



HAL
open science

Perspectives thérapeutiques de la modulation de PPAR-gamma dans les leucémies aiguës myéloïdes

Jaja Zhu

► **To cite this version:**

Jaja Zhu. Perspectives thérapeutiques de la modulation de PPAR-gamma dans les leucémies aiguës myéloïdes. Cancer. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL114 . tel-04799500

HAL Id: tel-04799500

<https://theses.hal.science/tel-04799500v1>

Submitted on 23 Nov 2024

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.

Perspectives thérapeutiques de la modulation de la voie de PPAR- γ dans les leucémies aiguës myéloïdes

Therapeutic perspectives of PPAR- γ modulation in acute myeloid leukemia

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582
Cancérologie, Biologie – Médecine - Santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Sciences du cancer
Graduate School : Sciences de la vie et santé.
Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Immunologie des maladies
virales, auto-immunes, hématologiques et bactériennes**
(Université Paris-Saclay, INSERM UMR 1184, CEA)
sous la direction du **Professeur Valérie BARDET**, PU-PH
le co-encadrement du **Docteur Sylvain CLAUSER**, MCU-PH

Thèse soutenue à Fontenay-aux-Roses, le 22 novembre 2023, par

Jaja ZHU

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

| | |
|---|------------------------------|
| Monsieur le Professeur Philippe ROUSSELOT PU-PH, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines | Président du Jury |
| Monsieur le Professeur Thorsten BRAUN PU-PH, Université Sorbonne Paris Nord | Rapporteur & Examineur |
| Madame la Professeure Oriane WAGNER-BALLON PU-PH, Université Paris-Est Créteil | Rapporteur & Examinatrice |
| Madame la Professeure Hélène LAPILLONNE PU-PH, Sorbonne Université | Examinatrice |

RESUME

Titre : Perspectives thérapeutiques de la modulation de la voie de PPAR- γ dans les leucémies aiguës myéloïdes

Mots clés : leucémie aiguë myéloïde, PPAR-gamma, cellules souches leucémiques, Gas6, AXL

Résumé : La leucémie aiguë myéloïde (LAM) représente la forme la plus fréquente de leucémie aiguë chez l'adulte. Le pronostic global des LAM reste souvent médiocre en raison de la fréquence élevée des rechutes, causées par la persistance des cellules souches leucémiques (CSL) peu ou insensibles à la chimiothérapie conventionnelle. L'activation de PPAR- γ implique la diminution transcriptionnelle de STAT5A/B, deux facteurs de transcription essentiels à la maintenance des CSL. Cette modulation du niveau de STAT5 constitue un mécanisme d'action potentiel des agonistes de PPAR- γ dans les LAM, car la voie STAT5 est activée de manière constitutive dans 70% des cas et associée à un pronostic péjoratif ainsi qu'à une survie globale médiocre. La pioglitazone, agoniste de PPAR- γ présente un profil de toxicité bien établi après des années d'utilisation en clinique comme anti-diabétique, faisant de ce dernier un candidat de choix pour envisager un repositionnement thérapeutique. Nous avons confirmé le potentiel thérapeutique de la pioglitazone en monothérapie, celle-ci exerce *in vitro* un effet antiprolifératif sur les lignées de LAM et les cellules primaires de patients en culture liquide à court terme et en test clonogénique. Ces résultats n'ayant pas pu être confirmés *in vivo* dans des modèles murins de xénogreffe de cellules primaires, nous avons démembré un mécanisme de résistance *in vivo* aux agonistes de PPAR- γ médié par le microenvironnement médullaire. Ce mécanisme passe par la suractivation de l'axe Gas6/AXL sous l'action de la pioglitazone. AXL est un récepteur à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs TAM (TYRO-3, AXL, MER) dont la liaison à son ligand Gas6 recrute un certain nombre de voies de signalisation en aval, impliquées dans la prolifération et la survie. L'association avec un inhibiteur spécifique d'AXL, le bemcentinib, a permis de restaurer l'effet anti-leucémique de la pioglitazone *in vitro* sur un système de co-culture sur cellules stromales MS-5, mimant l'effet du microenvironnement. Outre cet effet antiprolifératif, l'activation de PPAR- γ possède également des propriétés anti-inflammatoires, anti-fibrotiques ainsi que de modulation du phénotype MDR (*Multidrug resistance*) qui pourraient bénéficier aux patients atteints de LAM. Dans ce contexte, nous avons pu mettre en évidence sur une cohorte de 53 patients atteints de LAM au diagnostic, la dérégulation d'un ensemble de cytokines et facteurs de croissance, caractérisée en particulier par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, S100A8/A9 et TNF- α) justifiant le rationnel à utiliser la pioglitazone dans les LAM. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité de modulation de la pompe d'efflux glycoprotéine-P (phénotype MDR) par les ligands de PPAR- γ aux doses thérapeutiques.

L'ensemble de ces résultats est en cours d'évaluation dans un modèle *in vivo* de xénogreffe de cellules primaires dans des souris NOD/SCID/IL2R γ -/-, ces modèles murins permettront de confirmer le potentiel thérapeutique de la combinaison pioglitazone + inhibiteur d'AXL à cibler et éliminer les CSL au sein de leur microenvironnement, tout en évaluant le rôle régulateur de PPAR- γ sur l'inflammation et la fibrose.

Title : Therapeutic perspectives of PPAR- γ modulation in acute myeloid leukemia

Keywords : acute myeloid leukemia, PPAR- γ , leukemic stem cells, Gas6, AXL

Abstract : Acute myeloid leukemia (AML) is the most common type of acute leukemia in adults. The overall prognosis of AML remains generally poor due to the high rate of relapse, often due to the persistence of leukemic stem cells (LSC) which are unresponsive or insensitive to conventional chemotherapy. Activation of PPAR- γ involves transcriptional downregulation of STAT5A/B, two essential transcription factors for LSC maintenance. This modulation of STAT5 levels is a potential mechanism of action for PPAR- γ agonists in AML, as the STAT5 pathway is constitutively activated in 70% of cases and associated with poor prognosis and shortened overall survival. The PPAR- γ agonist pioglitazone has a well-established safety profile after years of clinical use as an antidiabetic drug, making it a promising candidate for therapeutic repositioning. Our study confirms the therapeutic potential of pioglitazone as a monotherapy, exerting an antiproliferative effect on AML cell lines and primary patient cells *in vitro* in short-term liquid culture and in clonogenic assays. We have unraveled an *in vivo* resistance mechanism to PPAR- γ agonists mediated by the bone marrow microenvironment which involved overactivation of the Gas6/AXL axis under the influence of pioglitazone. AXL is a tyrosine kinase receptor of the TAM receptor family (TYRO-3, AXL, MER) whose binding to its Gas6 ligand recruits several downstream signaling pathways involved in leukemia cell proliferation and survival.

Combination with the specific AXL inhibitor bemcentinib, restores pioglitazone efficacy *in vitro*, in a co-culture system with MS-5 stromal cells, mimicking the effect of the microenvironment. In addition to this antiproliferative effect, PPAR- γ activation also implies anti-inflammatory and anti-fibrotic properties, as well as modulation of the MDR (Multidrug resistance) phenotype, which could be beneficial to AML patients. In this study, we analyzed a cohort of 53 patients with AML at diagnosis and found a deregulation of numerous of cytokines and growth factors. Specifically, we observed an increase in pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, S100A8/A9 et TNF- α), supporting the rationale of using pioglitazone in the treatment of AML. However, we were unable to demonstrate any modulation of the P-glycoprotein efflux pump by PPAR- γ ligands at therapeutic doses. All these findings are currently being evaluated in an *in vivo* primary cell xenograft model using NOD/SCID/IL2R- γ -/- mice. These murine models will confirm the therapeutic potential of the pioglitazone + AXL inhibitor combination, targeting and eliminating LSC within their microenvironment, and further explore the regulatory role of PPAR- γ on inflammation and fibrosis.

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer toute ma gratitude et mon respect à l'égard des membres du jury qui ont accepté d'y participer avec une grande spontanéité. Je tiens donc à adresser mes sincères remerciements à chacun d'entre vous pour l'honneur que vous me faites en jugeant ce travail.

Monsieur le Professeur Thorsten BRAUN, Madame la Professeure Oriane WAGNER-BALLON, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et de ma haute considération.

Madame la Professeure Hélène LAPILLONNE, Monsieur le Professeur Philippe ROUSSELOT, je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse. Soyez convaincus de ma sincère considération.

Merci à **Madame la Professeure Valérie BARDET** pour m'avoir bien sûr encadrée durant ce travail, mais surtout pour tout ce que tu m'as appris, bien delà de ces années de thèse. Je n'aurais jamais imaginé être capable de m'engager dans cette aventure mais je ne pouvais rêver mieux que de t'avoir en tant que directrice et de pouvoir bénéficier de tes qualités, tant scientifiques qu'humaines. Ton énergie positive et ta rigueur ont été des piliers essentiels durant ces années et continueront d'être une source d'inspiration. Tu sais tout le respect et l'admiration que je te porte. Aucun mot ne suffit à exprimer l'ampleur de ma gratitude. En espérant être à la hauteur de ton enseignement.

Merci au Dr **Sylvain CLAUSER** d'avoir accepté de co-encadrer ce travail, une mission qui, sans doute, n'a pas dû être facile mais qui a été menée à terme avec succès.

À tous les membres de mon comité de suivi de thèse,

Merci au **Dr Thomas BOYER**, au **Dr Virginie PENARD-LACRONIQUE**, au **Dr Françoise PFLUMIO** et au **Pr Philippe ROUSSELOT** d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse. Un grand merci pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues et vos précieux conseils en toute bienveillance.

À tous les membres de l'unité IMVA-HB,

Merci au Dr Roger LEGRAND et au Dr Emmanuel PAYEN de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Merci au Dr Stéphane PROST pour ta disponibilité, ta gentillesse et surtout tes qualités scientifiques. C'est une grande chance que d'avoir pu travailler à tes côtés.

Merci à Julien Calvo, pour tous tes conseils et ton aide si précieuse, en particulier avec les souris ! L'équipe s'est vraiment enrichie d'un maillon fort grâce à tes compétences scientifiques, sans oublier ta remarquable gentillesse.

Merci à Maèva, pour toutes ces moments de convivialité (toujours en restant productif bien sûr...), notamment durant ces longs moments de solitude dans le L2. Merci également pour ton aide et ton soutien, nous fêterons bientôt tout ça, je l'espère.

Merci à Camille, Karine, Olivier, Zahra pour vos toutes les discussions scientifiques (ou pas) en toute circonstance, que ce soit en réunion ou dans un coin de couloir. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés.

À toutes les personnes impliquées dans ce projet,

Sans qui bien sûr, ce travail n'aurait pas été possible.

Merci à Laëtitia d'avoir initié les bases de ce projet, à Anne-Margaux et Hippolyte de m'avoir aidée sur de nombreuses expériences. En hommage à tous nos Western blots ratés :)'

Merci à tous les cliniciens du service d'Hématologie clinique du Centre Hospitalier André Mignot pour les échantillons de cellules primaires, en particulier à Philippe, Juliette et Miléna qui pensent toujours à leur collègues biologistes, malgré leur emploi du temps bien chargé (et même pendant la cyberattaque).

Merci au Dr Françoise PFLUMIO, sans qui nous n'aurions pu mener de modèles murins et que je remercie également pour son expertise et ses précieux conseils. Merci également aux membres d'Animalliance, Caroline, Charlotte et Vilma pour leur aide et accompagnement avec les souris.

Merci au conseil scientifique du groupe ALFA, qui a répondu favorablement au projet et particulièrement au Pr Raphaël Itzykson et au Dr Nicolas Duployez.

Merci à tous les membres de la plateforme du département IDMIT, en particulier pour leur aide technique sur le Bio-Plex ou encore le Chemidoc.

À toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien,

Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes formidables qui ont croisé mon chemin et qui, par leur enseignement, leur aide, leur conseil ou simplement leur présence, m'ont permis d'être, je l'espère, une meilleure personne.

Merci en premier lieu à ma famille, et en particulier à ma mère pour son soutien indéfectible.

Merci à mon grand frère, qui a toujours été présent en toutes circonstances, car tu as toujours été un modèle pour moi.

Merci à Yilin, tu es véritablement une sœur pour moi.

Merci à Tatiana, en souvenir de tous ces bons moments depuis notre tendre enfance.

Merci à la formidable équipe de biologistes et de techniciens d'Ambroise-Paré (je ne préfère pas vous citer, mon amnésie risque de me jouer des tours !), c'est une immense chance que de travailler à vos côtés, ce que j'espère continuer le plus longtemps possible.

Merci à Élise d'avoir supporté un boulet, surtout ces derniers mois ! J'ai toujours été impressionnée par ta motivation inébranlable et ton dynamisme qui forcent le respect. Ton avenir est radieux, je suis ravie et honorée que tu viennes travailler à nos côtés. Je suis impatiente de voir tout ce que nous pourrons accomplir ensemble.

Merci à Riri (a.k.a. le caïd du 75) pour ton immense soutien. J'aurais sans doute perdu le fil plus d'une fois si tu n'avais pas été là. Tu as toujours su trouver les bons mots, toujours armé de ta légendaire clairvoyance. À nous le 猪 !

Enfin, une grande pensée à mes amis de toutes époques, que je ne pourrai bien sûr tous citer, mais je ne cesse de penser à tous ces moments qui nous lient à jamais : Stéphanie, Myriam, Laura, Aude, Adélie, Jonas, Mélanie, Manavy, Julie, Christelle, Serri, Melek, Dora, Maud, Rémi, Matthieu, Christophe, Vincent, Quentin... Bisous à tous !

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Résumé | 2 |
| Remerciements | 4 |
| Sommaire | 7 |
| Abréviations | 10 |
| Liste des figures | 15 |
| Liste des tableaux | 17 |
| Introduction | 18 |
| 1. Les leucémies aiguës myéloïdes | 18 |
| 1.1 Généralités sur les LAM | 18 |
| a) Épidémiologie | 18 |
| b) Étiologie des LAM..... | 19 |
| 1.2 De l'hématopoïèse à la leucémogénèse..... | 20 |
| a) Hématopoïèse physiologique..... | 20 |
| b) Niche hématopoïétique..... | 23 |
| c) Niche leucémique..... | 25 |
| d) Processus de leucémogénèse..... | 27 |
| e) Hématopoïèse pré-leucémique | 28 |
| f) Cellules souches leucémiques | 31 |
| 1.3 Démarche diagnostique | 35 |
| 1.4 Classification et pronostic | 37 |
| a) Classification FAB..... | 37 |
| b) Classification OMS 2022..... | 38 |
| c) Classification ICC 2022 | 41 |
| d) Facteurs pronostiques | 45 |
| e) Classification ELN..... | 47 |
| f) Impact pronostique de la maladie résiduelle..... | 49 |
| 1.5 Prise en charge thérapeutique..... | 52 |
| a) Traitement conventionnel | 52 |
| b) Traitement des LAM du sujet âgé ou « unfit »..... | 53 |
| c) Mécanismes de résistance | 58 |
| 2. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ | 62 |
| 2.1 Les récepteurs nucléaires PPAR..... | 62 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| a) | Généralités | 62 |
| b) | Distribution tissulaire..... | 62 |
| c) | Fonctions physiologiques | 63 |
| 2.2 | Le récepteur nucléaire PPAR- γ | 65 |
| a) | Structure et organisation de PPAR- γ | 66 |
| b) | Activation de PPAR- γ | 70 |
| 2.3 | Ligands de PPAR- γ | 74 |
| a) | Ligands naturels | 74 |
| b) | Ligands synthétiques..... | 75 |
| 2.4 | Rôles de PPAR- γ en physiologie et en pathologie | 80 |
| a) | Rôles dans l'adipogenèse..... | 80 |
| b) | Rôles dans l'homéostasie glucidique | 82 |
| c) | Rôles dans l'inflammation | 83 |
| d) | Rôles dans la fibrose | 89 |
| e) | Rôles dans l'hématopoïèse normale et pathologique | 92 |
| 3. | AXL | 101 |
| 3.1 | AXL, récepteur de la famille des TAM..... | 101 |
| a) | Généralités | 101 |
| b) | Distribution tissulaire..... | 103 |
| 3.2 | Structure et organisation d'AXL | 104 |
| a) | Structure protéique d'AXL | 104 |
| b) | Ligands naturels | 106 |
| c) | Activation d'AXL | 107 |
| d) | Régulation d'AXL..... | 110 |
| e) | Inhibiteurs d'AXL..... | 111 |
| 3.3 | Implications de l'axe Gas6/AXL en physiologie et en pathologie..... | 114 |
| a) | Rôle dans l'immunité innée et le contrôle de l'inflammation..... | 114 |
| b) | Rôles dans l'hématopoïèse..... | 115 |
| c) | Implications dans les LAM..... | 116 |
| d) | Rôles dans la résistance au traitement..... | 118 |
| e) | Rôles dans le microenvironnement | 119 |
| | Objectifs du travail | 121 |
| | Résultats..... | 123 |
| | Partie 1 : Le bemcentinib, un inhibiteur d'AXL restaure l'activité anti-leucémique de pioglitazone : un mécanisme de résistance médié par le microenvironnement médullaire..... | 123 |

| | |
|--|------------|
| Partie 2 : PPAR-γ dans les LAM : échappement thérapeutique, inflammation, fibrose, vers une cible thérapeutique potentielle ? | 170 |
| Discussion générale..... | 196 |
| Conclusion et perspectives..... | 206 |
| Annexe..... | 208 |
| Annexe 1 : Validation de STAT5 comme cible thérapeutique dans les LAM | 208 |
| Annexe 2 : Expression d'AXL dans les lignées de LAM | 213 |
| Bibliographie | 214 |

ABREVIATIONS

15d-PGJ2 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandine J2

A

AA Acide arachidonique
ABC *ATP Binding Cassette*
ADN Acide désoxyribonucléique
AF-1 *Activating fonction-1*
AINS Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AML1/ETO *Acute Myeloid Leukemia 1–Eight-Twenty-One*
AML-MRC *Acute Myeloid Leukemia-Myelodysplasia related changes*
AML-pCT *Acute Myeloid Leukemia-Post cytotoxic therapy*
Ang Angiopoïétine
AP-1 *Activator protein-1*
APS *AML Prognostic Score*
ARNm Acide ribonucléique messenger
ASXL1 Additional Sex Combs-Like 1
ATP Adénosine triphosphate

B

BCL2 *B-Cell Lymphoma 2*
BMPR2 *Bone morphogenetic protein receptor 2*
bZIP *Basic leucine zipper*

C

CAP *c-Cbl associated protein*
CALR Calréticuline
CAR *CXCL12-Abundant Reticular*
CBF *Core binding factor*
Cbl *Casitas B-lineage lymphoma*
CBP *CREB Binding Protein*
CDK *Cyclin-dependent kinase*
C/EBP *CCAAT/enhancer binding protein*
CD *Cluster de différenciation*
CHIP *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential*
CMP *Common myeloid progenitor*
CLL-1 *Human C-type lectin-like molecule-1*
CLP *Common lymphoid progenitor*
COX Cyclo-oxygénase
CSH Cellules souches hématopoïétiques
CSM Cellules souches mésenchymateuses
CSL Cellules souches leucémiques

CXCL-12 *C-X-C Motif chemokine ligand 12*

D

DNMT3A *DNA methyl-transferase 3 alpha*

DC *Dendritic cell*

DRIP *Vitamin D Receptor Interacting Protein*

E

EGF *Epithelial growth factor*

EGFR *Epithelial growth factor receptor*

ELN *European Leukemia Net*

EMA *Agence Européenne du médicament*

EPHX1 *Époxide hydrolase 1*

EPO *Érythropoïétine*

ERK *Extracellular signal-regulated kinase*

F

FBP1 *Fructose-1,6-bisphosphatase 1*

FDA *Food and drug administration*

FGFR *Fibroblast growth factor receptor*

FGF *Fibroblast growth factor*

FLT3 *Fms like tyrosine kinase 3*

FLT3-ITD *Fms like tyrosine kinase 3- Internal tandem duplication*

FLT3-TKD *Fms-like Tyrosine kinase 3-Tyrosine kinase domain mutation*

G

GAS6 *Growth Arrest Specific 6*

GMP *Granulocyte/macrophage progenitor*

G-CSF *Granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF *Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor*

Grb2 *Growth factor receptor-bound protein 2*

GO *Gemtuzumab-ozogamicine*

H

HAT *Histone acétyltransférase*

HBEGF *Heparin-Binding EGF-like Growth Factor*

HDAC *Histone désacétylase*

HGF *Hepatocyte growth factor*

HMOX1 *Heme oxygénase-1*

HIF *Hypoxia inducible factor*

HRE *Hypoxia responsive element*

I

| | |
|-----------------------|--|
| IDH1 / IDH2 | Isocitrate deshydrogénase 1 / isocitrate deshydrogénase 2 |
| IFN | Interféron |
| I κ B α | <i>NF-κB inhibitor α</i> |
| IL | Interleukine |
| IL1-RA | Récepteur antagoniste de l'interleukine-1 |
| IL-RAP | <i>Interleukin 1 Receptor Accessory Protein</i> |
| IRS-1 | <i>Insulin Receptor Substrate 1</i> |
| ITK | Inhibiteur de tyrosine kinase |

J

| | |
|-----|-------------------------|
| JAK | Janus kinase |
| JNK | c-Jun N-terminal kinase |

K

| | |
|-------|-----------------------------|
| KMT2A | Lysine méthyltransférase 2A |
| KO | <i>Knock out</i> |

L

| | |
|------|---|
| LAL | Leucémie aiguë lymphoblastique |
| LAM | Leucémie aiguë myéloïde |
| LamG | Laminine G |
| LAP | Leucémie aiguë promyélocytaire |
| LDAC | <i>Low-dose cytarabine</i> |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> |
| LIC | Cellule initiateur de leucémie |
| LMC | Leucémie myéloïde chronique |
| LMMC | Leucémie myélomonocytaire chronique |
| LMPP | <i>Lymphoid-primed multipotent progenitor</i> |
| LOX | Lipoxygénase |
| LSC | Cellules souches leucémiques |

M

| | |
|------|--|
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MDR | <i>Multi drug resistance</i> |
| MEP | <i>Megakaryocytic-erythroid progenitor</i> |
| MICI | Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin |
| MPO | Myéloperoxydase |
| MRD | <i>Measurable Residual Disease</i> |
| MRP | <i>Multidrug Resistance Protein 1</i> |

N

| | |
|------|--------------------------------------|
| NASH | <i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> |
| NcoR | <i>Nuclear Receptor Corepressor</i> |

| | |
|----------------|--|
| NF- κ B | <i>Nuclear Factor κB</i> |
| NFAT | <i>Nuclear Factor of Activated T cells</i> |
| NFS | Numération formule sanguine |
| NK | <i>Natural killer</i> |
| NPM | Néoplasie myéloproliférative |
| NPM1 | Nucléophosmine |
| NPM1c | Nucléophosmine cytoplasmique |
| Nrf2 | <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor</i> |
| NSG | NOD/SCID/IL2Rg ^{-/-} |

O

| | |
|------|-----------------------------------|
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| OPN | Ostéopontine |
| ORL1 | <i>Oxidized LDL receptor 1</i> |

P

| | |
|--------|---|
| PARP | Poly(ADP-ribose) polymérase |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PDGFR | <i>Platelet-derived growth factor receptor</i> |
| PGC-1 | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator</i> |
| P-gp | Glycoprotéine P |
| PI3K | Phosphoinositide 3 kinase |
| PON | Paraoxonase |
| PPAR | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> |
| PPRE | <i>Peroxisome Proliferator Responsive Element</i> |
| PtdSer | Phosphatidylsérine |
| PTEN | <i>Phosphatase and tensin homolog</i> |

R

| | |
|--------|---|
| RAS | <i>Rat sarcoma</i> |
| RCH | Rectocolite hémorragique |
| RIP140 | <i>Receptor Interacting Protein 140</i> |
| ROS | Espèces réactives de l'oxygène |
| R/R | En rechute ou réfractaire |
| RTK | Récepteur à activité tyrosine kinase |
| RUNX1 | <i>RUNX family transcription factor 1</i> |
| RXR | Récepteur X des rétinoïdes |

S

| | |
|-------|--------------------------------------|
| SBB | Sudan Black B |
| SCF | <i>Stem cell factor</i> |
| SDF1 | <i>Stromal cell Derived Factor-1</i> |
| SF3B1 | <i>Splicing factor 3B subunit 1</i> |

| | |
|---------|--|
| SHGB | <i>Sex hormone-binding globulin</i> |
| SI | <i>Stain index</i> |
| SIV | <i>Simian immunodeficiency virus</i> |
| SMD | Syndrome myélodysplasique / Néoplasie myélodysplasique |
| SMP | Syndrome myéloprolifératif |
| SMRT | <i>Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor</i> |
| SOCS | <i>Suppressor of cytokine signaling</i> |
| SOD | Superoxyde dismutase |
| SPPARMs | <i>Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulators</i> |
| SRSF2 | <i>Serine and arginine rich splicing factor 2</i> |
| STAT | <i>Signal transducer and activator of transcription</i> |
| SUMO | <i>Small ubiquitin-like modifiers</i> |
| SVF | Sérum de veau foetal |
| SWI/SNF | <i>Switch/Sucrose Non-Fermentable</i> |

T

| | |
|----------------|---|
| TAM | TYRO3, AXL, MER |
| TBP | <i>TATA Binding Protein</i> |
| TCGA | <i>The Cancer Genome Atlas</i> |
| TEM | Transition épithélio-mésenchymateuse |
| TET2 | <i>Ten-Eleven-Translocation-2</i> |
| TGF- β 1 | <i>Transforming growth factor-β1</i> |
| Th | <i>T helper</i> |
| TIM-3 | <i>T-cell immunoglobulin mucin-3</i> |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TLR | <i>Toll-like Receptors</i> |
| TP53 | <i>Tumor Protein 53</i> |
| TPO | Thrombopoïétine |
| TRAP220 | <i>Thyroid hormone Receptor-Associated protein</i> |
| TZD | Thiazolidinedione |

U

| | |
|-------|--|
| U2AF1 | <i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i> |
| UPN | <i>Unique patient number</i> |

V

| | |
|------|--|
| VCAM | <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> |
| VHL | von Hippel-Lindau |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |

W

| | |
|-----|--|
| Wnt | <i>Wingless-related integration site</i> |
| WT | <i>Wild type</i> |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Taux d'incidence selon la classe d'âge en France en 2018 d'après Le Guyader-Peyrou et al. (1). | 19 |
| Figure 2 : Modèles de l'hématopoïèse physiologique d'après Rodrigues et al. (13)..... | 22 |
| Figure 3 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique et de la coopération entre niche endostéale et vasculaire, adapté d'après Lee et al. (23). | 24 |
| Figure 4 : Principales classes des gènes les plus fréquemment mutés dans les LAM. | 28 |
| Figure 5 : Modèle simplifié de leucémogénèse multi-étapes. | 30 |
| Figure 6 : Modèle d'organisation hiérarchique des cellules souches leucémiques dans la LAM | 32 |
| Figure 7 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de LAM selon la classification OMS 2022. .. | 41 |
| Figure 8 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de LAM selon la classification ICC 2022..... | 44 |
| Figure 9 : Survie nette des patients atteints de LAM selon l'âge et en fonction du temps depuis le diagnostic selon Monnereau et al. (96)..... | 46 |
| Figure 10 : Recommandations actuelles de l'ELN sur la réalisation de la maladie résiduelle dans les LAM (78). | 50 |
| Figure 11 : Algorithme d'évaluation de la MRD selon la technique et sa pertinence selon les points de suivi d'après les recommandations de l'ELN (78, 99). | 51 |
| Figure 12 : Évolution des traitements dans les LAM approuvés par la FDA (Food Drug Administration) d'après El Chaer et al. (117). | 54 |
| Figure 13 : Proposition d'algorithme décisionnel concernant le choix thérapeutique des LAM nouvellement diagnostiquées, en rechute ou réfractaire basé sur les caractéristiques du patient et de la LAM adapté d'après C. D. DiNardo et A. H. Wei (143). | 58 |
| Figure 14 : Mécanisme d'action de PPAR..... | 63 |
| Figure 15 : Rôles des PPAR dans le métabolisme glucido-lipidique d'après Hong et al. (187). | 64 |
| Figure 16 : Organisation du gène PPARG, transcription et traduction, adapté d'après Hernandez-Quiles et al.(188). | 65 |
| Figure 17 : Organisation et structure du récepteur PPAR- γ | 66 |
| Figure 18 : Domaines de liaison à l'ADN et de liaison au ligand de PPAR, adapté d'après Khorasanizadeh et al. (201). | 67 |
| Figure 19 : Structure du domaine de liaison au ligand..... | 68 |
| Figure 20 : Rôle de l'hélice H12 dans la modification conformationnelle de PPAR- γ après fixation de son ligand d'après Kojetin et Burris (207). | 69 |

| | |
|--|-----|
| Figure 21 : Communication allostérique interdomaine du complexe PPAR- γ -RXR d'après Ricci et al. (211). | 71 |
| Figure 22 : Exemple de co-régulateurs impliqués dans la différenciation adipocytaire d'après Koppen and Kalkhoven (216). | 73 |
| Figure 23 : Mécanisme d'activation de PPAR- γ d'après Aouali et al. (221). | 73 |
| Figure 24 : Principales voies de biosynthèse des ligands naturels de PPAR- γ modifié d'après Wang et al. (231). | 75 |
| Figure 25 : Structures des composés clés dans le développement des thiazolinediones (241, 242). | 77 |
| Figure 26 : L'activation de PPAR- γ induit une diminution transcriptionnelle de STAT5, d'après S.Prost et al. (346). | 95 |
| Figure 27 : Principaux mécanismes anti-leucémiques de l'activation de la voie de PPAR- γ d'après Ryu et al. (248). | 98 |
| Figure 28 : Représentation schématique des 20 familles de RTKs selon leur caractéristiques structurales d'après M. A. Lemmon and J. Schlessinger (380). | 102 |
| Figure 29 : Expression d'AXL (en transcrit par million) et distribution selon les différents tissus. | 104 |
| Figure 30 : Organisation du gène AXL, transcription et traduction d'après Justine Migdall et Douglas K Graham, Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2010-02-01. | 105 |
| Figure 31 : Représentation schématique de la structure de Gas6 d'après Wu et al. (396). | 106 |
| Figure 32 : Analyse de la co-cristallisation d'AXL soluble et de son ligand Gas6 d'après Sasaki et al. (388). | 108 |
| Figure 33 : Activation d'AXL et voies de signalisation en aval. | 109 |
| Figure 34 : Résumé graphique des résultats de la partie 1 | 125 |
| Figure 35 : Schéma expérimental des modèles de xénogreffes. | 176 |
| Figure 36 : Les KG-1a présentent un phénotype MDR par l'expression de la P-gp. | 179 |
| Figure 37 : La modulation par la pioglitazone ne permet pas de neutraliser le phénotype MDR qu'il soit basal ou induit. | 181 |
| Figure 38 : Le profil d'expression de cytokines et facteurs de croissance est dérégulé dans les LAM. | 186 |
| Figure 39 : Le profil d'expression de cytokines et facteurs de croissance ne permet pas d'identifier de profil spécifiquement associé aux LAM-MRC ou aux LAM secondaires. | 193 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques aberrants des CSL d'après Mitchell et al. (76) et D. W. Hanekamp (77)..... | 34 |
| Tableau 2 : La classification Franco-Américaine-Britannique (FAB) des LAM..... | 37 |
| Tableau 3 : Classification des LAM selon l'OMS 2022..... | 39 |
| Tableau 4 : Classification des LAM selon l'ICC 2022. | 42 |
| Tableau 5 : LAM avec translocations récurrentes rares selon la classification ICC 2022..... | 43 |
| Tableau 6 : Classification pronostique génétique au diagnostic (ELN 2022), d'après Döhner et al. (99)..... | 48 |
| Tableau 7 : Principaux mécanismes anti-leucémiques de l'activation de la voie de PPAR- γ d'après Ryu et et al. (248)..... | 97 |
| Tableau 8 : Principales caractéristiques des lignées humaines de LAM..... | 172 |
| Tableau 9 : Principales caractéristiques de la cohorte des patients au diagnostic..... | 182 |
| Tableau 10 : Dosage des différents marqueurs dans les plasmas de patients atteints de LAM en comparaison aux témoins. | 183 |
| Tableau 11 : Dosage des cytokines pro-inflammatoires dans les plasmas de patients atteints de LAM selon le statut mutationnel <i>RUNX1</i> et <i>TET2</i> | 187 |
| Tableau 12 : Dosage des différents marqueurs dans les plasmas de patients atteints de LAM présentant un profil MRC+ <i>versus</i> MRC-. | 188 |
| Tableau 13 : Dosage des différents marqueurs dans les plasmas de patients présentant un profil de LAM secondaires <i>versus</i> LAM <i>de novo</i> | 189 |
| Tableau 14 : Principales caractéristiques des cellules primaires de LAM..... | 194 |

INTRODUCTION

1. Les leucémies aiguës myéloïdes

1.1 Généralités sur les LAM

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou de progéniteurs engagés dans la lignée myéloïde. Ces cellules leucémiques ou blastes prolifèrent dans la moelle osseuse et peuvent passer dans le sang ou envahir d'autres tissus. Elles se développent aux dépens de l'hématopoïèse physiologique, aboutissant à une insuffisance médullaire responsable des principales manifestations cliniques.

a) Épidémiologie

Les LAM représentent la forme la plus fréquente (80%) de leucémie aiguë chez l'adulte mais sont toutefois considérées comme une pathologie rare avec 3 428 nouveaux diagnostics en France en 2018. Le taux d'incidence est de 3,1 chez l'homme et de 2,3 chez la femme pour 100 000 personnes-années avec un rapport hommes/femmes égal à 1,35. Ce taux d'incidence est inégal selon l'âge, puisqu'il est faible chez les sujets jeunes de moins de 50 ans (<3 pour 100 000 personnes-années, ce taux étant comparable entre les deux sexes) puis augmente de façon non linéaire avec l'âge (**Figure 1**) pour atteindre une valeur maximale de 34,4 pour 100 000 personnes-années chez les hommes entre 85 et 89 ans et de 26,1 chez les femmes entre 90 et 94 ans (1). Il s'agit donc d'une pathologie affectant majoritairement le sujet âgé avec un âge médian au diagnostic de 69 ans chez l'homme et de 72 ans chez la femme. Entre 1990 et 2018, l'incidence en France a légèrement augmenté, la majeure partie de l'augmentation du nombre de cas étant attribuable à l'évolution démographique de la population (1). Il est toutefois probable que nous observions aussi à l'avenir une hausse de l'incidence des LAM, en particulier des formes secondaires aux traitements utilisés en oncologie, domaine quand lequel les thérapies ne cessent de progresser et rallongent significativement la survie des patients.

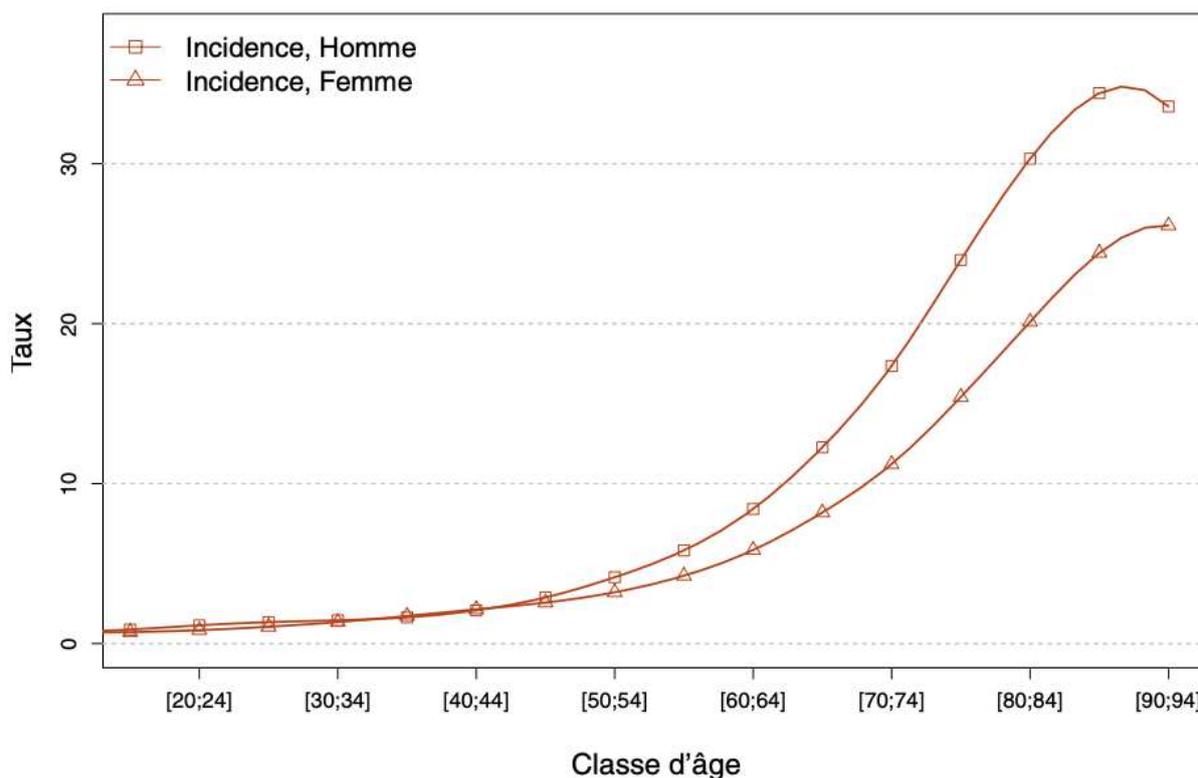


Figure 1 : Taux d'incidence selon la classe d'âge en France en 2018 d'après Le Guyader-Peyrou et al. (1).

b) Étiologie des LAM

L'étiologie de la plupart des cas de LAM reste inconnue, sans exposition à un facteur leucémogène objectivé. Ainsi, en l'absence de cause identifiée, il s'agit d'une LAM «*de novo*». Par opposition, les LAM sont considérées comme «*secondaires*», soit lorsqu'elles résultent de l'évolution d'une hémopathie sous-jacente : syndromes myélodysplasiques (SMD) ou syndromes myéloprolifératifs (SMP), soit d'une exposition antérieure à un traitement par chimiothérapie (agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase ou de PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase)) ou radiothérapie (2)

Le développement des LAM est également associé à d'autres facteurs de risque identifiés, intrinsèques à l'individu comme les prédispositions génétiques. En effet, un certain nombre d'anomalies génétiques constitutionnelles syndromiques est associé à un surrisque significatif de développer une LAM : syndrome de Down (trisomie 21) (3), syndrome de Li-Fraumeni, la neurofibromatose ou l'anémie de Fanconi. Bien que rares, ces entités font l'objet d'un chapitre dédié aux hémopathies myéloïdes avec prédisposition germinale à partir la version révisée OMS (Organisation Mondiale de la Santé) 2016.

Ainsi, certaines mutations germinales ont été intégrées dans la version révisée de la classification OMS 2016 parmi lesquelles les mutations de *CEBPA* ou de *DDX41* prédisposant préférentiellement aux hémopathies myéloïdes comme les LAM, sans maladie préexistante ni atteinte d'autres organes.

Une grande variété de facteurs environnementaux est également associée à l'installation ou au développement de la LAM, la liste n'étant pas exhaustive : exposition aux radiations ionisantes (4), au benzène, aux chimiothérapies telles que les agents alkylants ou inhibiteurs de topoisomérase (5). Tous ces agents favorisent une instabilité génétique responsable de l'émergence d'évènements génétiques oncogéniques, modèle que nous développerons dans le paragraphe dédié à la leucémogénèse.

1.2 De l'hématopoïèse à la leucémogénèse

a) Hématopoïèse physiologique

L'hématopoïèse est un processus continu et hiérarchique aboutissant à la formation de l'ensemble des éléments figurés du sang : hématies, plaquettes et leucocytes. Chez l'adulte, l'hématopoïèse physiologique s'effectue exclusivement dans la moelle osseuse et produit entre 4 et 5×10^{11} cellules par jour (6). Ce processus dynamique et finement régulé permet à l'organisme de s'adapter aux contraintes physiologiques et pathologiques. L'homéostasie du système hématopoïétique repose sur les capacités intrinsèques de quiescence, d'auto-renouvellement, de multipotence et de différenciation des CSH dans un modèle pyramidal présenté en **Figure 2**, le renouvellement du pool de CSH étant assuré par la division asymétrique de ces dernières.

Si elle semble aujourd'hui communément acquise par la communauté scientifique, la notion de cellule souche a été pour la première fois proposée en 1868 par Ernst Haeckel (7), un biologiste allemand et grand partisan de la théorie de l'évolution Darwinienne. Il définit la cellule souche (*stammzelle*) comme une cellule au sommet d'une hiérarchie et ancêtre commun à l'origine de toutes les autres cellules de tous les organismes multicellulaires. Ce modèle a été par la suite adapté dans le cadre de l'hématopoïèse avec la notion de cellule souche hématopoïétique par Artur Pappenheim en 1905 (8) comme une cellule centrale, ancêtre commun de l'ensemble de toutes les cellules du système sanguin. Cette cellule souche

possède deux propriétés fondamentales la définissant : l'auto-renouvellement et la différenciation.

La preuve fonctionnelle des CSH a été mise en évidence à partir des années 1950, d'abord sur des modèles murins soumis à une irradiation létale, mettant en évidence les rôles primordiaux de la rate et de la moelle osseuse (9, 10). Ainsi, chez l'Homme, les premières tentatives de transplantations de moelle osseuse homologue ont été réalisées sur des patients accidentellement irradiés (11).

Dans le modèle historique de l'hématopoïèse, tel un arbre phylogénétique, les CSH qui sont au sommet de la hiérarchie, sont considérées comme une population cellulaire homogène avec une division binaire en deux populations progénitrices distinctes de lignées myéloïdes et lymphoïdes en aval des progéniteurs myéloïdes communs (CMP ou « *common myeloid progenitor* ») et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP ou « *common lymphoid progenitor* »).

L'essor de nouvelles technologies en séquençage, particulièrement les analyses transcriptomiques en « cellule unique », a permis de revoir ce paradigme et indique en réalité un *continuum* dans le processus de différenciation des CSH, dans un modèle de trajectoire de différenciation (12). Désormais, le *pool* de CSH est considéré comme plus hétérogène, que ce soit en termes d'auto-renouvellement ou de capacité de différenciation (**Figure 2**).

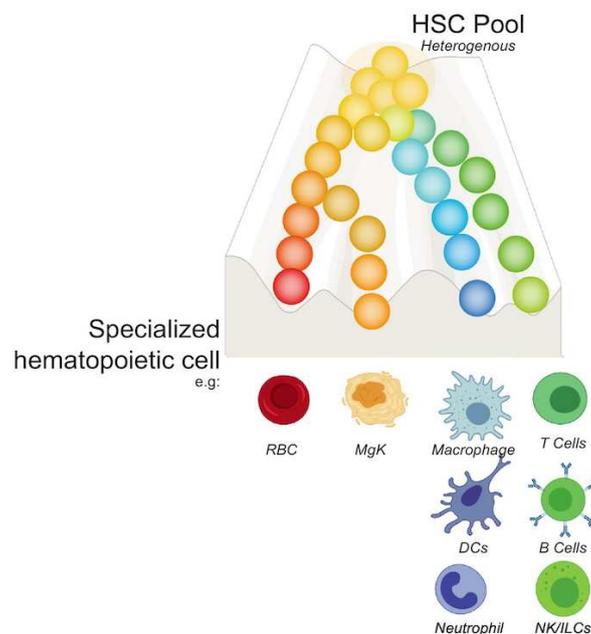
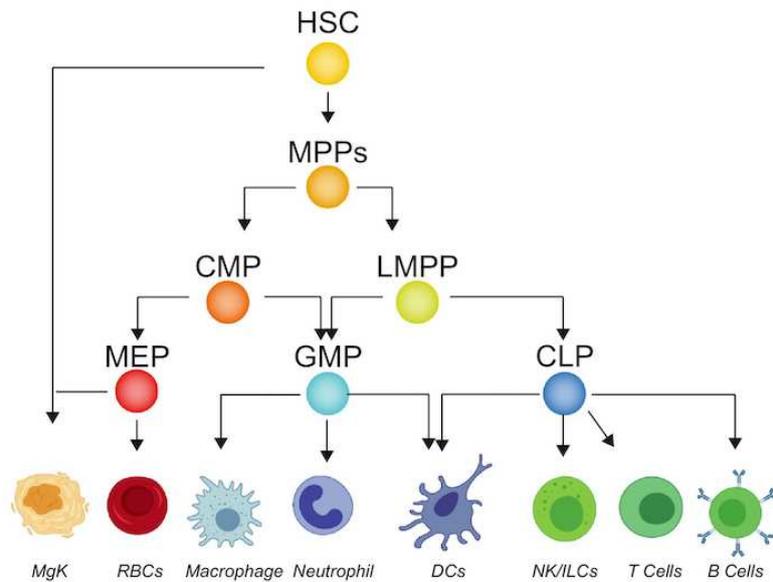


Figure 2 : Modèles de l'hématopoïèse physiologique d'après Rodrigues et al. (13).

Schéma illustrant le modèle d'hématopoïèse canonique par étapes. Les CSH contribuent dans le modèle historique à chaque lignée de manière égale. Le modèle actuel révisé montre que l'hématopoïèse représente davantage un continuum dans la différenciation des CSH. En effet, de récentes découvertes indiquent que seule une petite fraction des CSH génère un résultat équivalent pour toutes les cellules sanguines matures, alors que la plupart des CSH présentent un biais de différenciation vers une lignée.

Abréviations : CLP : progéniteur lymphoïde commun ; CMP : progéniteur myéloïde commun ; DC : cellule dendritique ; GMP : progéniteur de granulocyte/macrophage ; CSH : cellule souche hématopoïétique ; ILC : cellule lymphocytaire innée ; LMPP : progéniteur multipotent à potentialité lymphoïde ; MEP : progéniteur mégacaryocytaire/érythroïde ; MgK : mégacaryocyte ; MPP, progéniteur multipotent ; NK : Natural killer ; RBC : globules rouges.

b) Niche hématopoïétique

L'homéostasie du système hématopoïétique repose également sur son interaction avec le microenvironnement médullaire appelé également « niche hématopoïétique », structure anatomique complexe assurant la maintenance fonctionnelle des CSH. Ce concept a été introduit par Raymond Schofield en 1978 (14) postulant que le comportement de la cellule souche peut être déterminé par son association avec d'autres cellules au sein d'une même « niche ». Cette niche hématopoïétique, composée d'une matrice extracellulaire, de cytokines/chimiokines et de divers types cellulaires comprenant majoritairement des cellules stromales mésenchymateuses (CSM), des cellules endothéliales ou des ostéoblastes, participe à la régulation des processus de prolifération et de différenciation des CSH. La régulation des CSH dans leur niche est soumise à de nombreux signaux relayés par une grande variété de facteurs (intégrines, protéines matricielles, chimiokines, facteurs de croissance, systèmes Jagged-1/Notch et Wnt/beta caténine, voie du TGF- β 1, hypoxie...) (15-19) associés au maintien de leur quiescence ou de leur auto-renouvellement. La régulation dynamique des CSH et de leur balance entre quiescence et renouvellement est assurée par l'ensemble des interactions directes ou indirectes avec les nombreux acteurs de ce microenvironnement.

A l'heure actuelle, le modèle communément accepté est celui d'une niche unique hématopoïétique, composée de territoires fonctionnellement distincts où se localisent les CSH : la niche endostéale et la niche non-endostéale ou vasculaire (**Figure 3**).

La grande majorité (80%) des CSH se localise à proximité de l'endothélium sinusoidal (20), les autres sont localisées au niveau péri-artériolaire (10%) (21) et à proximité de l'endostéum (10%) (22).

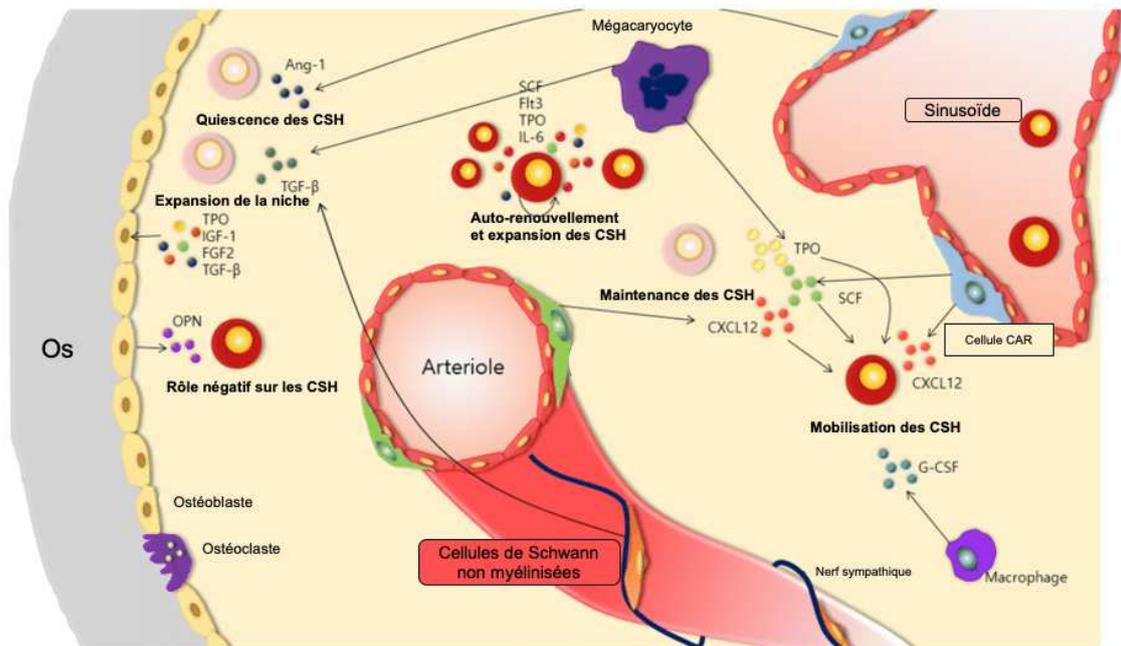


Figure 3 : Représentation schématique de la niche hématopoïétique et de la coopération entre niche endostéale et vasculaire, adapté d'après Lee et al. (23).

L'homéostasie des CSH est régulée par de multiples interactions, en particulier avec les facteurs solubles sécrétés par les cellules de la niche. Le CXCL12 (SDF-1) sécrété par les CSM péri-artériolaires participe à la maintenance des CSH tandis que le CXCL12 sécrété par les CSM péri-sinusoïdaux est impliqué dans la mobilisation des CSH. Les monocytes, macrophages et les mégacaryocytes produisent Ang-1 (angiopoïétine-1) nécessaire à la quiescence des CSH, le FGF (Fibroblast Growth Factor) pour l'auto-renouvellement et l'expansion des CSH, la TPO (thrombopoïétine) pour le maintien des CSH et le G-CSF pour la mobilisation des CSH.
 Abréviations : OPN : ostéopontine ; SCF : stem cell factor; TGF-β1 : transforming growth factor-β1; CXCL12 : CXC-chemokine ligand.

La niche endostéale, localisée au contact de l'os cortical, est principalement composée de cellules de la lignée ostéoblastique et ostéoclastique, ainsi que de CSM. Bien qu'il persiste des controverses quant à leur rôle fonctionnel respectif, la niche endostéale serait impliquée dans le contrôle de l'auto-renouvellement (24) et de la quiescence des CSH, favorisée notamment par la sécrétion d'ostéopontine par les ostéoblastes (25). La niche vasculaire quant à elle est principalement constituée de cellules endothéliales sinusoïdales et de péricytes et favoriserait à l'inverse, la différenciation des CSH et la prolifération des progéniteurs (24). D'autres types cellulaires peuvent également indirectement interagir avec les CSH et réguler leur homéostasie. Les cellules de Schwann non myélinisées, localisées au niveau péri-artériolaire régulent la quiescence des CSH par sécrétion TGF-β (26). De même, les mégacaryocytes transitoirement associés aux vaisseaux sinusoïdaux, jouent un rôle central dans la quiescence des CSH, en sécrétant de nombreux facteurs tels que le TGF-β ou CXCL4 (PF4, *Platelet factor 4*) (27).

