GCG TGC TGT GCT CTG
<i>TGFB1</i>	Transforming Growth Factor β 1	GGA CAT CAA CGG GTT CAC TAC	GCA CGC AGC AGT TCT TCT C
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	TGC TCC AAT GCC ACA GTT C	ATC GGT TGT TGA GGC TAT CG
<i>TIMP1</i>	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1	TGT TGT TGC TGT GGC TGA TAG	ACG CTG GTA TAA GGT GGT CTG
<i>FOS</i>	Fos Proto-Oncogene	GGC AAG GTG GAA CAG TTA TCT C	CTT CAG CAG GTT GGC AAT CTC
<i>JUN</i>	Jun Proto-Oncogene	CGA GAG CGG ACC TTA TGG	CGT TGC TGG ACT GGA TTA TC
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GTA TCG TGG AAG GAC TCA TGA CC	GTT CAG CTC AGG GAT GAC CTT
Amorces murines			
Gène	Protéine	Amorce sens 5'-3'	Amorce anti-sens 5'-3'
<i>Ccn2</i>	Ctgf	AGG ACC GCA CAG CAG TTG	GCA GTT GGC TCG CAT CAT AG
<i>Col1a1</i>	Collagène type 1 α 1	CAG TGG CGG TTA TGA CTT CAG	GGC TGC GGA TGT TCT CAA TC
<i>Fn1</i>	Fibronectine	AGT CAG TGT CTC CAG TGT CTA C	CAG AAT GCT CGG CGT GAT G
<i>Adipoq</i>	Adiponectine	GCT CTC CTG TTC CTC TTA ATC	TGC CAT CTC TGC CAT CAC
<i>Plin2</i>	Perilipine 2	GTG CCA GAG GTG CCG	AAC TGT ATT GAT GCT GCC ATT GAC
<i>Lama1</i>	Laminine α 1	CGT GGA TGG CGT CAA GTT C	TTC GTT GTC TGC TCT GTA AGT G
<i>Pai1</i>	Plasminogen Activator Inhibitor 1	CTC CTC ATC CTG CCT AAG TTC	GTC CCG CTC TCG TTT ACC
<i>Ep300</i>	Histone Acétyltransferase P300	AAC CAC CAC CAG CAA CAG	CAG AAG GAG CAG CAG GAA G
<i>Tgfb1</i>	Transforming Growth Factor β 1	AGC AAC AAT TCC TGG CGT TAC	GTA TTC CGT CTC CTT GGT TCA G
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	CAT CTT CCT GGC TTC CTT GAG	TCC TCC ACT GAC ACC ACT TG
<i>Timp1</i>	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases 1	ATC TCT GGC ATC TGG CAT CC	ACG CTG GTA TAA GGT GGT CTC
<i>Fos</i>	FBJ osteosarcoma proto-oncogene	CCG ATG ACC TTG GCT TCC	CGT TGC TGA TGC TCT TGA C
<i>Jun</i>	Jun proto-oncogene	GCC AAG AAC TCG GAC CTT C	GTC GGT GTA GTG GTG ATG TG
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GCA TTG TGG AAG GGC TCA TGA CC	GTT CAG CTC TGG GAT GAC CTT G
<i>Il15</i>	Interleukine 15	TTT GGG CTG TGT CAG TGT AGG	ATT CCA GGA GAA AGC AGT TCA TTG
<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	CTC CAG GCG GTG CCT ATG T	GA GAG CGT GGT GGC CC
<i>Ifng</i>	Interferon γ	CTC AAG TGG CAT AGA TGT GGA AG	AGG TGT GAT TCA ATG ACG CTT ATG
<i>Il1b</i>	Interleukine 1 β	GCA GCA GCA CAT CAA CAA GAG	CAC CAG CAG CAG GTT ATC ATC ATC ATC
<i>Il5</i>	Interleukine 5	CGC TCA CCG AGC TCT GTT G	CCA ATG CAT AGC TGG TGA TTT TT

Tableau 8 : Séquence des amorces humaines et murines utilisées en RT-qPCR.

Titre : Potentiel thérapeutique de l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ dans la myélofibrose

Mots clés : myélofibrose, PPAR γ , TGF- β 1, néoplasmes myéloprolifératifs, p300

Résumé : La myélofibrose primitive (MFP) est un néoplasme myéloprolifératif (NMP) classique BCR-ABL négatif associé à une forte altération de la qualité de vie et à une augmentation de la mortalité. Les traitements conventionnels réduisent les symptômes mais ont peu d'effet sur l'histoire naturelle de la maladie. La MFP résulte d'interactions complexes entre le développement du clone hématopoïétique malin, l'installation d'un contexte inflammatoire et le remodelage du microenvironnement médullaire. Chacun de ces axes est une cible thérapeutique potentielle. Dans ce travail, nous avons évalué le potentiel thérapeutique de l'activation de PPAR γ dans trois modèles murins de myélofibrose et nous montrons que les ligands de PPAR γ permettent d'améliorer les paramètres hématologiques et histologiques en rapport avec l'installation du phénotype de myélofibrose. Chacun des axes de la physiopathologie a ensuite été exploré.

Les ligands de PPAR γ ont une action anti-proliférative sur le clone malin, tant dans les modèles murins de NMPs que dans les cellules JAK2V617F de lignée et dans les progéniteurs hématopoïétiques issus de patients atteints de NMPs. Le traitement atténue également l'hyperleucocytose associée au phénotype inflammatoire des NMPs et modifie la transcription de gènes de l'inflammation. Enfin, les ligands de PPAR γ ont un effet protecteur sur le stroma médullaire, dépendant de la capacité de PPAR γ à contrecarrer la voie de signalisation du TGF- β 1, cytokine majeure du développement de la fibrose médullaire, par déplacement du cofacteur de transcription p300 de la voie du TGF- β 1 vers la voie PPAR γ . Par son action sur les trois composantes de la physiopathologie, l'activation de PPAR γ constitue une cible thérapeutique pertinente dans la prise en charge de la MFP.

Title : Therapeutic potential of activation of the nuclear receptor PPAR γ in myelofibrosis

Keywords : myelofibrosis, PPAR γ , TGF- β 1, myeloproliferative neoplasms, p300

Abstract: Primary myelofibrosis (PMF) is a non BCR-ABL myeloproliferative neoplasm (MPN) associated with poor quality of life and reduced survival. Current treatments are mainly symptomatic and have little effect on the natural history of the disease. PMF results from complex interactions between the emergence of a hematopoietic malignant clone, an inflammatory context and the remodeling of the bone marrow (BM) microenvironment. Each of these axes is a potential therapeutic target. Here, we evaluated the therapeutic potential of PPAR γ ligands in three murine models of myelofibrosis and we showed that PPAR γ ligands improve hematological and histological changes related to myelofibrosis phenotype. Then, we explored each axis of the pathophysiology.

We showed that PPAR γ ligands have an anti-proliferative effect and limit the proliferation of the malignant clone in murine models of MPNs, in JAK2V617F cell lines and in hematopoietic progenitors from MPNs patients. PPAR γ ligands also decrease leukocytosis related to the inflammatory phenotype of MPNs and modify the transcription of inflammatory genes. Finally, we demonstrated that PPAR γ ligands have a protective effect on BM stroma. They counteract the signaling pathway of TGF- β 1, a major cytokine in BM fibrosis development, by moving the p300 cofactor of transcription from the TGF- β 1 pathway to the PPAR γ pathway. By its action on the three components of the pathophysiology, activation of PPAR γ pathway is a relevant therapeutic target in PMF.