Il s'agit évidemment d'un système dynamique, les deux niches étant interconnectées par un processus de migration des CSH puis de domiciliation ou « *homing* », à savoir la relocalisation des CSH au sein d'une des niches (endostéale ou non) permettant de favoriser leur auto-renouvellement ou au contraire d'engager leur différenciation. Ce processus de domiciliation est régulé par des facteurs solubles comme : CXCL12 (SDF-1) ou encore des molécules d'adhésion comme la E-selectine (28) ou encore V-CAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) (29) exprimée à la surface des cellules endothéliales. Une des chimiokines essentielles impliquée dans la migration et la domiciliation des CSH à leur niche respective est CXCL12 ou SDF-1, en se liant à son récepteur CXCR4 exprimé sur les CSH, mais également sur les progéniteurs immatures (30). Une fraction des CSM péri-sinoïdales exprimant fortement CXCL12 est appelée cellules « CAR » pour « *CXCL12-Abundant Reticular* ». Elles sont caractérisées par une forte production du facteur de croissance SCF (*Stem Cell Factor*) (17), ligand du récepteur c-KIT régulant la maintenance et l'auto-renouvellement des CSH (24). L'axe de signalisation CXCL12/CXCR4 va donc favoriser au sein de la niche vasculaire, la mobilisation des CSH et leur sortie de la niche endostéale dédiée au maintien de leur quiescence.

c) Niche leucémique

Le processus de leucémogénèse s'est longtemps limité à la prolifération de la cellule leucémique elle-même. Ce concept a été remis en question par la description d'une rechute précoce de cellules leucémiques dérivées de cellules du donneur masculin chez une patiente ayant reçu une allogreffe de CSH, suggérant l'action d'un agent leucémogène issu de l'hôte (31). Cette observation renvoie à la théorie de la "graine et du sol" proposée par Paget en 1889, qui suggérait que les métastases tumorales nécessitaient des interactions favorables entre les cellules tumorales (la "graine") et leur microenvironnement (le "sol") pour pouvoir se développer (32).

Ainsi le rôle des cellules non hématopoïétiques dans la leucémogénèse a été démontré par Marc Raaijmakers où la délétion de *Dicer1* dans les CSM à différenciation ostéoblastique, prédispose au développement d'une hématopoïèse dysplasique. *Dicer1* code pour une enzyme impliquée dans le traitement des micro-ARN, induisant une sous-expression de *Sbds*, gène muté dans le syndrome de Shwachman-Diamond, maladie congénitale multi-systémique prédisposant notamment aux hémopathies myéloïdes. De manière intéressante, cette mutation dans les cellules hématopoïétiques elle-même n'induit pas la maladie, alors que la greffe des cellules du microenvironnement issues des animaux *Dicer1*^{-/-} est capable d'induire

le phénotype dysplasique sur les cellules hématopoïétiques, apportant la preuve que la maladie observée chez les souris *Dicer1*^{-/-} est déterminée par le microenvironnement (33). Pour aller plus loin dans la compréhension du rôle du microenvironnement, la même équipe a montré que la délétion *Sbds* dans les CSM induit un dysfonctionnement mitochondrial, un stress oxydatif et un phénotype pro-inflammatoire par sécrétion des alarmines S100A8 et S100A9 par le microenvironnement, favorisant la leucémogénèse (34). Ces études suggèrent un rôle potentiellement causal de la niche hématopoïétique dans le développement de cellules leucémiques, qui elles-mêmes en retour sont capables de remodeler la niche et de détourner les processus homéostatiques physiologiques aux dépens des CSH (35). En effet, les cellules leucémiques peuvent reprogrammer les CSM pour créer une niche pro-tumorale, soit au moyen de contacts cellulaires directs (36), soit par l'intermédiaire de facteurs solubles ou d'exosomes (37). L'analyse comparative de l'expression de 93 gènes dans des CSM provenant de moelles normales ou de patients atteints de LAM au diagnostic, révèle une diminution de l'expression de plusieurs facteurs de niche, tels que le SCF, la TPO (thrombopoïétine), *Ang-1* (angiopoïétine 1) ou encore *VCAM1* (protéine d'adhésion des cellules vasculaires) (38), bien qu'il n'y ait pas de différence significative dans leur capacité à soutenir une hématopoïèse, qu'elle soit normale ou pathologique.

Ainsi, les anomalies du microenvironnement médullaire et des interactions niche/CSH jouent non seulement un rôle dans le développement des hémopathies myéloïdes mais également dans leur maintien en favorisant la quiescence des cellules souches leucémiques (CSL) et donc leur résistance à la chimiothérapie conventionnelle (39). De plus, les CSM sont également capables de protéger les cellules leucémiques par transfert de mitochondries, leur permettant de produire davantage d'ATP (adénosine triphosphate), favorisant leur prolifération, une résistance accrue aux chimiothérapies et donc un avantage de survie (40).

Parmi les autres acteurs du microenvironnement, le tissu adipeux intervient également dans la protection et la survie des cellules leucémiques. D'une part, les cellules leucémiques répriment la maturation des adipocytes de la moelle osseuse, entravant la différenciation myéloïde et érythroïde (41). De l'autre, les cellules leucémiques induisent la lipolyse des triglycérides en acides gras libres pour leur propre utilisation, les CSL surexprimant le CD36, transporteur membranaire d'acides gras, favorisant *in fine* la chimiorésistance, leur prolifération et leur survie (42, 43).

Le rôle du microenvironnement est donc indispensable à prendre en compte pour appréhender l'effet *in vivo* d'un traitement dirigé contre les LAM. En effet, son implication dans les

mécanismes de résistance à la midostaurine (inhibiteur de FLT3, *Fms-like Tyrosine kinase 3*) est rapportée dans la littérature. Ces mécanismes de résistance impliquent notamment l'activation de voies de signalisations alternatives comme Notch (44) ou encore AXL (45), dont la surexpression a été décrite *in vitro* sur les lignées de LAM en condition de co-culture avec des cellules stromales (46).

d) Processus de leucémogénèse

Le processus de leucémogénèse est complexe et a été décrit initialement, telle l'hématopoïèse physiologique, sur un modèle hiérarchique impliquant le concept de cellules souches leucémiques ou cellule initiant la leucémie (CIL).

Près de 80% des LAM présente des anomalies clonales somatiques au diagnostic (47), suggérant un lien fonctionnel et coopératif entre les différents événements génétiques oncogéniques. Ainsi, l'évolution d'une hématopoïèse physiologique vers une hématopoïèse clonale puis leucémique est un processus multi-étapes et dynamique.

Sur la base de ces observations est proposé au début des années 2000, un modèle de physiopathologie des LAM en « *two-hit* » (48). Ce modèle se base sur la collaboration entre au moins deux grandes classes de mutations et l'accumulation d'évènements génétiques de laquelle découlent des anomalies fonctionnelles prodiguant un avantage à la cellule. Les mutations de classe I, sont représentées par des récepteurs à activité tyrosine kinase activés de manière constitutive (*FLT3, N-RAS, K-RAS, c-KIT*), conduisant ainsi à l'activation de voies de signalisation (ERK/MAPK, PI3K/AKT...) essentielles à la prolifération et à la survie. Les mutations de classe II conduisent quant à elles au blocage de différenciation par l'inactivation de facteurs de transcription clé de l'hématopoïèse (*AML1/ETO, CBF α , CBF β , CEBP α , PML/RAR α ...*).

Les progrès récents dans le domaine du séquençage d'exome mais surtout de l'analyse du génome du cancer ont révolutionné l'image que nous avons de la LAM et complexifient ce modèle en « *two-hit* ». Ces études ont révélé qu'une grande proportion de patients ne présente pas ces anomalies fonctionnelles de type I ou II et bien d'autres anomalies ont été découvertes depuis grâce aux progrès du séquençage, notamment grâce au projet du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (49). Ainsi, d'autres mutations récurrentes ou altérations au sein de nouvelles voies ont été mises en évidence dans les LAM permettant d'élargir la compréhension des nombreux mécanismes impliqués dans la physiopathologie des LAM.

Parmi ces nouvelles classes d'évènements mutationnels, nous retrouvons l'atteinte de gènes codants pour des protéines impliquées dans la régulation épigénétique (*ASXL1*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*...), dans la maturation des ARN (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*...) ou connues pour leur rôle de suppresseurs de tumeur (*TP53*, *WT1*...) (50).

À l'heure actuelle, les anomalies génétiques retrouvées dans les LAM peuvent être organisées selon 9 classes fonctionnelles (51) : les gènes ayant un rôle dans la signalisation cellulaire (59%), les gènes modificateurs épigénétiques, modifiant la condensation de la chromatine (30%), et la méthylation de l'ADN (44%), le gène de la nucléophosmine (*NPM1*) (27%), les gènes codants pour des facteurs de transcription (22%), les gènes régulant l'épissage des ARNm (14%), les gènes suppresseurs de tumeur (16%) et enfin les gènes du complexe cohésine (13%) (**Figure 4**).

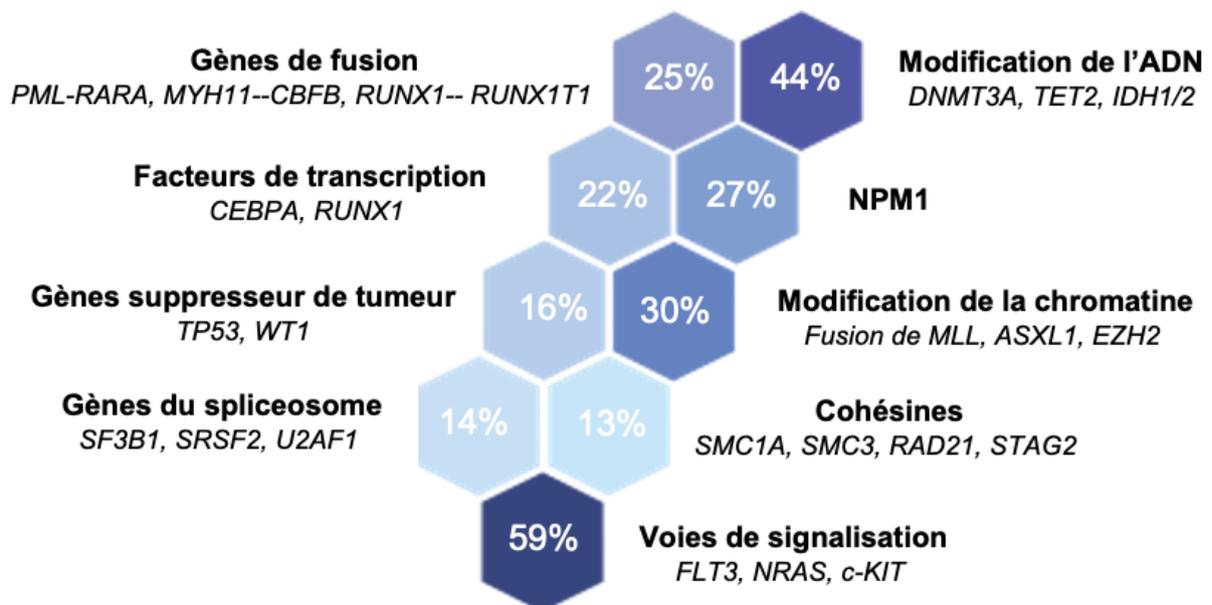


Figure 4 : Principales classes des gènes les plus fréquemment mutés dans les LAM.

Adapté d'après Carolyn S.Grove *Dis Model Mech.* 2014 (52), à partir des données du Cancer Genome Atlas.

e) Hématopoïèse pré-leucémique

L'évolution d'une hématopoïèse physiologique en une hématopoïèse clonale et pathologique est un processus multi-étapes et évolutif. Au cours de la vie, l'hématopoïèse peut devenir en partie clonale, indépendamment de toute hémopathie avérée, conduisant ainsi à une hématopoïèse dite « clonale de signification indéterminée » ou CHIP (*Clonal*

hematopoiesis of indeterminate potential). La sensibilité accrue des récentes techniques de séquençage à haut débit a permis de détecter un certain nombre de mutations somatiques dans les cellules sanguines de sujets sans hémopathie sous-jacente. Ainsi, l'analyse d'exome réalisée sur le sang de plusieurs milliers d'individus ne présentant ni hémopathie ni cancer, indique que la prévalence de ces mutations atteint jusque 10 % des sujets de plus de 70 ans et près de 20 % des plus de 90 ans (53, 54). La majorité (80%) des individus présentant une CHIP n'a qu'une seule et unique mutation, les gènes les plus souvent mutés étant impliqués dans des processus de modulation épigénétique : *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1* (53, 54).

DNMT3A (DNA methyl-transferase 3 alpha) est une enzyme de la famille des ADN méthyltransférases qui catalyse la réaction de méthylation sur le carbone 5 des résidus cytosines, qui a lieu principalement au niveau des îlots CpG. Ce mécanisme de régulation épigénétique est généralement associé à une répression transcriptionnelle. En effet, la méthylation des cytosines des îlots CpG des régions promotrices des gènes limite la fixation de certains facteurs de transcription et au contraire favorise le recrutement de certains répresseurs (MBPs, *Methyl Binding Proteins*). Des mutations perte de fonction de *DNMT3A* ont été décrites dans plus de 20 % des LAM *de novo*, leur conférant un pronostic péjoratif (55). L'étude sur des modèles murins a permis de montrer que la perte de fonction de *DNMT3A* dans les CSH conduit à leur accumulation par perte de leur potentiel de différenciation (56).

TET2 (Ten-Eleven-Translocation-2) intervient également dans le processus de régulation épigénétique en jouant un rôle actif dans la déméthylation de l'ADN. En effet, cette enzyme catalyse l'hydroxylation des cytosines méthylées (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosines (5hmC) dont l'oxydation sera poursuivie en 5-formylcytosines (5fC) et en 5-carboxycytosines (5caC). Ces nucléotides 5caC pourront être à leur tour décarboxylés en cytosine. Le 5hmC peut également être hydrolysé par des glycosylases conduisant à la formation d'un site abasique qui sera remplacé par des cytosines non méthylées par le complexe de réparation de l'ADN BER (*Base Excision Repair*). En résulte donc une déméthylation des îlot CpG au niveau d'un promoteur favorisant la transcription du gène en aval. Ainsi, les mutations induisant une perte de fonction de la protéine *TET2* entraînent une hyperméthylation de l'ADN. Des délétions et des mutations perte de fonction de *TET2* sont observées dans 10 % des LAM (57). A l'image de *DNMT3A*, la perte de fonction de *TET2* (58) dans les cellules hématopoïétiques procure un avantage compétitif par rapport aux autres cellules hématopoïétiques, permettant une expansion clonale des cellules porteuses de la mutation aux dépens des cellules non mutées.

Ainsi, les mutations initiales semblent établir un environnement propice à l'émergence et à l'accumulation de mutations secondaires dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans la signalisation comme *NRAS* ou *FLT3* (59).

L'étude séquentielle de l'architecture clonale de LAM survenues chez des sujets préalablement porteurs d'une CHIP montre que les cellules leucémiques sont porteuses de l'anomalie initiale et dérivent ainsi du clone initialement asymptomatique (54). Certaines LAM sont donc la conséquence de l'accumulation séquentielle de mutations somatiques au sein d'une même CSH, passant par un état « pré-leucémique » avant d'évoluer vers une LAM. Il s'agirait donc d'un modèle avec plusieurs stades d'hématopoïèse clonale, en fonction de l'ordre d'apparition des mutations somatiques, de leur potentiel oncogénique et de leur coopération (**Figure 5**).

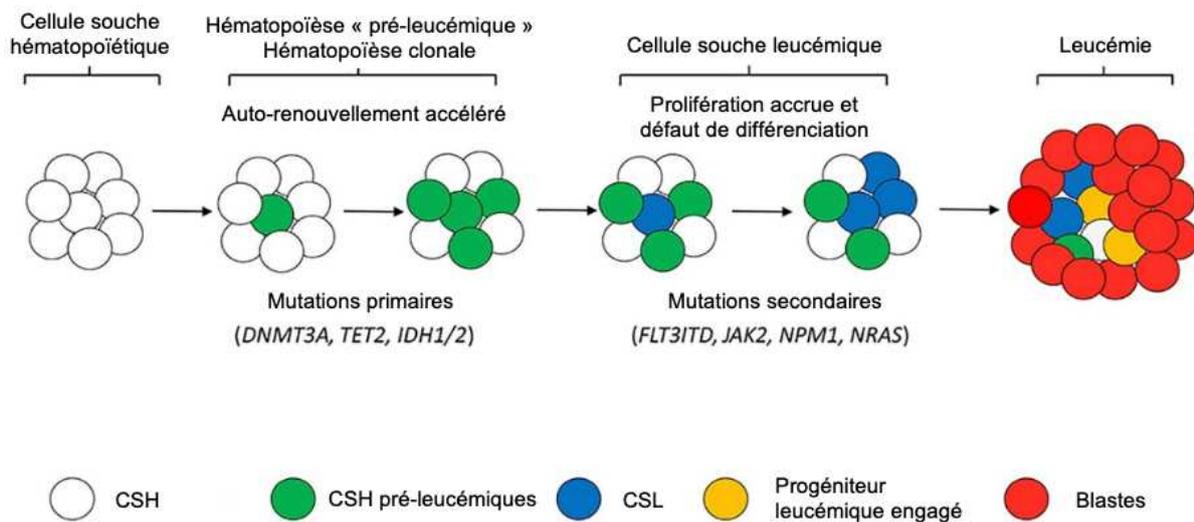


Figure 5 : Modèle simplifié de leucémogénèse multi-étapes.

L'acquisition de mutations primaires, principalement DNMT3A, TET2 ou IDH1/2, modifie la régulation épigénétique dans les CSH normales, aboutissant à une hématopoïèse clonale « pré-leucémique ». L'acquisition de mutations secondaires telles que FLT3-ITD ou JAK2 confère aux CSH pré-leucémiques une capacité accrue de prolifération. Enfin, l'altération de la différenciation des CSL vient compléter ce modèle et conduit à l'accumulation de blastés, à l'origine de la leucémie. Schéma adapté d'après Jin et al. (60).

Plus récemment, un nouveau modèle sur l'origine des LAM a été proposé sur la base de trois groupes de mutations : les "mutations de type A" (gènes de fusion) sont nécessaires pour initier ou maintenir le phénotype leucémique, les "mutations de type B" (*ABL*, *PDGFR*, *KIT*, *FLT3*, etc.) favorisent la prolifération et la survie des cellules leucémiques et enfin les "mutations de type C" (régulateurs épigénétiques) procurent un avantage en termes de prolifération mais ne sont pas suffisantes à elles seules pour induire la maladie. L'étude sur des modèles murins montre que la combinaison de mutations de deux types, c'est-à-dire A + B ou A + C ou B + C, peut induire une LAM (61).

L'évolution vers une hémopathie n'est pas systématique chez tous les patients porteurs de CHIP, raison pour laquelle cette hématopoïèse clonale est dite de signification indéterminée. Ce risque d'évolution reste toutefois supérieur à celui de la population générale et est estimé à 0,5–1 % par an (53, 54).

f) Cellules souches leucémiques

Le processus de leucémogénèse est complexe et a été décrit initialement, telle l'hématopoïèse physiologique, sur un modèle hiérarchique introduisant le concept de cellule initiatrice de la maladie ou de cellule souche leucémique dans le cadre des LAM.

Par définition, ce concept de CSL implique des propriétés communes avec les CSH, notamment fonctionnelles comme les propriétés d'auto-renouvellement, de quiescence, de différenciation mais surtout la capacité d'initier et de reconstituer la maladie au décours d'expériences de xénogreffe chez la souris immunodéficiente. Cette notion a été introduite en 1986 par les travaux de James D. Griffin qui montra que seule une fraction des cellules blastiques possédait la capacité de former des colonies en méthylcellulose, ouvrant ainsi l'hypothèse que ces cellules clonogéniques agissent comme des cellules souches *in vivo* pour maintenir le reste de la population de cellules leucémiques (62).

La première preuve de ce concept a été apportée en 1994 par les travaux de John Edgar Dick. En effet, seule une fraction de cellules (LT-SL-IC, *Long Term SCID-Leukemia Initiating Cells*), présente au diagnostic et contenue dans le compartiment CD34+CD38-, permet une reconstitution de la maladie à partir de xénogreffes sériées dans des souris NOD/SCID (*Non-Obese diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*) (63, 64). Ces travaux ont également permis de révéler un modèle d'organisation hiérarchique de la prolifération leucémique, mettant ainsi en évidence plusieurs populations de CSL fonctionnellement distinctes et

capables d'initier la leucémie. Les « *Long Term SCID-Leukemia Initiating Cells* » (LT-SL-IC), sont capables d'initier la maladie lors de xénotransplantations sériées et pendant plusieurs passages, elles-mêmes capables de générer une seconde population, les « *Short Term SCID-Leukemia Initiating Cells* » (ST-SL-IC) capables d'initier la maladie uniquement lors de la première xénotransplantation mais pas en greffe secondaire ou tertiaire. Enfin, les LT-SL-IC quiescentes sont capables d'initier la leucémie uniquement de la greffe secondaire, après être restées quiescentes lors de la greffe primaire (**Figure 6**).

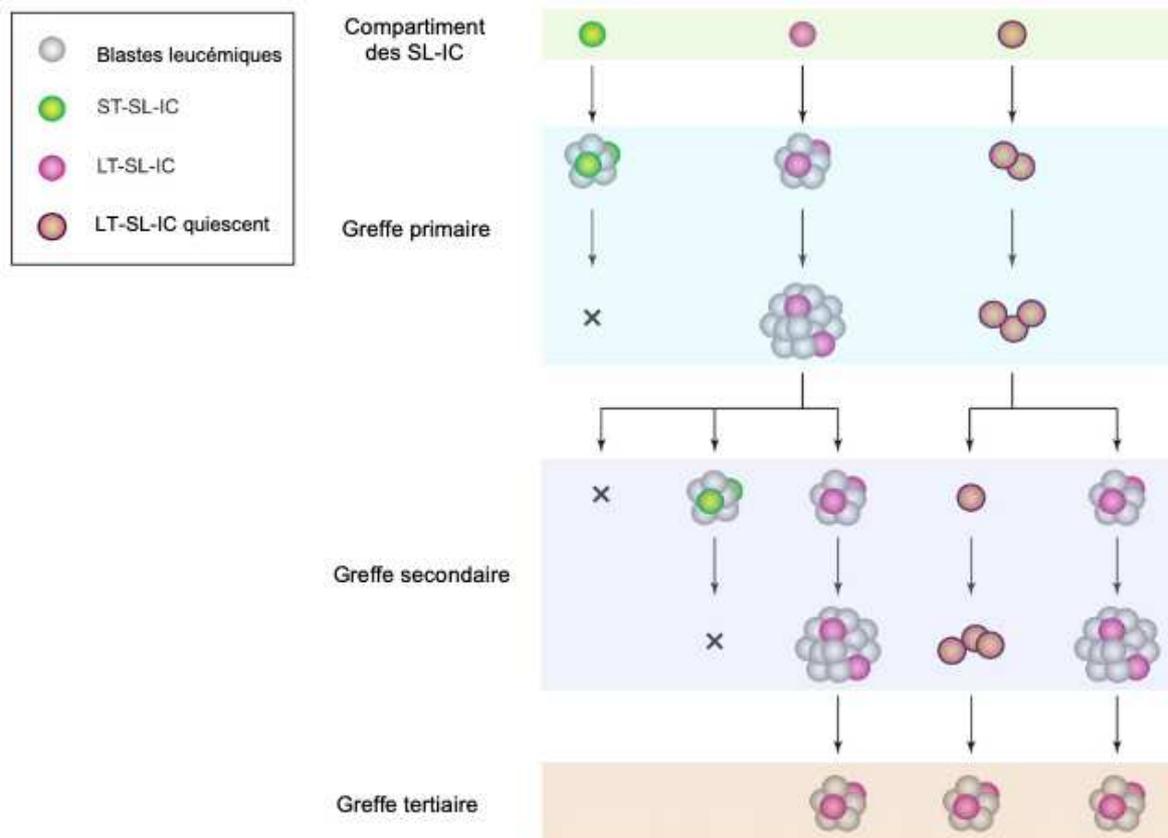


Figure 6 : Modèle d'organisation hiérarchique des cellules souches leucémiques dans la LAM
Adapté d'après John Edgar Dick (65).

Depuis la mise en évidence fonctionnelle des CSL, de nombreux travaux se sont intéressés à leur caractérisation et définition phénotypique, permettant notamment de mieux différencier les CSL des CSH physiologiques contenues dans le même compartiment CD34+CD38-.

L'un des premiers marqueurs associé aux CSL et à la capacité de greffe dans des souris NOD/SCID est le cluster de différenciation CD90 (Thy-1), une glycoprotéine de surface absente sur les CSL contrairement aux CSH normales (66). A l'inverse, l'expression aberrante de

plusieurs marqueurs de surface a été décrite sur les CSL, la liste n'étant ni exhaustive, ni consensuelle :

- **CD44**, molécule d'adhésion essentielle à l'interaction des CSL avec la niche hématopoïétique (67)
- **CD45RA**, isoforme du CD45 marqueur pan-leucocytaire et membre de la famille des protéines tyrosines phosphatases est considéré comme l'un des marqueurs les plus solides pour détecter les CSL (68), la fraction CD34+CD38-CD45RA+ triée conservant sa capacité de xénotransplantation sériée (69).
- **CD97**, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, essentiel à la capacité de greffe dans des souris NOD/SCID, de différenciation et surtout facteur de mauvais pronostic (70)
- **CD123**, chaîne α du récepteur à l'IL-3, facteur de croissance fondamental dans le processus de prolifération en activant les voies de signalisation des MAP kinases, PI3K/AKT et STAT5 (71)
- **IL1RAP** (*Interleukin 1 Receptor Accessory Protein*), appartient comme son nom l'indique, à la famille de protéines de l'interleukine 1 (IL-1) et dont l'intérêt dans les hémopathies myéloïdes a été identifié à partir de l'analyse transcriptomique de fractions triées de progéniteurs issus de patients atteints de LAM, comparé à des moelles normales. Ce marqueur surexprimé de manière aberrante dans plusieurs cohortes de LAM est associé à un pronostic péjoratif (72).
- **CLL-1** (*Human C-type lectin-like molecule-1*) ou CD371, glycoprotéine transmembranaire appartenant à une famille de récepteurs apparentée aux lectines de type C, impliquée dans la régulation du système immunitaire (récepteur inhibiteur). Dans une cohorte de 89 LAM CD34+ au diagnostic, la protéine CLL-1 a été préférentiellement retrouvée dans la fraction CD34+CD38- et absent des moelles témoins normales (73).
- **TIM-3** (*T-cell immunoglobulin mucin-3*) ou CD366 est une glycoprotéine de surface, molécule de co-stimulation inhibitrice du système immunitaire. A l'image de CLL-1, la protéine TIM-3 est exprimée sur les blastes de la fraction CD34+CD38- et absente des blastes des moelles témoins (74). D'un point de vue fonctionnel, l'interaction de TIM-3 avec son ligand Gal-9 est indispensable à la capacité de greffe des CSL dans des souris NSG, ce qui fait donc de TIM-3 une cible thérapeutique de choix (75).

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques aberrants des CSL d'après Mitchell et al. (76) et D. W. Hanekamp (77).

| Marqueur | Fonction | Expression physiologique | Expression LAM | Expression LSC CD34+ CD38- |
|----------------------|--|---------------------------------------|----------------|----------------------------|
| CD25 | Chaîne α du récepteur IL-2 | Lymphocytes B et T activés | 25% | + |
| CD44 | Molécule d'adhésion | Ubiquitaire | 100% | ++ |
| CD45RA | Récepteur tyrosine phosphatase de type C | Lymphocytes T, cellules myéloïdes | 65% | + |
| CD47 | Signal inhibiteur de la phagocytose | Ubiquitaire | 100% | ++ |
| CD96 | Signal régulateur de la réponse immunitaire | Lymphocytes T activés, lymphocytes NK | 33% | + |
| CD97 | Protéine d'adhésion | Cellules myéloïdes, lymphoïdes | 50% | + |
| CD99 | Adhésion, agrégation et migration cellulaire | Cellules myéloïdes | 83% | + |
| CD123 | Chaîne α du récepteur IL-3 | Cellules myéloïdes | 82% | ++ |
| CD366 (TIM-3) | Inhibiteur de point de contrôle | Lymphocytes T activés, lymphocytes NK | 91% | + |
| CD371 (CLL-1) | Modulation réponse immunitaire | Cellules myéloïdes | 70% | + |
| IL1RAP | Co-récepteur IL-1 | Lymphocytes T | 79% | + |
| GPR56 | Protéine d'adhésion | Ubiquitaire | 62,5% | + |

Malgré le grand nombre de marqueurs évalués ces dernières années, la grande hétérogénéité intra et inter-patients ne permet pas l'utilisation d'un seul marqueur de surface pour isoler les CSL, d'où un intérêt certain de leur utilisation combinée notamment en pratique courante pour la détermination de la maladie résiduelle. Dans ce cadre ont été retenus CD45RA, CD123 et CLL-1 par le groupe coopérateur de l'ELN (*European Leukemia Net*) (78) sur la fraction CD34+CD38-. Un travail majeur de l'équipe de Dominique Bonnet a également montré en 2008, que les CSL étaient également présentes dans la fraction CD34+CD38+, la répartition des CSL entre les deux fractions variant d'un patient à l'autre (79). Du fait de l'absence de marqueur robuste, la plupart des publications concerne la fraction CD34+CD38-.

Au-delà de leur caractérisation fonctionnelle et phénotypique, l'étude de l'impact pronostique des CSL constitue un enjeu majeur en clinique, que ce soit au diagnostic ou dans le suivi de la maladie. En effet, un pourcentage élevé de blastes CD34+CD38- au diagnostic, fraction contenant le contingent de CSL, est associé à un taux plus élevé de rechute ainsi qu'à une survie globale moindre (80). La signature transcriptomique des cellules souches a également montré son intérêt, mettant en évidence l'impact pronostique du caractère « souche » dans la réponse au traitement. Sur la base de cette observation, une signature transcriptomique de 17 gènes (LSC17) a été identifiée en comparant les profils d'expression génique de 138 fractions CSL+ et 89 CSL- isolées chez 78 patients atteints de LAM. Cette signature constitue un biomarqueur prédictif de résistance primaire au traitement standard avec un fort impact pronostique (81). Cette observation renforce l'idée que ces cellules majoritairement quiescentes résistent à la chimiothérapie conventionnelle qui cible essentiellement les cellules en cycle, faisant ainsi le lit de la rechute par reconstitution de la maladie sur le modèle hiérarchique précédemment décrit. La CSL est donc une cible thérapeutique idéale.

Plus récemment, un nouveau score de signature d'expression génique de 16 gènes a été proposé : le score APS (*AML Prognostic Score*). Ce score dérive de l'analyse combinée du transcriptome de 176 patients et du séquençage de l'exome entier de 89 patients à l'aide d'une approche d'apprentissage automatisé (régression LASSO) et a été validé sur trois cohortes indépendantes dont une pédiatrique. De manière intéressante, le score APS montre des performances supérieures au LSC17, possiblement en raison de sa capacité à capter le signal du microenvironnement en intégrant des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'interaction de la CSL avec son environnement (82).

1.3 Démarche diagnostique

La présentation clinique des LAM n'est pas spécifique, la plupart des signes cliniques résultant de l'insuffisance médullaire secondaire à l'envahissement tumoral. En effet, l'accumulation des cellules blastiques dans la moelle osseuse, limitant ainsi l'hématopoïèse physiologique mais également dans d'autres localisations, est à l'origine des principaux symptômes de la maladie.

D'un point de vue biologique, les patients se présentent la plupart du temps avec une ou plusieurs cytopénies. Le retentissement clinique de ces cytopénies se manifeste donc par une pâleur cutanéomuqueuse, une dyspnée à l'effort, une tachycardie ainsi qu'une asthénie d'installation plus ou moins rapide en cas d'anémie, des troubles de l'hémostase primaire

secondaires à la thrombopénie ou une susceptibilité accrue aux infections bactériennes secondaire à la neutropénie.

Ainsi, un diagnostic de leucémie aiguë est évoqué en premier lieu sur l'examen de l'hémogramme qui révèle dans la plupart des cas une ou plusieurs cytopénies (anémie, thrombopénie, neutropénie) associées à une hyperleucocytose en cas de blastose circulante. L'analyse morphologique des blastes peut aider à l'orientation de leur origine avec la présence de corps d'Auer pathognomoniques d'une affiliation myéloïde.

Le diagnostic d'une LAM sera affirmé sur l'examen cytologique du sang et/ou de la moelle osseuse, qui retrouve une infiltration par plus de 20% blastes, à l'exception de certaines entités où la seule présence de l'anomalie cytogénétique ou moléculaire est suffisante pour poser le diagnostic quel que soit le pourcentage de blastes (83). Ces entités seront détaillées dans le paragraphe suivant.

Les LAM sont classées selon la classification de l'OMS (dernière version en 2022) qui intègre des critères cytogénétiques, moléculaires, morphologiques, phénotypiques liés à la maladie mais aussi des critères liés au patient comme les antécédents de traitement par radiothérapie ou chimiothérapie ou les antécédents d'autre hémopathie myéloïde. L'examen cytologique de la moelle osseuse est donc complété par un immunophénotypage et par l'exploration des anomalies cytogénétiques et moléculaires, permettant d'évaluer le pronostic de la maladie, ainsi que l'éligibilité à certaines thérapies, et de disposer d'un ou plusieurs marqueur(s) de suivi pour la maladie résiduelle (MRD).

L'immunophénotypage permet de confirmer l'affiliation de lignée des blastes, en particulier pour les formes morphologiquement indifférenciées (CD13, CD33, MPO pour la lignée myéloïde) mais également pour établir la nature monocytaire (CD14, CD36, CD64), érythroïde (GPA ou CD235a, CD71) ou mégacaryoblastique (CD41, CD42b, CD61). Le phénotypage des blastes permet également d'objectiver des expressions phénotypiques aberrantes permettant le suivi de la MDR qui constitue par ailleurs un élément pronostique (84, 85).

L'évolution des techniques de biologie a permis de mieux appréhender et caractériser l'hétérogénéité des LAM d'un point de vue phénotypique mais surtout moléculaire où peuvent s'associer plusieurs anomalies à potentiel oncogénique (facteurs de transcription, voies de signalisation, régulation épigénétique...), avec en moyenne cinq mutations somatiques chez un patient atteint de LAM (86). L'association de ces anomalies cytogénétiques et moléculaires, de l'âge et de la réponse au traitement sont actuellement les principaux facteurs de classification, mais également des facteurs pronostiques (87, 88).

1.4 Classification et pronostic

a) Classification FAB

La classification historique des LAM repose sur des critères morphologiques de différenciation observés sur le frottis médullaire : la FAB (French American British) établie en 1976 (89). Cette dernière a été enrichie de nouvelles entités dans la version révisée en 1985 (90) incluant la forme variante de la leucémie aiguë promyélocytaire, de la leucémie aiguë myélomonocytaire avec éosinophiles anormaux (LAM4 Eo) et enfin de la leucémie aiguë mégacaryocytaire (LAM 7). Dernière entité à intégrer cette classification, la leucémie aiguë myéloïde avec différenciation minimale (LAM 0) qui voit son apparition dans la version révisée en 1991 (91). Cette classification (**Tableau 2**) repose sur l'identification morphologique du progéniteur ou du précurseur à l'origine de la LAM.

Tableau 2 : La classification Franco-Américaine-Britannique (FAB) des LAM.

| Sous-groupe | Description |
|---|--|
| LAM 0 : avec différenciation minimale | Blastes indifférenciés, MPO < 3 % Pas de maturation granuleuse |
| LAM 1 : myéloblastique sans maturation | Blastes myéloïdes, MPO > 3% Maturation granuleuse < 10 % |
| LAM 2 : myéloblastique avec maturation | Blastes myéloïdes, MPO > 3% Maturation granuleuse > 10 % |
| LAM 3 : promyélocytaire | Promyélocytes avec corps d'Auer en fagots |
| LAM 4 : myélo-monocytaire | Blastes > 20 %, Maturation granuleuse > 20% Lignée monocytaire > 20 % ou monocytose sanguine > 5 G/L |
| LAM 4 Eo : myélo-monocytaire avec éosinophiles | + Éosinophiles anormaux |
| LAM 5 : monoblastique | Monoblastes > 80% (5a) ou incluant plus de 20% de maturation monocytaire (5b) |
| LAM 6 : érythroblastique | Blastes myéloïdes > 20 % Lignée érythroblastique > 50 % |
| LAM 7 : mégacaryoblastique | Mégacaryoblastes > 50 % |

L'essor de nouvelles technologies en biologie a permis de mieux caractériser l'hétérogénéité des LAM d'un point de vue cytogénétique et moléculaire avec la présence d'anomalies récurrentes, motivant l'arrivée de nouvelles classifications intégrant ces données, apportant de surcroît une aide à la stratification et à une classification pronostique des patients. L'OMS a donc proposé une classification diagnostique sur la base de ces nouvelles données cytogénétiques et moléculaires dès 2001 (92), dont la dernière édition (5^{ème}) est parue en

2022. Les caractéristiques moléculaires jouent un rôle de plus en plus important, avec de nombreuses entités de LAM définies exclusivement par des mutations génétiques, reléguant ainsi la classification morphologique historique au second plan. Toutefois, cette classification basée sur des critères morphologiques et phénotypiques est toujours présente dans cette 5^{ème} édition avec la catégorie des LAM définies selon le degré de différenciation, lorsque les cas ne sont pas caractérisés par la présence d'une anomalie génétique spécifique.

b) Classification OMS 2022

L'importance toujours plus croissante des données génomiques a contribué à une meilleure compréhension des profils génétiques spécifiques associés à chaque sous type de LAM, conduisant à une classification simplifiée par rapport à l'édition précédente (2) (**Tableau 3** et **Figure 7**). La modification majeure concerne la disparition du pourcentage de blastes médullaires requis pour poser le diagnostic de LAM lorsqu'elles sont définies par une anomalie génétique. La définition des LAM avec mutations de *CEBPA* intègre désormais, en plus des mutations bi-alléliques, les mutations mono-alléliques du domaine « *basic leucine zipper* » (bZIP) dans le cadre de lecture. L'entité provisoire des LAM avec transcrite de fusion *BCR::ABL1* devient définitive en 2022 mais requiert au moins 20 % de blastes médullaires. Trois nouveaux partenaires de réarrangements intègrent également cette version révisée : *KMT2A*, *MECOM* et *NUP98*. Enfin, les LAM associées avec anomalies cytogénétique ou moléculaire aux néoplasies myélodysplasiques (LAM-MR) ne nécessitent plus l'évaluation morphologique de la dysplasie, la présence seule de l'anomalie étant suffisante.

Tableau 3 : Classification des LAM selon l'OMS 2022.

| Classification selon l'OMS 2022 des sous types de LAM | |
|---|---|
| LAM définies par anomalies génétiques* | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Leucémie aiguë promyélocytaire avec transcrite de fusion <i>PML::RARA</i> - LAM avec transcrite de fusion <i>RUNX1::RUNX1T1</i> - LAM avec transcrite de fusion <i>CBFB::MYH11</i> - LAM avec transcrite de fusion <i>DEK::NUP214</i> - LAM avec transcrite de fusion <i>RBM15::MRTFA</i> - LAM avec transcrite de fusion <i>BCR::ABL1</i> - LAM avec réarrangement impliquant <i>KMT2A</i> - LAM avec réarrangement impliquant <i>MECOM</i> - LAM avec réarrangement impliquant <i>NUP98</i> - LAM avec mutation <i>NPM1</i> - LAM avec mutation bi-allélique <i>CEBPA</i> ou monoallélique dans le domaine bZIP | |
| LAM avec anomalie cytogénétique associée aux néoplasies myélodysplasiques | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Caryotype complexe - Délétion 5q ou perte 5q secondaire à une translocation déséquilibrée - Monosomie 7, délétion 7q ou perte 7q secondaire à une translocation déséquilibrée - Délétion 11q - Délétion 12p ou perte 12p secondaire à une translocation déséquilibrée - Monosomie 13 ou délétion 13q - Délétion 17p ou perte 17p secondaire à une translocation déséquilibrée - Isochromosome 17q - Chromosome isodicentrique (X)(q13) | |
| LAM avec anomalie moléculaire associée aux néoplasies myélodysplasiques | |
| <ul style="list-style-type: none"> - <i>ASXL1</i> - <i>BCOR</i> - <i>EZH2</i> - <i>SF3B1</i> - <i>SRSF2</i> - <i>STAG2</i> - <i>U2AF1</i> - <i>ZRSR2</i> | |
| LAM définies par niveau de différenciation | |
| <ul style="list-style-type: none"> - LAM avec différenciation minimale - LAM sans maturation - LAM avec maturation | <p>Colorations cytochimiques SBB (coloration Sudan Black B) et MPO (myéloperoxydase) (<3%) négatives. Expression d'au moins 2 antigènes myéloïdes comme CD13, CD33 ou CD117.</p> <p>MPO > 3% (cytochimique ou cytométrie en flux), maturation granuleuse < 10%. Expression d'au moins 2 antigènes myéloïdes comme CD13, CD33 ou CD117.</p> <p>MPO > 3% (cytochimique ou cytométrie en flux), maturation granuleuse < 10%. Composante monocytaire</p> |

| | |
|-----------------------------|--|
| | < 20%. Expression d'au moins 2 antigènes myéloïdes comme CD13, CD33 ou CD117. |
| - LA à composante basophile | Blastes avec granules cytoplasmiques de type basophile positifs à la coloration métachromatique (bleu de toluidine) et présence de polynucléaires basophiles. Coloration estérase négative. Absence d'expression forte du CD117 (exclusion leucémie à mastocytes). |
| - LA myélomonocytaire | MPO > 3% (cytochimique ou cytométrie en flux), composante monocyttaire > 20%, composante granuleuse > 20%. |
| - LA monoblastique | Composante monocyttaire > 80%, composante granuleuse > 20%. Les blastes et les promonocytes expriment au moins 2 antigènes monocytaires (CD11b, CD14, CD36 ou CD64) ou sont positifs pour la coloration estérase. |
| - LA érythroïde pure | > 30% proérythroblastes, lignée érythroblastique > 80% |
| - LA mégacaryoblastique | Expression d'au moins un antigène de la lignée plaquettaire : CD41 (glycoprotéine IIb), CD61 (glycoprotéine IIIa) ou CD42b (glycoprotéine Ib). |
| Sarcome myéloïde | |

*Indépendamment du décompte de blastes médullaires, à l'exception des LAM avec transcrit de fusion *BCR::ABL1* et mutation de *CEBPA*, nécessitant un taux supérieur ou égal à 20%

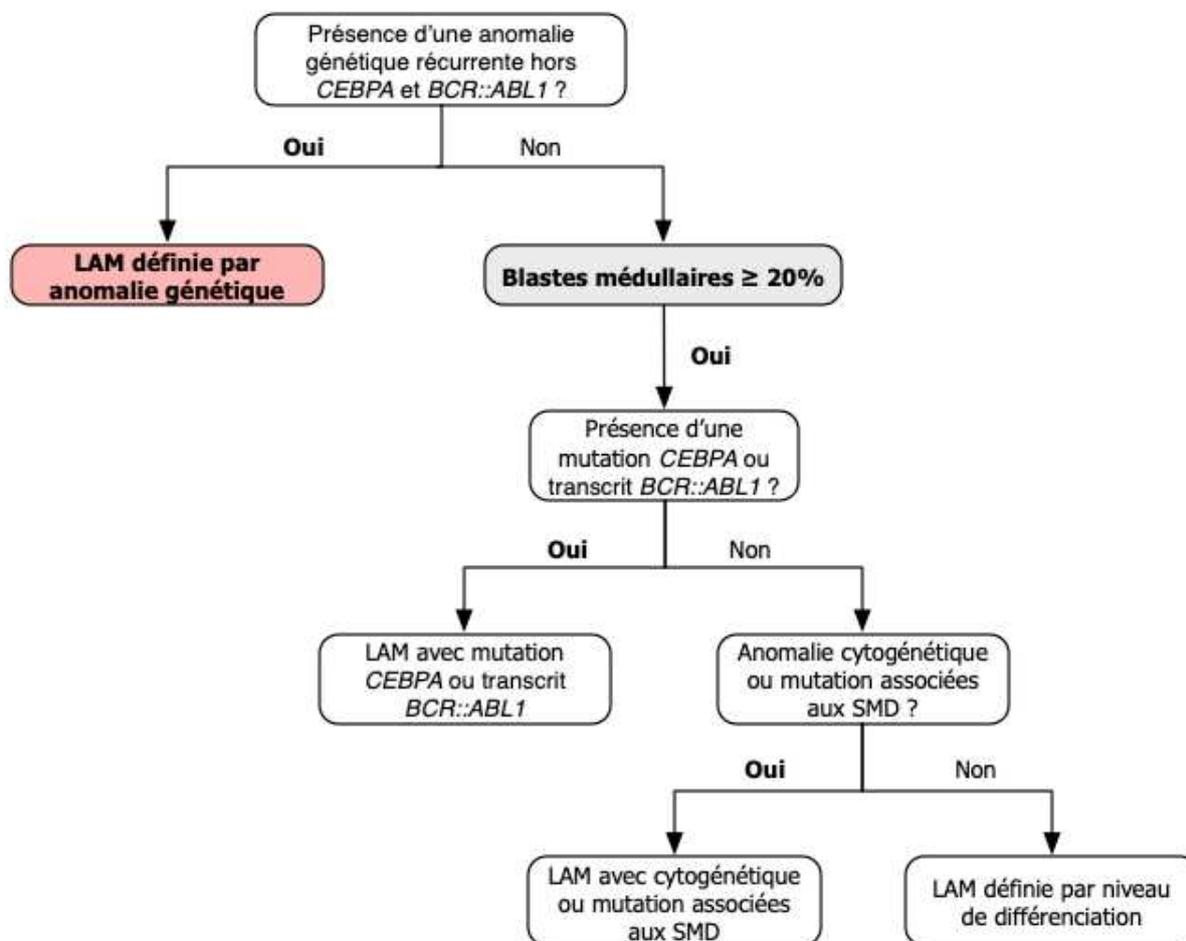


Figure 7 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de LAM selon la classification OMS 2022.

c) Classification ICC 2022

Parallèlement à la publication de la version révisée de l'OMS, un autre système de classification alternatif issu d'un groupe d'experts indépendants, a fait son apparition la même année : l'ICC ou *International Consensus Classification*. Cette nouvelle classification (**Tableaux 4 et 5, Figure 8**) apporte plusieurs points de divergence avec la classification OMS, notamment en termes de pourcentage de blastes nécessaire au diagnostic d'une LAM ou en termes d'entités. En effet, selon l'ICC, un taux de blastes d'au moins 10% est requis pour poser le diagnostic de LAM. Dans un *continuum*, une nouvelle entité de SMD/LAM est définie avec 10 à 19 % de blastes dans la moelle osseuse et en l'absence d'anomalies génétiques récurrentes qui définissent les LAM. Ces SMD/LAM sont l'équivalent de la catégorie de SMD avec excès de blastes de type 2 de la classification OMS et peuvent ouvrir à de nouvelles possibilités d'essais cliniques pour ces patients. L'autre divergence avec l'OMS

concerne l'entité des LAM avec mutation de *CEBPA* considérant exclusivement les mutations dans le domaine bZIP, qu'elles soient mono- ou bi-alléliques.

Tableau 4 : Classification des LAM selon l'ICC 2022.

| Classification selon l'ICC 2022 des sous-types de LAM incluant le pourcentage de blastes requis au diagnostic |
|---|
| - Leucémie aiguë promyélocytaire avec t(15;17)(q24.1;q21.2)/ <i>PML::RARA</i> ; blastes ≥ 10% |
| - Leucémie aiguë promyélocytaire avec autre réarrangement de <i>RARA*</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec autres réarrangements de <i>KMT2A\$</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec t(6;9)(p22.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec autres réarrangements de <i>MECOM#</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec autres translocations récurrentes rares% ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1§</i> ; blastes ≥ 20% |
| - LAM avec mutation de <i>NPM1</i> ; blastes ≥ 10% |
| - LAM avec mutation de <i>CEBPA</i> dans le domaine bZIP dans le cadre de lecture ; blastes ≥ 10% |
| - LAM/SMD ou LAM avec mutation de <i>TP53</i> ; blastes 10-19% ou ≥ 20% respectivement |
| - LAM/MDS ou LAM avec anomalie moléculaire associée aux néoplasies myélodysplasiques ; blastes 10-19% ou ≥ 20% respectivement Ces mutations incluent <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> ou <i>ZRSR2</i> |
| - LAM/SMD ou LAM avec anomalies cytogénétiques associée aux néoplasies myélodysplasiques ; blastes 10-19% ou ≥ 20% respectivement Ces anomalies comprennent caryotype complexe (≥ 3 anomalies chromosomiques en l'absence d'une autre anomalie classante ; del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) ou del(17p), del(20q), et/ou idic(X)(q13) |
| - LAM/SMD ou LAM sans autre spécification ; blastes 10-19% ou ≥ 20% respectivement |

*Incluant les LAM avec t(1;17)(q42.3;q21.2)/*IRF2BP2::RARA*; t(5;17)(q35.1;q21.2)/*NPM1::RARA*; t(11;17)(q23.2;q21.2)/*ZBTB16::RARA*; inv(17q) cryptique ou del(17)(q21.2q21.2)/*STAT5B::RARA, STAT3::RARA*; et autres gènes rarement réarrangés avec *RARA:TBL1XR1* (3q26.3), *FIP1L1* (4q12), *BCOR* (Xp11.4).

\$ Incluant les LAM avec t(4;11)(q21.3;q23.3) / *AFF1::KMT2A#*; t(6;11)(q27;q23.3) / *AFDN::KMT2A*; t(10;11)(p12.3;q23.3) / *MLLT10::KMT2A*; t(10;11)(q21.3;q23.3) / *TET1::KMT2A*; t(11;19)(q23.3; p13.1) / *KMT2A::ELL*; t(11;19)(q23.3;p13.3) / *KMT2A::MLLT1* (essentiellement chez le nouveau-né et l'enfant).

Incluant les LAM t(2;3)(p11~23;q26.2)/*MECOM::?*; t(3;8)(q26.2;q24.2)/*MYC, MECOM*; t(3;12)(q26.2;p13.2)/*ETV6::MECOM*; t(3;21)(q26.2;q22.1)/*MECOM::RUNX1*

§ La catégorie des SMD/LAM ne doit pas être utilisée pour les LAM avec *BCR::ABL1* en raison d'un recouvrement avec la LMC (leucémie myéloïde chronique) en progression

% Table des autres rares translocations récurrentes selon la classification ICC 2022

Tableau 5 : LAM avec translocations récurrentes rares selon la classification ICC 2022.

| LAM avec translocations récurrentes rares selon la classification ICC 2022 | |
|---|------------------------|
| LAM avec t(1;3)(p36.3;q21.3) | <i>PRDM16::RPN1</i> |
| LAM avec t(3;5)(q25.3;q35.1) | <i>NPM1::MLF1</i> |
| LAM avec t(8;16)(p11.2;p13.3) | <i>KAT6A::CREBBP</i> |
| LAM mégacaryoblastique avec t(1;22)(p13.3;q13.1) | <i>RBM15::MRTFA*</i> |
| LAM avec t(5;11)(q35.2;p15.4) | <i>NUP98::NSD1*</i> |
| LAM avec t(11;12)(p15.4;p13.3) | <i>NUP98::KMD5A*</i> |
| LAM avec NUP98 et autres partenaires* | |
| LAM avec t(7;12)(q36.3;p13.2) | <i>ETV6::MNX1*</i> |
| LAM avec t(10;11)(p12.3;q14.2) | <i>PICALM::MLLT10</i> |
| LAM avec t(16;21)(p11.2;q22.2) | <i>FUS::ERG</i> |
| LAM avec t(16;21)(q24.3;q22.1) | <i>RUNX1::CBFA2T3</i> |
| LAM avec inv(16)(p13.3q24.3) | <i>CBFA2T3::GLIS2*</i> |

*(essentiellement chez le nouveau-né et l'enfant).

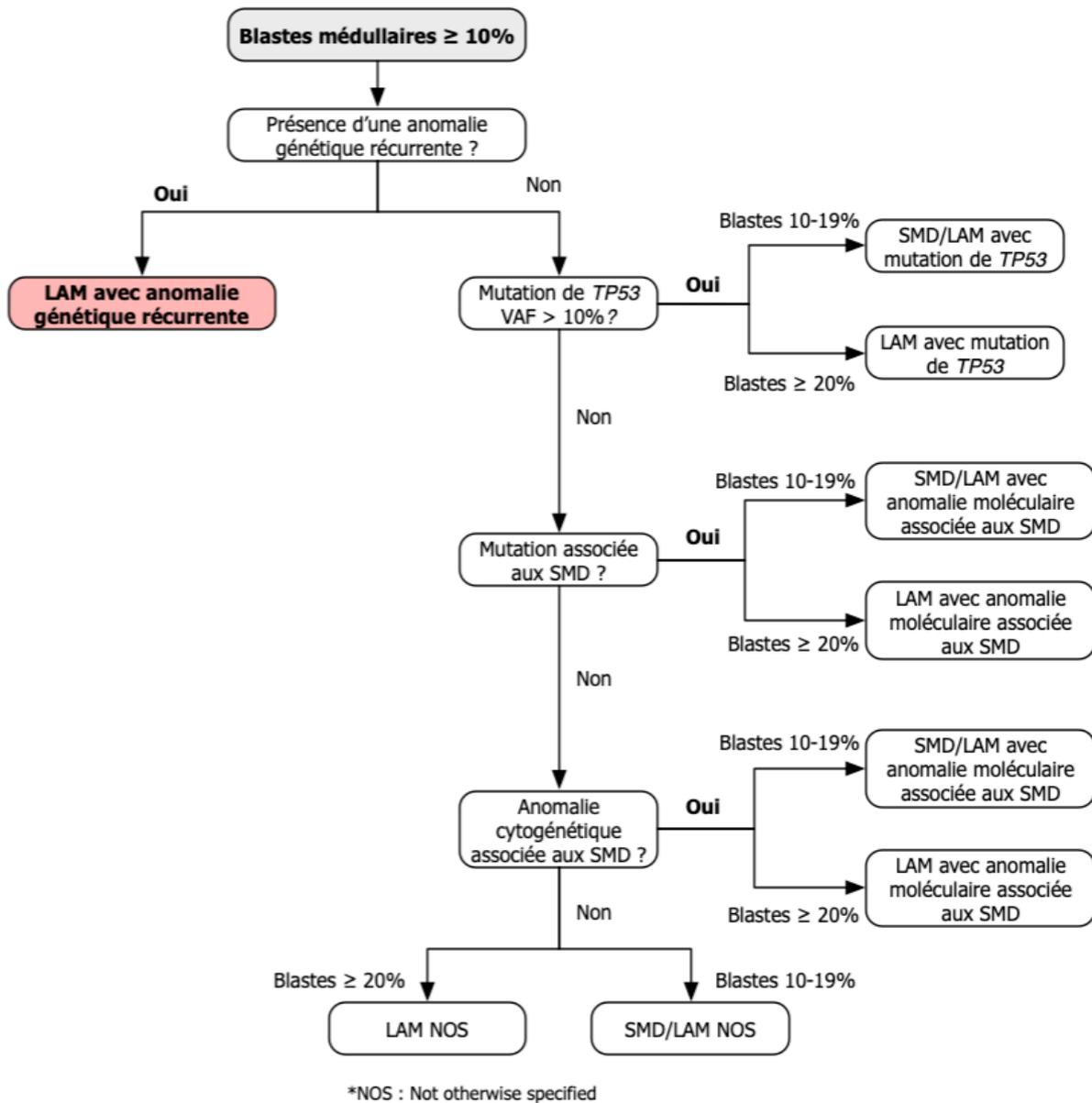


Figure 8 : Arbre décisionnel pour le diagnostic de LAM selon la classification ICC 2022.

Le diagnostic et la classification des LAM se sont complexifiés en 2022 avec les nouvelles propositions de la 5ème édition de l'OMS et de l'ICC, mettant en lumière quelques points de divergence. Ces deux systèmes mettent l'accent sur l'intégration des données génomiques et se sont attachés à définir plus finement les sous-groupes de LAM de manière à proposer la prise en charge la plus adaptée, voire individualisée.

Le changement le plus notable est le pourcentage de blastes pour poser un diagnostic de LAM puisque le seuil de 20% de blastes n'est plus exigé pour toutes les entités définies par anomalies génétiques répertoriées dans le **Tableau 3** (à l'exception de la LAM avec transcrite de fusion *BCR::ABL1* et de la LAM avec mutation *CEBPA*). En effet, malgré un taux de blastes

initialement < 20%, ces patients évolueront rapidement vers une LAM en l'absence de traitement intensif (93). Cette modification de seuil permet également d'ouvrir une option d'éligibilité pour des essais cliniques destinés aux LAM (2). La classification OMS 2016 a introduit l'entité des AML-MRC (*Myelodysplasia Related Changes*) : LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies. Celle-ci est désormais renommée AML-MR (*Myelodysplasia Related*) dans la dernière édition de l'OMS 2022 et séparée en deux catégories dans l'ICC 2022 en fonction d'anomalies cytogénétiques ou moléculaires (**Tableau 4**). Les deux classifications s'accordent sur un seuil $\geq 20\%$ de blastes pour définir cette catégorie et suppriment l'analyse morphologique de la dysplasie comme pré-requis au diagnostic. L'ICC 2022 introduit également une nouvelle catégorie de SMD/LAM (remplaçant les SMD avec excès de blastes de type 2, dans l'OMS 2016) pour les patients avec 10 à 19% de blastes, permettant aux patients de ce groupe de pouvoir participer aux essais cliniques sur les SMD ou la LAM en fonction des critères d'inclusion (94). Les critères de classification de cette catégorie sont identiques à ceux de la LAM avec plus de 20% de blastes (**Figure 8**). En revanche, la classification OMS 2022 continue d'intégrer ces patients en MDS-IB2 (*Increased blasts*, terme modifié par rapport aux SMD avec excès de blastes) pour éviter un surtraitement. Il reste toutefois possible de considérer un MDS-IB2 comme une LAM dans une optique thérapeutique.

Près de deux décennies après l'introduction de la première classification OMS, l'arrivée de deux classifications distinctes va à l'encontre de la nécessité d'une terminologie commune, essentielle à la compréhension et la communication entre cliniciens et biologistes, le tout dans l'intérêt de la prise en charge des patients. Une harmonisation au sein des groupes d'experts et des mises à jour seront nécessaires dans un futur proche afin d'aboutir à une classification plus consensuelle.

d) Facteurs pronostiques

L'évolution des techniques de biologie a permis de mieux appréhender et caractériser l'hétérogénéité des LAM d'un point de vue phénotypique (cytométrie en flux) mais surtout moléculaire où peuvent s'associer plusieurs anomalies à potentiel oncogénique (facteurs de transcription, voies de signalisation, régulation épigénétique...), avec en moyenne cinq mutations somatiques chez un patient atteint de LAM (86). L'association de ces anomalies cytogénétiques et moléculaires, de l'âge et de la réponse au traitement sont actuellement les principaux facteurs pronostiques (87, 88).

À l'exception de rares sous-types comme la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP), caractérisée par la présence d'une translocation chromosomique t(15;17) et bénéficiant d'une prise en charge spécifique (acide tout-trans-rétinoïque et trioxyde d'arsenic), les LAM sont de pronostic souvent médiocre. En effet, si le taux de survie globale est excellent dans le sous-groupe des LAP (99% à 2 ans) (95), il n'est que de 21% à 5 ans pour les autres, en raison d'une fréquence élevée de rechutes (96). Ce taux de survie varie également selon l'âge des patients et il est particulièrement mauvais (<10% à 5 ans) chez les sujets de plus de 65 ans, qui représentent plus de la moitié des patients (96).

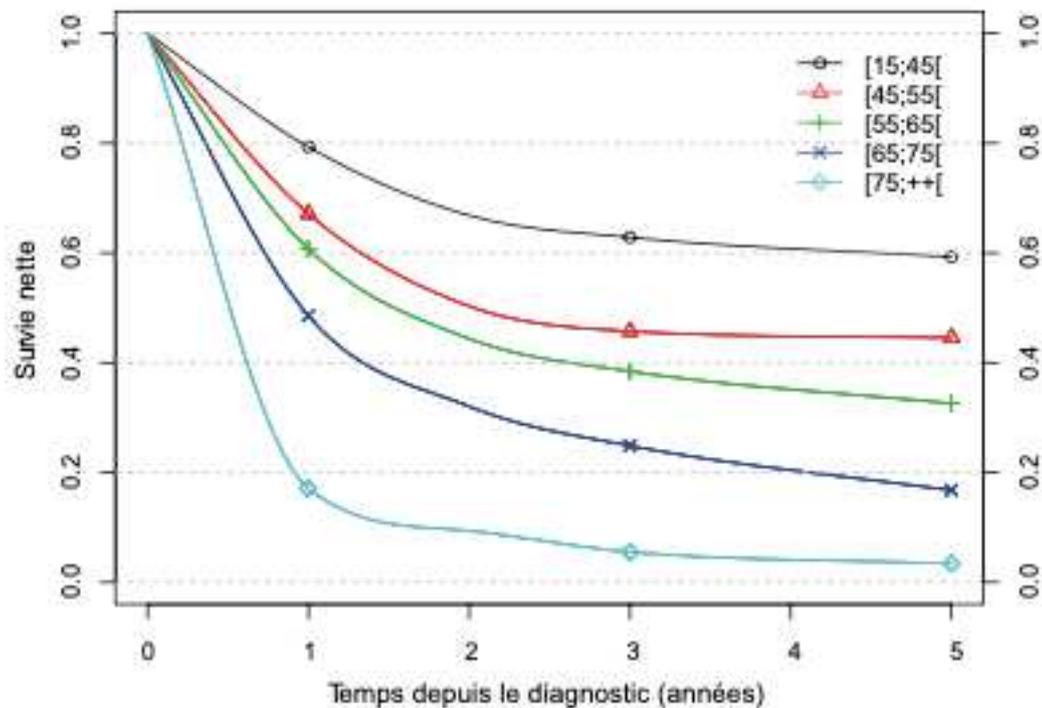


Figure 9 : Survie nette des patients atteints de LAM selon l'âge et en fonction du temps depuis le diagnostic selon Monnereau et al. (96).

Le mauvais pronostic global des LAM est dû à la fréquence élevée des rechutes de la maladie après une période de rémission complète. Ces rechutes sont causées par la persistance des CSL peu ou insensibles à la chimiothérapie conventionnelle. Le développement de thérapies permettant de cibler ces CSL est donc un enjeu majeur dans cette pathologie, comme cela a été démontré avec succès dans le sous-groupe de LAM *PML-RAR-α* où l'association de deux thérapies ciblées (acide tout-trans rétinoïque et trioxyde d'arsenic) permet l'éradication des CSL (95).

e) Classification ELN

Depuis 2010, la stratification du pronostic des patients repose sur les recommandations de l'ELN (*European Leukemia Net*), un groupe coopérateur constitué d'experts à l'échelle internationale. Ces recommandations concernent le diagnostic mais surtout la prise en charge thérapeutique des LAM avec une stratification des patients selon trois groupes de risque sur la base de critères cytogénétiques et moléculaires : risque favorable, intermédiaire ou défavorable. Cette nouvelle classification met en lumière l'impact pronostique de certaines mutations de gènes ou anomalies génétiques retrouvées au diagnostic, à la fois sur la réponse primaire au traitement mais aussi sur le risque de rechute. La classification pronostique de l'ELN a été révisée en 2017 et 2022.

La version révisée en 2022 (**Tableau 6**) a introduit plusieurs modifications, parmi lesquelles il n'est plus nécessaire de calculer le ratio allélique de la forme *FLT3* mutée par rapport à la forme sauvage en raison d'un manque de standardisation des tests. Par ailleurs, toutes les LAM mutées *FLT3-ITD* relèvent désormais de la catégorie de risque intermédiaire indépendamment de la présence de la mutation de *NPM1*. En effet, les résultats de l'essai RATIFY ont confirmé la supériorité de l'association avec une thérapie ciblant *FLT3* (midostaurine) dès lors que la mutation de *FLT3* était présente (97).

Les LAM avec mutations associées aux syndromes myélodysplasiques présentent un pronostic défavorable. En plus des mutations d'*ASXL1* et/ou de *RUNX1* déjà présentes dans l'ELN 2017, la dernière version révisée intègre désormais les variants pathologiques d'au moins l'un des gènes suivants : *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ou *ZRSR2*.

Un autre changement notable concerne la prédominance de l'impact d'une anomalie cytogénétique à risque défavorable par rapport à l'effet bénéfique associé à la présence de la mutation de *NPM1*. Les résultats d'une méta-analyse ont montré que ces patients présentaient des taux de rémission plus bas, une survie globale à 5 ans inférieure, ainsi qu'une incidence cumulée de rechute plus élevée (98).

Enfin, de nouvelles anomalies cytogénétiques récurrentes définissant la LAM sont intégrées dans le groupe à risque défavorable : $t(3q26.2;v)$ impliquant le gène *MECOM* ou $t(8;16)(p11.2;p13.3)$ associée avec la fusion du gène *KAT6A::CREBBP*.

Enfin, les caryotypes hyperdiploïdes caractérisés par la présence de multiples trisomies (ou polysomies) ne sont plus à considérer comme des caryotypes complexes à risque défavorable.

Tableau 6 : Classification pronostique génétique au diagnostic (ELN 2022), d'après Döhner et al. (99).

| Catégorie de risque | Anomalies génétiques |
|----------------------|---|
| Favorable | t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> & inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> Mutation de <i>NPM1</i> § sans <i>FLT3-ITD</i> Mutation de <i>CEBPα</i> dans le domaine bZIP\$ |
| Intermédiaire | Mutation de <i>NPM1</i> § avec <i>FLT3-ITD</i> NPM1 sauvage avec <i>FLT3-ITD</i> t(9 ;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> ✕ Anomalies cytogénétiques non classées dans les groupes favorable ou défavorable |
| Défavorable | t(6;9)(p23;q34)/ <i>DEK::NUP214</i> t(v;11)(v;q23.3)/ <i>KMT2A</i> réarrangé t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11;p13)/ <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> t(3q26.2;v)/ <i>MECOM(EVI1)</i> réarrangé -5 ou del(5q); -7; -17/anomalie (17p) Caryotype complexe* Caryotype monosomique** Mutation d' <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ou ZRSR2</i> # Mutation de <i>TP53</i> ## |

&La mutation conjointe des gènes *KIT* et/ou *FLT3* ne modifie pas la catégorisation du risque

§L'association à des anomalies cytogénétiques à risque défavorable est catégorisée comme à risque défavorable.

\$Seules les mutations affectant la région « *basic leucine zipper* » (bZIP) de *CEBPα*, qu'elles soient sous la forme de mutations mono-alléliques ou bialléliques, ont été associées à un risque favorable

✕Hors duplication partielle en tandem (PTD).

*3 anomalies chromosomiques excluant les anomalies récurrentes suivantes, t(8;21), inv(16), t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3), t(3;3); t(9;22) ou les caryotypes hyperdiploïdes

**monosomie autosomique associée avec au moins une monosomie supplémentaire ou anomalie chromosomique non CBF

#Pour l'instant, ces marqueurs ne doivent pas être utilisés comme marqueurs pronostiques défavorables s'ils coexistent avec des sous-types de LAM à risque favorable.

##Mutation *TP53* avec un ratio allélique d'au moins 10%, quel que soit le statut allélique de *TP53* (mutation mono ou biallélique). Les mutations *TP53* sont significativement associées aux LAM à caryotype complexe et monosomique.

f) Impact pronostique de la maladie résiduelle

Le suivi de la maladie résiduelle (MRD ou *Measurable Residual Disease*) constitue un facteur pronostique post-thérapeutique indépendant (100-102), permettant d'identifier des cellules leucémiques résiduelles avec une sensibilité supérieure à celle de l'examen morphologique retenu pour la définition de la rémission complète (5.10^{-2}). La MRD constitue un biomarqueur d'intérêt majeur pour évaluer la réponse au traitement, adapter la stratégie thérapeutique et détecter plus précocement l'apparition d'une rechute.

Les techniques les plus fréquemment réalisées en pratique courante pour le suivi de la MRD sont la cytométrie en flux (CMF) et les techniques moléculaires comprenant la PCR quantitative (qPCR, *real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction*), la PCR digitale (dPCR) et le NGS (Next Generation Sequencing) avec des sensibilités de détection allant de 10^{-3} à 10^{-6} (**Figure 10**). Les techniques de PCR quantitatives offrent les meilleures sensibilités de détection (10^{-5} à 10^{-6}) mais se limitent aux mutations de *NPM1* et aux transcrits de fusion *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11* ou *PML::RARA*.

Le suivi de la MRD par CMF repose soit sur la méthode LAIP (*Leukemia Associated Immunophenotypes*) par analyse de l'expression aberrante d'antigènes par les blastes au diagnostic, soit sur la méthode DfN (*Different from Normal*) par mise en évidence de profils de différenciation ou de maturation aberrants lors du suivi par rapport à des moelles normales. Bien que moins sensibles, ces deux stratégies d'analyse employées en CMF offrent une applicabilité à près de 90% des patients (103).

Le suivi de la MRD en NGS permet de détecter des mutations dans près de 85% des LAM selon le panel de gènes utilisé (104), avec un seuil de positivité provisoirement défini par une

fréquence allélique supérieure à 0,1 % (10^{-3}). Les dernières recommandations de l'ELN proposent un panel de 23 gènes myéloïdes pour l'évaluation de la MRD moléculaire (78).

Toutes les mutations détectées par NGS peuvent être utilisées comme marqueur de MRD à l'exception des mutations « DTA » (*DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*) associées à une CHIP et sans impact pronostique (105). Les mutations dans les gènes des voies de signalisation (par exemple, *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS* et autres) représentent très probablement une LAM résiduelle lorsqu'elles sont détectées, mais elles sont souvent subclonales et ont une faible valeur prédictive négative (106). Il est ainsi recommandé d'utiliser ces mutations en combinaison avec d'autres marqueurs de la MRD telles que la CMF.

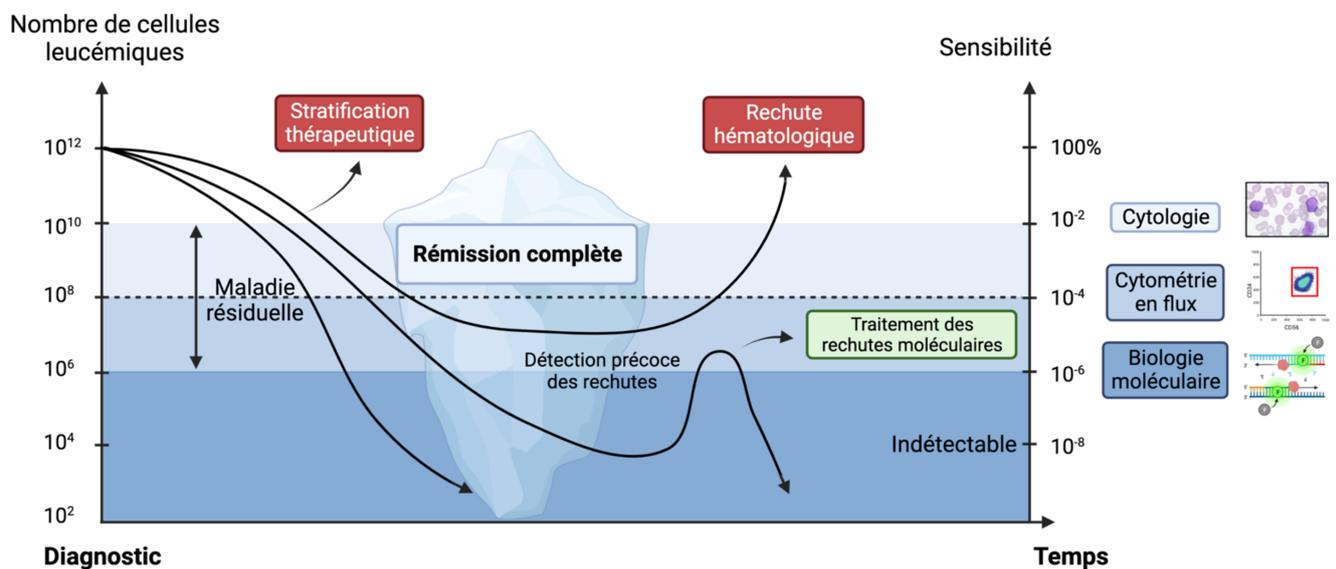


Figure 10 : Recommandations actuelles de l'ELN sur la réalisation de la maladie résiduelle dans les LAM (78).

En 2018, l'ELN a complété la définition de la rémission complète par l'ajout d'un marqueur de maladie résiduelle indétectable qu'elle soit phénotypique ou moléculaire : la rémission complète avec MRD négative (RC MRD-) définit un biomarqueur d'intérêt sur plusieurs points de suivi (107) (**Figure 11**).

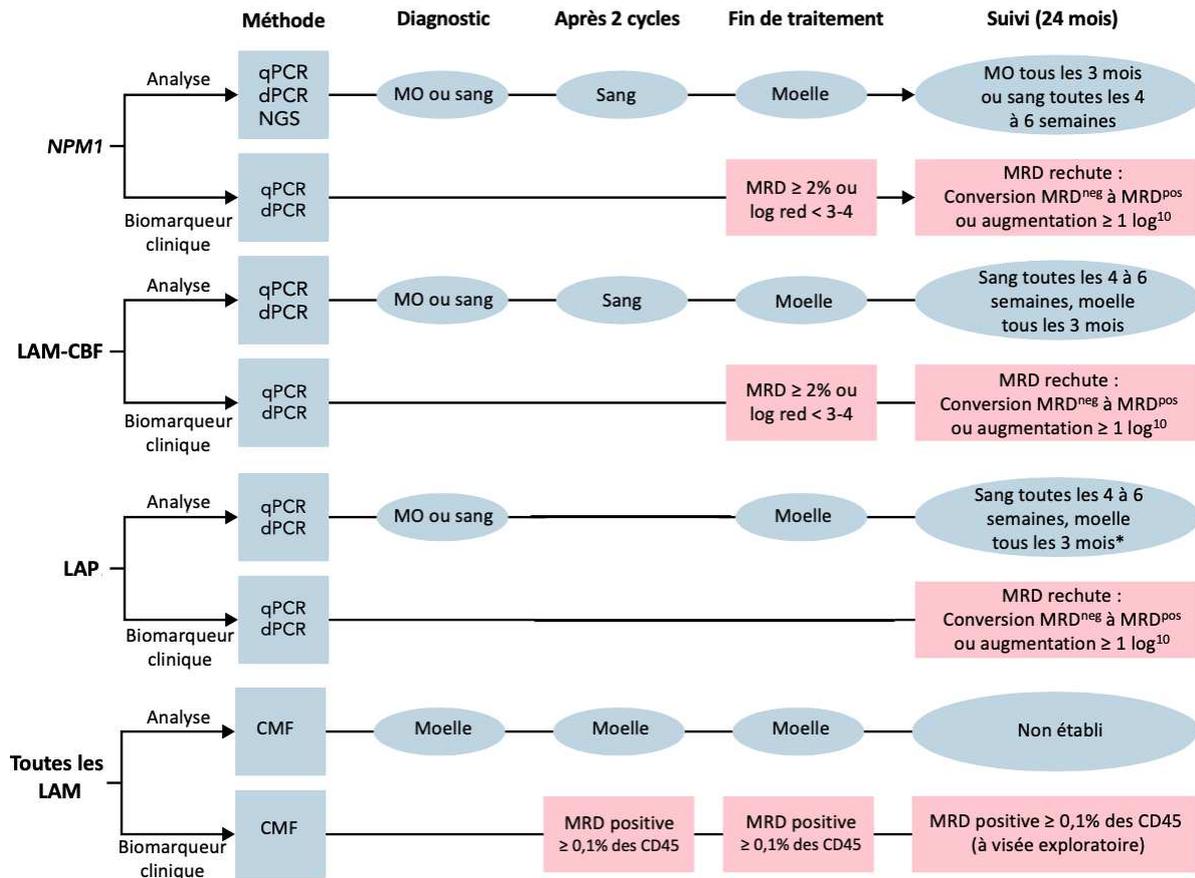


Figure 11 : Algorithme d'évaluation de la MRD selon la technique et sa pertinence selon les points de suivi d'après les recommandations de l'ELN (78, 99).

Les ovals bleus indiquent le type d'échantillon à privilégier en fonction du point de suivi de la MRD. Les carrés roses indiquent le(s) point(s) de suivi où le traitement peut être modifié sur la base du résultat de la MRD. Par exemple, si la MRD moléculaire par qPCR est positive supérieure ou égale à 2 % ou si les taux de transcrits n'ont pas diminué d'au moins 3 à 4 log après la fin de la consolidation, un changement thérapeutique peut être envisagé.

*Uniquement pour les LAP à haut risque.

Abréviations : CMF : cytométrie en flux par méthode LAIP ou DfN ; dPCR : digital Polymerase Chain Reaction ; log red : log réduction ; MO : moelle osseuse ; NGS : Next-Generation Sequencing ; qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction.

1.5 Prise en charge thérapeutique

a) Traitement conventionnel

Un des progrès thérapeutiques majeurs dans les LAM a concerné un sous-groupe particulier de LAM, la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP, 5-10% des LAM (108)) porteur de l'anomalie moléculaire *PML-RAR α* produit de la translocation t(15;17)(q24;q21). Dans ce sous-groupe, l'association de deux thérapies ciblées, l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) qui lie *RAR α* et le trioxyde d'arsenic, a permis d'obtenir chez les patients sans facteur de risque défavorable, un taux de rémission complète et une survie globale supérieurs à ceux obtenus avec l'association ATRA-chimiothérapie conventionnelle (95) grâce à leur action synergique permettant d'éliminer les CIL (109). Cette approche a marqué une avancée majeure dans le traitement de cette forme spécifique de LAM, la classant ainsi dans une catégorie à part entière.

Traitement d'induction

En dehors des LAP, le traitement standard actuel des LAM du sujet jeune (< 65 ans, sans comorbidité) repose sur l'association d'une anthracycline (daunorubicine ou idarubicine) pendant 3 jours et d'un analogue des bases pyrimidiques (cytarabine) pendant 7 jours (schéma « 3+7 »). Ce traitement hautement toxique et non spécifique des cellules leucémiques n'a été que peu modifié depuis sa première description dans les années 1970 (110). Ce traitement d'induction a pour objectif d'obtenir une rémission complète, qui est atteinte dans 60 à 80% des cas selon les cohortes (111). Malgré la grande hétérogénéité des LAM, le choix du traitement de première ligne des LAM non promyélocytaires est peu influencé par les différentes anomalies moléculaires. Des études randomisées ont toutefois démontré la supériorité de l'association du traitement standard avec une thérapie ciblée en termes de survie sans évènement et de survie globale.

En effet, l'association du traitement d'induction avec la midostaurine, un inhibiteur de tyrosine kinase est désormais un standard pour les patients avec mutation *FLT3-ITD* ou *FLT3-TKD*. Cette combinaison permettait d'atteindre une survie globale à 4 ans de 51,4% contre 44,3% et un prolongement de la survie médiane de 25,6 à 74,5 mois par rapport au bras standard dans une cohorte de patients jeunes âgés de 18 à 59 ans (97).

Le gemtuzumab-ozogamicine (GO) est un anticorps IgG monoclonal anti-CD33 humanisé chimiquement conjugué à la calichéamicine, un puissant agent cytotoxique. Après fixation sur son antigène cible, cet immunoconjugué est internalisé et délivre directement la calichéamicine dans la cellule cible et induit des cassures double brin de la molécule d'ADN conduisant à l'arrêt de la réplication et à la mort cellulaire. Une étude randomisée a démontré que de l'adjonction de GO à l'induction par rapport au bras standard, conférait un bénéfice en termes de survie sans événement et globale chez les patients âgés de 50 à 70 ans présentant une LAM *de novo*, avec un bénéfice pour les patients aux maladies à risque cytogénétique favorable (notamment les LAM-CBF (112)) ou intermédiaire (113, 114). Bien que le taux de réponse complète fût superposable dans les deux groupes, l'adjonction de GO à l'induction conférait un bénéfice à deux ans sur la survie sans événement (40,8% contre 17,1%), la survie sans rechute (50,3% contre 22,7%) et la survie globale (53,2% contre 41,9%) (113).

Traitement de consolidation

Le choix de la stratégie de consolidation est guidé par le risque de rechute qui dépend de facteurs pré-thérapeutiques définis par la classification pronostique de l'ELN mais également de la réponse au traitement évaluée par la MRD.

La consolidation par une allogreffe de CSH (HSCT: *Hematopoietic stem cell transplant*) lorsque l'état du patient le permet, reste l'option de choix pour les patients dont le risque de rechute est estimé à plus de 35-40%. Il s'agit notamment de patients avec une maladie de pronostic intermédiaire ou défavorable ou favorable avec persistance d'une MRD positive (99, 115). Étant donné le surrisque de morbi-mortalité associé à l'allogreffe de CSH, la décision dépendra de la balance/risque entre le risque de rechute et les complications liées à l'allogreffe.

Concernant les patients avec un pronostic favorable, le traitement de consolidation repose sur de la cytarabine à dose intermédiaire (1000 à 1500 mg/m²) ou à forte dose (3000 mg/m²) (116).

b) Traitement des LAM du sujet âgé ou « unfit »

Compte-tenu de l'âge médian au diagnostic et des comorbidités des patients, près de 30% ne seront pas éligibles à la chimiothérapie intensive du fait de sa forte toxicité et d'une balance bénéfice/risque défavorable. Le développement de stratégies non intensives basées sur des

thérapies ciblées et peu toxiques est donc également nécessaire afin de traiter efficacement les patients plus âgés et les plus fragiles.

L'essor de nouvelles technologies de séquençage ces dernières années a permis de mieux caractériser les anomalies moléculaires des LAM et leur implication dans la physiopathologie mais également d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques comme en témoigne le nombre croissant de molécules approuvées par l'agence américaine du médicament (**Figure 12**).

Ces nouvelles molécules offrent de nouvelles options et combinaisons thérapeutiques, en particulier pour les patients « *unfit* » dont l'âge ou les comorbidités les rendent inéligibles à un traitement intensif.

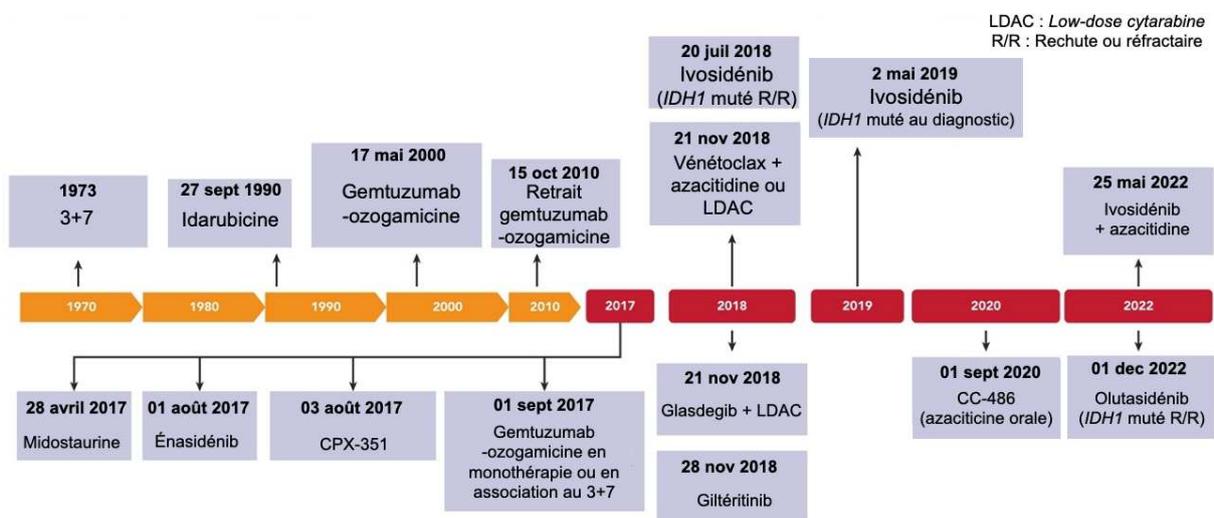


Figure 12 : Évolution des traitements dans les LAM approuvés par la FDA (Food Drug Administration) d'après El Chaer et al. (117).

CPX-351

Le CPX-351 est une formulation liposomale combinant de la cytarabine et de la daunorubicine avec un ratio molaire de 1:5. Cette forme galénique permet la libération contrôlée des deux drogues à une concentration synergique aux cellules leucémiques de la moelle osseuse par absorption active des liposomes dans les vacuoles cytoplasmiques (118). L'utilisation du CPX-351 comparée au traitement d'induction standard (3+7) a montré un net bénéfice sur la survie globale à 3 ans (21% contre 9%) et à 5 ans (18% contre 8%) sur une cohorte de patients âgés de 60 à 75 ans incluant des LAM secondaires aux thérapies, secondaires à un SMD ou des LAM *de novo* présentant des anomalies associées aux SMD (119).

Agents hypométhylants

L'azacitidine, chef de file des agents déméthylants, est un analogue nucléosidique de la cytidine qui agit en tant que qu'antimétabolite après incorporation lors de la synthèse d'ARN et d'ADN. Ce dernier interfère d'une part avec la synthèse protéique et entraîne d'autre part un arrêt du cycle cellulaire. L'azacitidine agit également comme régulateur épigénétique, l'incorporation de l'azacitidine dans l'ADN entraînant une inactivation de l'ADN méthyltransférase (DNMT1) par liaison covalente avec l'enzyme, ce qui conduit à une inhibition irréversible de ses fonctions enzymatiques et une réduction globale de la méthylation de l'ADN des gènes présentant une méthylation aberrante (120). L'azacitidine constitue donc une alternative chez les sujets âgés inéligibles à un traitement intensif. Le bénéfice de l'azacitidine a été évalué sur deux cohortes indépendantes, comparé aux autres traitements conventionnels (cytarabine à faible dose, traitement de support), avec un gain sur la survie globale que le taux de blastes au diagnostic soit inférieur à 30% (121) ou supérieur à 30% (122) et surtout un niveau d'indépendance transfusionnelle supérieur.

Le CC-486, un agent hypométhylant oral dérivé de l'azacitidine permet de maintenir une déméthylation prolongée dans le temps et a démontré son activité en monothérapie dans les SMD/LMMC (leucémie myélomonocytaire chronique) et les LAM (33% et 22% de réponse globale respectivement (123)). Il a aujourd'hui obtenu son autorisation dans le traitement d'entretien des LAM de pronostic intermédiaire ou défavorable, qui ont obtenu une RC ou Rci après une thérapie intensive et qui ne sont pas éligibles à une greffe de CSH. Cependant, il est probable que ses usages notamment en association avec d'autres molécules soient en expansion dans les années à venir.

Nouvelles thérapies ciblées

- **Inhibiteur de tyrosine kinase** : FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase (RTK) impliqué dans la signalisation de fonctions physiologiques comme la survie, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire. Ce récepteur est muté dans environ 25% des LAM de l'adulte (47). Les mutations comprennent la mutation *FLT3-TKD* (*tyrosine kinase domain*), caractérisée par une mutation dans la boucle d'activation du récepteur et la mutation *FLT3-ITD* (*internal tandem duplication*), caractérisée par une duplication dans le domaine juxtamembranaire. Ces deux types de mutation entraînent une activation constitutive de FLT3 et des voies de signalisation en aval (RAS/MAPK, JAK/STAT5 and PI3K/AKT) conférant ainsi un avantage prolifératif et de survie des cellules (124). Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) anti-FLT3 inhibent FLT3 par compétition avec

l'ATP avec à ce jour deux molécules approuvées. La midostaurine, inhibiteur de première génération, agissant sur les deux types de mutation peut être proposée chez tous les patients présentant une LAM avec mutation de *FLT3* mais limitant l'indication aux patients éligibles à un traitement d'induction. Le giltéritinib, inhibiteur de seconde génération plus spécifique, est également un inhibiteur d'AXL, un autre RTK impliqué dans la résistance aux chimiothérapies conventionnelles dans de nombreux modèles de cancers, sujet que nous développerons dans le chapitre III. Il est quant à lui proposé en monothérapie chez les patients atteints de LAM avec une mutation de *FLT3* en rechute ou réfractaire. Cette indication est basée sur les résultats d'une étude randomisée de phase III qui a montré un gain médian de 3,7 mois en survie globale comparé à la chimiothérapie de rattrapage (125).

- **Inhibiteur de protéine anti-apoptotique** : Les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) telles que BCL2, BCL-XL ou MCL-1 inhibent l'apoptose en séquestrant les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak ainsi que les BH3 only (Bim, Bid, ou encore Puma), dans leur poche hydrophobe formée par les domaines BH1, BH2 et BH3.

Cette inhibition favorise ainsi la survie cellulaire et la chimiorésistance. La surexpression de ces protéines dans les LAM a été associée à des taux de réponse réduits, à une rechute précoce et à une survie globale moindre (126, 127). Le vénétoclax (ABT-199) est un BH3-mimétique, inhibiteur sélectif de la protéine anti-apoptotique mitochondriale BCL-2 et est capable d'induire l'apoptose *in vitro* à la fois dans les lignées cellulaires de LAM et des cellules primaires de patients mais également dans des modèles *in vivo* de xénogreffes de souris (128). Bien que les résultats en monothérapie aient été modestes sur une étude de phase II (19% de réponse globale) (129), son activité s'est surtout révélée intéressante combinée à d'autres thérapies puisqu'en effet, elle permet de restaurer les mécanismes pro-apoptotiques induits par ces derniers.

Le vénétoclax combiné avec la cytarabine à faible dose (LDAC, *low-dose cytarabine*) a permis d'obtenir 48% de réponse globale contre 13% pour les patients traités avec LDAC seul avec un prolongement de la survie globale de 4,3 mois (8,4 contre 4,1 mois) (130).

Par rapport à l'azacitidine seule, l'ajout du vénétoclax a amélioré la réponse globale (66,4% contre 28,3%) ainsi que la survie globale (14,7 contre 9,6 mois) établissant ainsi une nouvelle référence pour la prise en charge thérapeutique des LAM inéligibles à un traitement intensif (131).

- **Agents différenciants** : Les enzymes isocitrate déshydrogénases 1 et 2 (IDH1 et 2) interviennent dans le cycle de Krebs et catalysent la conversion de l'isocitrate en

α -cétoglutarate dans le cytoplasme et dans la mitochondrie respectivement. Les enzymes IDH mutées acquièrent une néo-activité enzymatique conduisant à la production du 2-hydroxyglutarate. Cet oncométabolite agit comme un inhibiteur compétitif des dioxygénases dépendantes de l' α -cétoglutarate, dont les familles d'enzymes responsables de la déméthylation de l'ADN et des histones comme TET2 entraînant un profil d'hyperméthylation, et un blocage de différenciation des cellules porteuses de la mutation (132, 133). Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* sont retrouvées dans 20 % des LAM au diagnostic (86), et jusqu'à 30 % chez les sujets de plus de 70 ans (134). Deux molécules sont actuellement approuvées pour le traitement des patients présentant une mutation d'*IDH*, l'ivosidénib et l'énasidénib, respectivement inhibiteur d'*IDH1* et d'*IDH2*. Malgré des résultats prometteurs obtenus dans les études de phase I/II en termes de réponse globale (40,3%) chez des patients en rechute ou réfractaire (135), l'étude randomisée de phase 3 n'a pas réussi à démontrer une supériorité de l'énasidénib en monothérapie comparé au traitement standard en ce qui concerne la survie globale (136). De manière similaire, l'ivosidénib a également démontré des résultats encourageants dans une étude de phase I/II chez des patients en rechute/réfractaire en termes de réponse globale (41,6%) avec une durée médiane de réponse de 6,5 mois (137), mais son développement se fait surtout en association avec l'azacitidine chez des patients inéligibles à la chimiothérapie intensive en première ligne. Dans une étude randomisée de phase III, cette combinaison montre un net bénéfice sur la survie globale (24 mois contre 7,9 mois) comparé au bras azacitidine seul (138).

Autres thérapies : La voie *Hedgehog* joue un rôle dans l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules et est suractivée dans les LAM. La protéine transmembranaire SMO (*Smoothened*) joue un rôle dans le maintien des CSL (139) et dans la résistance à la chimiothérapie (140).

Le glasdegib (PF-913) est un inhibiteur oral de la voie *Hedgehog* qui, en se liant à la protéine SMO (141), a montré des résultats encourageants en combinaison avec LDAC chez les patients SMD de haut risque/LAM de plus de 75 ans inéligibles à une chimiothérapie intensive. Les taux de rémission complète étaient de 17 % dans le groupe glasdegib contre 2 % dans le groupe standard avec une amélioration de la médiane de survie globale de 3,9 mois (8,8 contre 4,9 mois) motivant un essai en phase III le combinant soit à la chimiothérapie intensive soit à l'azacitidine (142).

Les progrès récents dans l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ont permis l'approbation de plusieurs nouvelles molécules ces dernières années et en particulier chez les patients les plus fragiles (**Figure 13**).

| | | Traitement de 1 ^{ère} ligne | Entretien | |
|---|------------------------------|--|---------------|----------------------------------|
| Patients éligibles à une chimiothérapie intensive | CBF | Chimiothérapie intensive + GO | | |
| | FLT3 ^{mut} | Chimio intensive + midostaurine | Midostaurine* | |
| | LAM-t, LAM-MR | CPX-351 | | |
| | Autre alternative non ciblée | Chimiothérapie intensive + GO | CC-486** | |
| > 75 ans ou comorbidités | FLT3-ITD | AZA ± inhibiteur FLT3 | | |
| | IDH1 ^{mut} | AZA et/ou ivosidénib | | IDH1 ^{mut} Ivosidénib |
| | IDH2 ^{mut} | AZA et/ou énasidénib | | IDH2 ^{mut} Enasidénib |
| | NPM1 ^{mut} | AZA ou LDAC + vénétoclax | | FLT3 ^{mut} Giltéritinib |
| | Autre alternative non ciblée | AZA ou LDAC + vénétoclax LDAC + glasdegib | | Autre Chimio intensive ± GO |

Figure 13 : Proposition d'algorithme décisionnel concernant le choix thérapeutique des LAM nouvellement diagnostiquées, en rechute ou réfractaire basé sur les caractéristiques du patient et de la LAM adapté d'après C. D. DiNardo et A. H. Wei (143).

*Pour les patients en rémission et ne pouvant bénéficier d'une allogreffe de CSH, un traitement d'entretien peut être envisagé pour les patients présentant une mutation de FLT3. L'efficacité de la midostaurine dans ce contexte n'ayant toutefois pas été prouvée par un essai randomisé. **Le CC-486 pourrait être une option future comme traitement d'entretien pour les patients ≥55 ans en rémission et inéligibles à une allogreffe de CSH.

Abréviations : AZA : Azacitidine ; CBF : Core Binding Factor ; GO : gemtuzumab-ozogamicine ; LAM-MR : LAM associée aux anomalies génomiques des néoplasies myélocytaires ; LAM-t : LAM secondaire aux thérapies ; LDAC : Low-dose cytarabine.

c) Mécanismes de résistance

Bien que les traitements intensifs permettent d'obtenir un taux élevé de rémission complète chez la majorité des patients (54-82% selon les protocoles et les groupes pronostiques (144)), un grand nombre d'entre eux finira par rechuter (145, 146).

L'étude de l'évolution clonale suite au traitement révèle plusieurs modèles de rechute pouvant se manifester soit par la réapparition du clone d'un sous-clone initialement présent ou soit à une nouvelle évolution clonale ayant acquis secondairement de nouvelles mutations suite au traitement de la LAM (147). Ces observations soulignent la plasticité des cellules leucémiques ainsi que leur capacité à évoluer et à s'adapter en réponse aux thérapies. Une meilleure compréhension des mécanismes de résistance constitue un enjeu majeur dans cette pathologie.

De nombreuses données dans la littérature montrent que la chimiorésistance dans la LAM est multifactorielle, passant par une surexpression des pompes d'efflux, une dérégulation des voies de signalisation, des altérations d'expression des gènes de contrôle du cycle cellulaire, la dérégulation des micro-ARN ou encore le rôle central des interactions avec microenvironnement médullaire.

La glycoprotéine P (P-gp) et MRP1 (*Multidrug Resistance Protein 1*) sont des pompes ATP-dépendantes appartenant à la famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*). Ces pompes jouent un rôle central dans la chimiorésistance en exportant activement les xénobiotiques en dehors des cellules, réduisant ainsi l'efficacité du traitement. La surexpression de ces pompes dans les LAM comme biomarqueur (respectivement sur 32% et 38,4% des patients pour P-gp et MRP1) constitue un facteur pronostic défavorable (148).

Les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (BCL-2, MCL-1, MCL-XL) peuvent être surexprimées dans de nombreuses hémopathies dont la LAM. Cette surexpression diminue la sensibilité des cellules leucémiques à l'apoptose, ce qui semble constituer un mécanisme potentiel de résistance aux thérapies (127). Ainsi, la surexpression de MCL-1 est associée à une résistance au vénétoclax et à un pronostic défavorable (149, 150). Étant donné l'hétérogénéité d'expression des protéines BCL-2 dans la LAM, le BH3 *profiling* qui est un test fonctionnel permettant de mesurer la dépendance des cellules leucémiques aux protéines anti-apoptotiques, constitue un biomarqueur intéressant pour prédire leur sensibilité au vénétoclax, mais également à l'azacitidine (151).

Parmi les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées, en particulier aux anti-FLT3, ces mécanismes sont en lien avec la taille et le site de l'ITD ainsi que l'émergence secondaire de clones mutés. Ces mutations au niveau du récepteur peuvent concerner soit la poche de fixation de l'ATP, soit affecter la boucle d'activation du récepteur, empêchant ainsi la fixation de l'ITK (152).

L'activation de voies de signalisation alternatives, telles que SYK (153), PIM (154) ou AXL (46), constitue un mécanisme d'échappement aux thérapies ciblées. Le rôle voie Gas6/AXL dans la résistance aux thérapies fera l'objet d'un développement dans le chapitre III.

Ainsi, ces voies de signalisation dites de « *by-pass* » permettent de maintenir une signalisation oncogénique active et assurent la survie des cellules malgré l'inhibition de l'oncogène *driver* (exemple des LAM *FLT3* muté).

Les microARN sont de petits ARN non codants composés de 19 à 24 nucléotides impliqués dans le contrôle de l'expression de gènes en réprimant la traduction de protéines impliquées

dans de nombreux processus dérégulés dans les LAM et participant *in fine* aux mécanismes de chimiorésistance. Ainsi, la diminution du miR-27a et du miR-181a favorise respectivement la surexpression de pompes d'efflux telles que la glycoprotéine-P et de protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2. À l'inverse, la surexpression du miR-638 peut également réduire la traduction de protéines impliquées dans le cycle cellulaire telles que la kinase CDK2 (*Cyclin-dependent kinase 2*), aboutissant à un ralentissement du cycle, les rendant ainsi moins sensibles aux drogues qui ciblent les cellules en phase de division rapide (155).

Enfin, la chimiorésistance est étroitement liée à la niche hématopoïétique, qui joue un rôle fondamental dans ce processus par le biais de divers mécanismes. Ces mécanismes impliquent soit des facteurs solubles sécrétés par le microenvironnement médullaire, soit des interactions cellulaires directes. Parmi les facteurs solubles, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire C (VEGF-C) protègent les cellules leucémiques de l'apoptose induite par la cytarabine, la daunorubicine ou l'étoposide (156). De la même manière, la liaison de CXCL12 sécrété par le microenvironnement médullaire à son récepteur CXCR4 induit sa phosphorylation et le recrutement de voies de signalisation en aval favorisant la prolifération et la survie telles que les voies MEK/ERK, JAK/STAT ou PI3K/AKT (157). Un acteur clé dans l'interaction directe des cellules leucémiques avec le microenvironnement médullaire est le CD44, glycoprotéine qui agit comme médiateur dans l'adhésion et la migration cellulaire (158). La liaison du CD44 exprimé à la surface des cellules leucémiques avec ses ligands présents dans le microenvironnement médullaire (tels que l'acide hyaluronique dans la niche endostéale (154) ou l'ostéopontine) joue un rôle pivot dans la résistance au vénétoclax en établissant une interaction directe avec l'axe CXCL-12/CXCR4 (159).

L'interaction entre les cellules leucémiques et leur microenvironnement est un processus dynamique. Les cellules leucémiques possèdent également la capacité de transformer la niche en un microenvironnement favorable à leur auto-renouvellement et à leur prolifération en détournant les processus homéostatiques aux dépens de l'hématopoïèse normale. Cette interaction notamment par la sécrétion de facteurs solubles comme les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α) (160), de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, Ang-1, Ang-2) (161) ou d'exosomes qui tendent à appauvrir la niche des cellules stromales et ostéoblastiques, induit un remaniement de la niche et génère ainsi une niche leucémique incapable de soutenir une hématopoïèse normale (37, 162).

Outre les facteurs solubles, les caractéristiques physiques de la niche, telles que l'hypoxie (la pression en oxygène variant de l'ordre de 1% à proximité de la zone péri-sinusoidale et 3%

au niveau des vaisseaux de la zone endostéale (163)) constituent un environnement protecteur pour les cellules leucémiques, maintenant leur quiescence et réduisant leur sensibilité à la cytarabine (164). Un régulateur clé dans cette réponse à l'hypoxie est HIF1 (*Hypoxia inducible factor 1*) qui est un hétérodimère de 2 sous unités (HIF-1 α , HIF-2 α ou HIF-3 α et HIF-1 β) et dont la fixation à l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) présent dans le promoteur de nombreux gènes, permet de réguler leur transcription (165). HIF-1 α joue un rôle fondamental dans la maintenance des CSL et dont l'inhibition pharmacologique restaure la sensibilité aux traitements malgré l'hypoxie, faisant ainsi de HIF-1 α une cible thérapeutique particulièrement intéressante (166). D'autres études restent toutefois nécessaires puisque d'autres études ont révélé qu'au contraire, la suppression de HIF-1 α dans un modèle murin syngénique de LAM (MLL-AF9) favorise la progression tumorale sans affecter le compartiment de CSL après traitement par cytarabine et doxorubicine (167).

Enfin, parmi les facteurs individuels interviennent également la variabilité pharmacocinétique inter-individuelle en raison de polymorphismes affectant les enzymes intervenant dans le métabolisme des principales molécules utilisées pour le traitement d'induction. L'étude de l'impact de 10 polymorphismes différents de gènes impliqués dans le métabolisme de la cytarabine dans une cohorte de 225 LAM *de novo*, montre l'association entre certains variants des gènes activateurs (désoxycytidine kinase) et désactiveurs (cytidine désaminase) avec la réponse au traitement ou la survie globale ajustée selon le risque cytogénétique (168). Plus récemment, la surexpression d'*EPHX1* (*microsomal epoxide hydrolase 1*), codant pour une enzyme de détoxification des époxydes, a été associée à une résistance aux anthracyclines *in vitro*. La surexpression d'*EPHX1* sur une cohorte de 113 LAM *de novo* est associée à un risque de rechute plus élevé et une médiane de survie globale moindre, indépendamment du groupe de risque pronostique (169).

Les mécanismes de résistance aux traitements sont donc multifactoriels, intrinsèques aux cellules leucémiques, mais doivent également intégrer les données inhérentes à l'hôte et au microenvironnement. Dans ce contexte, la CSL ou cellule initiatrice de leucémie (LIC), responsable de la persistance de la maladie et des rechutes en dépit d'une période de rémission complète initiale, constitue une cible idéale en raison de ses propriétés d'auto-renouvellement, de quiescence et de résistance aux chimiothérapies conventionnelles. Le développement de nouvelles thérapies permettant de cibler ces CSL constitue donc un réel enjeu dans les LAM.

2. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ

2.1 Les récepteurs nucléaires PPAR

a) Généralités

Les PPARs (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires dont le premier membre a été purifié et identifié en 1990 à partir du cytoplasme de cellules hépatiques de rongeurs (170, 171) puis chez l'Homme en 1992 dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome (172). Ils tirent leur nom de leur capacité à induire la prolifération des peroxysomes après liaison de certaines molécules telles que le clofibrate et qui s'avèreront par la suite, être des ligands de ce dernier. Par la suite, trois sous-types de récepteurs apparentés ont été clonés chez le xénope et nommés respectivement PPAR- α , PPAR- β et PPAR- γ (173). La séquence de PPAR- δ a été initialement identifiée chez l'Homme en 1992 comme codant un nouvel isotype PPAR, mais elle s'est avérée être étroitement liée à la séquence codant PPAR- β décrit chez le xénope avec 81-86% d'homologie au niveau du domaine de fixation à l'ADN et 71-73% au niveau du domaine de fixation au ligand (172). L'analyse des relations phylogénétiques a révélé que PPAR- β chez le xénope et PPAR- δ humain partagent une origine commune et sont considérés comme des orthologues, d'où l'appellation de « PPAR- β/δ » (174).

Chaque isotype de PPAR (PPAR- α , PPAR- β/δ et PPAR- γ) est codé par un gène distinct : *PPARA* (ou *NR1C1*), *PPARD* (ou *NR1C2*) et *PPARG* (ou *NR1C3*), localisés respectivement sur le chromosome 22 (22q12-q13.1) (175), le chromosome 6 (6p21.1-p21.2) (176) et le chromosome 3 (3p25) (177).

b) Distribution tissulaire

Bien qu'ils partagent un haut degré d'homologie structurelle, ces isotopes diffèrent selon leur distribution tissulaire et leur affinité respective vis-à-vis de leurs ligands, leur conférant ainsi une spécificité récepteur-dépendant de la modulation de l'activité transcriptionnelle.

PPAR- α est exprimé principalement dans les tissus où le catabolisme des acides gras est important, tels que le foie, les reins, le cœur ou le tissu musculaire (178). PPAR- γ est quant à lui hautement exprimé dans le tissu adipeux tandis que PPAR- β/δ est ubiquitaire mais dont le niveau d'expression peut varier d'un tissu à l'autre avec notamment une expression plus élevée dans le gros intestin (178).

c) Fonctions physiologiques

Une fois lié à leur ligand, les PPAR forment des hétérodimères avec les récepteurs X des rétinoïdes (RXR) qui appartiennent également à la famille des récepteurs nucléaires (179). Les hétérodimères PPAR/RXR reconnaissent et se lient à une séquence d'ADN spécifique connue sous d'élément de réponse spécifique PPRE (*PPAR responsive element* ou PPRE) qui consiste en une répétition de six nucléotides (5'AGGTCA n AGGTCA 3') séparés par un seul nucléotide aléatoire (180), situés en 5' dans la région contenant les promoteurs des gènes cibles dont ils régulent la transcription (**Figure 14**).

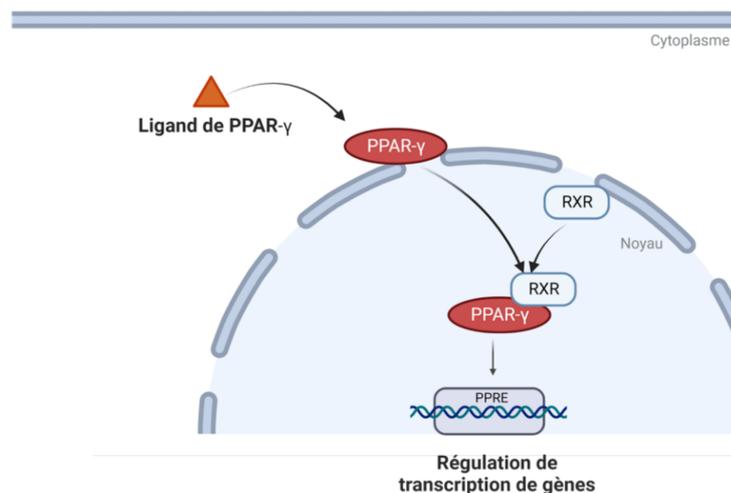


Figure 14 : Mécanisme d'action de PPAR.

L'hétérodimère PPAR/RXR se lie à un PPRE (élément de réponse PPAR) situé dans le promoteur des gènes cibles par l'intermédiaire du domaine C (domaine de liaison à l'ADN) de PPAR et RXR. L'activité du récepteur est régulée par la phosphorylation du domaine A/B et la fixation du ligand par le domaine E/F (domaine de liaison au ligand).

Les trois isotypes de PPAR activent à la fois la transcription de gènes cibles communs, mais également des gènes spécifiques à chaque récepteur selon l'organe. Le PPRE est présent au niveau du promoteur de nombreux gènes qui codent pour des protéines impliquées dans différentes fonctions cellulaires, les plus connues étant le métabolisme lipidique et la sensibilité à l'insuline en raison du potentiel thérapeutique de l'activation de la voie de PPAR dans la correction des anomalies métaboliques dans le diabète de type 2 (181).

Concernant le métabolisme lipidique, PPAR- α et PPAR- β/δ activent tous deux des gènes impliqués dans l'oxydation des lipides (182, 183), tandis que PPAR- γ active des gènes impliqués

dans l'adipogenèse (175) (**Figure 15**). Dans la régulation de l'homéostasie du glucose, l'activation de PPAR- α favorise la néoglucogenèse et diminue la glycolyse (184) tandis que l'activation de PPAR β/δ a un effet inverse en favorisant l'absorption du glucose et le stockage du glycogène hépatique, tout en diminuant la néoglucogenèse (185). Enfin, PPAR- γ favorise l'insulinosécrétion des cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques et favorise la sensibilité des cellules musculaires à l'insuline (186).

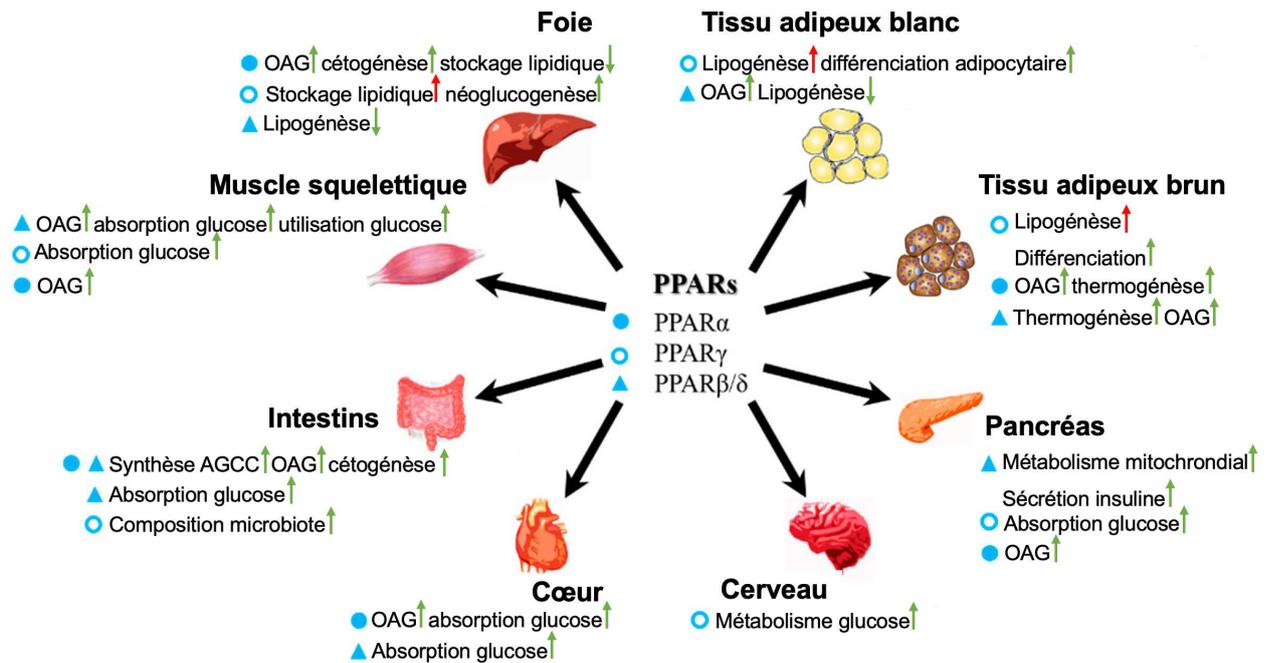


Figure 15 : Rôles des PPAR dans le métabolisme glucido-lipidique d'après Hong et al. (187).

Les trois sous-types de PPAR sont exprimés dans divers organes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique, notamment le foie, les tissus adipeux blanc et brun, le pancréas, le cœur, l'intestin et le muscle squelettique. L'impact de la régulation de PPAR dans les différents tissus sont indiqués par des flèches. Le cercle rempli représente PPAR- α ; le cercle vide représente PPAR- γ ; le triangle représente PPAR- β/δ ; la flèche verte représente un effet bénéfique et la flèche rouge un effet néfaste. Par exemple, PPAR- α est le régulateur principal dans le foie et son activation augmente l'oxydation des acides gras (OAG), induit la cétogénèse et diminue le stockage lipidique.

Les nombreux rôles physiologiques de PPAR- γ ainsi que son application en pathologie seront abordés dans le chapitre dédié à ce dernier.

2.2 Le récepteur nucléaire PPAR- γ

PPAR- γ est l'un des sous-types d'une famille de trois récepteurs nucléaires (PPAR- α , PPAR- β/δ et PPAR- γ) impliqués dans de nombreux processus physiologiques.

Le gène humain *PPARG* (ou *NR1C3*) est localisé sur le bras court du chromosome 3 et comprend 6 exons codants à partir du cadre de lecture ouvert (exons 1-6) (**Figure 16**)

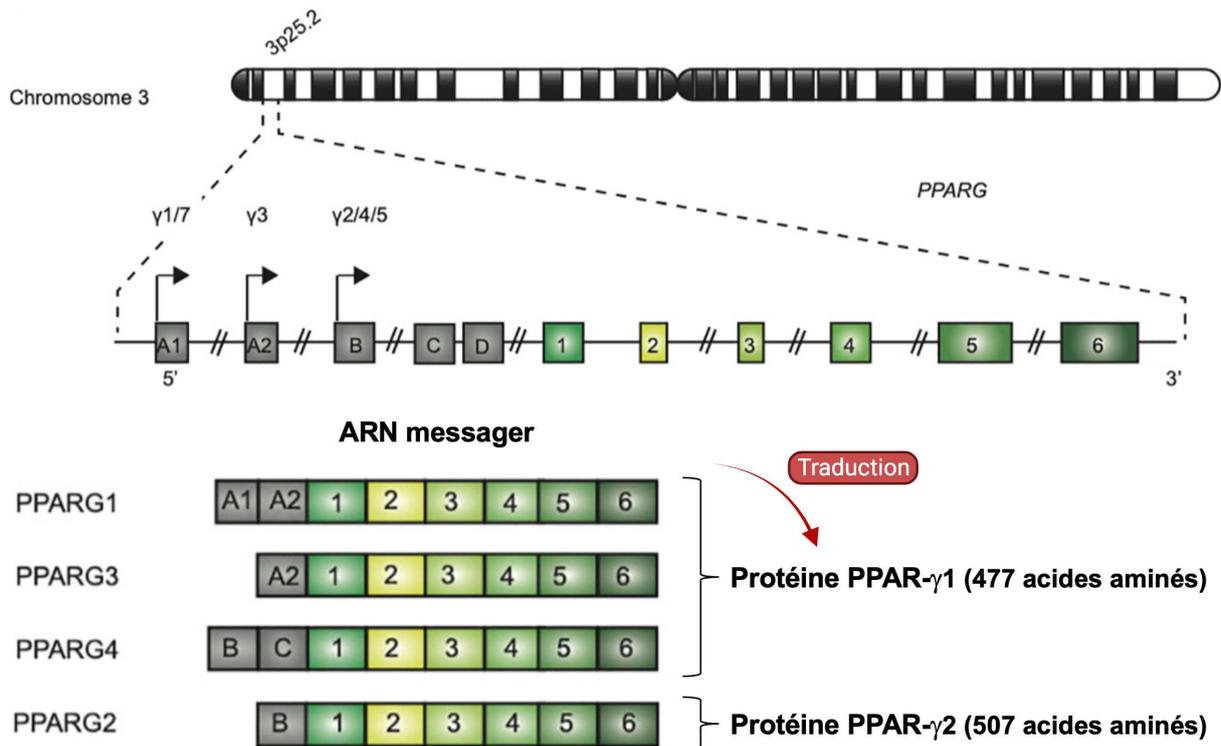


Figure 16 : Organisation du gène *PPARG*, transcription et traduction, adapté d'après Hernandez-Quiles et al.(188).

La présence de plusieurs sites d'initiation de la transcription (A1, A2 ou B) et d'épissage alternatif de *PPARG* conduit à la transcription de quatre ARN messagers : PPARG1, PPARG2, PPARG3 et PPARG4. Les transcrits PPARG1, PPARG3 et PPARG4 codent pour la même protéine PPAR γ 1 (477 acides aminés) tandis que le transcrit PPARG2 code pour la protéine PPAR- γ 2 (507 acides aminés). Il existe ainsi deux isoformes de la protéine PPAR- γ : PPAR- γ 1 et PPAR- γ 2, cette dernière se distinguant par la présence de 30 acides aminés supplémentaires au niveau de l'extrémité N-terminale (189).

Les deux isoformes de PPAR- γ sont hautement exprimées dans le tissu adipeux et plus modestement dans le foie, le cœur et le muscle squelettique. De plus, l'isoforme PPAR- γ 1 est également exprimée dans l'intestin grêle et le rein (178, 190). Concernant le tissu

hématopoïétique, les deux isoformes de PPAR- γ sont exprimées, en particulier dans les cellules immunitaires : monocytes/macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes (191-193).

a) Structure et organisation de PPAR- γ

Le récepteur PPAR- γ est structuré en six domaines fonctionnels (**Figure 17**) :

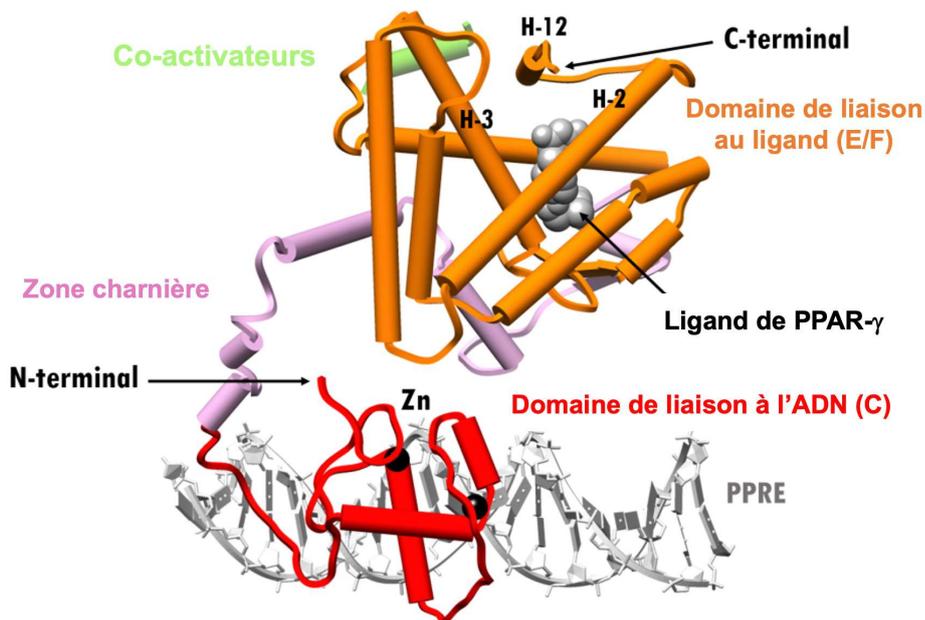
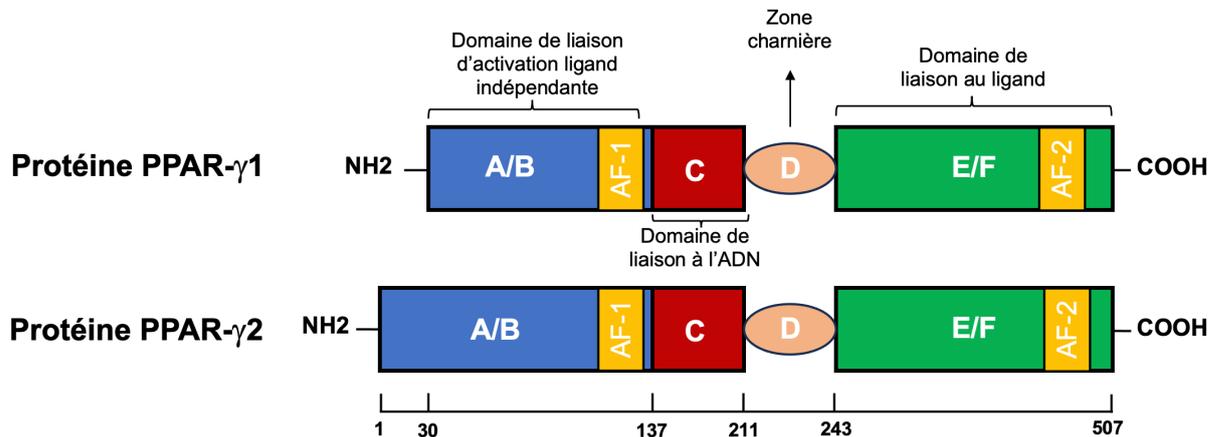


Figure 17 : Organisation et structure du récepteur PPAR- γ .

Le récepteur nucléaire PPAR- γ est organisé en six domaines fonctionnels. Les domaines A/B portent un site de transactivation ligand-indépendant nommé AF-1 (Activating Fonction-1). Le domaine C permet la fixation du récepteur à l'ADN grâce à deux motifs en en doigt de zinc. Le domaine D est la région charnière. Enfin, le domaine E/F assure l'activation du récepteur après de la fixation de son ligand et porte le second site de transactivation nommé AF-2 (Activating Fonction-2) d'après Escher et Whali (194). Structure cristallographique du complexe actif PPAR- γ , RXRa et PPRE (PPAR responsive element), modifié d'après Chandra et al. (195).

- **Domaine A/B** : Ce domaine régulateur codé par l'exon 1 (196) est situé à l'extrémité N-terminale et contient une séquence appelée AF-1 (*Activating fonction-1*) impliquée dans l'activation autonome du récepteur indépendamment du ligand (197). Ce domaine est le site de modifications post-traductionnelles permettant de réguler l'activité transcriptionnelle de PPAR- γ . Le site de phosphorylation a été identifié sur la sérine 112 de PPAR- γ 2 (correspondant à la sérine S82 de PPAR- γ 1), située dans la région AF-1 à l'intérieur d'un site consensus MAPK. La phosphorylation de ce résidu sérine diminue l'activité de PPAR- γ en réduisant à la fois l'affinité de liaison du ligand et l'interaction avec le co-activateur (198). La SUMOylation de PPAR- γ par SUMO1 a été rapportée pour la première fois en 2004. Le site de SUMOylation a été identifié sur la lysine 107 sur PPAR- γ 2 (sérine 77 sur PPAR- γ 1) et agit comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles (199).

- **Domaine C** : Ce domaine codé par les exons 2 et 3 (196) est juxtaposé au domaine AF-1 et hautement conservé notamment au niveau de deux régions appelées boîtes P (proximale) et D (distale). Le domaine C est constitué d'environ 70 acides aminés et contient le domaine de liaison à l'ADN contenant deux motifs en « doigts de zinc », chacun étant constitué d'une séquence d'acides aminés qui forment une boucle autour d'un ion de zinc coordonné avec 4 résidus de cystéine. La boîte (proximale) se trouve à l'extrémité C-terminale du premier doigt de zinc et présente une séquence CEGCKG conservée dans tous les PPAR et impliquée dans la spécificité de reconnaissance du motif hexamérique (AGGTCA) localisé sur le PPRE. La boîte D (distale) localisée entre les deux premières Cys du deuxième doigt de zinc comprend trois acides aminés et intervient dans la dimérisation du domaine. Ces motifs en « doigts de zinc » possèdent également une extension carboxyl-terminale (CTE) contribue à la spécificité de liaison de PPAR aux séquences à l'extrémité 5' du PPRE (194, 200) (**Figure 18**).

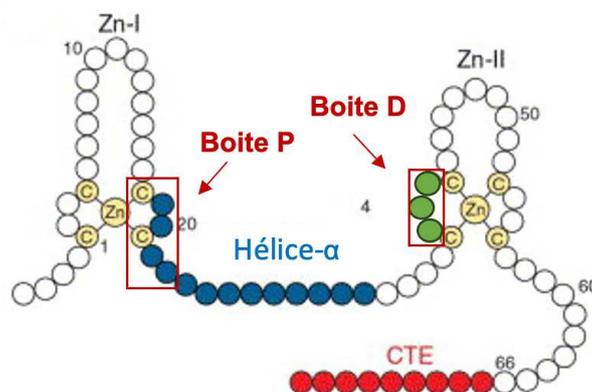


Figure 18 : Domaines de liaison à l'ADN et de liaison au ligand de PPAR, adapté d'après Khorasanizadeh et al. (201).

- **Domaine D** : Ce domaine codé par le 4^{ème} exon (196) est une région charnière flexible permettant de relier le domaine de liaison à l'ADN (domaine C) au domaine de liaison au ligand (domaine E/F). Ce domaine permet au récepteur d'adopter des conformations qui vont faciliter les interactions de ses différents domaines de liaison. La translocation nucléaire des PPAR est médiée par un signal de localisation nucléaire (*Nuclear Localization Signal*) situé dans cette zone charnière et interagit avec ses récepteurs respectifs notamment l'importine α/β (202).

- **Domaine E/F** : Le domaine de liaison au ligand codé par les 5^{ème} et 6^{ème} exon (196) est situé à l'extrémité C-terminale. Le domaine E est le plus grand domaine de PPAR- γ et le second domaine le plus conservé après le domaine de liaison à l'ADN. L'analyse cristallographique montre que la structure tertiaire de ce domaine est composée de 12 hélices α organisées en trois couches antiparallèles et d'un feuillet β à quatre brins. Le site de liaison au ligand est une grande cavité hydrophobe en forme de T qui s'étend de l'hélice C-terminale H12 au feuillet β situé entre les hélices H3 et H6. La grande taille et la composition en acides aminés de cette cavité autorise la liaison d'une grande variété de ligands (203) (**Figure 19**).

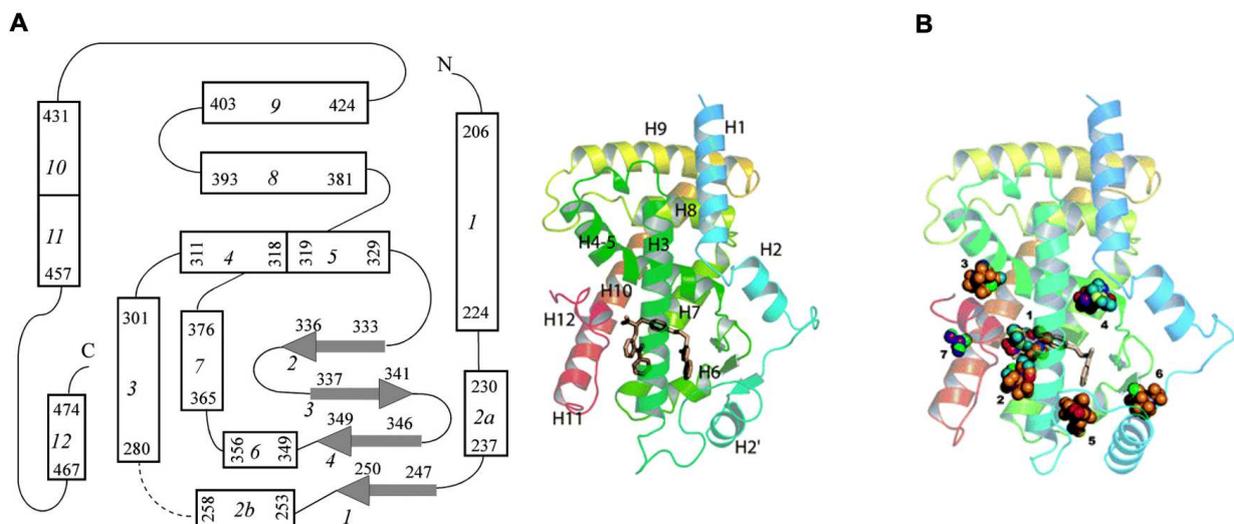
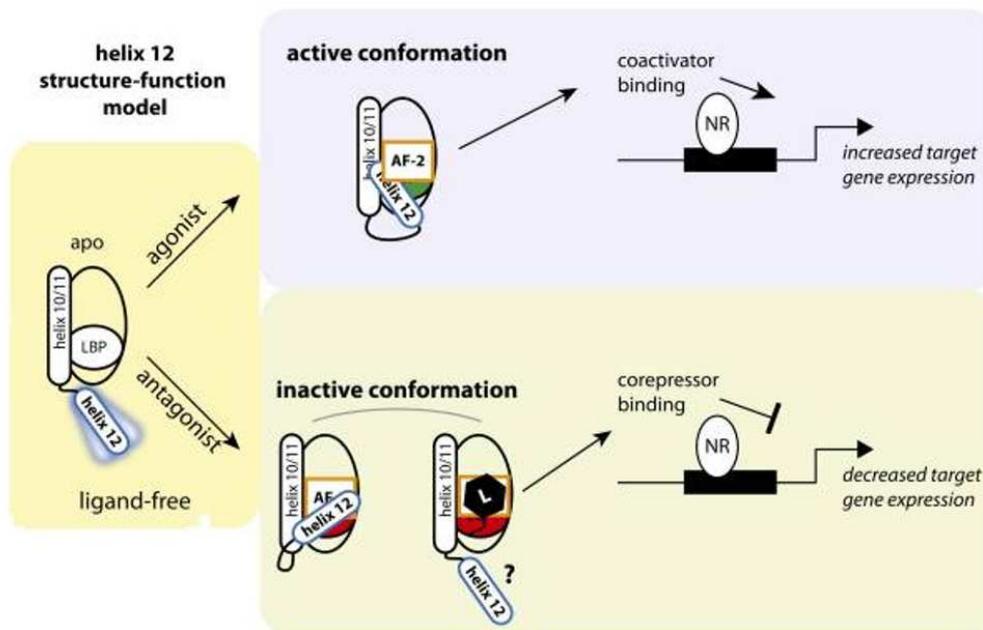


Figure 19 : Structure du domaine de liaison au ligand.

(A) : En représentation bidimensionnelle et cristallographique, cette poche hydrophobe est formée de 13 hélices α , indiquées par des cadres numérotés, ainsi que d'un feuillet β à quatre brins, symbolisés par des flèches numérotées de 1 à 4, d'après Uppenberg et al (204).

(B) Exemple d'une co-cristallisation de la rosiglitazone, un ligand synthétique qui occupe environ 40 % du site de liaison du ligand. Le ligand est dans une conformation en U, s'enroulant autour de H3 avec son anneau benzénique central, les numéros indiquant les principaux sites consensus de liaison, d'après Sheu et al (205).

Outre sa fonction principale de liaison au ligand, ce domaine de liaison offre également une deuxième interface de dimérisation, une surface de liaison aux molécules co-régulatrices et porte le second site de transactivation AF-2 (*Activating Fonction-2*). La liaison du ligand induit un changement conformationnel de l'hélice H12 située à l'extrémité C-terminale et portant le site AF-2. Une fois le complexe stabilisé en position active, AF-2 sert de site de liaison pour les molécules co-activatrices grâce à leur séquence consensus LXXLL (L : Leucine, x : autre acide aminé) et activer la transcription (206) (**Figure 20**).



1) Fixation du ligand (agoniste ou antagoniste) et stabilisation respectivement dans une conformation active ou inactive

2) Recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs permettant de réguler l'expression des gènes cibles selon le promoteur

Figure 20 : Rôle de l'hélice H12 dans la modification conformationnelle de PPAR- γ après fixation de son ligand d'après Kojetin et Burris (207).

Lors de la liaison d'un agoniste, l'hélice H12 change de conformation et recouvre le ligand fixé dans la poche. Le mouvement de l'hélice H12 permet de démasquer AF-2 et facilite la liaison des protéines co-activatrices. Ce récepteur est dans une conformation active et permet la transcription des gènes cibles. À l'inverse, lors de la liaison d'un antagoniste, la surface AF-2 reste masquée, ce qui inhibe la liaison du co-activateur et facilite la liaison du co-répresseur limitant ainsi la transcription des gènes cibles.

Le domaine E/F joue également un rôle essentiel dans l'hétérodimérisation avec son partenaire de liaison, le récepteur X aux rétinoïdes (RXR), (194, 203, 204). Enfin, ce domaine est également un site de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation sur le résidu sérine 273 par Cdk5 (*cyclin-dependent kinase*) qui induit une diminution de l'expression

des gènes codant le CD36, un transporteur d'acides gras ou d'adipokines comme l'adiponectine et la leptine (208).

b) Activation de PPAR- γ

L'activation de ces récepteurs par leurs ligands induit son association sous forme d'hétérodimères avec l'un des trois sous-types de récepteur X de l'acide rétinoïque (RXR- α , RXR- β et RXR- γ), l'hétérodimère ayant une affinité variable avec le PPRE selon le partenaire (209, 210). Les RXR sont des facteurs de transcription qui agissent comme des co-régulateurs et dont l'association avec PPAR a été décrite la première fois après avoir été activés par leur ligand, l'acide 9-cis rétinoïque (179). L'hétérodimère PPAR γ -RXR se fixe aux PPRE situés en 5' dans la région contenant les promoteurs des gènes cibles dont ils régulent la transcription. Le PPRE est formé par la répétition directe d'un motif hexamérique de reconnaissance des récepteurs nucléaires (DR ou *Direct Repeat*) séparé par un seul nucléotide aléatoire (DR-1) (5'AGGTCA n AGGTCA 3'), chaque motif hexamérique étant appelé « demi-site ». Ainsi, PPAR- γ et RXR se fixent respectivement sur les parties 5' et 3' des demi-sites (180).

PPAR-RXR est un hétérodimère dit permissif pouvant être activé à la fois par les ligands de PPAR mais également les ligands de RXR grâce à une communication allostérique interdomaine (**Figure 21**).

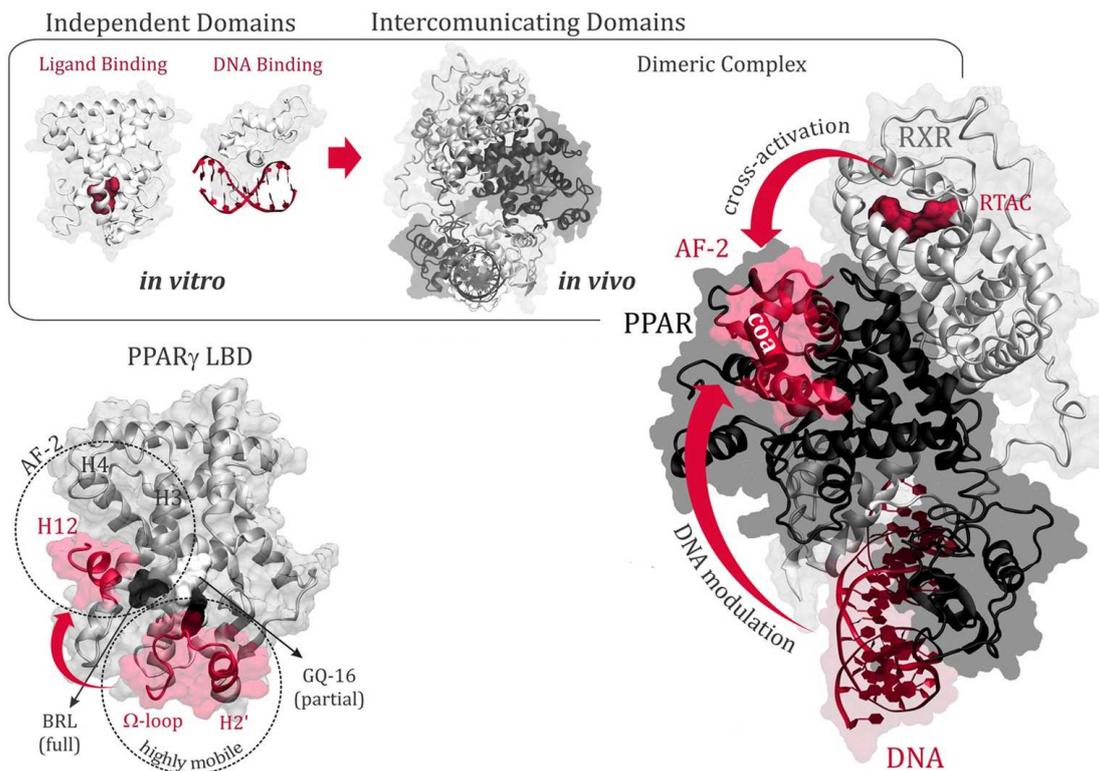


Figure 21 : Communication allostérique interdomaine du complexe PPAR- γ -RXR d'après Ricci et al. (211).

Les ligands RXR, tels que l'acide 9-*cis*-rétinoïque peuvent induire une activation croisée de PPAR- γ en induisant des changements de conformation dans sa région de fonction d'activation (AF-2) au niveau de l'hélice H12. Le domaine de liaison au ligand (LBD : Ligand binding domain) de de PPAR γ se distingue des autres récepteurs nucléaires par la présence d'une hélice supplémentaire (H2') suivie d'une boucle Ω particulièrement large et flexible. Ainsi, les agonistes complets, tels que la rosiglitazone (BRL), activent la région AF-2 en formant une interaction directe avec H12, tandis que les agonistes partiels (tels que GQ-16) n'établissent pas de contact direct avec H12, suggérant des mécanismes allostériques alternatifs impliquant la boucle Ω et les régions flexibles H2'.

Une fois l'hétérodimère formé, de nombreux cofacteurs pourront être recrutés conduisant à une expression différentielle des gènes cibles et une réponse biologique variable selon le ligand (**Figure 22**). Les co-activateurs sont des protéines qui stimulent l'activité transcriptionnelle tandis que les co-répresseurs vont la réprimer. En l'absence de ligand, l'activité transcriptionnelle du complexe PPAR- γ /RXR est réprimée par des co-répresseurs tels que NcoR (*Nuclear Receptor Corepressor*) et SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor*). La séquence permettant la liaison des co-répresseurs au récepteur est portée par un motif LXXI/HIXXXI/L (L pour leucine, X autre acide aminé, I pour isoleucine et H pour histidine) (212). NcoR et SMRT interagissent directement avec le répresseur transcriptionnel mSin3A pour former un complexe multiprotéique, permettant le recrutement de l'histone désacétylase 1 (HDAC1). En résulte une désacétylation des histones et une compaction de la chromatine

qui n'est ainsi plus accessible à la machinerie transcriptionnelle, réprimant ainsi l'expression des gènes cibles (213). D'autres co-répresseurs comme la protéine RIP140 (*Receptor Interacting Protein 140*) peuvent quant à eux indirectement en entrant en compétition avec les co-activateurs pour la fixation sur le site AF-2 (214).

L'activation de PPAR- γ par liaison de son ligand entraîne la dissociation du complexe co-répresseur (**Figure 23**). Lorsque les PPARs sont activés, le mouvement de l'hélice H12 démasque AF-2 qui permet le recrutement de protéines co-activatrices qui présentent un motif LXXLL (L pour leucine, X pour autre acide aminé). Les co-répresseurs ainsi libérés sont remplacés par des co-activateurs qui vont agir directement sur la chromatine et induire leur remodelage, telles que les déméthylases ou les acétyltransférases (HAT), facilitant l'accès aux différents composants de la machinerie transcriptionnelle. Parmi les co-activateurs qui présentent une activité acétyltransférases ou recrutent d'autres protéines ayant une activité HAT : la famille p300/CBP (*CREB Binding Protein*), les co-activateurs des récepteurs stéroïdiens SRC (SRC-1, SRC-2 ou SRC-3), le coactivateur spécifique de PPAR- γ (PGC-1, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator*) ou encore Tip60 (215, 216). D'autres protéines comme les protéines de l'ensemble SWI/SNF (*Switch/Sucrose Non-Fermentable*) induisent un remodelage de la chromatine ATP-dépendante en modifiant la conformation du nucléosome, facilitant également l'accessibilité de la chromatine à la machinerie transcriptionnelle (217). Enfin, les composants du complexe Médiateur tels que TRAP220 (*Thyroid hormone Receptor-Associated protein*) (218) ou MED14 (219) se lient à PPAR- γ et facilitent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle comme la protéine TBP (*TATA Binding Protein*), les facteurs associés à la protéine TBP (*TBP-associated factors*) facilitant la liaison avec l'ARN polymérase II et la transcription de gènes cibles spécifiques (220).

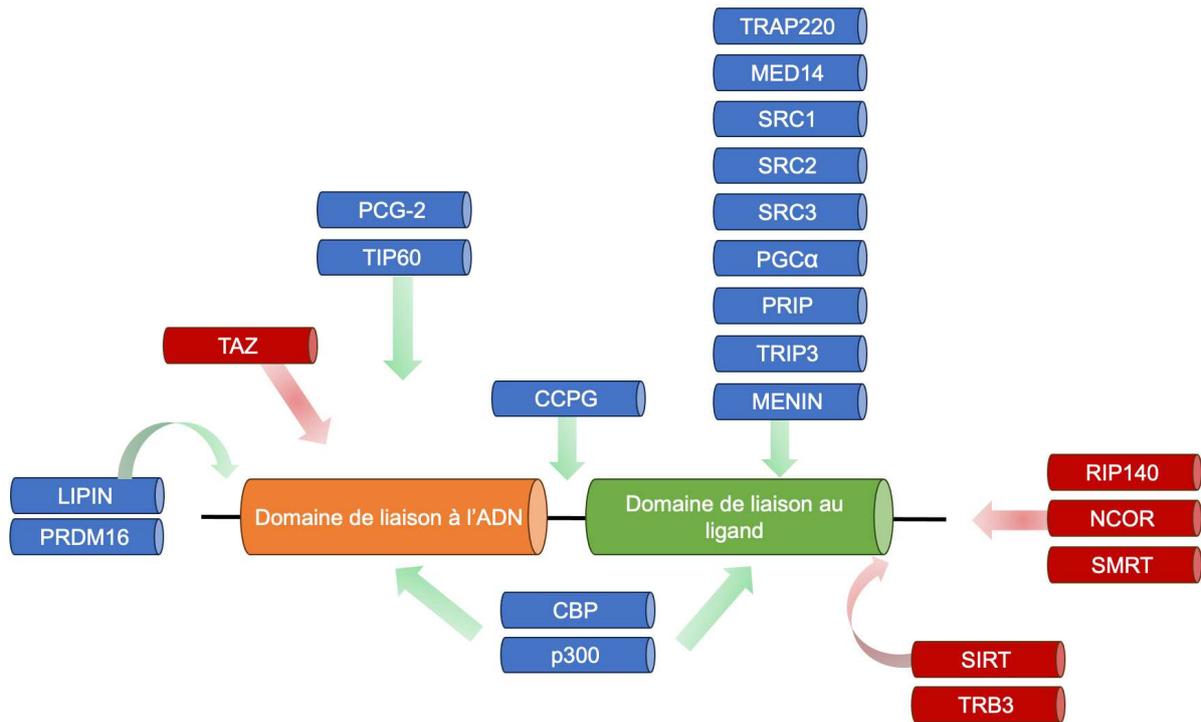


Figure 22 : Exemple de co-régulateurs impliqués dans la différenciation adipocytaire d'après Koppen and Kalkhoven (216).

Les co-activateurs sont indiqués en bleu et les co-répresseurs en rouge, la liste n'étant pas exhaustive.

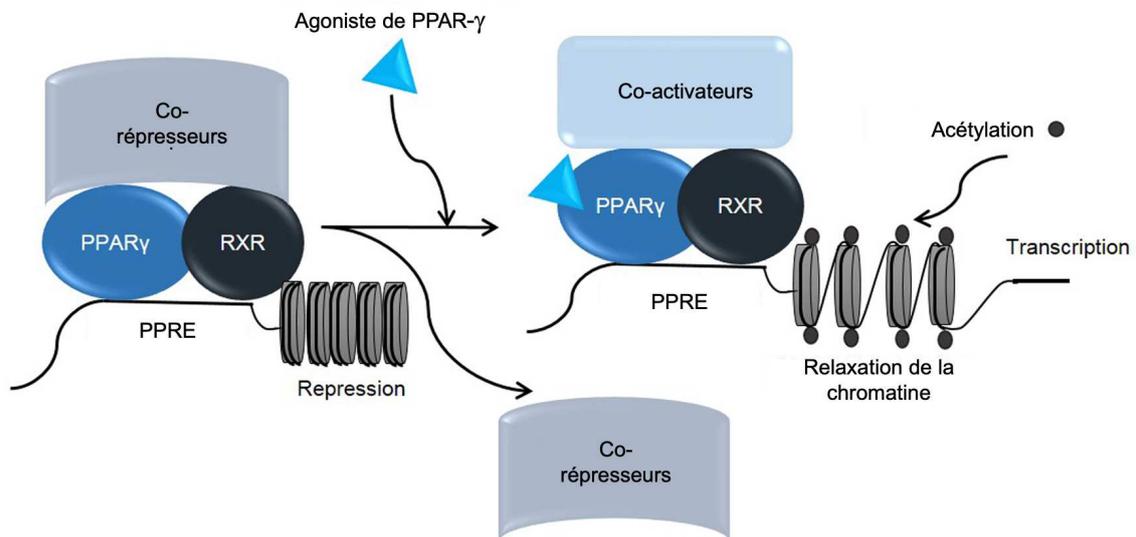


Figure 23 : Mécanisme d'activation de PPAR- γ d'après Aouali et al. (221).

En l'absence de ligand, le complexe PPAR- γ -RXR est lié à des co-répresseurs. L'activation de PPAR- γ par liaison de son ligand entraîne la dissociation du complexe co-répresseur, 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. La fixation du complexe à l'élément de réponse des PPARs (PPRE) est suivie du recrutement d'autres co-facteurs de transcription permettant la transcription des gènes cibles.

Une fois activé par son ligand et après avoir exercé son rôle de facteur de transcription, le récepteur PPAR- γ est dégradé dans le protéasome après avoir été ubiquitinylé par une ubiquitine ligase. Cette activité d'ubiquitination et de dégradation du récepteur est ligand-dépendante et est corrélée à l'activation du site AF-2 du domaine de liaison au ligand, formant une boucle d'auto-régulation (222, 223). Ainsi, cette dégradation par le protéasome permet de réinitialiser le système pour une nouvelle activation.

2.3 Ligands de PPAR- γ

Les ligands de PPAR- γ se fixent au récepteur au niveau de la poche de liaison dans le domaine E/F du récepteur. Cette poche de liaison est parmi les plus grandes de la superfamille des récepteurs nucléaires, avec un volume d'environ 1300 Å³ (203), ce qui lui permet d'accueillir une grande variété de ligands, qu'ils soient naturels ou synthétiques. Ainsi, le mode de fixation du ligand affecte le changement conformationnel du récepteur, notamment au niveau de l'hélice H12 qui joue un rôle clé dans le recrutement des co-activateurs transcriptionnels. La nature des ligands et la dynamique structurale du récepteur conduisent à une régulation transcriptionnelle propre à chaque complexe, expliquant la diversité des effets biologiques observés. Les agonistes totaux vont stabiliser l'hélice H12 en interagissant directement avec la Y⁴⁷³ et les H³²³ and H⁴⁴⁹ (203) alors que les agonistes partiels n'interagissent certaines régions, notamment AF-2 (224).

a) Ligands naturels

De nombreuses molécules ont été identifiées comme étant des ligands naturels de PPAR- γ , notamment les acides gras à chaîne longue polyinsaturés tels que l'acide arachidonique ou l'acide linoléique. Parmi ces dérivés, les eicosanoïdes (196, 225), les composés dérivés de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (ou LDL) ou encore des dérivés d'acide linoléique comme les acides 9- ou 13-hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE et 13-HODE) (226) sont capables de lier et d'activer PPAR- γ *in vitro*. Les eicosanoïdes sont une classe d'acides gras principalement dérivés de l'acide arachidonique, soit par la voie de la lipoxigénase conduisant à la formation de leucotriènes (LT) et d'acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE), soit par la voie de la cyclooxygénase produisant des prostaglandines (PG) (**Figure 24**).

Bien que spécifiques, la majorité de ces ligands endogènes se lie à PPAR- γ avec une affinité relativement faible comme le 15-Deoxy- Δ 12, 14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2), métabolite de la prostaglandine J2 et décrit comme le premier ligand endogène de PPAR- γ à être décrit en

1995 par deux groupes indépendants (227, 228). En effet, dans la plupart des systèmes étudiés, des concentrations de l'ordre du micromolaire étaient nécessaires pour activer PPAR- γ , il est probable ces ligands ne soient présents pas à des concentrations physiologiques suffisantes pour induire l'activation de PPAR- γ (229, 230).

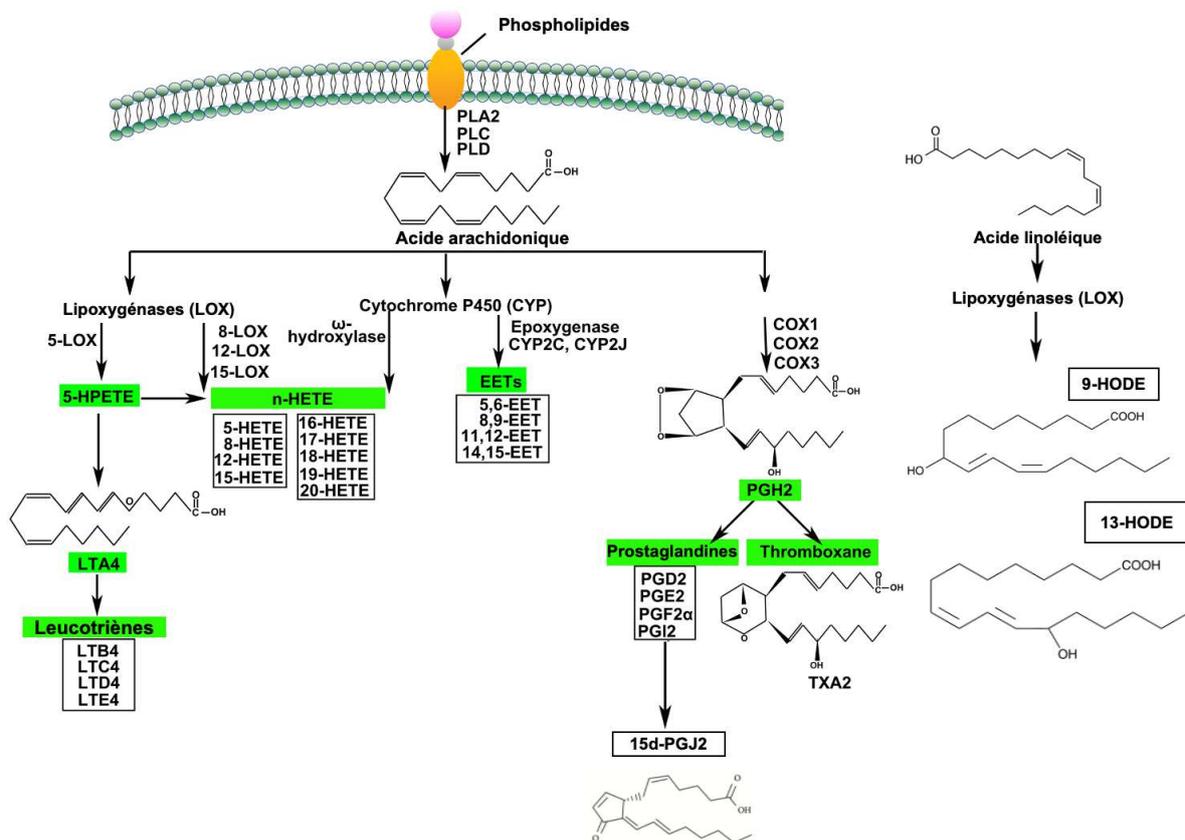


Figure 24 : Principales voies de biosynthèse des ligands naturels de PPAR- γ modifié d'après Wang et al. (231).

Les phospholipases (phospholipases A2, C et D) catalysent la libération de l'acide arachidonique (AA) à partir de l'hydrolyse des phospholipides membranaires. Les cyclo-oxygénases (COX) métabolisent l'AA en prostaglandine H2 (PGH2), intermédiaire métabolique de la prostacycline et du thromboxane. Les lipoxygénases (LOX) métabolisent l'AA en hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) et leucotriènes. Enfin, les époxygénases métabolisent l'AA en HETE à chaînes moyennes et en quatre isomères de position de l'acide époxyeicosatriénoïque (EET). L'acide linoléique est quant à lui métabolisé par la voie des lipooxygénases et conduit à la synthèse dérivés 9- et 13-acide hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE et 13-HODE).

b) Ligands synthétiques

Le potentiel thérapeutique de l'activation de la voie de PPAR- γ dans la correction des anomalies métaboliques du diabète de type 2 a conduit au développement d'agonistes synthétiques de meilleure affinité dont les plus connus et les plus utilisés en clinique sont les membres de la famille des thiazolidinediones et les fibrates.

Les thiazolidinediones

La synthèse des thiazolidinediones (TZD) a précédé la découverte des PPAR. En effet, alors qu'elle travaillait au développement de dérivés plus efficaces du clofibrate (un ligand spécifique de PPAR- α) dans le traitement de l'hyperglycémie, la société japonaise *Takeda Chemical Industries* a mis en évidence une activité hypoglycémiant des dérivés de la thiazolidine-2,4-dione chez des souris obèses diabétiques et résistantes à l'insuline. Bien que structurellement apparentés au clofibrate, les TZD se lient sélectivement à PPAR- γ avec une grande affinité (entre le nano et le micromolaire selon les molécules) (232).

L'un des composés, la ciglitazone, a fait l'objet d'une évaluation dans des modèles précliniques murins. Toutefois, malgré son potentiel en tant qu'agent hypoglycémiant et hypolipémiant, son efficacité n'a pas été suffisante pour poursuivre son développement en tant que molécule destinée à un usage en clinique (233, 234). Plusieurs groupes pharmaceutiques ont travaillé au développement des TZD avec de nombreuses nouvelles molécules synthétisées telles que, la troglitazone, la pioglitazone, l'englitazone, la darglitazone ou encore la rosiglitazone. Finalement, trois d'entre eux ont obtenu une autorisation de mise sur le marché : la troglitazone, la rosiglitazone et enfin la pioglitazone (**Figure 25**).

La troglitazone développée par Sankyo en 1988, est devenue la première TZD à être approuvée pour un usage clinique aux États-Unis, au Japon et au Royaume-Uni en 1997 (REZULIN®). Malgré des précautions et un contrôle mensuel du bilan hépatique dès l'instauration du traitement, la troglitazone a été retirée en 2000 en raison d'hépatites fulminantes (235).

SmithKline Beecham (plus tard GlaxoSmithKline) a synthétisé la rosiglitazone et l'a mise sur le marché en 1999 aux États-Unis et en 2000 en Europe (AVANDIA®). Une méta-analyse publiée en 2007 (236) a soulevé un risque accru de complications cardiovasculaires chez les patients traités par rosiglitazone, motivant ainsi le retrait de la molécule par l'agence Européenne du médicament (EMA) en 2010. L'usage de la rosiglitazone demeure ainsi restreint aux États-Unis, dont l'autorisation a été maintenue à la suite des résultats de l'étude randomisée RECORD qui n'a pas confirmé ce sur risque de complications cardiovasculaires (237).

Enfin, l'usage de la pioglitazone (Takeda) est autorisé par la FDA en 1999 aux États-Unis et par l'EMA en 2000. En raison de données établissant un lien potentiel entre le traitement par pioglitazone et la survenue d'un cancer de la vessie, l'autorisation de mise sur le marché est suspendue en France en 2011, mais la pioglitazone (ACTOS®) reste toutefois disponible dans

les autres pays Européens. Depuis, plusieurs études ou méta-analyses ont fourni des conclusions parfois contradictoires en ce qui concerne le lien entre la pioglitazone et le risque de cancer de la vessie, ce dernier variant selon la durée d'utilisation et/ou la dose totale reçue (238-240).

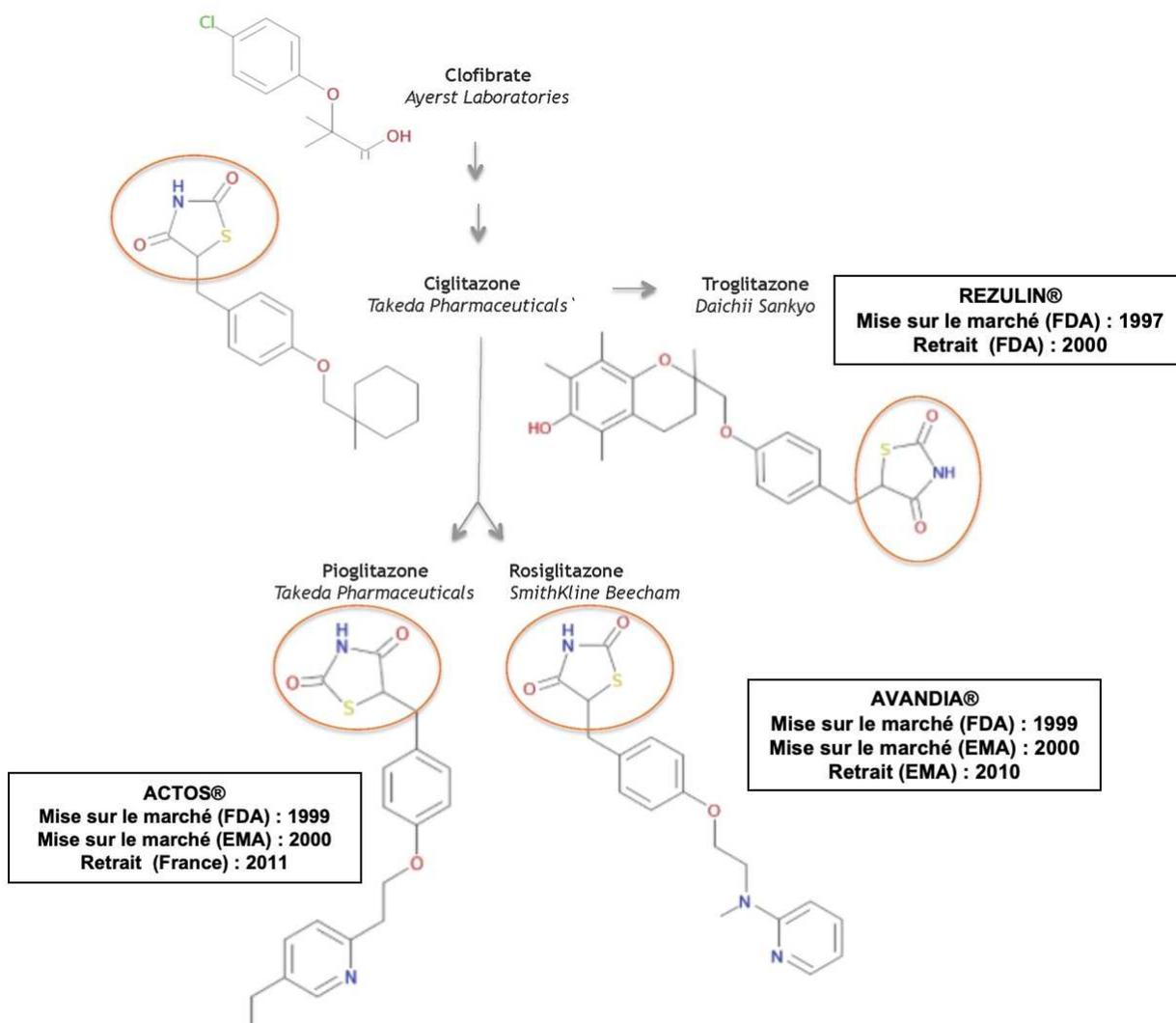


Figure 25 : Structures des composés clés dans le développement des thiazolidinediones (241, 242).

Les modulateurs sélectifs de PPAR- γ

Les SPPARMs (*Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulators*) ont été mis au point afin de moduler les signatures d'expression génique et d'optimiser les effets thérapeutiques tout en réduisant les effets secondaires indésirables comme la surcharge

hydrosodée, la prise de poids ou le remodelage osseux (perturbation de la balance ostéoclaste/ostéoblaste).

Il s'agit d'agonistes partiels qui modulent sélectivement l'activité des PPARs, en activant un certain panel de gènes cibles sans activer l'ensemble du répertoire de gènes régulés par les PPARs (243). De nombreux ligands synthétiques sélectifs de PPAR- γ ont déjà été synthétisés tels que le MRL24, le SR1664 ou son analogue le SR1824.

La liaison du MRL24, agoniste partiel et sélectif induit une conformation moins stable de l'hélice H12 entraînant d'une part une liaison atténuée des co-activateurs, mais bloque également la phosphorylation de la Sérine 273 de PPAR- γ induite par CDK5 (*Cyclin-Dependent Kinase 5*), dont l'activité a été montrée comme augmentée dans les tissus adipeux des souris obèses soumises à un régime riche en graisses. La phosphorylation de la Sérine 273 diminue la capacité de PPAR- γ à sensibiliser à l'insuline, contribuant ainsi à une augmentation de l'insulino-résistance (208). Les nouveaux ligands synthétiques SR1824 et SR1664 ne présentent pas d'activité de transactivation de PPAR- γ mais bloquent la phosphorylation de PPAR- γ médiée par CDK5, présentent une activité antidiabétique sans induire de rétention d'eau, de prise de poids ou d'ostéopénie (244).

De manière surprenante, certains inhibiteurs du récepteur de l'angiotensine largement utilisés dans le traitement de l'hypertension comme le telmisartan ou l'irbesartan, interagissent directement avec le domaine de liaison de de PPAR- γ en tant que SPPARM, induisant un changement de conformation distinct de celui d'une TZD et dont l'activité a été confirmée sur des modèles murins (245). Malgré des résultats prometteurs en pré-clinique, aucune de ces molécules n'a pu atteindre un développement suffisant pour justifier son usage en clinique humaine.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) exercent en partie leurs effets en inhibant les LOX et COX, enzymes jouant un rôle clé dans le métabolisme de l'acide arachidonique et la synthèse des médiateurs lipidiques tels que les prostaglandines qui jouent un rôle clé dans l'inflammation. Certains AINS exercent également leurs effets en interagissant directement avec PPAR- γ , avec toutefois une affinité moindre, de l'ordre du micro au millimolaire. Il s'agit de molécules telles que l'indométacine, l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA) principe actif de la mésalazine ou leur prodrogues (balsalazide, olsalazine) qui sont largement utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Le rôle de PPAR- γ est d'ailleurs

central puisque le 5-ASA n'est plus capable d'exercer ses effets thérapeutiques sur des modèles murins haplo-insuffisants pour PPAR- γ .

Le CDDO (acide 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oïque) est un dérivé synthétique des triterpénoïdes, famille de composés actifs extraits de plantes médicinales traditionnelles. Initialement développé comme inhibiteur de la COX-2 (cyclooxygénase-2) et de l'iNOS (oxyde nitrique synthase) pour ses vertus anti-inflammatoires, le CDDO présente également des propriétés de différenciation adipogénique sur une lignée de fibroblastes à de faibles doses (100 nM) et s'est avéré être un agoniste partiel mais sélectif de PPAR- γ (246). Outre ses propriétés anti-inflammatoires, ce dérivé exerce également des propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques sur diverses lignées dérivées de cancers solides mais également d'hémopathies en particulier les LAM (247, 248).

Plus récemment, l'amorfrutine qui est un principe actif extrait d'une plante médicinale traditionnelle (*Amorpha fruticosa*) utilisée dans le traitement des troubles inflammatoires et métaboliques, s'avère également exercer ses effets thérapeutiques en tant qu'agoniste partiel mais sélectif de PPAR- γ . Cette dernière présente une structure apparentée à celle de l'acide salicylique et sa liaison à PPAR- γ a permis de réduire de manière significative l'expression et la sécrétion de plusieurs médiateurs de l'inflammation sur des modèles *in vitro* de lignée de cellules coliques (249). Outre son action anti-inflammatoire, l'amorfrutine a également montré un potentiel thérapeutique dans la régulation des désordres du métabolisme glucido-lipidique et l'insulinorésistance dans des modèles murins précliniques, ainsi qu'à une réduction de l'inflammation liée au stress métabolique. Contrairement aux TZD, l'amorfrutine n'a présenté aucune hépatotoxicité (250).

Les pan-agonistes

Les différents isotypes de PPAR contrôlent des profils d'expression de voies métaboliques qui leur sont propres d'où la stratégie de l'activation simultanée de PPAR- γ et PPAR- α comme principe de traitement synergique des maladies métaboliques, exerçant respectivement leur effet sur l'insulinorésistance et leur effet hypolipémiant (251). Certains ligands de PPAR- γ , qu'ils soient synthétiques comme la pioglitazone (252) ou naturels comme les amorfrutines (250) activent également PPAR- α mais avec une moindre affinité.

C'est dans cette perspective que des doubles agonistes synthétiques avec une meilleure affinité pour PPAR- γ /PPAR- α ont été développés, comme la famille des glitazars. Parmi ces derniers,

seul le saroglitazar (ZYH1) a obtenu en 2013 une autorisation de mise sur le marché dans un nombre limité de pays (Inde, puis Mexique en 2017) pour le traitement des troubles glucido-lipidiques chez des patients atteints de diabète de type 2 (253) et plus récemment dans le traitement de la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). Cette approbation s'appuie sur des résultats encourageants obtenus à la fois sur un modèle murin de NASH (254), mais également lors d'une étude de phase II incluant 16 patients, qui a montré une amélioration significative des paramètres biochimiques et histologiques des sujets traités (254).

Enfin, les pan-agonistes ciblent simultanément les 3 isotypes de PPAR et permettent d'étendre le spectre thérapeutique en ciblant une gamme plus large de voies métaboliques. Le lanifibranor (ou IVA337), un pan-agoniste PPAR possède ainsi des propriétés anti-inflammatoires, anti-fibrotiques, hypolipémiante et améliore la sensibilité à l'insuline. Ces propriétés en font un candidat de choix dans le traitement de la NASH ciblant en agissant simultanément sur les mécanismes sous-jacents de la stéatose et de la fibrose. Les résultats de l'étude « NATIVE » de phase IIb menée sur 247 patients, a montré une réduction du score évaluant la sévérité de la fibrose (*Steatosis Activity Fibrosis*) dans le bras traité. Ces résultats prometteurs ont conduit à l'initiation d'une étude de phase III, actuellement en phase de recrutement (NCT04849728) (255).

2.4 Rôles de PPAR- γ en physiologie et en pathologie

Historiquement décrits dans le tissu adipeux, les rôles les mieux connus et décrits de PPAR- γ concernent la sensibilité à l'insuline, la régulation de l'homéostasie énergétique et du métabolisme glucido-lipidique.

Le champ d'étude s'est aujourd'hui élargi, confirmant le rôle fondamental de PPAR- γ dans d'autres processus biologiques comme la modulation de l'immunité et de l'inflammation. Concernant l'hématopoïèse, PPAR- γ est impliqué à plusieurs niveaux : dans le compartiment immature il participe à la régulation de la balance entre quiescence et prolifération des CSH (256, 257), mais aussi dans le compartiment mature où il joue un rôle dans la différenciation des monocytes en macrophages (258).

a) Rôles dans l'adipogenèse

PPAR- γ joue un rôle central dans l'adipogenèse par son action sur la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire. Les niveaux les plus élevés

de PPAR- γ sont d'ailleurs exprimés dans le tissu adipeux, en particulier l'isoforme PPAR- γ 2 (259). Peu après la découverte des récepteurs, Tontonoz a montré en 1994 que l'expression ectopique de PPAR- γ au moyen d'un rétrovirus et son activation sont capables de promouvoir l'adipogenèse dans des cellules non adipogéniques telles que les lignées de fibroblastes NIH-3T3 (260). Les facteurs de transcription de la famille C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) jouent également un rôle important dans la différenciation adipocytaire en coopération avec PPAR- γ . Les isoformes C/EBP β et δ initient la différenciation des préadipocytes en stimulant l'expression de PPAR- γ alors que C/EBP α intervient plus tardivement dans le maintien du phénotype adipocytaire. Les fibroblastes C/EBP α -/- perdent leur potentiel adipogène et expriment des niveaux réduits de PPAR- γ suggérant une régulation mutuelle entre C/EBP α et PPAR- γ (261). PPAR- γ demeure toutefois le régulateur principal de l'adipogenèse puisque C/EBP α ne peut induire à lui seul l'adipogenèse sur une lignée de fibroblastes lorsque PPAR- γ a été invalidé (262).

Ce rôle central de PPAR- γ dans l'adipogenèse a également été confirmé *in vivo* sur des modèles murins notamment par des expériences de *knock-out* fonctionnel.

L'inactivation de PPAR- γ dans un modèle murin à partir de cellules souches embryonnaires est létale. Elle induit un défaut de différenciation terminale du trophoblaste et de la vascularisation placentaire, entraînant secondairement un amincissement sévère du myocarde du fœtus. Les embryons PPAR- γ -/- succombent ainsi avant d'avoir développé tout tissu adipeux (263). Pour pallier ce problème, Rosen utilisa des modèles de souris chimériques utilisant des cellules embryonnaires PPAR- γ -/- réinjectées dans des blastocystes PPAR- γ +/+, ce système permettant ainsi aux autres tissus de se développer à partir des cellules de génotype sauvage. Ce modèle a permis de confirmer le rôle central de PPAR- γ *in vivo* dans l'adipogénèse puisque le tissu adipeux est quasi exclusivement issu des cellules PPAR- γ +/+ alors que la plupart des autres organes ne montre aucune prédominance des cellules PPAR- γ +/+ ou PPAR- γ -/- avec un chimérisme équilibré à 50% dans les intestins, la rate ou le cœur (264). Par la suite, un modèle de souris transgénique PPAR- γ -/- conditionnel ciblant spécifiquement et de manière inductible le tissu adipeux grâce au promoteur de l'aP2 (protéine de liaison des acides gras) (265) a également permis de confirmer PPAR en tant que régulateur maître de l'adipogenèse.

Outre son importance dans l'adipogenèse, PPAR- γ joue également un rôle important dans la régulation du métabolisme des lipides, leur répartition et leur localisation au sein des différents tissus. Parmi les gènes cibles directement régulés par PPAR- γ on retrouve la lipoprotéine lipase responsable de l'hydrolyse des triglycérides présents dans les lipoprotéines circulantes (266), la protéine de transport des acides gras favorisant le stockage de ces derniers dans les

adipocytes (267) ou encore ORL1 (*oxidized LDL receptor 1*) impliquée dans le métabolisme du cholestérol et qui augmente la teneur en cholestérol des adipocytes (268).

PPAR- γ régule également la localisation et la distribution du tissu adipeux, les *knock-out* conditionnels de *PPARG* dans le tissu adipeux étant à l'origine de lipodystrophies : disparition de la graisse blanche et brune sous-cutanée, augmentation des taux plasmatiques de triglycérides et stéatose hépatique (269). Un certain nombre de cas de mutations hétérozygotes de *PPARG* ont été rapportées chez l'homme, ces patients présentant une lipodystrophie partielle notamment de la graisse sous-cutanée, une résistance sévère à l'insuline ainsi qu'une stéatohépatite (270, 271). Certaines mutations de *PPARG* en cause dans la lipodystrophie familiale partielle (FPLD3) sont aujourd'hui mieux caractérisées d'un point de vue fonctionnel. La mutation R212Q réduit la capacité d'interaction de la région charnière du récepteur avec le petit sillon de la double hélice d'ADN situé en 5' du PPRE tandis que la mutation E379K affecte le domaine de liaison au ligand et la stabilité de l'hétérodimère PPAR- γ -RXR (272).

b) Rôles dans l'homéostasie glucidique

Outre son rôle dans la différenciation des adipocytes et le métabolisme des lipides, PPAR- γ est également essentiel pour réguler l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose, comme en témoigne les patients porteurs de mutations hétérozygotes de *PPARG* qui présentent une lipodystrophie partielle et une résistance à l'insuline prédisposant au diabète de type 2.

L'activation de PPAR- γ augmente l'expression des transporteurs de glucose (GLUT2 et GLUT4) (273, 274) et de la protéine associée à c-Cbl (CAP) indispensable à la signalisation de l'insuline (275). Ainsi, les ligands de PPAR- γ , notamment les TZD sont largement utilisés pour leurs effets sensibilisants à l'insuline et exerce son effet anti-diabétique par une action au niveau des organes cibles de l'insuline tels que le foie et le tissu adipeux (269). PPAR- γ , est également exprimé dans les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques, où son activation induit l'expression de gènes clés impliqués dans la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (276).

Au-delà de son rôle de stockage, le tissu adipeux est un organe endocrinien à part entière et est capable de sécréter un grand nombre d'hormones et de cytokines qui affectent l'homéostasie énergétique. Plusieurs d'entre eux sont sous le contrôle de PPAR- γ tels que l'adiponectine (277), le TNF- α ou la résistine dont l'augmentation est impliquée dans la résistance acquise à l'insuline (278). Le rôle de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α dans

l'homéostasie glucidique a été confirmée sur des modèles murins. Les souris invalidées pour *TNFA* et soumises à un régime riche en graisses présentant moins de résistance à l'insuline, comparé aux souris de phénotype sauvage (279). Le TNF- α induit la phosphorylation de l'IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) sur plusieurs sérines (636/639, 307) par l'activation de sérine kinases, dont JNK ou ERK. Une fois phosphorylé, l'IRS-1 agit comme un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur de l'insuline et de sa signalisation en aval contribuant ainsi à la résistance à l'insuline (280).

L'adiponectine est une adipokine sécrétée par le tissu adipeux et dont les faibles concentrations sériques sont corrélées à une résistance à l'insuline chez les patients (281). L'administration d'adiponectine à des doses physiologiques restaure la sensibilité à l'insuline dans des modèles murins de diabète de type 2, haplo-insuffisantes pour PPAR- γ (282). L'adiponectine est indispensable pour relayer l'effet sensibilisant à l'insuline des TZD puisque les souris invalidées pour l'adiponectine ne sont plus capables de répondre aux effets anti-diabétiques des TZD (283).

La résistine (*resistance to insulin*) a été identifiée en 2001 dans le transcriptome de cellules adipocytaires en cours de différenciation et est associée à une résistance systémique à l'insuline. En effet, l'administration de résistine recombinante à des souris témoins induit une résistance à l'insuline alors que l'administration d'un anticorps anti-résistine restaure la sensibilité à l'insuline sur un modèle de souris obèses. De façon intéressante, l'activation de PPAR- γ par des TZD réprime l'expression de la résistine et permet de restaurer la sensibilité à l'insuline (278).

c) Rôles dans l'inflammation

PPAR- γ joue également un rôle important dans la régulation du système immunitaire notamment au niveau du contrôle de l'inflammation chronique. En effet, PPAR- γ peut être activé par un certain nombre de ligands endogènes dérivés des acides gras ainsi que les prostaglandines ou leucotriènes produits au cours de la réponse inflammatoire. Cette modulation de la réponse pro-inflammatoire induite par l'activation de PPAR- γ , empêche son activation excessive telle qu'une boucle de rétrocontrôle (284).

Régulation de PPAR- γ sur la voie NF- κ B

Les mécanismes par lesquels PPAR- γ exerce son action anti-inflammatoire ne sont pas tous élucidés, le principal passant par la modulation de voies transcriptionnelles impliquées dans

les réponses inflammatoires, en particulier la signalisation NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*), facteur de transcription clé dans l'expression et la régulation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation. Dans les monocytes/macrophages, l'activation de PPAR- γ diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6) en inhibant l'activité des facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que AP-1, STAT1 ou NF- κ B (285, 286). Un autre mécanisme appelé « *squelching* » implique la régulation réciproque des systèmes de transcription par la disponibilité limitée de cofacteurs communs (CBP/p300, SRC-1). Ainsi, lorsque PPAR- γ est activé, ces coactivateurs communs sont séquestrés, empêchant ainsi NF- κ B de réguler l'expression de ses gènes cibles. Cette régulation de l'activité transcriptionnelle implique également les co-répresseurs et des modifications post-traductionnelles comme la SUMOylation ligand-dépendante de la Lysine 365 du LBD de PPAR- γ . Une fois SUMOylé, PPAR- γ cible les complexes co-répresseurs nucléaires NCoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) et HDAC3 (*Histone Deacetylase 3*) situés sur les promoteurs des gènes cibles de NF- κ B. La stabilisation de ces co-répresseurs par PPAR- γ empêche le recrutement de la machinerie d'ubiquitylation et la dégradation des co-répresseurs par le protéasome nécessaires à l'expression des gènes cibles de NF- κ B (287).

PPAR- γ agit également directement comme une ubiquitine ligase E3, interagissant physiquement avec la sous-unité p65 de NF- κ B par l'intermédiaire de son LBD. En effet, que ce soit sur des modèles *in vitro* (fibroblastes) ou murins, l'invalidation de PPAR- γ induit une augmentation de la demi-vie de p65 sans en affecter sa transcription. Ainsi, en induisant l'ubiquitination de p65 (Lysine 48) et sa dégradation, PPAR- γ inhibe l'activation de NF κ B et réduit l'expression de gènes pro-inflammatoires (288). Enfin, PPAR- γ peut également exercer des effets indirects sur NF- κ B, notamment modulant la transcription de I κ B α , un régulateur négatif de NF- κ B qui permet de maintenir le complexe p50/p65 inactif dans le cytoplasme. Au cours des réactions inflammatoires, la phosphorylation d'I κ B α par le complexe kinase IKK (I κ B kinase) induit sa dégradation et permet de libérer la sous-unité p65 vers le noyau et d'induire l'expression de ses gènes cibles. Sur un modèle de cholangiocytes, l'activation de PPAR- γ par la pioglitazone ou la rosiglitazone est associée *in vitro* à une augmentation de la transcription d'I κ B α , se traduisant par une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires régulées par NF- κ B (289).

Régulation de PPAR- γ sur la voie AP-1

Parmi les autres voies transcriptionnelles impliquées dans la réponse inflammatoire, PPAR- γ peut également exercer une activité de transrépression sur les gènes cibles d'AP-1 (*Activator Protein-1*), un facteur de transcription hétérodimérique composé principalement de protéines de la famille Jun et Fos. Le site de liaison AP-1 est présent dans les promoteurs de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et régule positivement l'expression de plusieurs cytokines telles que le TNF- α , l'IL-2, l'IL-8 ou l'IFN- γ (290).

L'activation de PPAR- γ par ses ligands comme la rosiglitazone régule négativement AP-1 en empêchant la liaison des facteurs de transcription de la famille Fos/Jun au site AP-1 (291, 292).

Régulation de PPAR- γ sur les ROS

Les ROS ou espèces réactives de l'oxygène sont des molécules hautement réactives incluant le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^-). Les ROS sont naturellement produites lors de divers processus métaboliques, en particulier lors de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ils sont également générés spécifiquement par des enzymes telles que les NOX (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate [NADPH] oxydases) et remplissent une fonction de signalisation dans la cellule, notamment lors de la réponse inflammatoire (293). L'activation de PPAR- γ contribue à réguler et réduire la concentration de ROS en augmentant l'expression des enzymes antioxydantes. En effet, une séquence PPRE est présente dans le promoteur de nombreuses enzymes antioxydantes telle la catalase (294), la Mn-superoxyde dismutase (SOD) (295) et la CuZn-SOD (296) et dont l'expression est augmentée par l'activation de PPAR- γ réduisant ainsi respectivement les concentrations en O_2^- et en H_2O_2 . L'activation de PPAR- γ par la rosiglitazone ou la troglitazone est également capable d'induire l'expression de *HMOX1* (*Heme oxygenase-1*) dans les cellules endothéliales. HO-1 est l'enzyme responsable de la dégradation du noyau d'hème, potentiellement oxydant, tout en produisant des composés antioxydants dont le monoxyde de carbone (CO) qui diminue l'activité de la NADPH oxydase (297) ou encore la biliverdine (298, 299). PPAR- γ peut également former un complexe avec Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) et se lier à l'élément de réponse antioxydant (ARE) sur le promoteur de *HMOX1*, entraînant une augmentation de l'expression de cette enzyme antioxydante (300). PPAR- γ présente donc une activité inductrice d'antioxydants ce qui renforce son potentiel thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose. Sur une cohorte de 19 patients, le traitement par rosiglitazone a permis d'augmenter l'activité de PON-1

(paraoxonase-1), une enzyme antioxydante jouant un rôle central dans la protection contre les lésions oxydatives, notamment en limitant l'oxydation des LDL, acteur majeur dans la formation des lésions d'athérosclérose (301). Contrairement à PON-1 qui est associée aux HDL dans le plasma, PON-2 est une enzyme intracellulaire qui est exprimée dans divers tissus et cellules γ compris les macrophages, et dont l'expression augmente au cours de la différenciation des monocytes en macrophages (302). De la même manière, Shiner et al. ont montré que la rosiglitazone, stimule également l'expression de *PON2* et son activité de manière dose-dépendante sur une lignée de macrophages (303).

Régulation de PPAR- γ sur les cellules immunitaires

Bien que PPAR- γ soit principalement connu comme le régulateur maître de la différenciation adipocytaire, les premières études s'intéressant à la distribution tissulaire du récepteur ont permis de révéler une expression importante de PPAR- γ , que ce soit dans la rate chez la souris (304) ou au sein des leucocytes chez l'homme (177), suggérant une implication de PPAR- γ dans la modulation des fonctions immunitaires et de l'inflammation. A l'image des mécanismes moléculaires orchestrant la différenciation et l'activité des adipocytes, PPAR- γ intervient dans la différenciation des monocytes, la polarisation des macrophages ou encore la régulation de leur métabolisme et de leur sécrétome.

La fonction de PPAR- γ a été explorée en premier lieu dans les cellules monocytaires/macrophagiques, notamment en raison de leur implication dans l'inflammation et l'athérosclérose. En effet, PPAR- γ est fortement exprimé dans les cellules spumeuses des lésions athérosclérotiques alors qu'il est peu exprimé dans les cellules progénitrices médullaires ou dans les macrophages péritonéaux (305). En utilisant une lignée humaine THP-1 « monocyttaire », Tontonoz et al. montra que PPAR- γ est induit dans ces cellules après exposition à des LDL oxydés au niveau de la plaque d'athérome. L'activation de PPAR- γ par son ligand naturel 15d-PGJ2 induit la différenciation monocyttaire et l'expression du CD36 par les THP-1. Ce transporteur favorise la capture et l'absorption des LDL oxydés, conduisant à leur conversion en cellules spumeuses, qui elles-mêmes contribuent à la progression de l'athérosclérose (306). Schneider et al. a confirmé le rôle central de PPAR- γ dans la modulation transcriptionnelle de la différenciation des pré-macrophages en macrophages. En effet, les monocytes dérivés de souris présentant une invalidation spécifique de PPAR- γ dans les cellules myéloïdes, ne sont plus capables de répondre à l'effet différenciant du GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*). Ainsi, chez les souris invalidées, les macrophages

étaient non seulement moins nombreux, mais présentaient également une capacité phagocytaire altérée (307).

Outre la différenciation des macrophages, PPAR- γ est également un régulateur important de la polarisation des macrophages. À l'image du modèle de la polarisation lymphocytaire Th1/Th2 utilisé pour décrire les voies de différenciation et la fonctionnalité des lymphocytes T *helper*, la notion de polarisation M1/M2 des macrophages a été proposée il y a une vingtaine d'années sur la base de leur différenciation respective associée aux cytokines Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF α) ou Th2 (IL-4, IL-10, IL-13). Alors que les macrophages M1 « classiques » sont pro-inflammatoires, les macrophages M2 « alternatifs » modulent la réponse immunitaire et favorisent la résolution de l'inflammation (308). L'activation de PPAR- γ par la rosiglitazone favorise le phénotype « alternatif » M2 des macrophages (309) alors que son invalidation spécifique dans les macrophages inhibe cette transition vers le phénotype M2 (301). Ces macrophages M2 sont caractérisés par une signature transcriptomique parmi laquelle plusieurs gènes sont des cibles transcriptionnelles de PPAR- γ comme *ARG1* codant pour l'arginase 1 ou *HBEGF* (*Heparin-Binding EGF-like Growth Factor*) dont l'expression est réduite en présence d'inhibiteur de PPAR- γ (GW9662) ou dans des macrophages invalidés pour PPAR- γ (310, 311). Des travaux plus récents précisent le rôle de PPAR- γ comme « facilitateur » de la signalisation IL-4/STAT6, voie de signalisation cruciale pour la polarisation des macrophages M2. En effet, PPAR- γ intervient dans la modification de la structure de la chromatine en recrutant son coactivateur P300 et RAD21 une protéine structurale du complexe cohésine, facilitant ainsi la liaison de STAT6 et le recrutement de l'ARN polymérase II (311).

Comme décrit précédemment, l'activation de PPAR- γ par les TZD ou le 15d-PGJ2 diminue l'activation et la production monocyttaire des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6) induites par la PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), que ce soit au niveau transcriptionnel ou protéique (286). D'autres équipes ont montré que ces agonistes de PPAR- γ pouvaient réduire la transcription de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), de la gélatinase B (MMP-9 ou métalloprotéinase matricielle 9) et du récepteur *scavenger* A (SR-A) en réponse au TPA (phorbol ester 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate), des protéines associées à l'activation macrophagique. L'activation de PPAR- γ inhibe ainsi l'expression de ces gènes en antagonisant en partie l'activité des facteurs de transcription AP-1, STAT et NF- κ B (191).

Le rôle immunomodulateur de PPAR γ a également été étudié sur les lymphocytes T CD4+, principaux effecteurs de la réponse immunitaire adaptative. Les premières études effectuées sur des lymphocytes T murins montraient que l'activation pharmacologique de PPAR- γ 1 par le

15d-PGJ2 inhibait la prolifération T et la sécrétion d'IL-2, cytokine clé de la polarisation Th1 (312). Cette observation a également été confirmée sur les lymphocytes T humains, mettant en évidence un mécanisme de transrépression. Une fois activé, PPAR- γ s'associe physiquement au facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) qui régule le promoteur de l'IL-2, bloquant la liaison de NFAT à l'ADN et son activité transcriptionnelle (193). Ce mécanisme de transrépression inhibe également l'induction du promoteur de l'IFN- γ médiée par c-Jun, suggérant un rôle central de PPAR- γ dans la polarisation vers le phénotype Th2 (313).

Enfin, l'activation pharmacologique de PPAR- γ dans les cellules T CD4+ inhibe sélectivement la différenciation T *helper* 17 (Th17) et impliqués dans la pathogénèse des maladies auto-immunes ou inflammatoires telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'activation de PPAR- γ supprime spécifiquement l'expression de ROR γ t, facteur de transcription clé pour la polarisation Th17. A l'inverse, l'inactivation de PPAR- γ dans les lymphocytes T favorise la polarisation Th17 et aggrave les symptômes avec une cinétique plus précoce des animaux sur un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (314).

Parmi les autres cellules du système immunitaire, PPAR- γ est également exprimé dans plusieurs sous-types de cellules dendritiques (DC), cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes, exerçant ainsi un rôle de pivot dans la modulation de la réponse immunitaire. L'activation de PPAR- γ est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes lors de la différenciation des DC dérivées des monocytes et favorise la polarisation des lymphocytes T naïfs vers un profil Th2, en diminuant le rapport des molécules de co-stimulation CD80/CD86 et en réduisant la sécrétion d'IL-12 classiquement associées à une polarisation Th1 (315).

Les effets immunomodulateurs des ligands de PPAR- γ s'étendent également aux effecteurs de l'immunité innée. L'activation de PPAR- γ par la rosiglitazone dans les DC induit l'expression du CD1d, récepteur spécialisé dans la présentation d'antigènes lipidiques et favorisant ainsi le recrutement et la prolifération des iNKT (*invariant natural killer T*) (316).

Potentiel thérapeutique dans les maladies inflammatoires

Étant donné les propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices présentées en amont, l'activation de PPAR- γ se présente comme une stratégie de choix pour le traitement des pathologies inflammatoires avec certaines molécules qui sont encore utilisées en pratique courante dans la polyarthrite rhumatoïde (317) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou MICI.

Les MICI sont des affections caractérisées par une inflammation sévère de la paroi du tube digestif en partie liée à une dérégulation du système immunitaire. Les MICI regroupent principalement deux formes : la recto-colite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn. Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules immunitaires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN- γ ou l'IL-12 jouent un rôle central dans la physiopathologie des MICI.

L'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), un dérivé de l'acide salicylique est utilisé en pratique clinique depuis plusieurs décennies pour le traitement des maladies chroniques de l'intestin (RCH : recto-colite hémorragique, maladie de Crohn) avec une efficacité attestée par de nombreux essais cliniques dans les poussées d'intensité légère ou modérée (318). Malgré plusieurs décennies d'utilisation, le mécanisme d'action du 5-ASA n'a été clarifié qu'en 2005 révélant que le 5-ASA agissait comme un agoniste fonctionnel de PPAR- γ , également abondamment exprimé dans les intestins.

Sur un modèle de lignées de cellules coliques, le 5-ASA augmente l'expression PPAR- γ , favorise sa translocation vers le noyau et induit une modification conformationnelle permettant le recrutement de coactivateurs notamment DRIP (*Vitamin D Receptor Interacting Protein*) et l'expression de ses gènes cibles. Ces données ont également été validées sur des modèles murins de colite, haplo-insuffisantes pour PPAR- γ . Ces dernières étaient réfractaires à l'effet thérapeutique du 5-ASA comparé aux souris sauvages, confortant le rôle central de PPAR- γ dans la médiation *in vivo* de l'effet anti-inflammatoire du 5-ASA dans l'intestin (319) et de son potentiel thérapeutique dans le traitement MICI (320).

d) Rôles dans la fibrose

PPAR- γ est également un régulateur clé dans la physiopathologie de la fibrose son activation exerçant des effets anti-fibrotiques dans divers tissus en modulant l'activation cellulaire, la production de matrice extracellulaire et les réponses inflammatoires. PPAR- γ constitue ainsi une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement des maladies fibrotiques.

Potentiel thérapeutique dans la fibrose hépatique

L'activation et la transformation des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes sont considérées les principales causes du développement de la fibrose hépatique. PPAR- γ constitue un facteur clé dans la modification du phénotype des cellules stellaires puisque leur activation par l'inflammation ou un traumatisme est associée à une régulation négative de PPAR- γ ,

suggérant que PPAR- γ contribue à les maintenir en phase quiescente (321). À l'inverse, l'activation pharmacologique de PPAR- γ ou sa surexpression au moyen d'un vecteur viral, que ce soit sur des modèles *in vitro* ou sur des coupes histologiques de modèles murins de fibrose, est associée à une réduction de plusieurs marqueurs d'activation des cellules stellaires tels que l'expression du collagène I, de α -SMA (*α -smooth muscle actin*), la prolifération ou la migration cellulaire (322, 323). Dans ce contexte, les agonistes de PPAR- γ apparaissent comme une thérapie prometteuse dans le traitement de la NASH ciblant en ciblant simultanément les mécanismes sous-jacents de la stéatose et de la fibrose. Le lanifibranor, pan-agoniste PPAR est actuellement en évaluation dans une étude clinique de phase III (NCT04849728).

Potentiel thérapeutique dans l'hypertension artérielle pulmonaire

Dans un autre modèle de fibrose, les agonistes PPAR- γ se présentent également comme option thérapeutique pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) en exerçant des effets antiprolifératifs sur les cellules musculaires lisses vasculaires, anti-inflammatoires et anti-fibrotiques. En effet, l'activation PPAR- γ régule plusieurs gènes cibles fortement impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP, tels que l'adiponectine, l'IL-6 ou l'endothéline-1 (324). Par ailleurs, l'activation pharmacologique de PPAR- γ par la pioglitazone inhibe dans les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires, les voies canoniques TGF- β 1/Smad3 et non canoniques TGF- β 1/pSTAT3/pFoxO1, cytokine majeure associée à la fibrose. La perte de fonction de BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor 2*) un récepteur de la famille des facteurs de croissance transformants (TGF- β), est fréquemment retrouvée chez les sujets présentant une HTAP, conduisant à une prolifération excessive des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. L'activation de PPAR- γ agit comme effecteur en aval de l'effet antiprolifératif induit par l'interaction ligand/récepteur BMP2-BMPR2 et permet ainsi de compenser la dysfonction de BMPR2 (325). Enfin, l'activation pharmacologie de PPAR- γ par la pioglitazone permet d'inverser le phénotype délétère ainsi que le remodelage vasculaire pulmonaire sur un modèle murin d'HTAP surexprimant le TGF- β 1. À l'inverse, l'inactivation spécifique de PPAR- γ dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires induit l'activation du TGF- β 1 à la fois *in vitro* mais également dans un modèle murin, confirmant le rôle central de PPAR- γ dans l'antagonisation de la voie du TGF- β 1 (326).

Potentiel thérapeutique dans la fibrose intestinale

La fibrose intestinale secondaire à l'inflammation chronique est une complication fréquente des MICI et survient dans 30 à 40% dans les maladies de Crohn (327). Une augmentation de

l'expression du TGF- β 1 a été observée au niveau des coupes histologiques des territoires fibrosés chez les patients atteints de la maladie de Crohn, soulignant à nouveau le rôle central de cette cytokine dans la physiopathologie de la fibrose (328).

De nouvelles données pré-cliniques ont démontré le potentiel anti-fibrotique spécifique du GED-0507-34 Levo, un analogue du 5-ASA. Ce ligand de haute affinité pour PPAR- γ est un énantiomère de la famille des acides aminophényl-méthoxy-propioniques et possède des propriétés anti-inflammatoires 30 fois supérieures à celles du 5-ASA à la concentration optimale (30 mM) dans un modèle murin de colite chronique (329). L'activation de PPAR- γ par le GED inhibe le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induite par le TGF- β 1 sur lignée de cellule épithéliale intestinale, bloquant ainsi leur transformation en myofibroblastes responsables de la synthèse de matrice extracellulaire et de la fibrose. En plus de ses propriétés anti-inflammatoires, le GED-0507-34 Levo réduit la transcription des principaux gènes profibrotiques (*ACTA2*, *COL1A1*, *FN1* et *CTGF*) codant respectivement pour l' α -SMA (*smooth muscle α -actin*), le collagène I, la fibronectine et le facteur de croissance du tissu conjonctif. Cette observation a été également confirmée sur les coupes histologiques d'un modèle murin de colite traité par la GED (330). Une autre équipe a également confirmé sur un modèle murin de colite chronique, que l'activation de PPAR- γ par le GED était capable de réverser les caractéristiques histologiques de la fibrose intestinale, de normaliser l'expression des principaux marqueurs de fibrose et de moduler l'expression de protéines pro-fibrotiques ou impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse : restauration de l'expression de la E-cadhérine et de la β -caténine, diminution des facteurs de transcription associés à la TEM tels que ZEB1 et Snail. Tous ces effets ont été antagonisés par l'administration de GW9662, un l'inhibiteur spécifique PPAR- γ confirmant ainsi son rôle pivot dans ces processus (331).

Potentiel thérapeutique dans la myélofibrose

Qu'elle soit primitive ou secondaire à l'évolution d'une néoplasie myéloproliférative (NMP), la myélofibrose se caractérise par une fibrose médullaire avec une moelle progressivement envahie par des dépôts de fibres de réticuline et de collagène. Ces patients présentent un pronostic médiocre en raison de complications liées à l'aggravation des cytopénies, l'hypertension portale, les hémorragies ou thromboses, ou encore la transformation en LAM (332). A l'heure actuelle, en dehors de l'allogreffe de CSH, aucun des traitements disponibles à ce jour n'a d'impact sur l'évolution naturelle de la maladie.

Les NMP sont caractérisées par une hyperplasie mégacaryocytaire, source principale médullaire de TGF- β 1 (333), cytokine clé associée à la myélofibrose (334) tout comme dans tous les modèles de fibrose précédemment cités. Une étude menée au sein de l'équipe par le

Dr Juliette Lambert a permis de confirmer le potentiel thérapeutique *in vivo* de deux agonistes de PPAR- γ (le 5-ASA et la pioglitazone) sur trois modèles murins de myélofibrose : un modèle TPO^{high} obtenu après transduction des progéniteurs hématopoïétiques murins par un rétrovirus TPO, un modèle JAK2^{V617F} proche de la physiopathologie humaine et un modèle de thrombocythémie essentielle CALR^{del52}, obtenu par transduction des progéniteurs hématopoïétiques murin par un rétrovirus porteur du transgène de la forme mutée de la calréticuline. L'activation de PPAR- γ par ses ligands conduit au recrutement du cofacteur p300 pour la transcription de ses gènes cibles au détriment de la transcription des gènes cibles du TGF- β 1, réduisant ainsi la myélofibrose dans ces modèles murins. De plus, la pioglitazone exerce un effet antiprolifératif sur le modèle JAK2^{V617F} et CALR^{del52}, en partie grâce à une diminution transcriptionnelle de STAT5, facteur de transcription indispensable à la physiopathologie de la polyglobulie de Vaquez associée au modèle JAK2^{V617}. Ces résultats pré-cliniques prometteurs ouvrent la voie à une association des agonistes de PPAR- γ aux thérapies déjà disponibles telles que le ruxolitinib (anti-JAK2) afin d'optimiser la prise en charge de la myélofibrose (335).

e) Rôles dans l'hématopoïèse normale et pathologique

Peu de temps après la découverte du récepteur sur une lignée d'ostéosarcome, le gène de *PPARG* a été cloné à partir d'un criblage d'une banque d'ADN complémentaire d'un prélèvement médullaire humain, permettant l'obtention deux clones, correspondant respectivement aux deux isoformes de PPAR- γ : PPAR- γ 1 et PPAR- γ 2. Ces dernières sont retrouvées dans les cellules normales périphériques (monocytes, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes), conformément aux rôles aujourd'hui mieux connus de l'activation de PPAR- γ dans la régulation du système immunitaire, notamment au niveau du contrôle de la réponse inflammatoire que nous avons précédemment décrit.

Ces transcrits ont également été mis en évidence dans diverses lignées dérivées d'hémopathies, ainsi que dans des échantillons primaires de LAM, de leucémie aiguë lymphoblastique, de LMC en phase blastique et de cellules stromales suggérant un rôle de PPAR- γ dans l'hématopoïèse pathologique au sein de son microenvironnement (177).

Rôles dans l'érythropoïèse

Si les effets indésirables les plus fréquemment rapportés avec le traitement par TZD sont la rétention hydrosodée ou la prise de poids, de légères diminutions de l'hémoglobine (0,9 g/dL

en moyenne) sans impact clinique, sont souvent observées chez les patients. Initialement imputable à une hémodilution en raison de la rétention hydrosodée, une étude menée sur une cohorte de 50 patients diabétiques de type 2 et traités par pioglitazone, n'a pas montré de corrélation entre la diminution du taux d'hémoglobine et le volume du compartiment extracellulaire mesuré par bioimpédance avec de l'eau tritiée, suggérant ainsi un rôle intrinsèque de PPAR- γ sur l'hématopoïèse et plus précisément l'érythropoïèse (336).

Nagasawa et al. ont confirmé *ex vivo* l'expression de *PPARG* dans les progéniteurs érythroïdes que ce soit au stade BFU-E ou CFU-E. L'activation pharmacologique de PPAR- γ par la troglitazone ou la pioglitazone diminue d'une part la prolifération des progéniteurs érythroïdes sans induire d'apoptose mais retarde également leur maturation, objectivé par la diminution d'expression de la glycophorine A ou du récepteur à la transferrine. Ce retard de maturation est médié par un mécanisme de régulation transcriptionnelle négative de GATA-1, facteur de transcription et régulateur clé de l'érythropoïèse indispensable à la différenciation érythroïde terminale (337).

PPAR- γ peut également moduler l'érythropoïèse en agissant sur d'autres acteurs majeurs de ce processus, en particulier les macrophages des îlots érythroblastiques essentiels dans la phagocytose des noyaux lors de l'énucléation des érythroblastes ou le recyclage du fer. L'inactivation spécifique de PPAR- γ dans les cellules hématopoïétiques entraîne une diminution du nombre de macrophages qu'ils soient spléniques ou associés aux îlots érythroblastiques. Cette inactivation s'accompagne d'une modification de leur profil transcriptomique, orienté vers une signature pro-inflammatoire ainsi qu'une altération de l'érythropoïèse terminale, en situation de stress hémolytique (338).

Par ailleurs, les macrophages jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'érythropoïèse de stress (339), en particulier au cours de la transition des progéniteurs érythroïdes de stress, de la phase de prolifération à la différenciation. Au cours de la phase d'état, les macrophages synthétisent des ligands activant la voie canonique de Wnt, favorisant la prolifération et inhibant la différenciation de ces progéniteurs. La régulation de la balance prolifération/différenciation est sous la dépendance de PPAR- γ . En effet, la signalisation EPO/STAT5 macrophagique induit d'une part la surexpression de PPAR- γ mais également la synthèse de son ligand naturel le $\Delta 12$ -PGJ2 et entraîne ainsi la répression PPAR- γ -dépendante de Wnt. L'activation de PPAR- γ dans les macrophages par la pioglitazone conduit également à une répression de la signalisation de Wnt, favorisant la différenciation des progéniteurs érythroïdes (340).

Rôles dans la mégacaryopoïèse

L'expression de PPAR- γ a été retrouvée à la fois *in vitro* sur une lignée cellulaire de leucémie aiguë mégacaryoblastique (Meg-01) mais également *ex vivo* dans les mégacaryocytes (MK) issus de la moelle osseuse normale, tant au niveau transcriptomique que protéique. De façon plus surprenante, l'isoforme PPAR- γ 1 a également été identifiée dans les plaquettes, bien que ces cellules soient anucléées (341). La 15d-PGJ2, ligand spécifique de PPAR- γ intervient dans la maturation des MK favorisant la formation de proplaquettes et *in fine* la production de plaquettes fonctionnelles. Cette interaction suggère une auto-régulation de la thrombopoïèse, étant donné que les MK sont connus pour produire la prostaglandine D2, précurseur du 15d-PGJ2. Toutefois, le rôle spécifique de PPAR- γ n'a pas pu être confirmé puisque le 15d-PGJ2 maintient ses effets pro-plaquetto-gènes que ce soit à partir de MK inactivés pour *PPARG* ou lorsque co-cultivés avec du GW9662, un antagoniste spécifique de PPAR- γ (342).

Identifié et caractérisé à l'origine comme un facteur de transcription, l'expression de PPAR- γ dans les cellules anucléées, telles que les plaquettes, suggère des fonctions non transcriptionnelles. Ray et al. ont montré que l'activation des plaquettes par la thrombine ou le collagène diminuait l'expression de PPAR- γ par relargage dans les microparticules plaquettaires. De façon intéressante, le récepteur PPAR- γ contenu dans ces microparticules conserve sa capacité de liaison à l'ADN et peut être transmis à d'autres cellules, ouvrant la voie à de nouvelles régulations intercellulaires, celles-ci incluant des propriétés anti-inflammatoires pouvant être attribuées à sa capacité de transrépression (343).

Rôles dans les CSH

PPAR- γ est également fortement exprimé dans les CSH CD34+ et les progéniteurs multipotents. Plusieurs modèles dans la littérature soutiennent le rôle de PPAR- γ dans la régulation de l'homéostasie des CSH. L'inactivation par ARN interférent de PPAR- γ au sein des cellules Lin-CD34+CD38-CD45Ra-CD90+ issues de sang de cordon ou l'adjonction de GW9662, inhibiteur spécifique de PPAR- γ permet d'augmenter *ex vivo*, non seulement leur expansion mais également celle des progéniteurs multipotents, suggérant un rôle de PPAR- γ dans la régulation de la quiescence des CSH, comme régulateur négatif de leur auto-renouvellement. D'un point de vue fonctionnel *in vivo*, ces cellules traitées conservaient un potentiel de greffe et de reconstitution de l'hématopoïèse dans des souris NSG qui s'avérait être supérieur aux souris contrôles à court et à moyen terme, que ce soit en greffe primaire ou secondaire. Ainsi, l'inhibition de PPAR- γ favorise l'expansion des CSH en régulant

négativement de nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire mais également dans le métabolisme comme *FBP1* (*Fructose-1,6-bisphosphatase 1*), un régulateur négatif de la glycolyse (257), le métabolisme énergétique jouant un rôle clé dans la maintenance des CSH (344). Dans un autre modèle qui est celui l'anémie de Fanconi caractérisée par des mutations dans le système de réparation de l'ADN et associée à une insuffisance médullaire, l'inhibition de PPAR- γ qu'elle soit pharmacologique ou par interférence ARN, permet également de favoriser l'auto-renouvellement des CSH invalidées pour *FANCD2*, que ce soit *in vitro* ou dans des modèles murins (345).

Au sein de l'équipe, plusieurs travaux du Dr Stéphane Prost, qui s'était initialement intéressé aux cytopénies liées à l'infection par le virus du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), se sont focalisés sur le rôle de PPAR- γ dans l'hématopoïèse. La diminution du potentiel clonogénique des progéniteurs multipotents CD34+ des singes infectés par le SIV (*simian immunodeficiency virus*) comparé aux animaux contrôles suggérait un dysfonctionnement intrinsèque de l'hématopoïèse. Il montra que cet effet anti-clonogénique était lié à la protéine virale Nef qui induisait une diminution transcriptionnelle de STAT5 chez les animaux infectés et qui s'avérait également agir comme un agoniste de PPAR- γ . L'activation de PPAR- γ par ses ligands, qu'ils soient synthétiques (troglitazone, rosiglitazone) ou naturels (15d-PGJ2) réduisaient le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ en régulant négativement l'expression de STAT5 et agissait ainsi comme un inhibiteur de la myéloprolifération (**Figure 26**). Cet effet antiprolifératif est spécifiquement relayé par PPAR- γ puisqu'inhibé en présence de son antagoniste, le GW9662 (256).

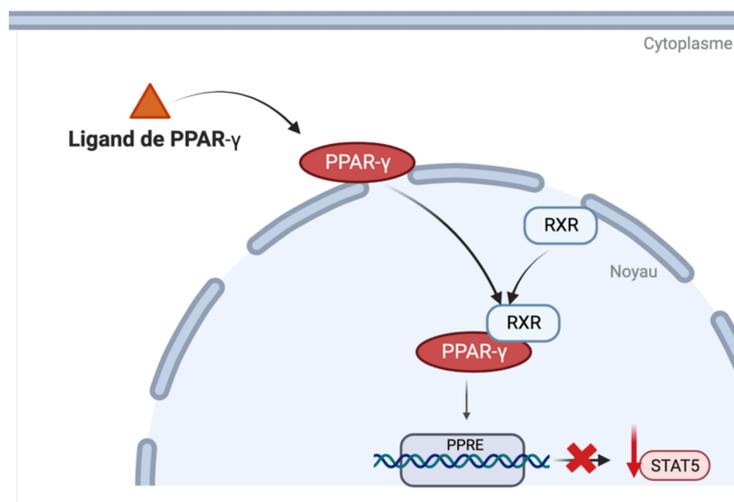


Figure 26 : L'activation de PPAR- γ induit une diminution transcriptionnelle de STAT5, d'après S.Prost et al. (346).

L'hétérodimère PPAR/RXR se lie à un PPRE (élément de réponse PPAR) situé dans le promoteur de STAT5 et régule négativement sa transcription.

Potentiel thérapeutique dans les hémopathies

Bien que les rôles les mieux étudiés de la voie PPAR- γ concernent l'adipogenèse et la sensibilité à l'insuline (181), mais nous avons vu que les rôles pléiotropiques de PPAR- γ lui confèrent de multiples propriétés potentielles en thérapeutique. Outre son potentiel anti-inflammatoire et anti-fibrotique, PPAR- γ présente également des propriétés anti-oncogéniques dans différentes tumeurs solides (347) ainsi que les hémopathies malignes (348) y compris les leucémies aiguës (349). En effet, les agonistes de PPAR- γ exercent leur potentiel anti-leucémique selon divers mécanismes d'action, bien que ces derniers varient selon la nature de la lignée cellulaire étudiée et qu'ils reposent principalement sur des études *in vitro* avec peu de données sur des cultures primaires provenant de patients. En outre, la plupart de ces études emploient des doses au-delà des doses utilisées en thérapeutique, exposant ainsi à des effets non spécifiques « *off-target* ».

L'activation de PPAR- γ par des doses élevées d'agonistes induit l'apoptose sur plusieurs lignées de LAM (K562, HL-60, U937 et Mono Mac 6) en activant des protéines pro-apoptotiques telles que Bax ou la caspase 3 et en inhibant des protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 ou la survivine (350, 351), mais également en favorisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (352) et l'effondrement du potentiel mitochondrial (351). Les agonistes de PPAR- γ exercent également un effet antiprolifératif sur les cellules de LAM en favorisant l'arrêt du cycle cellulaire (353, 354), notamment par l'augmentation de p21 et la diminution de la Cycline D1 (355). D'autres études ont également rapporté le potentiel des ligands de PPAR- γ en tant qu'agent différenciant sur les lignées U937 et THP-1, deux lignées à différenciation monocyttaire (356, 357). De façon intéressante dans le contexte hématologique, les agonistes de PPAR- γ sont capables d'exercer leurs effets en synergie avec d'autres composés utilisés en thérapeutique dans les LAM tels que la cytarabine, ou encore l'ATRA-RAR α qui est un des partenaires de RXR, au même titre que PPAR (358). L'ensemble des effets anti-leucémiques potentiels des agonistes de la voie de PPAR- γ est résumé dans le **Tableau 7** et la **Figure 27**.

Tableau 7 : Principaux mécanismes anti-leucémiques de l'activation de la voie de PPAR- γ d'après Ryu et al. (248).

| Mécanisme d'action | Ligand(s) de PPAR- γ | Lignée(s) étudiée(s) |
|--|--|-------------------------|
| Effet pro-apoptotique | CDDO-Me, pioglitazone, rosiglitazone, 15d-PGJ2 | KG-1, U937, HL-60 |
| Induction des caspases | CDDO-Me, troglitazone, 15d-PGJ2 | U937, MonoMac6 |
| Induction de ROS | CDDO-Me, ciglitazone, rosiglitazone, troglitazone, 15d-PGJ2 | U937 |
| Induction de Bax | CDDO-Me, troglitazone, 15d-PGJ2 | U937, HL-60 |
| Diminution BCL-2 | CDDO-Me, troglitazone, 15d-PGJ2 | HL-60 |
| Diminution BCL-XL | Troglitazone, 15d-PGJ2 | U937, MonoMac6 |
| Diminution MCL-1 | Troglitazone, 15d-PGJ2 | U937, MonoMac6 |
| Diminution survivine | Troglitazone, 15d-PGJ2 | K562, HL-60 |
| Diminution potentiel mitochondrial | CDDO, 15d-PGJ2, rosiglitazone | U937, HL-60, MonoMac6 |
| Effet de différenciation cellulaire | CDDO-Me, troglitazone, rosiglitazone, 15d-PGJ2 | HL-60, MonoMac6, THP-1 |
| Inhibition de la prolifération cellulaire | CDDO-Me, pioglitazone, troglitazone, rosiglitazone, 15d-PGJ2 | K562, KG-1, U937, HL-60 |
| Diminution signalisation ERK1/2 | CDDO-Me | U937, HL-60 |
| Ralentissement du cycle cellulaire | Pioglitazone, troglitazone | HL-60 |
| Augmentation p21 | Evodiamine (extrait naturel), troglitazone | K562, U937, EoL-1 |
| Diminution de la cycline D1 | Evodiamine (extrait naturel) | K562 |

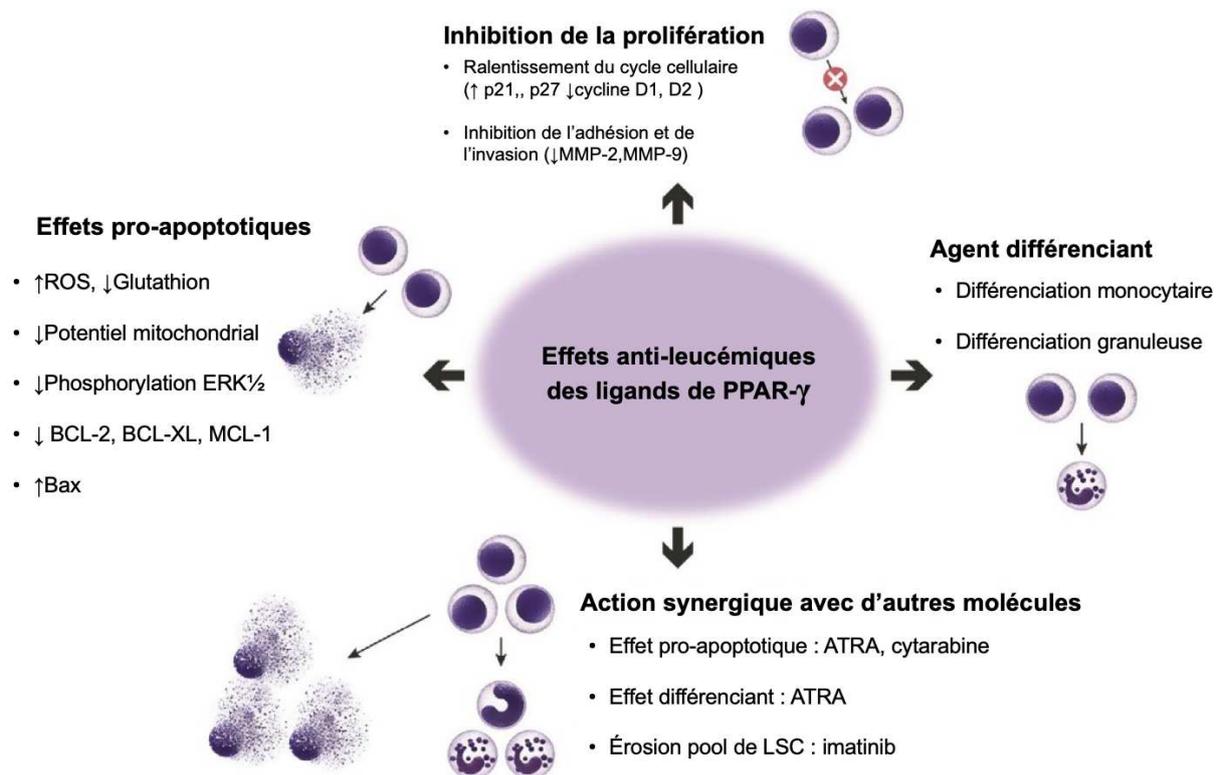


Figure 27 : Principaux mécanismes anti-leucémiques de l'activation de la voie de PPAR- γ d'après Ryu et al. (248)

Les études précédemment rapportées se concentrent sur l'effet des ligands sur les cellules leucémiques, mais les nombreuses facettes de l'activité de PPAR- γ doivent également être considérées sur les composantes de la niche hématopoïétique, en particulier les adipocytes. En effet, le niveau d'envahissement blastique médullaire contraste fréquemment avec la profondeur des cytopénies, suggérant une altération de l'hématopoïèse résiduelle en lien avec une altération du microenvironnement médullaire. Dans le contexte des LAM, Boyd et al. ont montré dans des modèles murins de xénogreffe que les cellules leucémiques perturbaient la niche adipocytaire de manière précoce. En effet, l'analyse transcriptomique des cellules stromales primaires issues de patients atteints de LAM confirmait l'altération de la voie relative à l'adipogenèse, cette altération induisant un défaut de maturation des lignées myéloïdes et érythroïdes. De manière intéressante, l'administration d'un agoniste de PPAR- γ dans un modèle murin de xénogreffe a permis de restaurer à la fois l'adipogenèse de la moelle osseuse mais également la maturation des lignées érythro-myéloïdes, tout en diminuant le potentiel clonogénique *ex vivo* des cellules leucémiques issues de la xénogreffe (41).

Une autre composante clé dans l'initiation et la progression tumorale est le réseau de cytokines pro-inflammatoires fréquemment amplifié dans les LAM. Cet environnement pro-inflammatoire est notamment maintenu par la sécrétion autocrine de TNF- α et l'activation constitutive de la

voie NF- κ B (359) qui conduit au remodelage de la niche en réponse à l'inflammation, favorisant ainsi la progression tumorale aux dépens de l'hématopoïèse normale (360). Récemment, un score basé sur la signature transcriptomique liée à l'inflammation et construit à l'aide d'une approche d'apprentissage automatisé (régression LASSO) a permis de stratifier le pronostic des patients, qu'ils soient adultes ou pédiatriques, un score élevé étant associé à une survie globale médiocre (361). Des premières approches visant à moduler pharmacologiquement cet environnement pro-inflammatoire, telles que l'utilisation de la dexaméthasone sont actuellement à l'étude (362), ce qui ouvre également des perspectives pour les ligands PPAR- γ étant donné leur propriétés anti-inflammatoires.

La reprogrammation métabolique est un mécanisme d'adaptation clé des cellules leucémiques pour favoriser leur prolifération ou leur survie dans un environnement plus défavorable. Ainsi les LAM présentent de nombreuses altérations métaboliques, qu'elles concernent les voies lipidiques, glucidiques ou encore celle des acides aminés comme la glutamine ou la cystine. Étant donné le rôle central de PPAR- γ dans la modulation métabolisme lipidique, les ligands de PPAR- γ apparaissent comme une cible thérapeutique intéressante à investiguer dans ce contexte, en particulier dans d'autres mécanismes de mort cellulaire tels que la ferroptose qui implique l'oxydation des acides gras (363). Néanmoins, nous avons choisi de ne pas développer ce volet en détail, car il nécessiterait un chapitre dédié.

L'ensemble de ces données ouvre une perspective d'approche thérapeutique plus holistique, ciblant à la fois les cellules leucémiques, mais également la niche leucémique dont les altérations compromettent l'hématopoïèse normale. Dans ce contexte, les propriétés pléiotropiques des ligands de PPAR- γ offrent un potentiel prometteur pour le traitement des LAM.

Potentiel de l'axe PPAR- γ /STAT5 : de la LMC à la LAM

Un mécanisme d'action potentiel de l'activation de la voie de PPAR- γ particulièrement intéressant dans les LAM implique la régulation transcriptionnelle des facteurs de transcription STAT5A et STAT5B (*Transducteur de Signal et Activateur de Transcription*). Ces facteurs sont impliqués dans la régulation de différents processus fondamentaux comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose (364, 365) ainsi que dans la régulation de la quiescence des CSH (366). STAT5 peut être activé en aval de nombreuses voies de signalisation ou en réponse à de multiples cytokines ou facteurs de croissance. Ainsi, de nombreuses anomalies génétiques rencontrées dans les hémopathies myéloïdes, qu'il s'agisse de NMP (mutation JAK2,

translocation BCR-ABL1) ou de LAM (mutation de *FLT3-ITD*, *cKIT*), entraînent une dérégulation et une activation constitutive de STAT5 (367). Par ailleurs, cette activation constitutive peut également être causée par des phénomènes d'auto ou de paracrinie (365).

À partir de son premier travail fondateur sur le rôle de PPAR- γ en tant qu'inhibiteur de la myéloprolifération, l'équipe du Dr Stéphane Prost s'est attachée à préciser le rôle de l'axe PPAR- γ /STAT5 dans LMC, qui est la plus fréquente des NMP. Dans cette pathologie, l'activation constitutive par phosphorylation de STAT5 en aval de BCR-ABL1 est essentielle dans l'apparition, le maintien de la maladie et à la transformation leucémique (368, 369). L'activation de PPAR- γ dans la LMC par la pioglitazone, entraîne l'érosion des CSL *in vitro* et en clinique, et ceci en relation avec la diminution transcriptionnelle de STAT5 qui contribue à la maintenance des CSL en activant des voies de quiescence telles que la voie HIF2 α -CITED2 (370). De manière intéressante, la pioglitazone potentialise l'action des Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK), traitement standard de la LMC et permet de cibler à la fois les cellules en division et les cellules quiescentes. Dans l'étude de phase II ACTIM, l'incidence cumulative de réponse moléculaire 4.5 (MR4.5) a été de 56% chez les patients traités la combinaison ITK et pioglitazone, contre 24% dans le groupe contrôle recevant un ITK seul (371). Concernant les LAM, la voie STAT5 est activée de manière constitutive dans 70% des cas (372, 373) et cette dérégulation est associée à un pronostic péjoratif et à une survie globale médiocre à la fois chez les patients adultes et pédiatriques (374-376), justifiant ainsi le rationnel de l'utilisation des agonistes de PPAR- γ dans les LAM.

3. AXL

3.1 AXL, récepteur de la famille des TAM

a) Généralités

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont un groupe de 58 protéines transmembranaires regroupés en 20 familles selon leur organisation structurale et qui jouent un rôle central dans signalisation cellulaire. Ces récepteurs présents à la surface des cellules régulent de nombreux processus physiologiques fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation ou la survie cellulaire. La dérégulation des RTK par leur surexpression ou leur activation constitutive leur confère un caractère oncogène mais également un mécanisme d'échappement thérapeutique qui font l'objet de nombreux développements.

AXL est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs TAM, du nom de ses 3 membres TYRO-3, AXL, et MER. Comme tous les RTK, les TAM récepteurs ont une structure composée d'un site de fixation du ligand situé dans le domaine extracellulaire relié au domaine cytoplasmique portant l'activité kinase par une simple hélice transmembranaire. AXL, MER et TYRO-3 partagent respectivement 31-36% et 54-59% d'homologie de séquence au sein de leurs régions extracellulaires et intracellulaires (377).

Les récepteurs TAM partagent un motif conservé d'acides aminés et spécifique à cette famille au niveau du domaine kinase : KWIAIES pour AXL et MER, les isoleucines étant remplacées par des leucines pour TYRO3 (378). Une autre spécificité des récepteurs TAM tient à leur domaine extracellulaire constitué de deux domaines de type immunoglobuline et deux domaines de type fibronectine III (FNIII), à l'image des molécules d'adhésion, qui jouent un rôle central dans les interactions intercellulaires (**Figure 28**) (379).

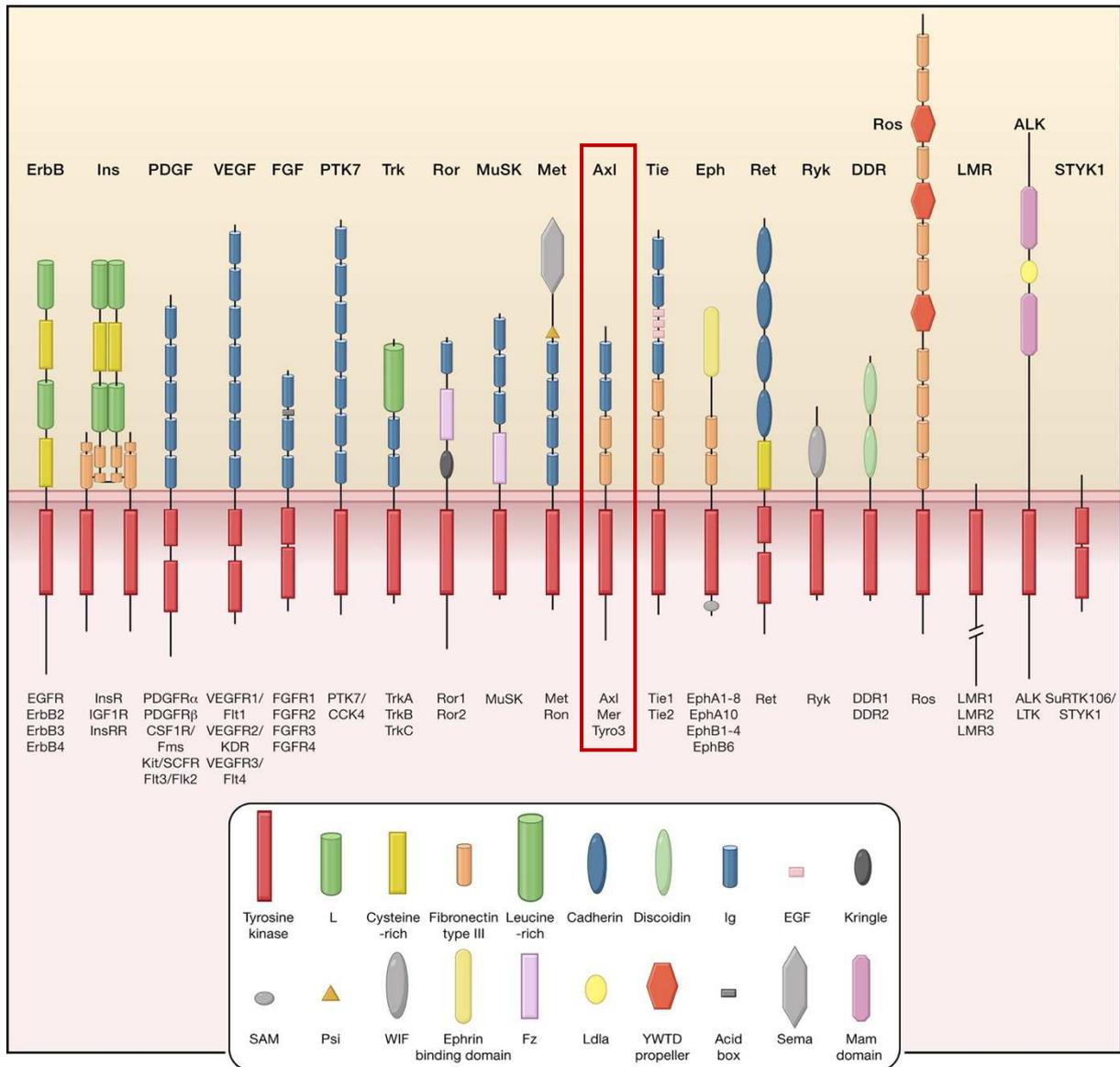


Figure 28 : Représentation schématique des 20 familles de RTKs selon leur caractéristiques structurales d'après M. A. Lemmon and J. Schlessinger (380).

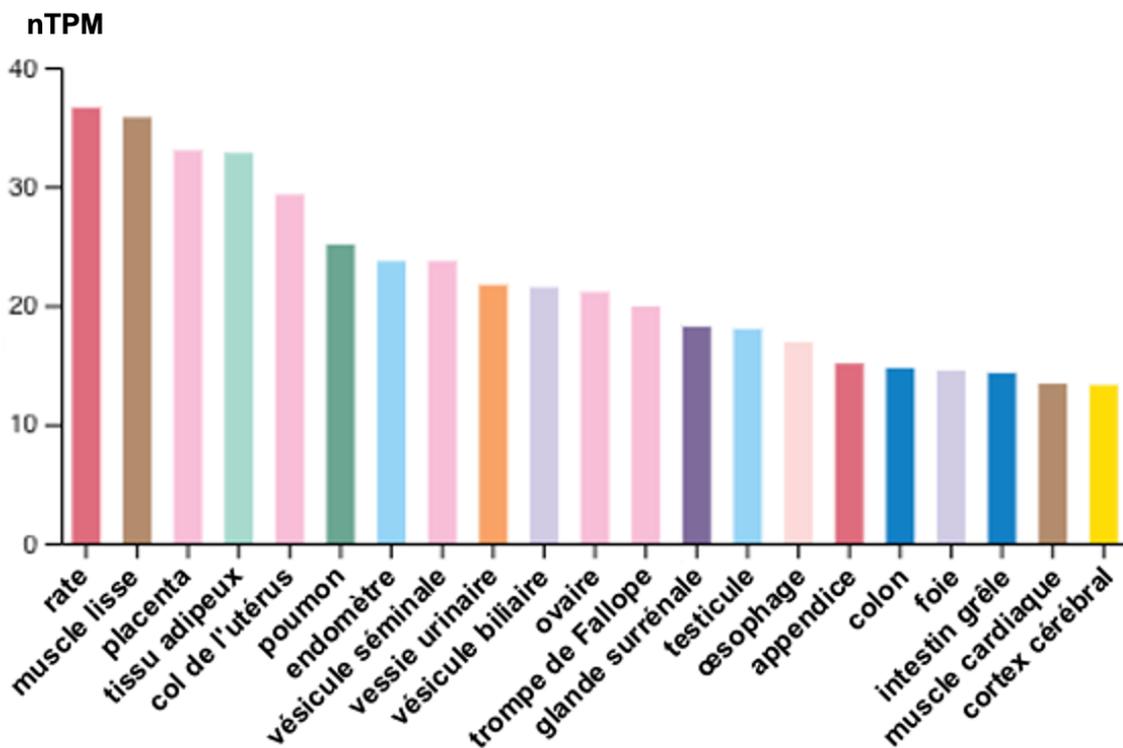
Le récepteur « prototype » de chaque famille est indiqué au-dessus du récepteur et les membres connus en dessous. Les domaines structurels de la région extracellulaire (partie orange) sont légendés dans l'encadré blanc tandis que le domaine intracellulaire est représenté en rouge.

Historiquement isolé en 1988 chez deux patients atteints de LMC (381) puis identifié en 1991 comme « gène transformant » dans la LMC, AXL tire son nom du grec "*anaxelektō*" signifiant "incontrôlé" (382). La même année et de manière concomitante, une autre équipe a cloné le même gène, toujours chez un patient atteint de LMC, qu'ils nomment alors UFO (*Unidentified Function Of*) en référence à la fonction non encore identifiée de sa protéine (383). AXL est également connu sous le nom d'ARK (*Adhesion-Related Kinase*), un RTK identifié chez la souris et dont la structure et la distribution tissulaire rappelle celle de certaines molécules d'adhésion, d'où cette dénomination (384).

Le gène *AXL* est situé sur le bras long du chromosome 19 (q13.2) et est composé de 20 exons répartis sur une région de 44 kb. Deux isoformes d'AXL sont générées par épissage alternatif de l'exon 10, l'isoforme complète étant la plus abondante (385). La protéine AXL est composée de 894 acides aminés pour un poids moléculaire de 104 kDa qui peut subir des modifications post-traductionnelles et peut atteindre 120 à 140 kDa selon son degré de glycosylation (382).

b) Distribution tissulaire

AXL est exprimé de façon ubiquitaire, avec des niveaux élevés dans le muscle lisse ou le tissu adipeux (386). Par ailleurs, l'expression notable d'AXL dans les organes lymphoïdes, les cellules dendritiques ou encore les monocytes/macrophages suggère une forte implication d'AXL dans l'homéostasie immunitaire par la régulation négative de la réponse immunitaire innée ou encore la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages (387).



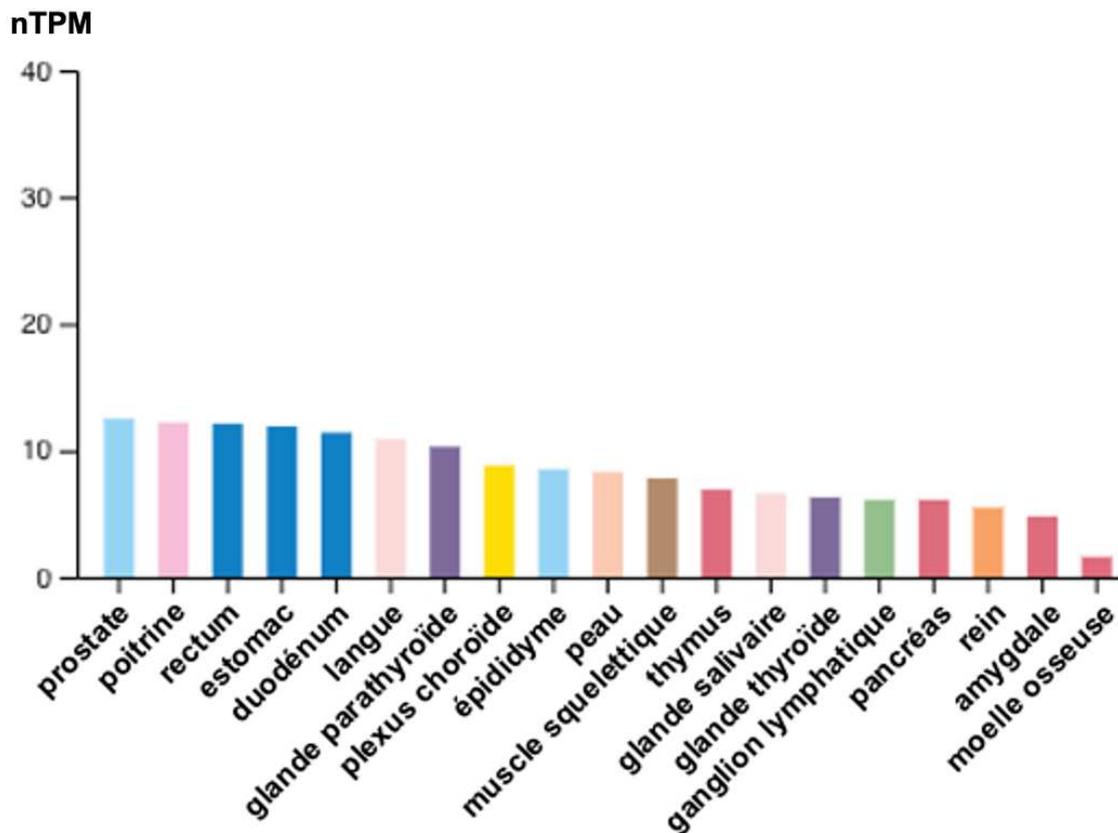


Figure 29 : Expression d'AXL (en transcrit par million) et distribution selon les différents tissus. Figure réalisée à partir des données issues de « The Human Protein Atlas » (386).

Les conséquences biologiques de la signalisation d'AXL ou de sa suractivation sont ainsi spécifiques au type de cellule ou tissu que ce soit en situation physiologique ou pathologique. Nous nous concentrerons uniquement sur ses fonctions les plus connues, plus particulièrement en relation avec son implication en hématologie et en immunologie.

3.2 Structure et organisation d'AXL

a) Structure protéique d'AXL

À l'image de tous les RTKs, AXL présente un domaine extracellulaire comprenant deux domaines de type immunoglobuline (Ig) et deux répétitions FNIII. Cette partie est reliée par une région transmembranaire, au domaine kinase intracellulaire qui porte les résidus Y779, Y821, Y866, impliqués dans l'activation d'AXL (**Figure 30**).

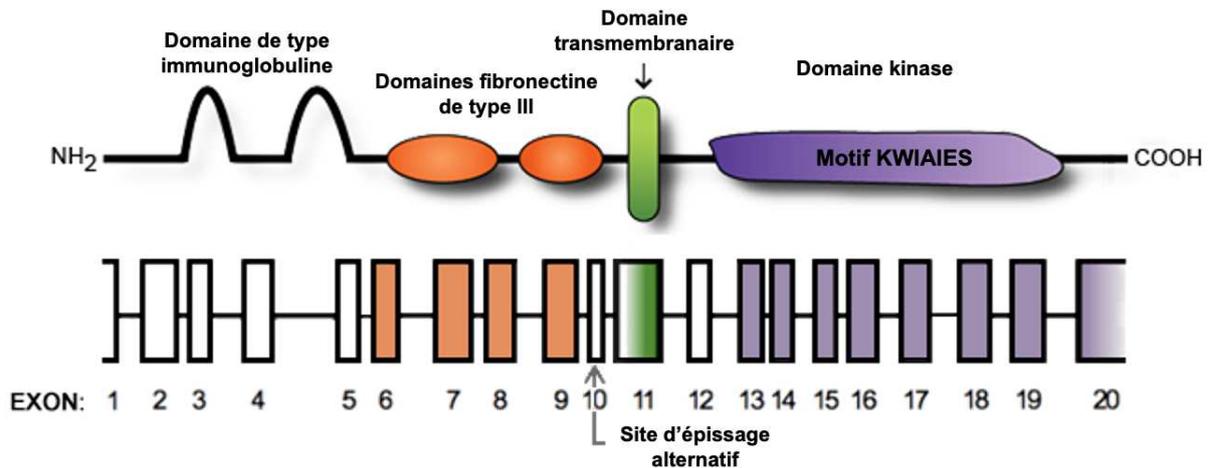


Figure 30 : Organisation du gène *AXL*, transcription et traduction d'après Justine Migdall et Douglas K Graham, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2010-02-01.

- **Exon 1** : L'insertion d'AXL dans la membrane cytoplasmique est dépendante d'un peptide signal codé par l'exon 1.

- **Exon 2 à 5** : Ces exons codent pour les deux domaines de type Ig, qui sont impliqués dans les interactions majeures et mineures avec le domaine de type laminine G présent sur Gas6, ligand d'AXL. Cette interaction confère à Gas6 une haute affinité (nM) comparé aux autres récepteurs TAM qui se lient uniquement via un contact de type mineur (388).

- **Exons 6 à 9** : Les deux domaines FNIII répétés codés par les exons 6 à 9, sont communs à d'autres molécules d'adhésion à l'image de NCAM (*neural-cell-adhesion molecule*). Ce domaine joue un rôle central dans les interactions cellules-cellules (389) mais également avec la matrice extracellulaire (390), en servant de pont moléculaire pour les intégrines médiant ainsi des phénomènes d'adhésion cellulaire. Cette interaction est particulièrement importante dans le contexte du cancer, AXL favorisant l'invasion tumorale ou encore les métastases (391).

- **Exon 11** : AXL peut subir un clivage post-traductionnel par des métalloprotéases au niveau de la région codée par l'exon 11, à proximité du domaine transmembranaire produisant ainsi une fraction AXL soluble de 80 kDa (392).

- **Exons 13 à 20** : Le domaine kinase enzymatique d'AXL situé à l'extrémité C-terminale intracellulaire est codé par les exons 13 à 20. Ce dernier contient la séquence conservée d'acides aminés KWIAIES spécifique aux récepteurs TAM.

b) Ligands naturels

Gas6 (*Growth Arrest Specific 6*) est une protéine vitamine-K dépendante et l'un des principaux ligands naturels des TAM récepteurs (393). Gas6 est une protéine sécrétée de 75 kDa avec un domaine Gla (acide glutamique) sur son extrémité N-terminale. Afin d'être biologiquement actif, ce domaine doit être carboxylé par la γ -glutamyl carboxylase, dont un des co-facteurs est la vitamine K. Ces groupements carboxyglutamiques assurent une liaison Calcium-dépendante avec les phospholipides membranaires chargés négativement, telles que les phosphatidylsérines (PtdSer) exposées à la surface des corps apoptotiques (394).

La séquence de *GAS6* a été identifiée et caractérisée à partir d'un criblage d'une banque d'ADN complémentaire issue d'une lignée de fibroblastes NIH 3T3 en arrêt de croissance, d'où son appellation, le 6 correspondant au numéro du clone (395). Le gène *GAS6* est situé sur le chromosome 13q34 et comporte 15 exons.

Le domaine Gla est suivi d'une boucle maintenue par un pont disulfure puis de quatre domaines répétés de type EGF (*Epidermal Growth Factor*). À son extrémité C-terminale, Gas6 présente un domaine semblable à la SHGB (*Sex hormone-binding globulin*) comprenant deux sous-domaines de type laminine G (LamG), directement impliqués dans la liaison avec AXL (**Figure 31**) (395).



Figure 31 : Représentation schématique de la structure de Gas6 d'après Wu et al. (396).

Gas6 se compose d'un domaine Gla qui assure la liaison avec les groupements PtdSer, suivi de quatre domaines EGF puis d'un domaine semblable à la SHGB (*Sex hormone-binding globulin*), lui-même composé de deux domaines similaires à la laminine G (*LamG*).

Bien que l'expression de *GAS6* soit ubiquitaire, son niveau d'expression est variable selon les tissus. Dans le microenvironnement médullaire, Gas6 est principalement sécrété par les composantes cellulaires de la niche hématopoïétique tels que les ostéoblastes (397), les cellules stromales (398) ou encore les cellules endothéliales (399). La concentration plasmatique de Gas6 varie entre 25 et 50 ng/mL selon des cohortes témoins (400, 401) mais peut être plus élevée dans certaines conditions pathologiques telles que le myélome (401) ou le sepsis (402).

Gas6 présente 44% d'homologie de séquence avec la protéine S (PROS1), plus largement connue comme protéine anticoagulante vitamine-K dépendante mais qui s'avère également

être un ligand des récepteurs TAM. PROS1 est présente à une concentration plasmatique environ 1 000 fois plus élevée dont 60 à 70 % est liée à la protéine C4BP (*C4b-binding protein*) (403). Alors que Gas6 est capable de se lier aux trois récepteurs TAM, PROS1 se lie uniquement à TYRO-3 et MER, mais pas à AXL en raison d'altération dans le troisième domaine extracellulaire FNIII) (404, 405). Malgré un haut degré d'homologie entre les récepteurs TAM et leurs ligands, AXL est préférentiellement activé par Gas6 avec une affinité de liaison 100 à 1000 fois plus élevée que MER et TYRO-3 (de l'ordre du nM) tandis que TYRO-3 est principalement activé par PROS1. MER quant à lui présente une affinité plus faible vis-à-vis des deux ligands (de l'ordre du μM) (406).

Plus récemment, la fonction de TULP1 (*Tubby and tubby-like protein 1*) a été rapportée comme ligand des récepteurs TAM macrophagiques, favorisant à la manière de Gas6 et PROS1, la phagocytose des corps apoptotiques (407). TULP1 appartient à la famille des protéines « tubby » qui compte quatre membres (tubby, TULP1, 2 et 3 ; Tulps) partageant un domaine de 260 acides aminés hautement conservé dans la région C-terminale et dont les rôles ont été initialement explorés dans la dégénérescence rétinienne associée à l'apoptose des photorécepteurs (408). TULP1 n'est pas apparenté à Gas6 ou PROS1, que ce soit en termes de séquence ou de structure, suggérant une liaison à AXL par un autre mécanisme encore non élucidé.

c) Activation d'AXL

L'activation canonique d'AXL et le recrutement de ses voies de signalisation en aval dépendent de la liaison d'AXL à son ligand Gas6. Ce dernier s'associe au domaine Ig d'AXL par l'intermédiaire de son domaine SHBG, agissant ainsi comme support pour la dimérisation d'AXL (409). Une des originalités de l'activation des récepteurs TAM *et a fortiori* d'AXL implique une interaction supplémentaire entre la partie γ -carboxylée de Gas6 et la PtdSer exposée à la surface des cellules (410).

L'analyse cristallographique du complexe Gas6/AXL montrent que la dimérisation d'AXL médiée par Gas6 s'effectue en deux étapes. Un premier complexe Gas6/AXL de haute affinité se forme par liaison du premier domaine LamG de GAS6 avec chacun des 2 domaines Ig d'AXL, puis deux complexes protéiques GAS6/AXL se dimérisent pour aboutir à un complexe protéique 2:2 (388) (**Figure 32**).

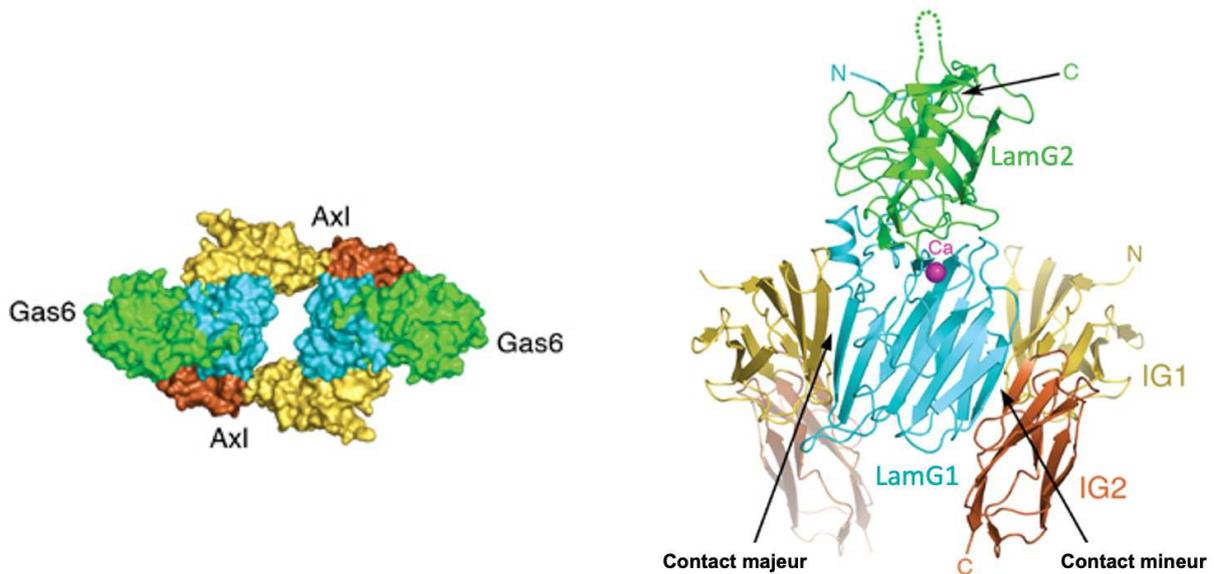


Figure 32 : Analyse de la co-cristallisation d'AXL soluble et de son ligand Gas6 d'après Sasaki et al. (388).

Les domaines Ig d'AXL (respectivement en jaune-IG1 et marron-IG2) sont impliqués dans des interactions majeures et mineures avec le domaine de type laminine G présent sur Gas6 respectivement en cyan (segment N-terminal et LamG1) et vert (LamG2). Ces interactions permettent la formation d'un complexe stable et spécifique.

Dans ce nouveau complexe protéique dimérique GAS6/AXL, la proximité des deux domaines kinases d'AXL permet la trans-autophosphorylation des résidus tyrosine (les trois sites connus étant 779, 821, 866) du domaine intra-cytoplasmique. Cette phosphorylation des différents résidus tyrosine permet le recrutement de motifs spécifiques comme les domaines PTH (*PhosphoTyrosine Binding*) ou SH2 (*Src Homology-2*) reconnus par des protéines en aval de la signalisation comme les voies de la PLC- γ , de la PI3K/AKT/mTOR, MEK-ERK, NF- κ B et JAK/STAT (411, 412).

La signalisation en aval d'AXL supporte donc divers processus cellulaires essentiels au développement tumoral telles que la prolifération, l'invasion et la migration, la transition épithélio-mésenchymateuse, le caractère souche, l'angiogenèse ou encore la modulation immunitaire (**Figure 33**).

Certains de ces mécanismes intéressent particulièrement les LAM, que nous traiterons dans le chapitre 3.

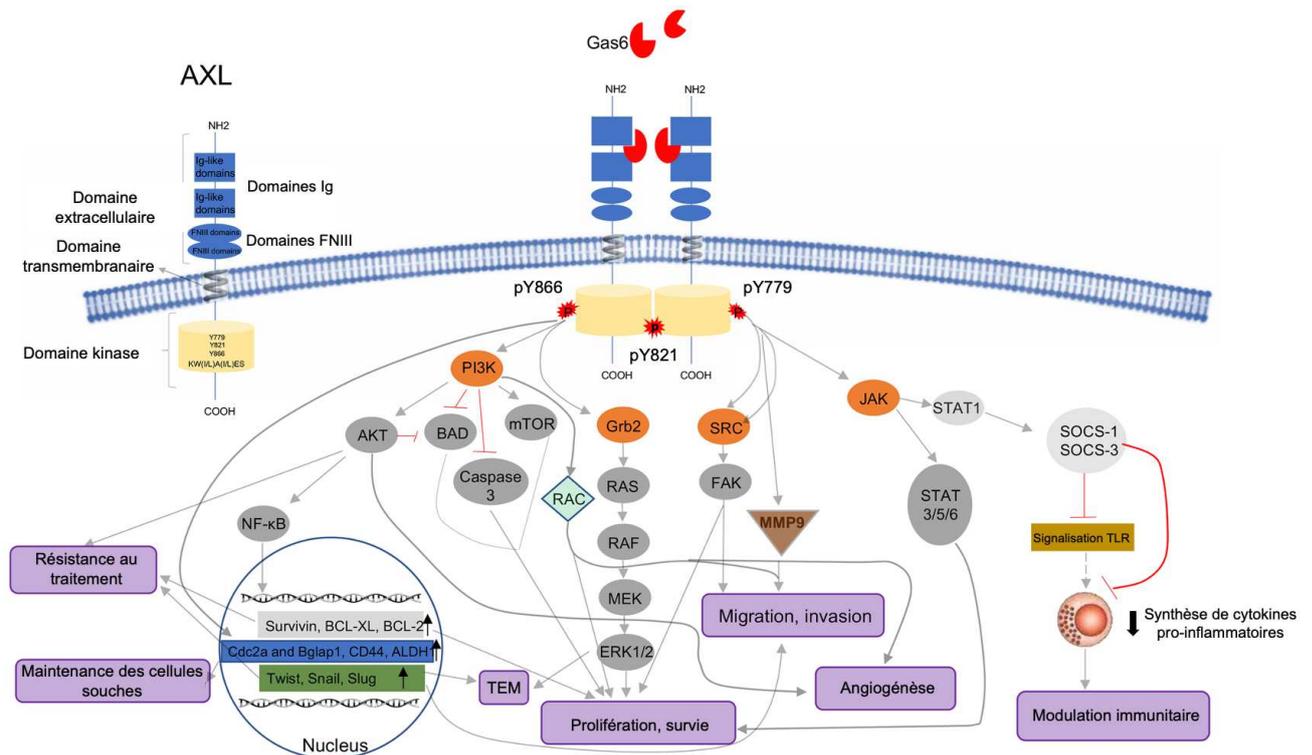


Figure 33 : Activation d'AXL et voies de signalisation en aval.

Après activation canonique d'AXL par Gas6, la transphosphorylation des domaines Tyr 821, 866 et 779 du domaine intracellulaire, permet le recrutement de voies de signalisation en aval telles que PI3K/AKT/mTOR, MEK-ERK, NF-κB et JAK/STAT impliquées dans divers processus fondamentaux comme la prolifération et la survie, la migration, l'invasion, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), l'angiogénèse, la résistance aux thérapies, la modulation immunitaire ou le maintien des cellules souches. D'après Zhu et al. (412)

AXL peut également être activé indépendamment de son ligand, en particulier lorsque le récepteur est surexprimé. En effet, la surexpression d'AXL par transfection sur plusieurs lignées cellulaires induit l'agrégation des cellules par liaison entre ses domaines extracellulaires, conduisant à une activation et une phosphorylation d'AXL (413). L'activation ligand-indépendante peut également s'effectuer par transactivation ou hétérodimérisation avec d'autres RTKs, qu'ils appartiennent à la famille TAM (414, 415) ou à d'autres familles telles que l'EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) (416), HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*) (417) ou encore FLT3 (418). Cette activation indépendante du ligand entraîne également une phosphorylation d'AXL et l'activation des voies de signalisation en aval.

Toutes ces interactions impliquant AXL avec d'autres RTKs *driver*, qu'elles soient physiques ou fonctionnelles par interaction avec les voies de signalisation renforcent le rôle d'AXL en tant que pivot dans les mécanismes d'échappement thérapeutique, permettant de maintenir une signalisation oncogénique active malgré l'inhibition de l'oncogène *driver*.

d) Régulation d'AXL

À l'image de nombreux systèmes biologiques, divers mécanismes régulent l'activité d'AXL afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et de limiter les effets potentiellement oncogéniques d'une signalisation aberrante.

L'ubiquitination post-traductionnelle joue un rôle majeur dans la régulation négative d'AXL, en favorisant sa dégradation dans le protéasome. Lors de sa liaison à AXL, Gas6 induit une boucle de rétrocontrôle en recrutant c-Cbl, une ubiquitine ligase de la famille Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*) également connue pour réguler l'activité d'autres RTKs comme EGFR, PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptor*) ou FGFR (*Fibroblast growth factor receptor*) (419). Une fois recruté, c-Cbl interagit soit directement en liant les résidus tyrosines d'AXL, soit indirectement en s'associant à la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), cette interaction favorisant l'endocytose d'AXL et sa dégradation lysosomale (420, 421). Dans une lignée de cellules rénales, la protéine VHL (*von Hippel-Lindau*) dont l'activité ubiquitine ligase est principalement connue dans la régulation d'HIF-1 α (422), est également impliquée dans la régulation post-traductionnelle d'AXL. En effet, en l'absence de VHL, AXL est surexprimé au niveau protéique, malgré des niveaux de transcrits semblables aux cellules non déficitaires (423). Ce résultat est toutefois à nuancer en raison de la régulation transcriptionnelle d'AXL par le facteur de transcription induit par l'hypoxie HIF1. En effet, en l'absence de VHL, HIF1 n'est pas correctement ubiquitiné et dégradé même en condition normoxique. Une fois accumulé, HIF1 peut ainsi se fixer au promoteur d'AXL, entraînant ainsi sa surexpression (424).

La déphosphorylation d'AXL par des tyrosine phosphatases constitue un deuxième mécanisme de régulation négative. AXL est capable d'interagir avec C1-TEN (ou TENC1 ou *Tensin2*) (425), un membre de la famille des tensines contenant un domaine portant une activité tyrosine phosphatase et dont le rôle régulateur a été démontré sur la protéine kinase AKT (426). Toutefois, malgré leur interaction physique, l'activité phosphatase directe sur AXL n'a pas été clairement démontrée.

Un autre mécanisme de régulation d'AXL consiste à contrôler la disponibilité du ligand Gas6 à son récepteur. Le groupement C-terminal du deuxième domaine FNIII sert de site de clivage protéolytique post-traductionnel par des métalloprotéases au niveau de la région codée par l'exon 11, libérant le domaine extracellulaire et produisant une forme soluble d'AXL de 80 kDa. Ce fragment contenant à la fois les domaines Ig et FNIII, est capable de se lier à Gas6 en tant

que récepteur leurre, réduisant la disponibilité du ligand et permet de réguler l'activité d'AXL de manière compétitive (392). Cette fraction soluble d'AXL constitue un biomarqueur d'intérêt pronostique dans le mélanome, une concentration plasmatique élevée étant associée à un pronostic péjoratif (427). sAXL peut également constituer un biomarqueur de réponse au traitement par un inhibiteur d'AXL, le bemcentinib, en particulier dans les SMD/LAM. Dans une étude de phase I/II évaluant l'activité anti-leucémique du bemcentinib chez 36 patients atteints de LAM en rechute/réfractaire ou SMD de haut risque, les patients non répondeurs présentaient une concentration élevée de sAXL à l'inclusion (428).

L'expression d'AXL peut également être régulée par certains microARN se liant à l'UTR 3' du transcrit d'AXL, réprimant ainsi sa traduction. Ainsi les miR-34a, miR-199a et miR-199b, régulateurs négatifs d'AXL, ont été identifiés au moyen d'un criblage bioinformatique à partir de lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules, de cancer du sein et de cancer colorectal. Mudduluru et al. ont par ailleurs montré que ces miR étaient eux-mêmes régulés de manière épigénétique, l'hyperméthylation des promoteurs de miR-34a, miR-199a et miR-199b aboutissant *in fine* à la surexpression d'AXL dans ces cancers solides (429).

Enfin, l'expression d'AXL peut également être modulée par un mécanisme épigénétique, son promoteur présentant une région riche en GC. Cette région comprend des sites de fixation pour plusieurs facteurs de transcription qui régulent l'activité du promoteur d'AXL (Sp-1, Sp-3, MZF1, AP-1). Ainsi, la méthylation de cette région régule négativement la transcription d'AXL (430, 431).

e) Inhibiteurs d'AXL

Comme vu précédemment, la signalisation Gas6/AXL supporte de nombreux processus fondamentaux tels que la survie, la prolifération, ou encore la migration cellulaire. Ainsi, AXL est un candidat particulièrement intéressant en tant que cible thérapeutique, en témoignent les nombreux essais cliniques en cours, particulièrement dans les cancers solides.

Diverses stratégies ont été développées pour inhiber AXL, incluant un anticorps monoclonal anti-AXL couplé ou non à un agent cytotoxique ou encore un récepteur leurre anti-ligand limitant la disponibilité de Gas6. Néanmoins, la stratégie la plus développée demeure l'inhibition de l'activité enzymatique du récepteur.

A l'image d'autres RTKs, la régulation dynamique de l'activité catalytique est essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, AXL peut adopter une conformation active ou inactive, seule la forme active permettant d'exercer son activité catalytique. Cette

conformation est conditionnée par une boucle d'activation contenant un motif hautement conservé DFG (Aspartate-Phénylalanine-Glycine) situé à proximité du site de fixation de l'ATP. Dans sa conformation active, la boucle d'activation est ouverte et permet la fixation de l'ATP et la transphosphorylation du récepteur. À l'inverse, dans sa conformation inactive, la boucle d'activation est repliée et masque le site de liaison à l'ATP, empêchant ainsi sa fixation (432).

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) sont des petites molécules hétérocycliques qui agissent par compétition avec ATP dans le domaine kinase du récepteur selon deux modes de fixation. Les inhibiteurs de type I se lient au site ATP de la kinase dans sa conformation active alors que les inhibiteurs de type II ciblent le récepteur sous sa conformation inactive en se liant à la fois au site de fixation de l'ATP mais également à la poche hydrophobe adjacente accessible uniquement dans cette conformation inactive. Cette double interaction permet ainsi d'augmenter la spécificité des inhibiteurs de type II (432).

Étant donné la multitude de molécules développées ces dernières années, le plus fréquemment des inhibiteurs multi-kinases utilisés dans les cancers solides, à l'exception du dabrafenib et du vemurafenib évalués en phase I/II dans les LAM R/R, nous nous concentrerons sur les deux inhibiteurs spécifiques d'AXL développés et étudiés dans le contexte des LAM : le bemcentinib et le gilteritinib, deux inhibiteurs oraux de type I.

Bemcentinib

Le bemcentinib (ou BGB324 ou R428) est le premier inhibiteur puissant et hautement sélectif d'AXL et dont la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité d'AXL (IC50) de 14 nM. Ce composé a été identifié à partir d'un criblage à haut débit d'une bibliothèque de molécules ciblant *in vitro* l'activité kinase d'AXL (433). Dans le cadre des SMD/LAM, le bemcentinib a fait l'objet de deux études de phase I/II, la première évaluant sa tolérance et son activité chez des patients présentant un SMD de haut risque ou une LAM, en échec ou réfractaires au traitement de première ligne par un agent hypométhylant (NCT03824080). La seconde étude évaluait son action toujours dans les SMD/LAM dans lesquels il est utilisé seul ou en association à de l'aracytine ou de la décitabine (NCT02488408). Ces études confirment la bonne tolérance et l'activité anti-leucémique du bemcentinib, seul ou en association (428). De manière intéressante, la présence de réponses plus tardives suggère également un mécanisme de modulation immunologique. En effet, les analyses multi-omiques réalisées sur des échantillons de suivis longitudinaux montrent une activation des lymphocytes T CD8+ et

B ainsi qu'un enrichissement des signatures inflammatoires liées au TNF- α chez les patients répondeurs (434).

Giltéritinib

Le giltéritinib (ou ASP2215) est un inhibiteur de FLT3 de seconde génération qui a pour particularité de cibler de manière spécifique à la fois FLT3 (sauvage mais également muté ITD ou TKD) mais également AXL avec un IC50 entre 0,29 à 1 nM selon les études (432). Cette double inhibition dans les LAM est parfaitement pertinente étant donné les données pré-cliniques suggérant l'implication d'AXL dans des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de FLT3 induits par le microenvironnement médullaire, justifiant le ciblage d'AXL pour surmonter cet échappement thérapeutique (46, 435).

Le giltéritinib (ou Xospata®) a récemment obtenu son autorisation de mise sur le marché pour le traitement en monothérapie chez des patients présentant une LAM porteurs d'une mutation FLT3, en rechute ou réfractaires, sur la base de l'essai ADMIRAL. Cet essai de phase III incluant 371 patients, compare le giltéritinib à une chimiothérapie conventionnelle de rattrapage. Le giltéritinib a permis d'améliorer le taux de rémission complète (21,1% contre 10,5%) et de rallonger significativement la durée de la survie médiane (9,3 mois contre 5,6 mois) par rapport au bras standard (125). Ces résultats ont été confirmés sur une cohorte française ambispective ALFA/FILO, sur des patients plus lourdement pré-traités, avec un taux de réponse complète à 25,4% et une survie médiane de 6,4 mois. En effet, bien que ce ne soit pas un critère d'exclusion, seuls 5,7 % des patients de l'essai ADMIRAL avaient été préalablement traités par la midostaurine en première intention (436).

3.3 Implications de l'axe Gas6/AXL en physiologie et en pathologie

a) Rôle dans l'immunité innée et le contrôle de l'inflammation

Bien que les homologues d'AXL aient été identifiés au sein de nombreuses espèces, l'analyse des relations phylogénétiques indique que les récepteurs TAM semblent être apparus relativement tard dans l'évolution, car absents chez *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans* (308). L'apparition plus tardive des récepteurs TAM par rapport à d'autres kinases telles que celles de la voie MAPK confirme leur rôle dans des processus plus complexes tels que l'hématopoïèse et la réponse immunitaire. À la différence de nombreux RTK essentiels au développement embryonnaire (437), l'invalidation simultanée des trois récepteurs TAM dans un modèle murin n'est pas létale, l'expression d'AXL n'apparaissant que tardivement au décours de l'embryogénèse (438). Néanmoins, les animaux mâles sont stériles par défaut de spermatogénèse et la plupart des femelles n'a pu mener la gestation à terme (439). Par ailleurs, les animaux invalidés pour les récepteurs TAM développent une hyperplasie lymphoïde avec une activation constitutive des lymphocytes B et T ainsi que des manifestations auto-immunes, en particulier chez les femelles, en lien avec l'hyperactivation des cellules dendritiques (440). Ainsi, les récepteurs TAM dont AXL jouent un rôle majeur dans l'homéostasie immunitaire notamment par la régulation négative de la réponse immunitaire innée et le contrôle de la réponse inflammatoire inappropriée (387).

Une des fonctions les mieux étudiées des récepteurs TAM et en particulier de MER est la régulation de l'efferoctose, processus de phagocytose des corps apoptotiques et étape-clé de la résolution de l'inflammation par élimination des antigènes intracellulaires (441). AXL quant à lui intervient à plusieurs étapes, en premier lieu, dans une boucle de rétrocontrôle modulant la signalisation inflammatoire des TLRs (*Toll-like Receptors*) dans les cellules dendritiques. Par l'intermédiaire du récepteur de l'interféron de type 1 (IFNAR), AXL induit la phosphorylation de STAT1 et l'expression de SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling*) et SOCS3, deux régulateurs négatifs de la signalisation des cytokines (442). Toujours dans les DC, AXL intervient dans un second mécanisme de régulation négative par interaction directe avec les lymphocytes T activés exposant PROS1, un ligand d'AXL par l'intermédiaire d'un groupement PtdSer (443). AXL intervient également dans la polarisation des macrophages, favorisant le phénotype M2 par modulation négative de la voie NF- κ B (444). Enfin, la signalisation médiée par AXL est essentielle à l'homéostasie des cellules NK en régulant leur prolifération et leur différenciation. Les souris invalidées pour AXL présentaient un défaut à la fois quantitatif et fonctionnel des lymphocytes NK, notamment en termes de cytotoxicité (445).

b) Rôles dans l'hématopoïèse

Depuis son identification historique chez deux patients atteints de LMC, l'expression d'*AXL* a été retrouvée dans de nombreuses hémopathies malignes, principalement myéloïdes (LMC, SMD, LAM). Chez les individus sains, *AXL* est également exprimé à la fois dans le compartiment des CSH CD34+ ainsi que dans les progéniteurs myéloïdes (CFU-M, CFU-GM) (446) ou les érythroblastes (447), confirmant son implication dans l'hématopoïèse. En effet, l'expression de *GAS6* sur plusieurs lignées de cellules stromales est corrélée avec leur capacité à soutenir l'hématopoïèse *in vitro*. La surexpression par transfection de *GAS6* dans une lignée de fibroblastes 3T3 normalement incapable de soutenir l'hématopoïèse, permet à ces cellules de soutenir une culture à long terme sans modification de leur sécrétome (448).

Le rôle de l'axe Gas6/*AXL* a également été rapporté dans l'érythropoïèse. L'inactivation de *GAS6* dans un modèle murin entraîne une diminution des progéniteurs érythroïdes au stade embryonnaire bien que les souris adultes ne présentent ni d'anémie, ni de dysplasie à l'état basal. En revanche, l'axe Gas6/*AXL* joue un rôle essentiel dans l'érythropoïèse de stress, la majorité des souris invalidées pour *GAS6* ne survivant pas à une anémie chimiquement induite. Alors que tous les animaux contrôles récupéraient leur hématocrite de base au 9^{ème} jour, les survivants invalidés pour *GAS6* présentaient un taux d'hématocrite significativement plus bas, suggérant un défaut d'érythropoïèse. L'absence de Gas6 peut également altérer la signalisation paracrine d'autres cellules, notamment des macrophages dont le rôle est essentiel dans la régulation de l'érythropoïèse de stress. Ainsi, l'inactivation de *GAS6* induit une augmentation de certaines cytokines, entraînant une érythropoïèse terminale altérée face au stress hémolytique (339). De la même manière, l'inactivation d'*AXL* induit un phénotype semblable, avec une diminution des progéniteurs érythroïdes aboutissant à un défaut de réponse à l'érythropoïèse de stress (447). Tang et al. ont pu montrer que l'un des mécanismes implique la régulation par l'axe Gas6/*AXL* de l'expression du récepteur à l'EPO et de GATA-1 par les progéniteurs érythroïdes (449).

Outre le défaut d'érythropoïèse, l'inactivation de *GAS6* dans un modèle murin leur confère une résistance à la thrombose liée non pas à un défaut quantitatif, mais à un dysfonctionnement fonctionnel des plaquettes par défaut d'agrégation et défaut de leur fonction de sécrétion par dégranulation (450). L'inactivation d'un des récepteurs TAM (*AXL*, *MER* ou *TYRO-3*) reproduit le même phénotype, seule l'inactivation simultanée des trois récepteurs induit une thrombopénie (451).

c) Implications dans les LAM

Le caractère transformant dans la LMC initialement attribué à AXL semble plutôt être lié à sa surexpression (382), bien qu'un certain nombre de mutations aient été rapportées en particulier dans les tumeurs solides mais dont l'impact fonctionnel demeure inexploré (405). Ainsi, le rôle délétère de la surexpression d'AXL a aujourd'hui été rapporté dans d'autres hémopathies et dans de nombreux cancers solides (mélanome, poumon, sein, pancréas, glioblastome...), où de multiples modèles ont montré son implication dans les processus de prolifération, d'invasion, de modulation immunitaire ou encore de métastases, tout autant de processus fondamentaux impliqués dans le développement tumoral (411, 412).

Dans les LAM, AXL semble être plus impliqué que les autres membres de la famille des récepteurs TAM. L'expression d'AXL est retrouvée dans la plupart des lignées de LAM utilisées à l'exception des Kasumi-1, lignée dérivée d'un patient présentant une LAM avec t(8;21) (452). Le rôle pronostique défavorable d'AXL a été rapporté sur deux cohortes indépendantes, la première publiée en 1999, portait sur une cohorte de 54 LAM *de novo*, dans laquelle l'expression d'AXL, rapportée chez 35% des patients, est corrélée à une plus forte expression de BCL-2 et ainsi qu'à une tendance en faveur d'une survie médiane raccourcie en analyse multivariée (453).

Dans une seconde cohorte constituée de 112 LAM de moins de 60 ans à caryotype normal, l'analyse des données transcriptomiques retrouve une expression d'AXL, de *TYRO-3*, de *MER* et de *GAS6* chez 57%, 79%, 85% et 90% des patients, respectivement. Parmi ces derniers, seule l'expression d'AXL s'est révélée pertinente comme marqueur pronostique. Ainsi, la valeur médiane d'expression d'AXL permet de stratifier les patients de cette cohorte en deux groupes, indépendamment de leur âge, du traitement ou de leur statut mutationnel. Ainsi, selon une analyse multivariée, la survie médiane était significativement raccourcie chez les patients exprimant AXL au-dessus de cette valeur médiane alors qu'elle n'est pas atteinte dans l'autre groupe. L'analyse de l'expression protéique par cytométrie en flux confirme cette surexpression sur 19 échantillons primaires de LAM, par rapport à des donneurs sains. De la même manière, cette expression protéique est enrichie dans le compartiment des CSL CD34+CD38- des patients comparées aux CSH issus de donneurs sains, suggérant un rôle d'AXL dans la maintenance et l'expansion des cellules souches, qu'elles soient normales ou pathologiques (398).

Dans ce contexte, Niu et al ont pu mettre en évidence un effet synergique du vénétoclax associé avec le SLC-391, un inhibiteur sélectif d'AXL de type II (IC50 = 9,6 nM) sur les CSL de

LAM. L'inactivation d'AXL, qu'elle soit au moyen d'une approche CRISPR/Cas9 ou pharmacologique par le SLC-391 diminue le potentiel clonogénique *in vitro* des cellules primaires de patients LAM surexprimant *AXL*. De manière intéressante, l'inactivation d'AXL permet de potentialiser l'effet du vénétoclax *in vitro* sur des expériences de culture à long terme de cellules primaires, où l'association permet de réduire significativement le nombre de colonies. Dans un modèle de xénogreffe de cellules primaires, cette combinaison permet réduire le taux de blastes et de rallonger significativement la durée de vie des animaux par rapport aux contrôles. L'analyse transcriptomique des cellules traitées par SLC-391 montre une diminution significative de la phosphorylation oxydative, une caractéristique métabolique clé des CSL, l'ensemble de ces données confirmant le rôle d'AXL dans leur maintenance (454).

Plus récemment, Maganti. et al ont montré que la supplémentation en Gas6 augmente *ex vivo* l'expansion de cellules humaines CD34+ CD45RA- traitées par un cocktail contenant un dérivé de la vitamine C (l'acide ascorbique 2-phosphate ou AA2P) et identifié comme un nouvel agoniste des cellules souches (455). L'analyse transcriptomique en cellule unique montre une augmentation d'expression d'AXL qui est notamment enrichie dans la fraction de CSH CD34+CD45RA-CD90+. De manière intéressante, le pré-traitement par ce nouveau cocktail supplémenté en Gas6 a permis d'augmenter drastiquement (x10) leur potentiel de greffe dans des souris NSG, que ce soit en greffe primaire, mais également secondaire confirmant le rôle central d'AXL dans le renouvellement des CSH et *a fortiori* des CSL étant donné sa forte expression chez les patients atteints de LAM (456).

Nous avons vu précédemment qu'AXL joue un rôle fondamental dans la régulation de l'immunité innée. Néanmoins, le rôle de la modulation immunitaire dans les LAM n'a été que peu étudié, étant donné que tous les modèles de xénogreffe *in vivo* reposent sur l'utilisation de souris immunodéprimées. Ainsi, Tirado-Gonzalez et al. ont investigué le rôle d'AXL sur l'immunité anti-tumorale au moyen d'un modèle murin syngénique de LAM. Dans ce modèle, l'invalidation de *GAS6* dans des souris immunocompétentes diminue drastiquement la prise de greffe des cellules leucémiques et rallonge significativement leur survie. En revanche, l'invalidation de *GAS6* dans des souris NSG n'a aucun impact, le taux de greffe restant identique, confirmant ainsi l'influence de l'immunité sur la prise de greffe. Dans ce même modèle de souris immunocompétente, l'inhibition pharmacologique d'AXL par le bemcentinib a permis de rallonger la survie des animaux traités, indépendamment de son action directe sur les blastes qui n'exprimaient pas AXL. Plus précisément, l'invalidation spécifique d'AXL au sein la lignée monocyte/macrophage inhibe quasiment la prise de greffe, par déplétion des cellules myéloïdes suppressives dérivées des monocytes, restaurant ainsi l'activité anti-tumorale

médiée par les lymphocytes NK (457). Ces données supportent l'hypothèse d'un rôle de la régulation immunitaire par le bemcentinib observée sur l'étude de phase I/II dans les SMD/LAM (434).

Le rôle pronostique défavorable de Gas6 a été également montré dans une cohorte de 270 LAM *de novo* à caryotype normal, où l'expression de *GAS6* est retrouvée chez seulement 26% des patients. L'expression de *GAS6* permet de stratifier les patients de cette cohorte en deux groupes : GAS6+ et GAS6-, la durée de survie sans progression et la survie globale (après ajustement selon l'âge) étant significativement raccourcies chez les patients GAS6+. L'expression de *GAS6* étant corrélée à celle d'*AXL* sur cette cohorte, ces données supportent également l'hypothèse d'une boucle d'activation autocrine délétère dans l'évolution de la maladie (458).

Ces données ont été confirmées sur une autre cohorte constituée à partir des données du TCGA, qui comprenait 71 LAM exprimant *GAS6* et ayant reçu une allogreffe de CSH. L'expression médiane de *GAS6* a permis de stratifier plus finement ces patients et reste un facteur pronostic péjoratif indépendant de l'âge ou du statut mutationnel (459).

d) Rôles dans la résistance au traitement

La résistance thérapeutique demeure un obstacle majeur dans la prise en charge des pathologies tumorales. L'implication d'*AXL* dans les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées a été documentée dans de nombreux modèles tumoraux, tels que la résistance à l'erlotinib ou à l'osimertinib (inhibiteur d'EGFR) dans le cancer du poumon non à petites cellules, au trastuzumab (anticorps anti-HER2) dans le cancer du sein (460) ou encore à l'imatinib dans la LMC (461). L'association de ces drogues avec un inhibiteur d'*AXL* permet de surmonter les mécanismes d'échappement thérapeutique, en particulier lorsque *AXL* fournit une signalisation alternative permettant de maintenir une signalisation oncogénique active malgré l'inhibition de l'oncogène *driver*. Par ailleurs, *AXL* a également été associé à des résistances impliquant des inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires fréquemment employés dans les cancers solides, justifiant également le rationnel de l'association avec un inhibiteur d'*AXL* étant donné son rôle central dans le contrôle de l'immunité innée et de la tolérance immune (460).

Les LAM ne faisant pas exception, le rôle de l'axe Gas6/*AXL* a été rapporté dans les mécanismes de résistance aux chimiothérapies cytotoxiques. Hong et al. ont montré que l'expression protéique d'*AXL* était significativement augmentée dans les blastes de patients réfractaires au

traitement d'induction (doxorubicine et aracytine) comparé à leur prélèvement au diagnostic, suggérant un rôle de la chimiothérapie sur l'expression d'AXL. En effet, l'exposition *in vitro* d'une lignée U937 de LAM à la doxorubicine, l'étoposide ou au cisplatine induit l'expression d'AXL. La surexpression d'AXL dans cette lignée par transfection lui confère une résistance à ces agents cytotoxiques. Les mécanismes de résistance décrits sont l'activation de la voie des MAP kinases et de la voie PI3K/AKT favorisant la prolifération et la survie cellulaire via l'induction d'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (462).

Toujours dans les LAM, Ben Batalla et al. ont mis en évidence la place centrale de la signalisation GAS6/AXL dans la prolifération, la survie et la chimiorésistance médiée par le microenvironnement médullaire. En effet, les blastes de LAM sont capables d'induire *in vitro* la sécrétion de Gas6 par les cellules stromales, conduisant *in fine* à l'activation d'AXL et des voies de signalisation en aval. Dans un modèle murin de xénogreffe sous-cutanée, le traitement par bemcentinib a permis de potentialiser la sensibilité des cellules leucémiques à la doxorubicine (398).

L'implication de l'axe Gas6/AXL a également été rapportée dans les mécanismes d'échappement aux inhibiteurs de FLT3 (midostaurine, quizartinib) dans les LAM, et est notamment corrélée avec le niveau de phosphorylation d'AXL, son blocage par une protéine chimérique Axl-Fc ou son inactivation par ARN interférant permettant de restaurer la sensibilité des cellules leucémiques à ces inhibiteurs (463). De manière intéressante, Dumas et al. ont également pu confirmer le rôle du microenvironnement médullaire dans la résistance au quizartinib, médiée par la surexpression et l'activation AXL par l'intermédiaire de STAT5 et de l'hypoxie à la fois *in vitro*, mais également dans un modèle de xénogreffe de lignée avec une mutation FLT3-ITD et invalidée pour AXL (46). Ces résultats valident le rationnel et le potentiel de la double inhibition FLT3/AXL par le giltéritinib *in vivo*, avec une meilleure réponse dans des modèles de xénogreffe de lignée ou de cellules primaires de LAM avec un haut ratio allélique FLT3, en comparaison avec le quizartinib (435).

e) Rôles dans le microenvironnement

Comme nous l'avons vu précédemment, la signalisation Gas6/AXL constitue un relais important dans l'interaction entre les cellules hématopoïétiques et le microenvironnement médullaire par des mécanismes de paracrinie. Rappelons également que ce microenvironnement constitue la principale source de Gas6, secrété notamment par la composante cellulaire de la niche de la niche hématopoïétique : ostéoblastes (397), cellules stromales (398) ou encore cellules endothéliales (399). En effet, bien qu'il puisse exister des phénomènes de régulation autocrine,

l'expression relative de *GAS6* est 380 fois plus élevée dans les cellules stromales que dans les CSH, suggérant la prédominance d'une communication paracrine au sein de la moelle osseuse (464).

L'axe Gas6/AXL est par conséquent une composante physiologique du microenvironnement, qui peut néanmoins être dérégulée dans des situations pathologiques et être détournée en particulier par les cellules tumorales pour favoriser leur propre développement mais également médier des phénomènes d'échappement thérapeutique.

Dans le mélanome où la place de l'immunothérapie est majeure, les cellules tumorales sont capables d'induire l'expression d'AXL et de Gas6 dans les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) monocytique ou granulocytaire. Cette modulation renforce leur capacité suppressive sur la réponse T anti-tumorale et maintient un microenvironnement immunosuppresseur. Ainsi, sur un modèle murin de greffe orthotopique, l'association d'un inhibiteur d'AXL est synergique avec un inhibiteur de *checkpoint* immunitaire sur la restauration de l'immunité anti-tumorale (465). Dans un modèle de métastase osseuse de cancer de la prostate, les ostéoblastes sont capables d'induire l'expression d'AXL à la surface des cellules tumorales au moyen d'une interaction directe via l'annexine II, les faisant ainsi bénéficier de la sécrétion paracrine de Gas6 par les ostéoblastes. Cependant, contrairement aux propriétés pro-prolifératives d'AXL dans d'autres cancers, la signalisation Gas6/AXL favorise la quiescence des cellules tumorales et l'échappement à la chimiothérapie (397).

Dans le contexte des LAM, il a été démontré que certaines cytokines du microenvironnement, comme la TPO, le GM-CSF ou encore l'IL-3, induisent l'expression d'AXL (46). De plus, une des caractéristiques physiques intrinsèques de la niche qu'est l'hypoxie, est également capable de réguler à la hausse l'expression d'AXL par l'intermédiaire d'HIF-1 α (46, 424).

L'expression de Gas6 dans les cellules leucémiques est corrélée à une surexpression de CXCL12 et de ses récepteurs CXCR4, CXCR7 (458), favorisant ainsi leur « *homing* » et un dialogue bidirectionnel avec le microenvironnement médullaire. La surexpression de CXCR4 a déjà été associée à une évolution clinique défavorable dans plusieurs cohortes de LAM (466, 467).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La prise en charge thérapeutique des LAM demeure une problématique majeure. Compte-tenu de l'âge avancé au diagnostic et des comorbidités des patients, un grand nombre de patients atteints de LAM est inéligible à la chimiothérapie intensive et/ou à l'allogreffe du fait de sa forte toxicité et d'une balance bénéfice/risque défavorable. Le pronostic global reste médiocre en raison des fréquentes rechutes, résultant de l'inefficacité des thérapies disponibles sur le ciblage des CSL.

Des alternatives peuvent être proposées comme les agents hypométhylants (5-azacitidine) seuls ou en association avec le vénétoclax avec toutefois un effet modeste sur la survie à long terme et au prix d'importantes toxicités. Le développement de stratégies non intensives basées sur des thérapies ciblant d'une part ces CSL mais également peu toxiques, est donc nécessaire afin de traiter efficacement les patients plus âgés et les plus fragiles.

C'est donc dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la modulation pharmacologique de la voie du récepteur PPAR- γ , ce projet s'inscrivant dans la continuité des travaux initiés par l'équipe dans les NMP et visant à évaluer le potentiel thérapeutique des agonistes de PPAR- γ dans les LAM. Initialement développée et approuvée pour le traitement du diabète de type 2, la pioglitazone présente un profil de toxicité bien établi après des années d'utilisation en clinique, faisant de ce dernier, un candidat de choix pour envisager un repositionnement thérapeutique.

L'activation de PPAR- γ implique la diminution transcriptionnelle de STAT5A/B, deux facteurs de transcription fréquemment suractivés dans les LAM (70%) et associés à une réponse faible à la chimiothérapie ainsi qu'à une survie globale moindre (374). Des résultats antérieurs de l'équipe ont pu confirmer la dépendance des CSL *in vitro* à l'expression des facteurs de transcription STAT5A et STAT5B grâce à une approche d'interférence ARN (shRNA anti STAT5A et STAT5B en vecteur lentiviral, collaboration Dr Isabelle Dusanter, Institut Cochin). Néanmoins, l'absence d'efficacité *in vivo* dans des modèles de xénogreffe de cellules primaires dans des souris NSG traitées par des agonistes de PPAR- γ (pioglitazone et darglitazone) nous a amené à explorer cette inefficacité *in vivo* contrastant avec les effets observés *in vitro*, en particulier par le biais d'un mécanisme médié par le microenvironnement médullaire.

La place des ligands de PPAR- γ va au-delà du ciblage de STAT5 dans les CSL et pourrait également intéresser d'autres composantes peu étudiées dans les LAM : l'inflammation et la

fibrose, qui peuvent favoriser la chimiorésistance et créer un environnement plus permissif à la progression tumorale. La prévalence réelle de la fibrose dans les LAM est difficile à évaluer mais semble être plus élevée dans certains sous-groupes de LAM, notamment les LAM avec anomalies associées aux néoplasies myélodysplasiques (AML-MRC, 25-30% des LAM) (468) et les LAM secondaires aux chimiothérapies (AML-pCT, 20% des LAM) (469). Ces sous-types sont le plus souvent de pronostic défavorable et présentent fréquemment un phénotype de *Multidrug Resistance* (MDR) par surexpression de transporteurs ATP-dépendants responsables de l'efflux des drogues, limitant ainsi leur efficacité (148). La P-gp est l'un des principaux acteurs du phénotype MDR, et sa transcription est modulée par PPAR- γ (470). Ainsi ces sous-groupes de LAM pourraient également bénéficier, en sus de l'action anti-leucémique, de l'effet modulateur de la pioglitazone sur la réversion du phénotype MDR, sur l'inflammation ainsi que de l'effet protecteur vis-à-vis de la fibrose sur le stroma médullaire.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'explorer le potentiel thérapeutique de la pioglitazone dans la LAM selon quatre axes de travail : le ciblage des CSL, la modulation du phénotype MDR, de l'inflammation et enfin de la fibrose, ceci au moyen de plusieurs approches expérimentales :

1. Étude et caractérisation de l'action anti-leucémique de la pioglitazone comme cible thérapeutique sur des lignées cellulaires de LAM et cellules primaires de patients atteints de LAM. Exploration du rôle protecteur du stroma médullaire vis-à-vis des cellules leucémiques et validation de la pertinence de l'axe Gas6/AXL comme cible dans les mécanismes de résistance à la pioglitazone *in vivo*.
2. Exploration des autres versants de l'activation de la voie de PPAR- γ qui pourraient bénéficier aux LAM, en particulier la modulation du phénotype MDR et de l'inflammation. Nous avons caractérisé le profil de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance sur une cohorte de 53 patients atteints de LAM bien caractérisée (cohorte ALFA issue du protocole ALFA-1200, NCT01966497) et 25 sujets sains afin d'identifier le profil de patients les plus susceptibles de bénéficier de l'action anti-inflammatoire de la pioglitazone.
3. Validation de l'efficacité de la pioglitazone associée seule ou associée à un inhibiteur d'AXL dans un modèle murin de xénogreffe de cellules primaires de patients sur la prolifération et la fibrose en greffe primaire ainsi que le contingent de CSL en greffe secondaire.

RESULTATS

Partie 1 : Le bemcentinib, un inhibiteur d'AXL restaure l'activité anti-leucémique de pioglitazone : un mécanisme de résistance médié par le microenvironnement médullaire.

Dans cette première partie, nous avons confirmé l'effet anti-leucémique de la pioglitazone sur trois lignées humaines de LAM (KG-1a, MOLM-14, OCI-AML3) représentatives des principales anomalies moléculaires observées dans les LAM (anomalies de *TP53*, *FLT3-ITD*, *NPM1*, *DNMT3A*) ainsi que sur des cellules primaires de patients atteints de LAM, en culture liquide à court terme et en test clonogénique. Les cellules primaires provenaient d'échantillons de sang ou de moelle osseuse dont la collecte a été réalisée en partenariat avec le service d'hématologie clinique (Pr Philippe Rousselot, Dr Juliette Lambert) et la Direction de la Recherche Clinique du Centre Hospitalier André Mignot (Versailles).

Des expériences de co-culture sur Transwell® sur cellules stromales MS-5 montrent une nette diminution de l'efficacité de la pioglitazone sur ces mêmes lignées de LAM, suggérant que cet effet de protection dépend d'une composante soluble sécrétée dans le milieu. L'analyse transcriptomique des lignées traitées nous a permis de mieux comprendre l'impact des voies biologiques activées ou inhibées en aval de l'activation de la voie de PPAR- γ et nous a permis d'identifier *AXL* parmi les gènes les plus différenciellement exprimés en condition traitée. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'effet de la modulation de la voie de PPAR- γ sur l'axe Gas6/AXL à la fois sur le plan transcriptionnel et protéique.

Nous avons pu mettre en évidence une sur-activation de l'axe Gas6/AXL sur les cellules leucémiques en condition de co-culture sur cellules stromales MS-5, connues pour sécréter Gas6. L'activation de la voie de PPAR- γ par la pioglitazone amplifie l'expression du récepteur AXL à la surface des cellules leucémiques menant ainsi en présence de Gas6, à l'activation des voies de signalisation en aval d'AXL, activation qui neutralise l'effet antiprolifératif de la pioglitazone.

Nous avons pu montrer l'efficacité de l'association de la pioglitazone avec un inhibiteur d'AXL, le bemcentinib, qui a permis de restaurer d'une part l'activité antiproliférative de la pioglitazone sur les cellules leucémiques en condition de co-culture mais également de rétablir la phosphorylation d'AXL à son état basal.

Afin de valider la spécificité de ce modèle, nous avons montré que l'adjonction de Gas6 humain exogène ou issu bien de milieu conditionné MS-5 aux cellules leucémiques cultivées seules reproduit l'inhibition de l'action de la pioglitazone observée en condition de co-culture sur cellules stromales. L'effet de protection stromale des cellules leucémiques vis-à-vis de la pioglitazone est quant à lui aboli sur cellules stromales MS-5 invalidées pour PPAR- γ . Ce mécanisme de résistance est donc PPAR- γ -dépendant.

Ces résultats restent à évaluer sur des modèles *in vivo* de xénogreffes de cellules primaires dans des souris NOD/SCID/IL2R γ ^{-/-}, ces modèles murins pré-cliniques permettront de confirmer le potentiel thérapeutique de la combinaison pioglitazone + inhibiteur d'AXL, en particulier sur l'éradication des CSL. Dans le cadre de ces modèles *in vivo*, le bemcentinib n'a pas pu être obtenu, la firme BerGenBio ayant décidé d'arrêter son développement dans les hémopathies malignes pour se concentrer sur les tumeurs solides. Nous avons donc opté pour le giltéritinib qui a l'avantage d'être une molécule approuvée, plus facilement accessible, offrant une perspective d'essais cliniques rapides en cas de résultats positifs des modèles pré-cliniques.

Une première version de cet article a été soumise à la revue PLOS Biology.

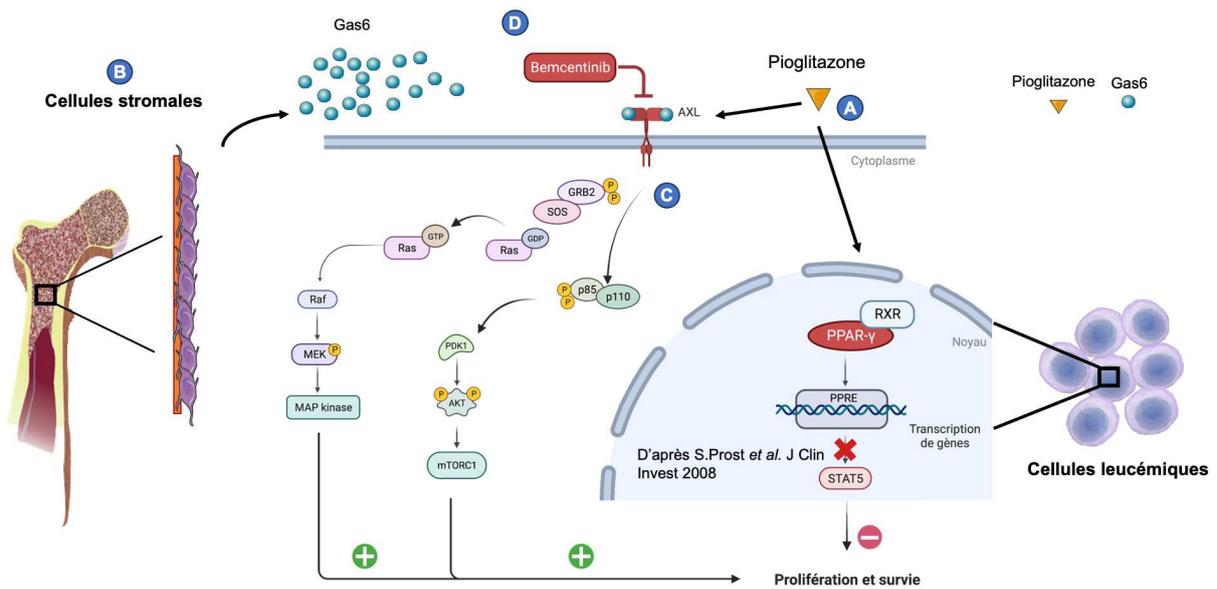


Figure 34 : Résumé graphique des résultats de la partie 1

(A) En culture seule, la pioglitazone, agoniste de PPAR- γ exerce un effet antiprolifératif sur les cellules leucémiques par diminution transcriptionnelle de STAT5. **(B)** Dans un système de co-culture, Gas6, principal ligand d'AXL est sécrété par les cellules stromales et **(C)** active son récepteur AXL lui-même surexprimé sur les cellules leucémiques sous l'effet de la pioglitazone. Cette suractivation de l'axe Gas6/AXL recrute les voies de signalisation en aval, augmentant la prolifération et la survie et contrecarrant l'effet antiprolifératif de la pioglitazone. **(D)** Le bemcentinib, inhibiteur d'AXL, restaure l'efficacité de la pioglitazone dans ce même système de co-culture.

Bemcentinib, an AXL inhibitor, overcomes microenvironment-mediated resistance to the anti-leukemic activity of pioglitazone.

Jaja Zhu ^{1,2}, Hippolyte Guérineau¹, Anne-Margaux Lefebvre-Fortané¹, Laetitia Largeaud², Juliette Lambert^{1,3}, Philippe Rousselot^{1,3}, Maeva Boudouin¹, Julien Calvo¹, Stéphane Prost¹, Sylvain Clauser^{1,2}¶ and Valérie Bardet^{1,2}¶*.

¹ Laboratoire cellules souches et applications thérapeutiques, UMR INSERM 1184, Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Fontenay-Aux-Roses, France

² Service d’Hématologie-Immunologie-Transfusion, APHP.Paris Saclay, CHU Ambroise Paré, Université Versailles Saint Quentin-Université Paris Saclay, Montigny le Bretonneux, France.

³ Service d’Hématologie et d’Oncologie, Centre Hospitalier André Mignot, Université Versailles Saint Quentin-Université Paris Saclay, Montigny le Bretonneux, France.

* Corresponding author

E-mail: valerie.bardet@aphp.fr (VB)

¶ These authors contributed equally to this work.

Abstract

Prognosis of acute myeloid leukemia (AML) remains poor especially in older patients who are ineligible for standard chemotherapy or have refractory disease. Here, we study the potential of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- γ agonist pioglitazone to improve the treatment of AML. Here we show that pioglitazone exerts an anti-proliferative and anti-clonogenic effect on AML cell lines KG-1a, MOLM-14 and OCI-AML3 and on primary cultures from AML patients. Co-culture of AML cells with stromal cells mimicking the bone marrow microenvironment abolishes this effect, suggesting the existence of a stroma-mediated resistance mechanism to pioglitazone. We show that pioglitazone upregulates receptor AXL in AML cells at the mRNA and protein levels, allowing AXL to be phosphorylated by its ligand Gas6 secreted by the stroma. Exogenous Gas6 or stromal cell conditioned medium also abolishes the anti-proliferative effect of pioglitazone with an increase in AXL phosphorylation in both conditions. Co-incubation with the AXL inhibitor bemcentinib restores the anti-leukemic activity of pioglitazone in the presence of stromal cells by reducing AXL phosphorylation to its baseline level. We also confirm that this resistance mechanism is PPAR- γ -dependent as stromal cells invalidated for PPAR- γ are unable to inhibit the antileukemic effect of pioglitazone. Altogether, we suggest that pioglitazone exerts an anti-leukemic effect and triggers a stroma-mediated resistance mechanism involving the Gas6/AXL axis. We demonstrated that a combination of pioglitazone with an AXL inhibitor overcomes this mechanism and exerts a potent anti-leukemic activity requiring further evaluation *in vivo* through murine xenograft pre-clinical models.

Keywords: acute myeloid leukemia, PPAR-gamma, Axl, Gas6, pioglitazone, bemcentinib

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is the most frequent form (70%) of acute leukemia in adults but prognosis remains poor [1] especially in older patients who are ineligible for standard chemotherapy or have refractory disease. AML is a widely heterogeneous disease in terms of phenotypic, genotypic and molecular features [2, 3]. Relapses are frequently caused by the persistence of leukemic stem cells (LSC) that are resistant to therapy [4]. Development of therapies targeting LSC is therefore a major challenge in this disease.

Signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) pathway is frequently activated in myeloid malignancies [5] in which persistent phosphorylation of STAT 5A/5B transcription factors is usually driven by tyrosine kinase oncogenes such as FLT3-ITD in AML or BCR-ABL in chronic myeloid leukemia (CML) [6]. In AML, dysregulation of STAT5 pathway was associated with poor response to chemotherapy [7, 8] and targeting of STAT5 by a specific inhibitor in a murine model of AML showed reduction of tumor burden, opening therapeutic perspectives for STAT5 inhibition [9, 10].

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ) belongs to a superfamily of ligand-activated transcription factors involved in lipid and glucose homeostasis, and modulating cell growth, differentiation and apoptosis [11]. In recent years, the therapeutic potential of PPAR- γ activation, first developed in diabetes, has been extended to other diseases, especially as a potential target for cancer therapy, ranging from colorectal cancer to hematological malignancies. Our group has previously demonstrated the therapeutic potential of PPAR- γ agonists in myeloproliferative neoplasms (MPN). In CML, PPAR- γ agonist pioglitazone led to erosion and eradication of LSC *in vitro* and *ex vivo* via STAT5 downregulation, thus potentializing response to standard tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment [12]. In Primary Myelofibrosis (PMF), we showed that PPAR- γ agonists reduced

myeloproliferation, modulated inflammation and protected bone marrow stroma against fibrosis [13].

In AML, *in vitro* studies showed that PPAR- γ agonists have pro-apoptotic [14, 15], anti-proliferative [16, 17] and differentiating effects [18, 19], however the use of high doses of agonists in these studies may have led to off-target effects. Clinical trials studying pioglitazone in the treatment of AML have been initiated: one has been terminated (NCT02942758) and another has been published, in which pioglitazone was added to standard induction chemotherapy [20]. The latter study showed no significant effect of pioglitazone, raising the possibility of an *in vivo* mechanism of resistance.

Here we demonstrate, on AML cell lines and primary cultures, that bone marrow stroma exerts a resistance mechanism to pioglitazone via activation of the AXL/Gas6 axis. We show that co-culture with stromal cells abrogates the anti-proliferative effect of pioglitazone in a PPAR- γ -dependent manner. Bemcentinib, a specific AXL inhibitor, overcomes the upregulation of this pathway and fully restores the anti-leukemic effect of pioglitazone, opening new therapeutic opportunities in AML.

Materials and methods

Cells and culture

KG-1a, MOLM-14 and OCI-AML3 human leukemia cell lines and MS-5 murine stromal cell line were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany). Cell lines were cultured in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco®) GlutamaxTM for leukemia cells and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®) for MS-5, both supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco®), without addition of penicillin and streptomycin in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C.

Peripheral blood samples and bone marrow aspirates were obtained from untreated patients with AML at diagnosis from the Centre Hospitalier André Mignot, Versailles, France. Written informed consent was collected from all patients involved in the study in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée III, dated July 7 2018. Isolation of Peripheral Blood (PB) or Bone Marrow (BM) mononuclear cells was obtained by Ficoll separation (GE Healthcare®). Primary cells were cultured in RPMI, supplemented with 10% FCS and 2N L-Glutamine (Gibco®) in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C.

Conditioned medium

Conditioned medium was collected from confluent layers of MS-5 stromal cells cultivated in RPMI for 3 days. The conditioned medium was then filtered through a 0.4 µm-diameter filter and syringe to remove small cell debris and larger vesicles.

Cell proliferation assay

Cell lines were seeded at Day 0 at a concentration of 300 000 cells/mL (3 000 000/mL for primary cells) in 12- or 24-well plates (Corning®) for single cell cultures and in 0.4 µm pore Transwell® inserts (Sarstedt®) for co-cultures. MS-5 for co-cultures were harvested on 12-well plates (Sarstedt®) at 60-70% confluence at Day 0. Cells were exposed to 10 µM pioglitazone (Sigma-Aldrich®), 50 nM bemcentinib (MedChemExpress®) or an equivalent volume of DMSO (dimethylsulfoxide) for controls. Leukemia cells (primary or AML derived cell lines) were counted and diluted every 48 hours and drugs were renewed at similar concentrations. Cell counts were performed by flow cytometry (BD FACSCanto II®) using fluorescent count beads at a known concentration (Precision Count Beads – Biolegend®). Dilutions of leukemic cells were calculated in order to adjust controls back to a concentration of 300 000 cells/mL for AML cell lines and 3 000 000/mL for primary cells. The same dilution was applied across all

experimental conditions for each cell line or primary cells. Cell counts were expressed as a percentage of cell count on untreated cells for each cell line. All controls were arbitrarily set to 100% for a clearer graphical representation.

Colony assays

Colony formation by leukemia cell lines was examined using methylcellulose-based medium (MethoCult™ GF H4434, StemCell Technologies). Leukemia cell lines (1×10^3 cells) were plated in MethoCult™ with DMSO or pioglitazone and colonies were counted after 7 (MOLM-14, OCI-AML3) or 14 days (KG-1a).

Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

Extraction of total RNA from cell lysates (500 000 to 1 000 000 cells) was performed using the RNeasy kit (Qiagen®) and reverse transcription using the SuperScript™ VILO™ (Invitrogen®) according to the manufacturers' instructions. Real-Time quantitative PCR was performed on day 7 of treatment on a CFX96 Thermal Cycler (Biorad®) using Master mix SYBR® Green (Applied Biosystem™). Primers used for human and murine cDNA amplification are detailed in Supplementary Table 1. The $\Delta\Delta\text{Ct}$ method [21] was used to calculate the relative-fold gene expression between two conditions after normalization to the reference gene *GAPDH*.

Western blot

Protein migration was performed on day 9 of treatment using 4-12% polyacrylamide gradient gels (Invitrogen®), transferred on 0.2 μm PVDF membranes (Biorad®) using the Trans-Blot Turbo system (Biorad®). We used anti-AXL (Cell Signaling® C44G1) and anti- β -actin (Cell Signaling® 13E5) as primary antibodies and a HRP-coupled goat anti-rabbit IgG antibody (ThermoFisher®) as secondary antibody. Revelation was performed on a ChemiDoc™

imaging system (Biorad®) or using an X-ray film to capture the enhanced chemiluminescence signal after membrane exposition to horseradish peroxidase substrate (Novex™ HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Invitrogen®) and Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (ThermoFisher®)).

Flow cytometry

AXL phosphorylation was analyzed using pAxl^{Y779} antibody (R&D Systems) on fixed and permeabilized cells (BD Cytfix/Cytoperm™, BD Biosciences). Cells were stained in a second step with goat Anti-Rabbit IgG H&L-APC (Abcam). All samples were acquired on a FACSCanto II® flow cytometer (BD Biosciences). Data analysis was performed with Kaluza™ 2.1 (Beckman-Coulter). The stain index ratio was calculated by dividing the stain index [22] of the specified condition by that of the untreated condition.

Gas6 ELISA

Human and mouse Gas6 quantification in culture supernatants was performed using Human Gas6 ELISA kit and Mouse Gas6 ELISA kit (Invitrogen®) according to the manufacturer's instructions.

Generation of PPAR- γ knock-out MS-5 cells

MS-5 were transfected with a combination PPAR- γ CRISPR/Cas9 KO Plasmid (sc-400030, Santa Cruz Biotechnology) and corresponding HDR Plasmid (sc-400030-HDR, Santa Cruz Biotechnology) to incorporate a Red Fluorescent Protein (RFP) gene to visually confirm transfection and puromycin resistance gene. Stable clones were selected by puromycin (10

µg/mL). Control plasmid was used in parallel in the same experimental conditions (sc-418922, Santa Cruz Biotechnology), the transfected cells were visualized with Green Fluorescent Protein (GFP).

RNAseq and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

For differential expression analysis of RNA-seq data, total RNA was collected from KG-1a, MOLM-14 and OCI-AML3 cells, treated twelve hours with 10 µM pioglitazone or control (DMSO). Libraries were prepared with the Illumina total RNA stranded with Ribozero plus prep kit and were sequenced on an Illumina NextSeq 500 sequencing system to produce 75-bp paired-ended reads at the Versailles-Saint Quentin University Genome Sequencing facility. RNA-seq fastq data files were processed using the fastp toolkit followed by read quality assessment with the FastQC analysis tool. Reads were mapped to the GRCh38 version of the human genome and transcriptome using the STAR RNA-seq alignment tool [23]. Reads were used for subsequent analysis if they mapped to a single genomic location, and gene counts were compiled using FeatureCounts [24]. Normalization and differential expression were carried out using the DESeq2 Bioconductor package [25] in the R statistical programming environment. Treated cells were compared with untreated cells, pooling data from different cell lines to identify common processes. The Gene Set Enrichment (GSEA) analysis was conducted using the "Hallmark" gene sets from the Gene Ontology (GO) database to identify enriched biological processes associated with our dataset and was tested with the GSEA software (<http://www.broad.mit.edu.proxy.insermbiblio.inist.fr/gsea/>). All statistical analyses were performed with R 3.6.0 (<http://www.R-project.org/>), and q-values (corresponding to p-values adjusted for multiple testing) <0.05 were retained as statistically significant. Volcano plot was created using <https://huygens.science.uva.nl/VolcanoR/>. Dataset containing differential

expression analysis is provided as Supplementary File 1. RNA sequencing raw data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE243586.

Statistics

All analyses were performed using GraphPad Prism software version 9 (San Diego, California USA). Data are presented as the mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). All tests were performed by a two-tailed Student's T-test with Welch's correction at a significance level of $p < 0.05$ with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Results

Pioglitazone exerts an anti-proliferative and anti-clonogenic effect on AML cell lines and primary cultures

We first sought to confirm the effect of PPAR- γ agonist pioglitazone on AML cell lines and primary cultures derived from patients. We used pioglitazone at a concentration of 10 μ M, in line with our previous papers [13] to avoid off-target effects. In order to reflect AML heterogeneity, we used three cell lines harboring the main mutations found in AML patients: KG-1a (TP53 mutations), MOLM-14 (FLT3-ITD mutation) and OCI-AML3 (NPM1 and DNMT3A mutations). As mentioned earlier, cell counts were expressed as a percentage of cell count on untreated cells for each cell line. As expected, pioglitazone exerted an anti-proliferative effect, with cell proliferation at day 9 compared to untreated controls reduced to 59 % in KG-1a ($p=0.017$), 58 % in MOLM-14 ($p=0.004$) and 44% in OCI-AML3 ($p=0.005$) (Fig 1A). The underlying cellular mechanism of the anti-proliferative effect is not dependent on apoptosis, regardless of the AML cell line ($p = 0.176, 0.324$ and 0.480 respectively for KG-

1a, MOLM-14 and OCI-AML3) (Fig S1). Similarly, we confirmed an anti-clonogenic effect of 10 μ M pioglitazone on AML cell lines, with Colony Forming Cell (CFC) number compared to untreated control, reduced to 70 % in KG-1a ($p < 0.001$), 52 % in MOLM-14 ($p = 0.030$) and 41% in OCI-AML3 ($p < 0.001$) (Fig 1B). We also confirmed the anti-proliferative effect of pioglitazone on primary cultures derived from five AML patients (Characteristics of patients are summarized in Supplementary Table 2), with cell growth decrease at day 7 ranging from 60% to 97% compared to untreated condition (Fig 1C).

Co-culture with stromal cells abolishes the anti-proliferative effect of pioglitazone on AML cells

We next studied the effect of pioglitazone on AML cells co-cultured in the presence of stromal cells, in order to mimic the BM microenvironment where other signaling pathways may be involved. As AML cells usually form leukemic cobblestone areas in co-culture with stromal cells [26], co-cultures were performed using Transwell® inserts with 0.4 μ m pore to ensure precise cell counting. As MS-5 stromal cells are recognized to provide support to leukemia cells, we first compared cell proliferation. Under co-culture conditions, AML cell lines proliferation showed an upward trend compared to liquid culture, however, this effect was only significant in the KG-1a cell line ($p = 0.016$) (Fig S2). We then assessed the anti-proliferative effect of pioglitazone on AML cell lines under co-culture conditions. Strikingly, co-culture on MS-5 stromal cells completely abolished the anti-proliferative effect of pioglitazone on AML cell lines (Fig 2A). Cell proliferation was even slightly enhanced on MOLM-14, the observed difference may be attributed to the modification of soluble factors secreted by MS-5 under the effect of pioglitazone (Fig 2A). These results suggested that stromal cells activated a signaling

pathway blocking or bypassing the anti-proliferative effect of pioglitazone on AML cells, via a soluble factor as evidenced by the physical separation of cells using Transwell® inserts.

As PPAR- γ is a nuclear receptor acting as a transcription factor regulating the expression of multiple genes, and to better understand the signaling pathways involved, we performed RNAseq analysis on AML cell lines cultured in the absence or presence of pioglitazone. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used on an expanded list of gene signatures from the mSigDB database from The Broad Institute to identify pathways affected by pioglitazone. Surprisingly, in addition to cholesterol homeostasis, several pathways related to inflammatory response (TNF α signaling, inflammatory response, TGF β signaling, IL6-JAK-STAT3 signaling) were upregulated under pioglitazone treatment. The signatures most depleted upon pioglitazone treatment corresponded to E2F family gene targets and G2/M cell cycle checkpoint targets, consistent with the antiproliferative effect of pioglitazone (Fig 2B). We then carried out differential expression analysis. Amongst the most upregulated genes in the presence of pioglitazone, our attention was drawn to *AXL* (Fig 2C). *AXL* is a ubiquitously expressed receptor, member of the receptor tyrosine kinase Tyro3, *AXL* and Mer (TAM) family. Upregulation of *AXL* and activation by its specific and main ligand growth arrest-specific factor 6 (Gas6) have been demonstrated to promote cell proliferation, chemotherapy resistance and metastasis in a wide variety of human cancer including hematological malignancies [27]. *AXL* has been well described in AML resistance to FLT3 inhibitors [28, 29] via a mechanism involving the Gas6/*AXL* axis, whereby ligand Gas6 is secreted by the BM stroma and binds *AXL* on AML cells, inducing FLT3 inhibitor resistance [30]. In light of our previous results, we investigated the potential role of the Gas6/*AXL* axis in a similar mechanism, which could lead to pioglitazone resistance.

Pioglitazone activates the Gas6/*AXL* axis in AML cell lines

According to the literature, *AXL* expression is upregulated in leukemic cells from a subset of AML patients and is associated with a poor prognosis. On the contrary, *GAS6* is mainly expressed by stromal cells that are the primary source of secreted Gas6 ligand in bone marrow [30]. We first studied *GAS6* and *AXL* mRNA expression respectively in stromal cells and AML cell lines cultured with or without pioglitazone. In both cell types, basal expression of *AXL* and *GAS6* was found as expected. *AXL* mRNA expression in AML cell lines was increased by pioglitazone 2.4-fold in KG-1a ($p=0.011$), 2.2-fold in MOLM-14 ($p<0.001$) and 3.5-fold in OCI-AML3 ($p=0.035$) (Fig 3A). Moreover, in co-culture condition of AML cell lines with MS-5, pioglitazone treatment also increased *AXL* expression, 2.1-fold in KG-1a ($p=0.015$), 1.91-fold in MOLM-14 ($p=0.048$) and 4.2-fold in OCI-AML3 ($p=0.020$) (Fig 3B). In stromal MS-5 cells, *GAS6* mRNA expression was not affected ($p=0.314$) after exposition to pioglitazone (Fig 3C). As PPAR- γ is known as a master regulator of adipogenesis, we ensured correct exposure to pioglitazone through macroscopic adipocyte differentiation of stromal cells (data not shown) and induction of mRNA expression of perilipin ($p=0.026$), an adipocyte differentiation-related protein (Fig 3D).

At the protein level, we confirmed AXL upregulation on AML cell lines after pioglitazone treatment, alone (Figure 4A) or when co-cultured with MS-5 (Fig 4B), by western blot and flow cytometry. Regarding Gas6, we measured both murine and human Gas6 by ELISA in culture supernatants. Levels of human Gas6 in AML cell line supernatants were undetectable, except for the MOLM-14 cell line (Fig 4C). In co-cultures, murine Gas6 levels were unchanged in control conditions but systematically decreased after exposure to pioglitazone, even in MS-5 cells alone (Fig 4D), suggesting rather a decrease related to adipocyte differentiation, than a greater consumption due to the co-culture.

Globally, these data suggested that the Gas6/AXL pathway could be over activated by exposure to pioglitazone when AML cells were co-cultured with stromal cells.

Bemcentinib restores the anti-leukemic effect of pioglitazone

We next used bemcentinib, a specific and highly selective AXL tyrosine kinase inhibitor [31], to counteract a resistance mechanism mediated by the Gas6/AXL axis. Bemcentinib has shown clinical efficacy in preclinical models of myeloproliferative neoplasms [32] and is currently evaluated in several clinical trials both in solid tumors (NCT03184571) and in myeloid malignancies (NCT03824080 and NCT02488408). AML cell lines were co-cultured with MS-5 stromal cells in the presence of pioglitazone and bemcentinib at low dose (50 nM) to avoid an off-target effect, a frequent issue with TKI at therapeutic concentrations. At 50 nM, bemcentinib specifically inhibits AXL, whereas at therapeutic dosage (0.4 μ M), FLT3 will be also targeted [33]. As expected, bemcentinib at low dose alone did not exert any anti-proliferative activity (Fig 5A-C), except for a non-significant trend in the case of MOLM-14, likely resulting from its particular sensitivity to TKI ($p=0.074$) (Fig 5B). In line with our hypothesis, the association of pioglitazone with low dose bemcentinib reduced cell proliferation compared to co-cultures without bemcentinib to 36% in KG-1a ($p=0.002$), 56% in MOLM-14 ($p=0.010$) and 47% in OCI-AML3 ($p=0.022$) (Fig 5A-C). These results are similar to those obtained in AML cell lines exposed to pioglitazone in the absence of stromal cells (Fig 1A) and demonstrate that this combination of drugs fully restores the anti-proliferative effect of pioglitazone.

Involvement of the Gas6/AXL pathway in AML resistance to pioglitazone

Pioglitazone enhances AXL phosphorylation, which is counteracted by the use of bemcentinib

To further decipher the involvement of the Gas6/AXL axis in this stroma-mediated resistance to pioglitazone, we focused our next experimentations on OCI-AML3, as this cell line exhibits some of the most prevalent abnormalities in AML, DNMT3A and NPM1 mutations. As shown previously, OCI-AML3 also expressed the highest levels of AXL, at baseline and after pioglitazone exposure.

We first studied the Tyr⁷⁷⁹ phosphorylation of AXL as a surrogate marker of the Gas6/AXL axis activation. As expected, OCI-AML3 cells co-cultured with MS-5 cells harbored a high level of p-AXL, further increased when treated with pioglitazone (Fig 6A), by 1.8-fold on average, (p=0.019) (Fig 6B). Inhibition of AXL by low dose bemcentinib significantly lowered basal p-AXL levels (2.2-fold, p=0.020). Notably, adjunction of bemcentinib counteracted pioglitazone-induced AXL activation, restoring AXL phosphorylation to a baseline level comparable to that without pioglitazone (p=0.001) (Fig 6A and 6B).

The activation of the Gas6/AXL pathway is PPAR- γ dependent in stromal cells

In order to decipher the link between the Gas6/AXL pathway and PPAR- γ , we generated PPAR- γ knock-out MS-5 cells (PPAR- γ KO) using a CRISPR/Cas9 approach. PPAR- γ KO MS-5 cells grew normally but were unable to differentiate to adipocytes as expected (data not shown). Deletion of PPAR- γ in stromal cells was able to restore the anti-proliferative effect of pioglitazone, with cell proliferation reduced to 53% in OCI-AML3 (p=0.003) (Fig 7A). Interestingly, pioglitazone treatment did not affect AXL phosphorylation of OCI-AML3 when co-cultured with PPAR- γ KO MS-5 (p=0.912) (Fig 7B and 7C). Interestingly, invalidation of PPAR- γ in stromal cells altered their secretome, particularly that of Gas6, which was drastically decreased compared to the wild-type MS-5, whether in co-culture conditions (p = 0.009) or not (p = 0.008) (Fig 7D). Regarding co-culture conditions, pioglitazone decreased

murine Gas6 levels when OCI-AML3 cell line were co-cultured with wild-type MS-5 ($p = 0.017$) as opposed to PPAR- γ KO MS-5, as Gas6 levels were very low in these conditions ($p = 0.492$) (Fig 7E).

Exogenous Gas6 adjunction mimics stroma-induced resistance to pioglitazone

To confirm the implication of Gas6 in the resistance of AML cells to pioglitazone, we cultured OCI-AML3 cells alone, and with pioglitazone, in the presence or absence of exogenous Gas6. Addition of recombinant Gas6 at a final concentration of 50 ng/mL was able to abolish the anti-proliferative effect of pioglitazone, with a cell proliferation comparable to control at days 7 and 9 (Fig 8A). Regarding the functional aspect, adjunction of exogenous Gas6 increased AXL phosphorylation compared to basal level, (Fig 8B and 8C, 1.8 fold, $p=0.029$) reproducing the increase produced by exposure to pioglitazone (Fig 8B).

The activation of the Gas6/AXL pathway is reproduced by MS-5 conditioned medium.

In a further step, to distinguish the effects of pioglitazone on leukemic cells from its action on stromal cells and especially on their secretome, we performed AML cell cultures in MS-5 conditioned medium. For greater clarity, this experiment has been separated into two figures (Fig 9A and 9B). Conditioned medium partly (50%) abolished the anti-proliferative effect of pioglitazone (Fig 9A, $p<10^{-4}$), confirming that this effect is not due to adipocyte differentiation of MS-5 cells. Although addition of bemcentinib had no additive effect when cells were treated with pioglitazone in the absence of MS-5 conditioned medium (Fig 9B, blue line), bemcentinib was able to restore the anti-proliferative activity of pioglitazone on AML cell line when cultured with MS-5 conditioned medium ($p=0.001$) (Fig 9B, turquoise blue line).

In parallel, p-AXL levels were increased by exposure to pioglitazone, conditioned medium, or both (Fig 9C). Addition of bemcentinib counteracted this increase whatever the condition, with or without conditioned medium (Fig 9C). Lastly, to confirm our hypothesis on the involvement of Gas6, ELISA quantification was performed on the different conditions. Despite a downward trend, Gas6 levels in conditioned medium were unchanged upon treatment with pioglitazone but were increased when bemcentinib was added ($p=0.019$) reflecting a decrease of consumption by the cells (Fig 9D).

Discussion

In the present work, we confirm that the PPAR- γ agonist pioglitazone has an anti-leukemic potential in AML through its anti-proliferative activity on AML cell lines and patient-derived primary cultures. As clinical trials did not show evidence of anti-leukemic activity of PPAR- γ agonists [20], and considering the key role of the BM niche to promote AML cell resistance as a supportive microenvironment [34] we hypothesized and unraveled a resistance mechanism mediated through the Gas6/AXL axis. Each of the two partners is involved in one of the two cellular compartments: AXL expression on AML cell lines is enhanced by pioglitazone treatment and Gas6, secreted by the stromal cells, binds and activates AXL on leukemic cells, providing pro-proliferative and pro-survival signals. Upregulation of AXL and activation by its specific ligand Gas6 have been demonstrated to promote cell proliferation, chemotherapy resistance and metastasis in a wide variety of human cancer including hematological malignancies. AXL overexpression in AML, especially in the hematopoietic CD34+CD38- fraction containing LSC, is associated with poor prognosis, regardless of patient karyotype [30]. Furthermore, AXL overexpression and activation by paracrine secretion of Gas6 by the BM microenvironment are both involved in resistance to FLT3 inhibitors in FLT3-ITD mutated AML [28, 29]. Moreover, dysfunctions in the BM microenvironment and in the

interaction between the niche and hematopoietic stem cells play a key role in the development of myeloid malignancies [35, 36]. BM microenvironment is also a key player in the maintenance of LSC in a quiescent state and their resistance to chemotherapy [37]. Considering the bidirectional interaction between BM microenvironment and leukemic cells, the latter can educate BM stromal cells to secrete Gas6 to ensure their own survival [30]. More surprisingly, despite the absence of co-culture with stromal cells, we observed an increase in AXL phosphorylation in OCI-AML3 cells with pioglitazone treatment. As shown earlier, the concentration of human Gas6 protein in culture supernatants of AML cell lines was relatively low in comparison to the levels of murine Gas6 secreted from MS-5 stromal cells. This suggests a limited contribution of the autocrine component in the Gas6/AXL loop. It is possible that the activation of AXL in leukemia cells by pioglitazone is enhanced by the presence in our culture medium of bovine Gas6 protein, originating from FCS supplementation. Bovine Gas6 shares 80% homology with the human protein and is undetectable using our species-specific ELISA. FCS is also a source of bovine protein S, which, like human protein S, has no demonstrated affinity for AXL [38]. Altogether, the Gas6/AXL axis seems to play major role in drug resistance of leukemic cells through the BM microenvironment, making it an interesting therapeutic target.

Analysis of differential gene expression in stromal cells differentiated into adipocytes, based on published transcriptomic data, revealed transcriptional repression of *GAS6*, suggesting that reduced Gas6 secretion is associated with adipocyte differentiation status [39]. As shown here, pioglitazone, by inducing adipocyte differentiation of stromal cells, decreases stromal Gas6 secretion, but Gas6 levels remains high enough to activate AXL and its downstream signaling pathways, neutralizing the effects of pioglitazone as would the BM environment. These findings corroborate the hypothesis of a bypass mechanism mediated by the hematopoietic niche and

suggest that targeting AXL signaling may be an interesting strategy to restore pioglitazone antiproliferative activity in AML.

We next show that addition of low dose bemcentinib restores the anti-leukemic effect of pioglitazone in this environment. Although bemcentinib concentration was 10-fold lower than therapeutic concentrations, it was sufficient to interact with AXL and specifically inhibit its phosphorylation [40]. Although bemcentinib is highly specific for AXL, it also inhibits FLT3 phosphorylation at therapeutic concentrations as well as its downstream signaling pathways including PI3K/AKT and ERK, thus inducing apoptosis and anti-proliferative activity [29]. Consequently, the low concentration used allowed us to avoid growth inhibition by bemcentinib itself and off-target effects, especially on the FLT3-mutated MOLM-14 cell line. In addition to its role in driving drug resistance, recent studies have revealed that the Gas6/AXL axis plays an important role in the regulation of LSCs and the BM niche [41].

Further work is needed *in vivo* on murine xenograft models to study the combined effect of pioglitazone and bemcentinib on leukemia development within a real bone marrow environment. These preclinical murine models are essential to evaluate the therapeutic potential of the combination of pioglitazone and bemcentinib in the elimination of LSC and can facilitate transition for clinical use. This targeted and orally administrated drug combination is safe and well-tolerated and could benefit to patients who are ineligible for intensive chemotherapy, a subset of patients which is increasing with the aging of the population.

References

1. Mrozek K, Kohlschmidt J, Blachly JS, Nicolet D, Carroll AJ, Archer KJ, et al. Outcome prediction by the 2022 European LeukemiaNet genetic-risk classification for adults with acute myeloid leukemia: an Alliance study. *Leukemia*. 2023;37(4):788-98. Epub 20230223. doi: 10.1038/s41375-023-01846-8. PubMed PMID: 36823396; PubMed Central PMCID: PMCPCMC10079544.
2. Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77. doi: 10.1182/blood.2022016867. PubMed PMID: 35797463.

3. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19. Epub 20220622. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1. PubMed PMID: 35732831; PubMed Central PMCID: PMC9252913.
4. Stelmach P, Trumpp A. Leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2023;108(2):353-66. Epub 2023/02/02. doi: 10.3324/haematol.2022.280800. PubMed PMID: 36722405; PubMed Central PMCID: PMC9890038.
5. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud O, Gjertsen BT, et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*. 2004;118(2):217-28. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.028. PubMed PMID: 15260991.
6. Maurer B, Kollmann S, Pickem J, Hoelbl-Kovacic A, Sexl V. STAT5A and STAT5B-Twins with Different Personalities in Hematopoiesis and Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11). Epub 2019/11/07. doi: 10.3390/cancers11111726. PubMed PMID: 31690038; PubMed Central PMCID: PMC6895831.
7. Kornblau SM, Minden MD, Rosen DB, Putta S, Cohen A, Covey T, et al. Dynamic single-cell network profiles in acute myelogenous leukemia are associated with patient response to standard induction therapy. *Clin Cancer Res*. 2010;16(14):3721-33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0093. PubMed PMID: 20525753; PubMed Central PMCID: PMC3385931.
8. Redell MS, Ruiz MJ, Gerbing RB, Alonzo TA, Lange BJ, Twardy DJ, et al. FACS analysis of Stat3/5 signaling reveals sensitivity to G-CSF and IL-6 as a significant prognostic factor in pediatric AML: a Children's Oncology Group report. *Blood*. 2013;121(7):1083-93. doi: 10.1182/blood-2012-04-421925. PubMed PMID: 23243289; PubMed Central PMCID: PMC3575754.
9. Nelson EA, Walker SR, Xiang M, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, et al. The STAT5 Inhibitor Pimozide Displays Efficacy in Models of Acute Myelogenous Leukemia Driven by FLT3 Mutations. *Genes Cancer*. 2012;3(7-8):503-11. doi: 10.1177/1947601912466555. PubMed PMID: 23264850; PubMed Central PMCID: PMC3527989.
10. Wingelhofer B, Maurer B, Heyes EC, Cumaraswamy AA, Berger-Becvar A, de Araujo ED, et al. Pharmacologic inhibition of STAT5 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32(5):1135-46. Epub 2018/02/24. doi: 10.1038/s41375-017-0005-9. PubMed PMID: 29472718; PubMed Central PMCID: PMC5940656.
11. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*. 2004;5(7):419-29. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01509-8. PubMed PMID: 15231248.
12. Prost S, Relouzat F, Spentchian M, Ouzegdouh Y, Saliba J, Massonnet G, et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARgamma agonists. *Nature*. 2015;525(7569):380-3. doi: 10.1038/nature15248. PubMed PMID: 26331539.
13. Lambert J, Saliba J, Calderon C, Sii-Felice K, Salma M, Edmond V, et al. PPARgamma agonists promote the resolution of myelofibrosis in preclinical models. *J Clin Invest*. 2021;131(11). doi: 10.1172/JCI136713. PubMed PMID: 33914703; PubMed Central PMCID: PMC8159700.
14. Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, Peng J, Wu XY, Lin Q, et al. Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Ann Oncol*. 2005;16(3):455-9. doi: 10.1093/annonc/mdi077. PubMed PMID: 15642706.
15. Chen YC, Shen SC, Tsai SH. Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1743(3):291-304. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.10.016. PubMed PMID: 15843042.

16. Saiki M, Hatta Y, Yamazaki T, Itoh T, Enomoto Y, Takeuchi J, et al. Pioglitazone inhibits the growth of human leukemia cell lines and primary leukemia cells while sparing normal hematopoietic stem cells. *Int J Oncol.* 2006;29(2):437-43. PubMed PMID: 16820887.
17. Sun C, Zhang G, Luan S, Luan C, Shao H, Dong F, et al. Evodiamine inhibits the proliferation of leukemia cell line K562 by regulating peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARgamma) pathway. *J Recept Signal Transduct Res.* 2016;36(4):422-8. Epub 2015/12/17. doi: 10.3109/10799893.2015.1122040. PubMed PMID: 26671528.
18. Konopleva M, Elstner E, McQueen TJ, Tsao T, Sudarikov A, Hu W, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(10):1249-62. Epub 2004/10/16. PubMed PMID: 15486192.
19. Hui H, Chen Y, Yang H, Zhao K, Wang Q, Zhao L, et al. Oroxylin A has therapeutic potential in acute myelogenous leukemia by dual effects targeting PPARgamma and RXRalpha. *Int J Cancer.* 2014;134(5):1195-206. Epub 2013/08/13. doi: 10.1002/ijc.28435. PubMed PMID: 23934681.
20. Ghadiany M, Tabarraee M, Salari S, Haghghi S, Rezvani H, Ghasemi SN, et al. Adding Oral Pioglitazone to Standard Induction Chemotherapy of Acute Myeloid Leukemia: A Randomized Clinical Trial. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2019;19(4):206-12. Epub 2019/02/17. doi: 10.1016/j.clml.2019.01.006. PubMed PMID: 30770307.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PubMed PMID: 11846609.
22. Maecker H, Trotter J. [Selecting reagents for multicolor BD flow cytometry]. *Postepy Biochem.* 2009;55(4):461-7. PubMed PMID: 20201361.
23. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. Epub 2012/10/30. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635. PubMed PMID: 23104886; PubMed Central PMCID: PMC3530905.
24. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923-30. Epub 2013/11/15. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656. PubMed PMID: 24227677.
25. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. Epub 2014/12/18. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8. PubMed PMID: 25516281; PubMed Central PMCID: PMC4302049.
26. Schuringa JJ, Schepers H. Ex vivo assays to study self-renewal and long-term expansion of genetically modified primary human acute myeloid leukemia stem cells. *Methods Mol Biol.* 2009;538:287-300. Epub 2009/03/12. doi: 10.1007/978-1-59745-418-6_14. PubMed PMID: 19277587.
27. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res.* 2008;100:35-83. doi: 10.1016/S0065-230X(08)00002-X. PubMed PMID: 18620092; PubMed Central PMCID: PMC3133732.
28. Dumas PY, Naudin C, Martin-Lannere S, Izac B, Casetti L, Mansier O, et al. Hematopoietic niche drives FLT3-ITD acute myeloid leukemia resistance to quizartinib via STAT5-and hypoxia-dependent upregulation of AXL. *Haematologica.* 2019;104(10):2017-27. doi: 10.3324/haematol.2018.205385. PubMed PMID: 30923103; PubMed Central PMCID: PMC6886433.
29. Park IK, Mundy-Bosse B, Whitman SP, Zhang X, Warner SL, Bearss DJ, et al. Receptor tyrosine kinase Axl is required for resistance of leukemic cells to FLT3-targeted therapy in acute myeloid

leukemia. *Leukemia*. 2015;29(12):2382-9. doi: 10.1038/leu.2015.147. PubMed PMID: 26172401.

30. Ben-Batalla I, Schultze A, Wroblewski M, Erdmann R, Heuser M, Waizenegger JS, et al. Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood*. 2013;122(14):2443-52. doi: 10.1182/blood-2013-03-491431. PubMed PMID: 23982172.

31. Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2010;70(4):1544-54. Epub 20100209. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2997. PubMed PMID: 20145120.

32. Beitzten-Heineke A, Berenbrok N, Waizenegger J, Paesler S, Gensch V, Udonta F, et al. AXL Inhibition Represents a Novel Therapeutic Approach in BCR-ABL Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Hemasphere*. 2021;5(9):e630. Epub 2021/08/17. doi: 10.1097/HS9.0000000000000630. PubMed PMID: 34396051; PubMed Central PMCID: PMCPCMC8357258.

33. Loges S, Heuser M, Chromik J, Vigil CE, Paschka P, Ben-Batalla I, et al. Final analysis of the dose escalation, expansion and biomarker correlations in the Ph I/II trial BGBC003 with the selective oral AXL inhibitor bemcentinib (BGB324) in relapsed/refractory AML and MDS. *Blood*. 2018;132:2672.

34. Yao Y, Li F, Huang J, Jin J, Wang H. Leukemia stem cell-bone marrow microenvironment interplay in acute myeloid leukemia development. *Exp Hematol Oncol*. 2021;10(1):39. Epub 20210710. doi: 10.1186/s40164-021-00233-2. PubMed PMID: 34246314; PubMed Central PMCID: PMCPCMC8272391.

35. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-7. doi: 10.1038/nature08851. PubMed PMID: 20305640; PubMed Central PMCID: PMCPCMC3422863.

36. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*. 2007;129(6):1081-95. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.055. PubMed PMID: 17574022; PubMed Central PMCID: PMCPCMC2768301.

37. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1315-21. doi: 10.1038/nbt1350. PubMed PMID: 17952057.

38. Hafizi S, Dahlback B. Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J*. 2006;273(23):5231-44. Epub 20061025. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05529.x. PubMed PMID: 17064312.

39. Casado-Diaz A, Anter J, Muller S, Winter P, Quesada-Gomez JM, Dorado G. Transcriptomic Analyses of Adipocyte Differentiation From Human Mesenchymal Stromal-Cells (MSC). *J Cell Physiol*. 2017;232(4):771-84. Epub 20160712. doi: 10.1002/jcp.25472. PubMed PMID: 27349923.

40. Kimani SG, Kumar S, Bansal N, Singh K, Kholodovych V, Comollo T, et al. Small molecule inhibitors block Gas6-inducible TAM activation and tumorigenicity. *Sci Rep*. 2017;7:43908. Epub 20170308. doi: 10.1038/srep43908. PubMed PMID: 28272423; PubMed Central PMCID: PMCPCMC5341070.

41. Niu X, Rothe K, Chen M, Grasedieck S, Li R, Nam SE, et al. Targeting AXL kinase sensitizes leukemic stem and progenitor cells to venetoclax treatment in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2021;137(26):3641-55. doi: 10.1182/blood.2020007651. PubMed PMID: 33786587; PubMed Central PMCID: PMCPCMC8462401.

Figure legends

Figure 1: Pioglitazone exerts an anti-proliferative and anti-clonogenic effect on AML cell lines and primary cultures.

(A) Cell growth reduction induced in AML cell line (KG-1a, MOLM-14, OCI-AML3) after pioglitazone (10 μ M) incubation compared to vehicle (DMSO). Cell counts were performed by flow cytometry. (B) Pioglitazone (10 μ M) reduced the clonogenic potential of AML cell lines compared to vehicle. Colony forming cell number after 7 (MOLM-14, OCI-AML3) or 14 days (KG-1a). (C) Cell growth reduction induced in AML primary cells (5 different AML patients, UPN, Unique Patient Number) after pioglitazone (10 μ M) incubation compared to vehicle. Cell counts were performed by flow cytometry.

Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant

Figure 2: Co-culture with stromal cells abolishes pioglitazone anti-proliferative activity on AML cells.

(A) Abolition of pioglitazone (10 μ M) effect when AML cell lines (KG-1a, MOLM-14, OCI-AML3) were co-cultured on MS-5 stromal cells using Transwell® inserts with 0.4 μ m pore. Cell counts were performed by flow cytometry. Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant. (B) Waterfall plot showing the results of the GSEA using the Hallmark set. Only genesets with a q-value and FDR < 0.05 are shown, and their enrichment scores are plotted on the x-axis. GSEA analysis was performed after RNA sequencing on AML cell lines (KG-1a, MOLM-14, OCI-AML3) cultured 12h with pioglitazone or DMSO as control. Treated cell transcripts were compared to untreated cells irrespective of cell line. (C) Volcano plot of differentially expressed genes. The log₂ FC indicates the mean expression level for each gene. Each dot represents one gene. The vertical and horizontal dotted lines show the cut-off of fold-change = ± 1.5 , and of p-value = 0.01, respectively.

Figure 3: Pioglitazone upregulates the Gas6/AXL axis in a co-culture system.

(A) Quantification of mRNA transcript levels of *AXL* at day 7 in AML cell lines (KG-1a, MOLM-14, OCI-AML3) after pioglitazone (10 μ M) incubation compared to vehicle (DMSO) and (B) when co-cultured on MS-5 stromal cells. (C) Quantification of mRNA transcript of *GAS6* and (D) *PLIN2* levels at day 7 in MS-5 stromal cells after pioglitazone (10 μ M) incubation compared to vehicle (DMSO).

Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Figure 4: Pioglitazone upregulates the Gas6/AXL axis in a co-culture system.

Analysis of AXL protein levels in AML cell lines after 7 days of pioglitazone (10 μ M) incubation compared to vehicle (DMSO) by (A) Western blot with β -actin as a loading control and flow cytometry (B). (C) Human Gas6 protein levels in culture supernatants after 7 days of pioglitazone incubation compared to vehicle (DMSO). (D) Mouse Gas6 protein levels secreted by MS-5 stromal cells alone or in co-culture supernatants after 7 days of pioglitazone (10 μ M) incubation compared to vehicle.

Quantification of western blot signals was performed with ImageJ software.

Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Figure 5: Bemcentinib restores the anti-leukemic effect of pioglitazone.

AML cell lines (KG-1a (A), MOLM-14 (B), OCI-AML3 (C)) were treated with pioglitazone (10 μ M), bemcentinib (50 nM) or a combination of both. Cell counts were performed by flow cytometry and compared to vehicle (DMSO).

Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Figure 6: Pioglitazone and co-culture with MS-5 stromal cells enhance AXL activation, which is counteracted by the use of bemcentinib.

OCI-AML3 cell line was co-cultured with MS-5 stromal cells and treated with pioglitazone (10 μ M) alone, bemcentinib (50 nM) alone or a combination of both. (A) Levels of phosphorylated AXL^{Y779} in OCI-AML3 at day 7 determined by flow cytometry with (B) results expressed by stain index ratio compared to vehicle (DMSO).

Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Figure 7: Deletion of PPAR- γ in stromal cells restores the anti-proliferative effect of pioglitazone and is associated with a decrease of Gas6.

(A) OCI-AML3 cell line was co-cultured with PPAR- γ KO or Cas9 control MS-5 stromal cells using Transwell® inserts with 0.4 μ m pore and then treated with pioglitazone (10 μ M). Cell counts were performed by flow cytometry and compared to vehicle (DMSO). (B) Levels of phosphorylated AXL^{Y779} in OCI-AML3 at day 7 determined by flow cytometry with (C) results expressed by stain index ratio compared to vehicle (DMSO). (D) Mouse Gas6 protein levels secreted by wild-type or PPAR- γ KO MS-5 stromal cells, were examined when cultured alone or co-cultured with OCI-AML3 cell line. (E) Mouse Gas6 protein levels secreted by wild-type or PPAR- γ KO MS-5 stromal cells, co-cultured with OCI-AML3 cell line and treated with pioglitazone (10 μ M) compared to vehicle (DMSO).

Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Figure 8: Exogenous Gas6 adjunction mimics stroma-induced resistance to pioglitazone

(A) OCI-AML3 cell line was treated with pioglitazone (10 μ M) alone, exogenous Gas6 (50 ng/mL) alone or in combination. Cell counts were performed by flow cytometry and compared to vehicle (DMSO). (B) Levels of phosphorylated AXL^{Y779} in OCI-AML3 at day 7 determined by flow cytometry with (C) results expressed by stain index ratio compared to vehicle (DMSO). Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Figure 9: The activation of the Gas6/AXL pathway is reproduced by MS-5 conditioned medium.

OCI-AML3 cell line was cultured in standard medium or MS-5 conditioned medium (CM) and treated with pioglitazone (10 μ M) alone (A), bemcentinib (50 nM) alone or in combination (B). Cell counts were performed by flow cytometry and compared to vehicle (DMSO). (C) Levels of phosphorylated AXL^{Y779} in OCI-AML3 at day 7 determined by flow cytometry with results expressed by stain index ratio compared to vehicle (DMSO). (D) Relative mouse Gas6 protein levels assessed by ELISA in conditioned medium at day 7 compared to untreated condition. Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant.

Figure 1

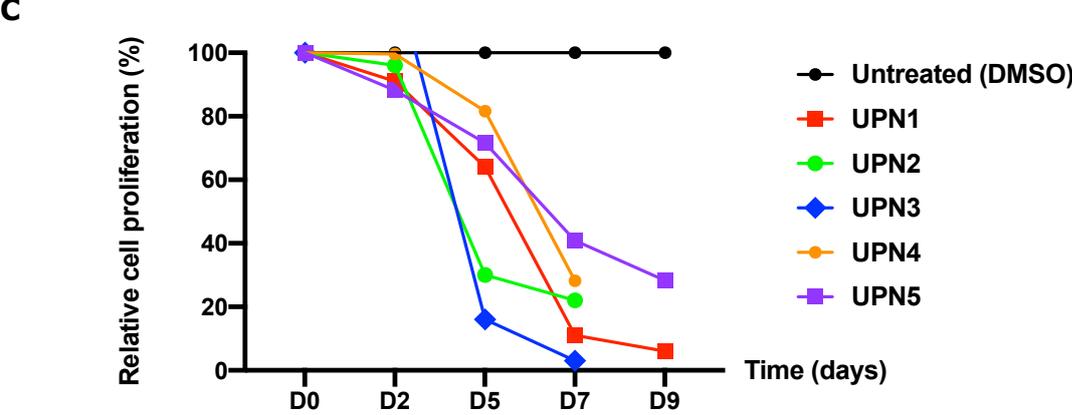
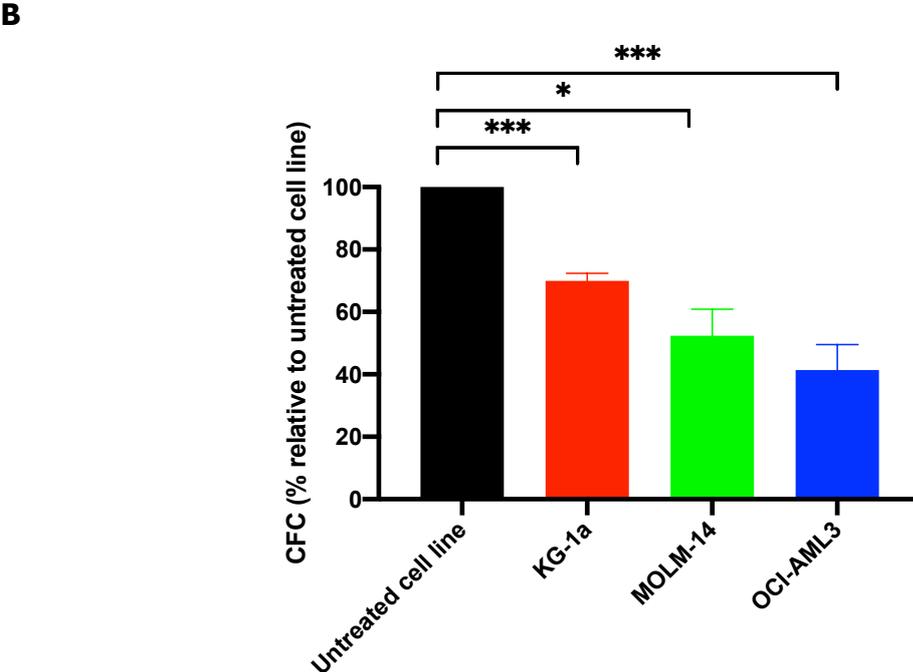
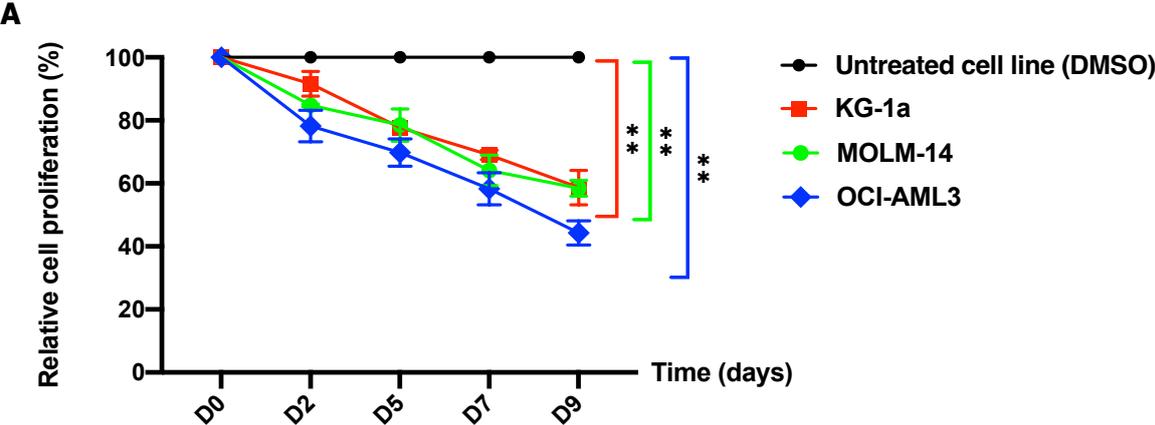


Figure 2

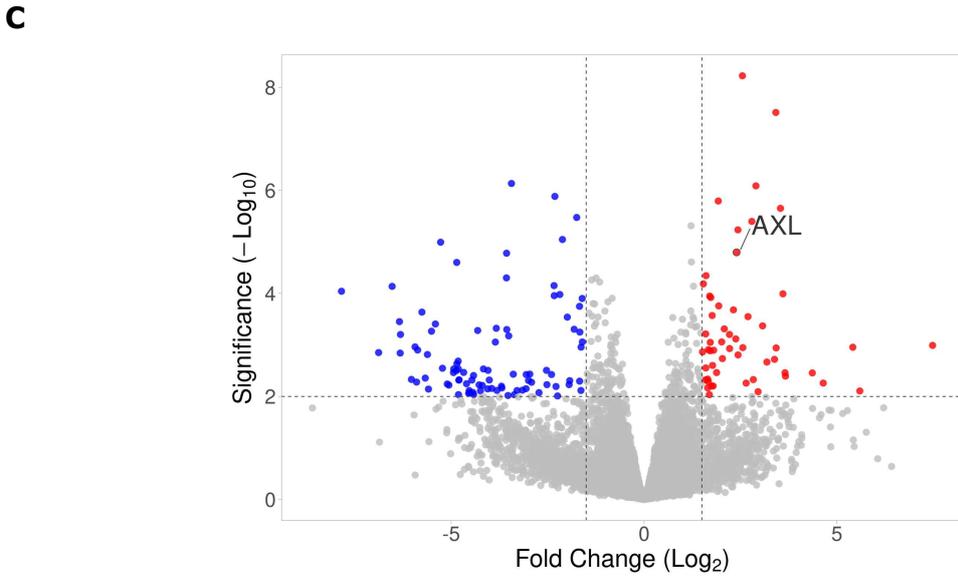
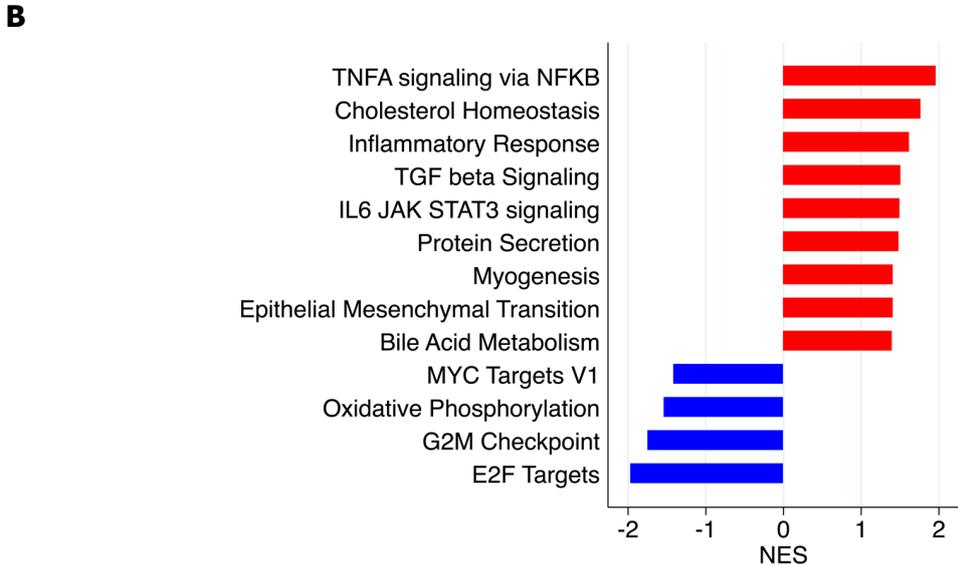
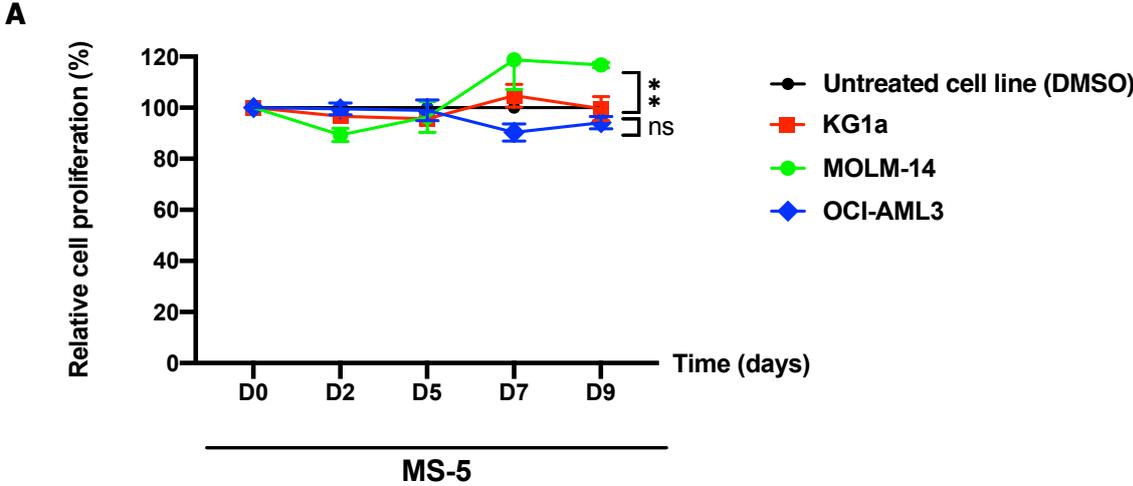


Figure 3

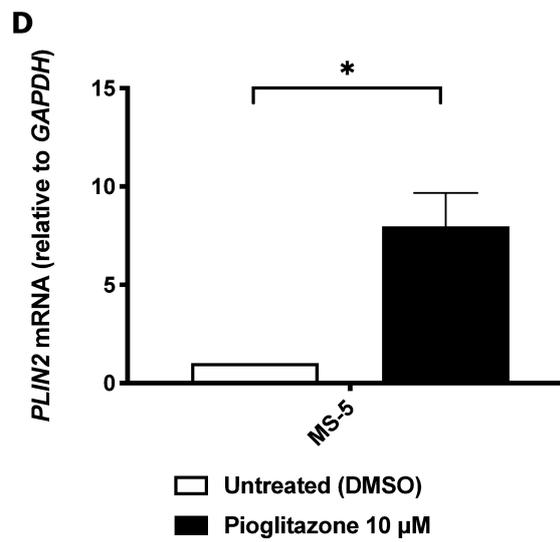
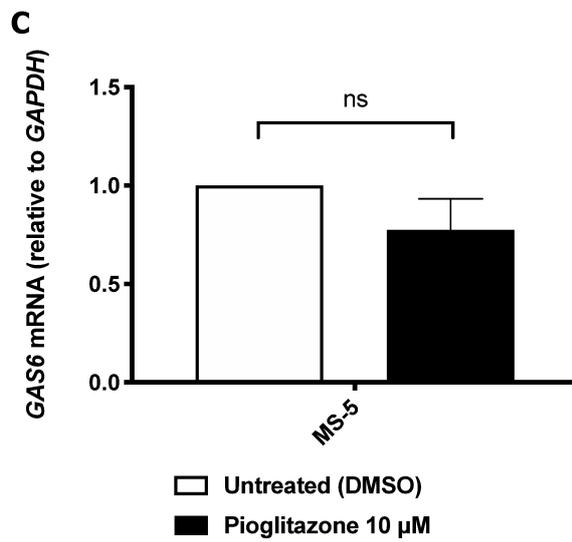
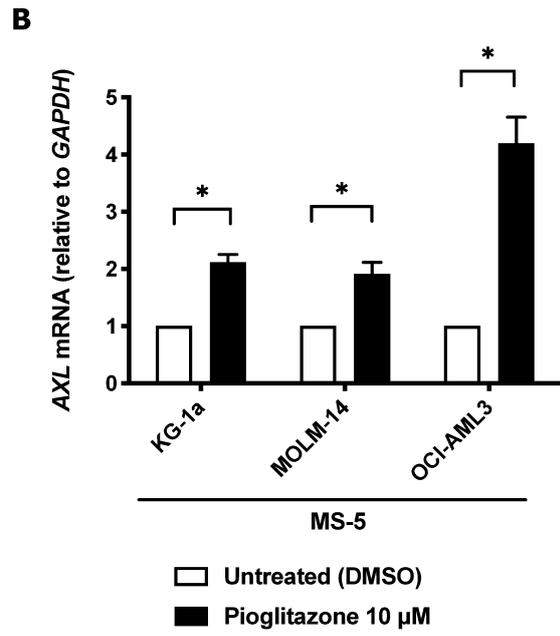
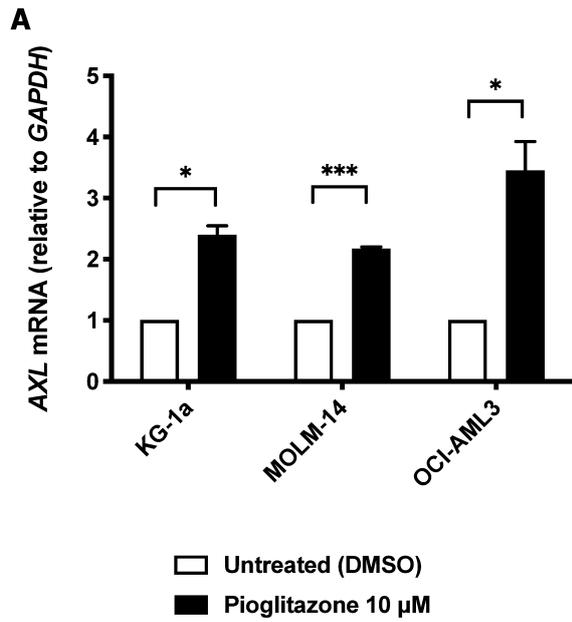
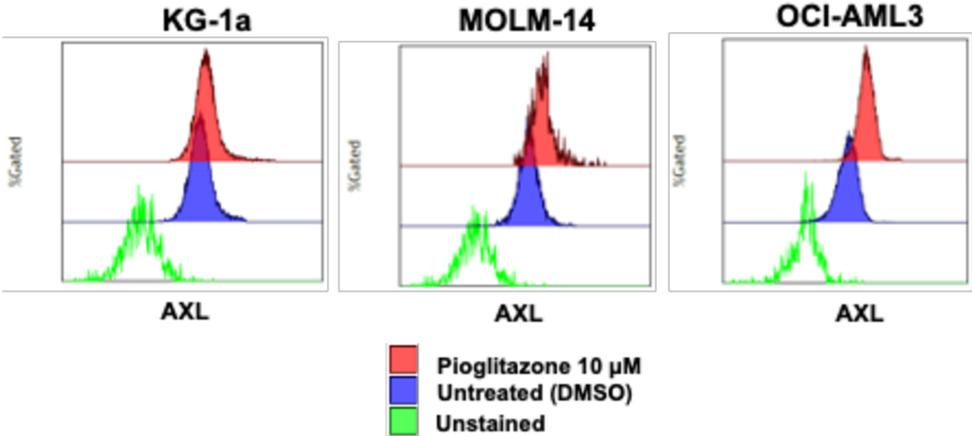
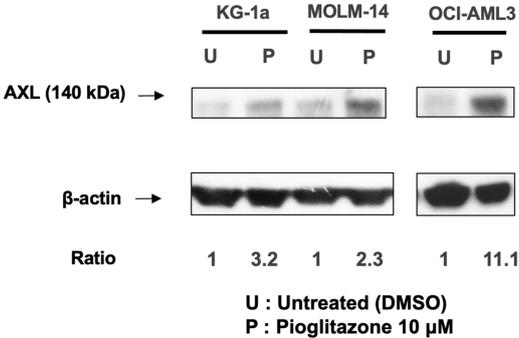


Figure 4

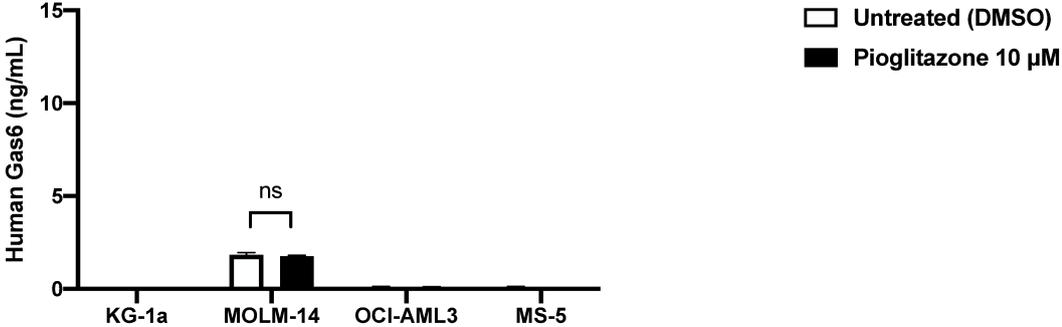
A



B



C



D

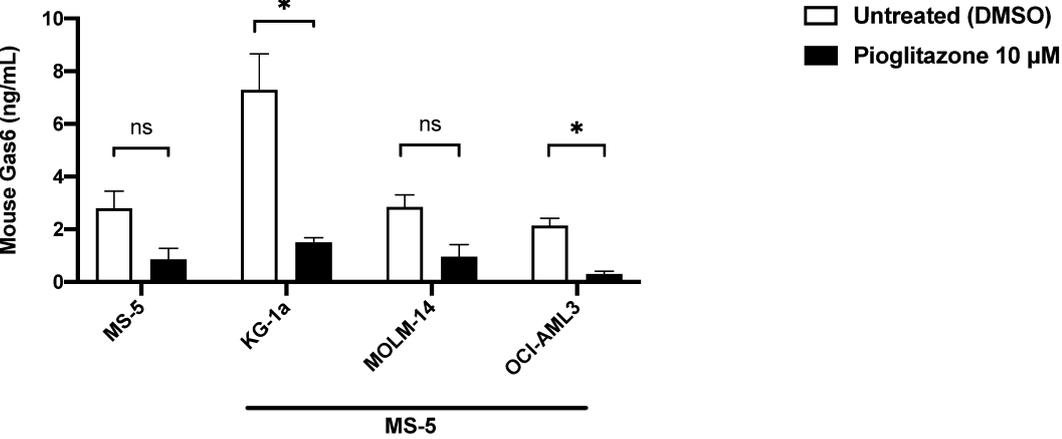
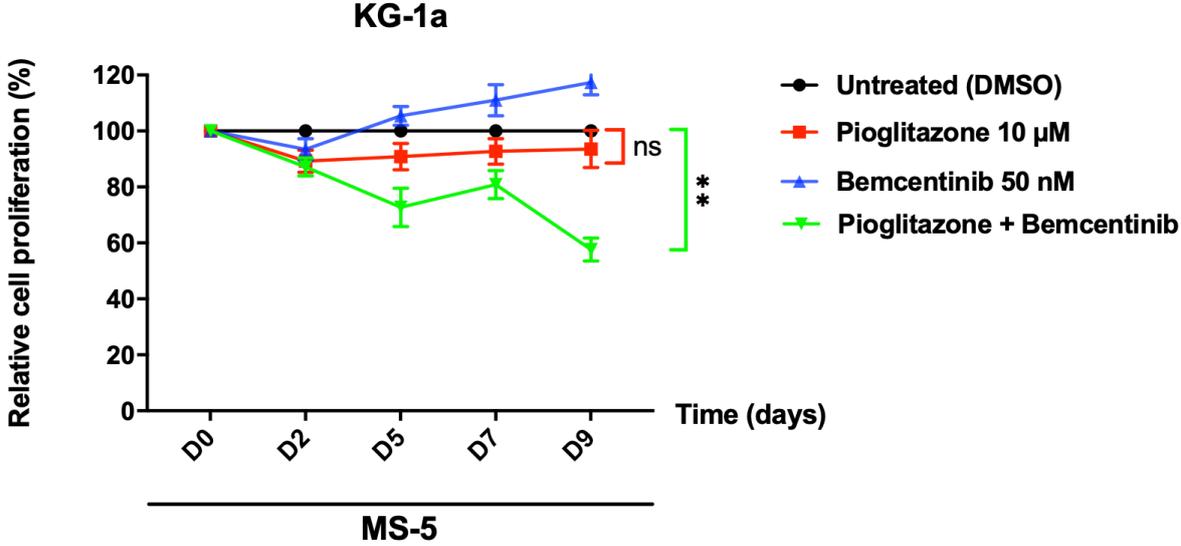
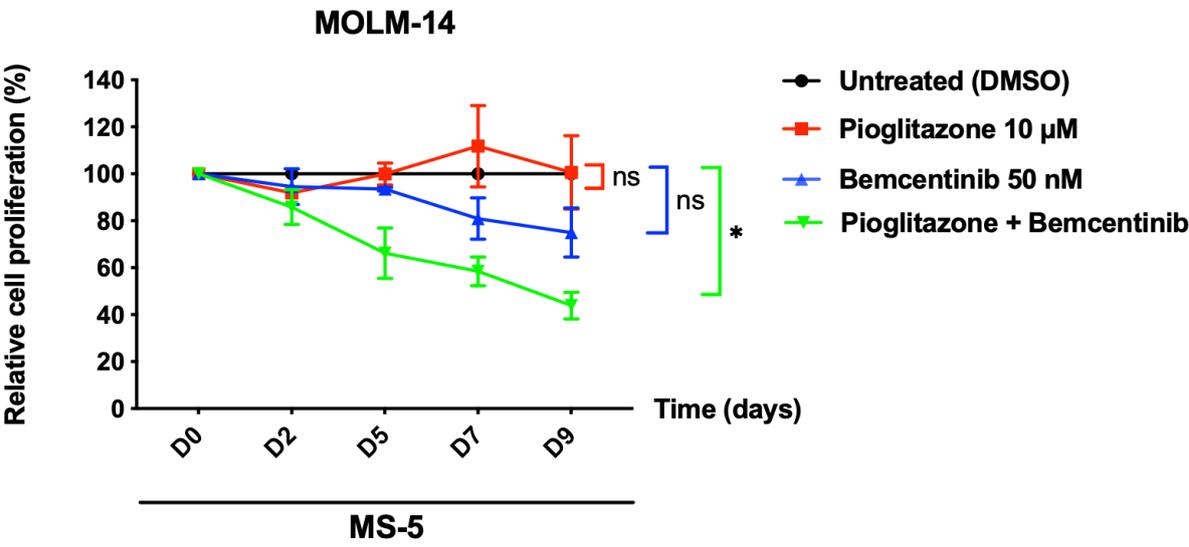


Figure 5

A



B



C

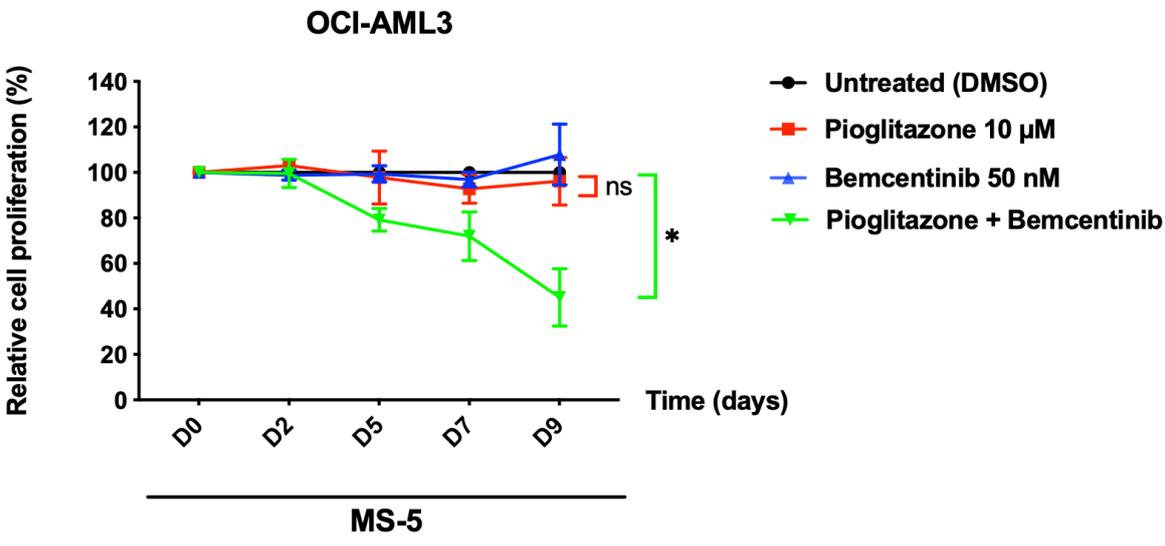
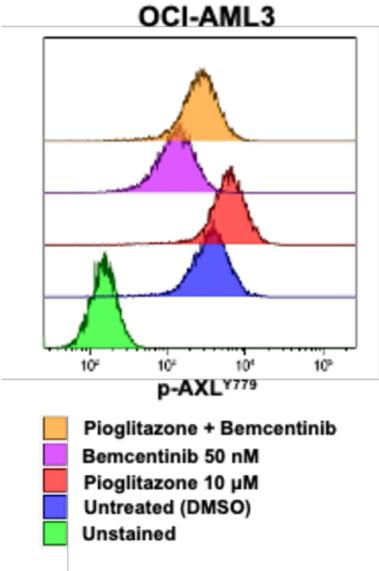


Figure 6

A



B

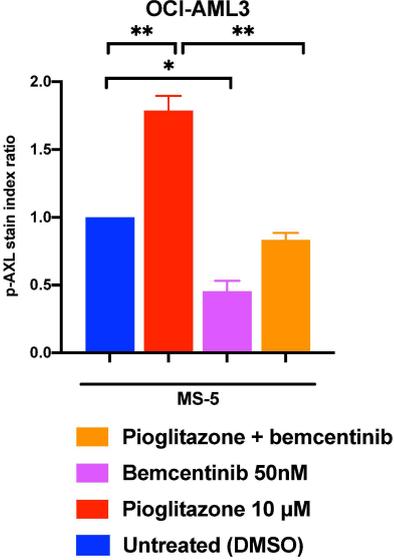
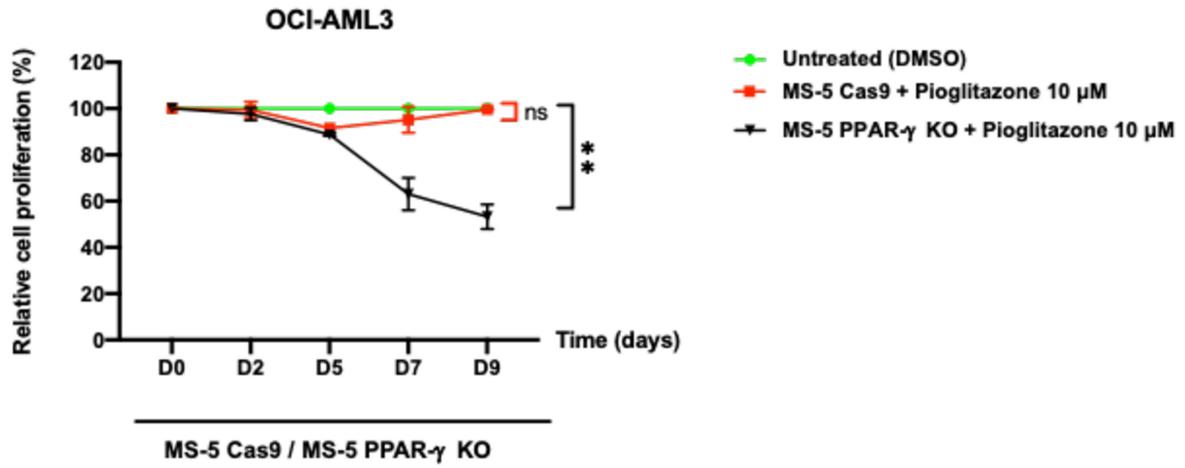
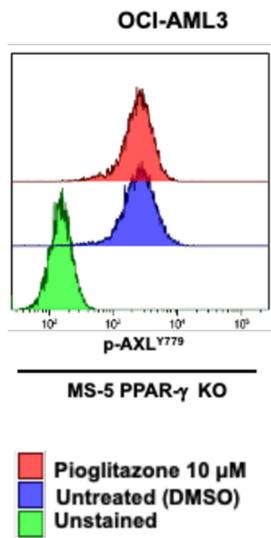


Figure 7

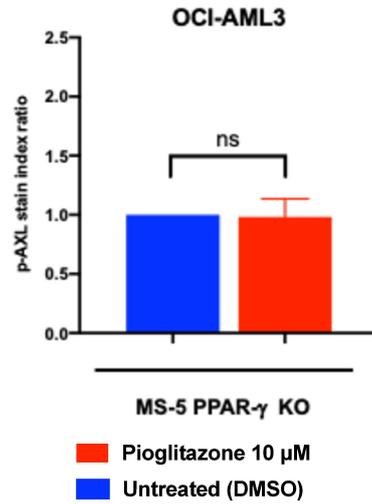
A



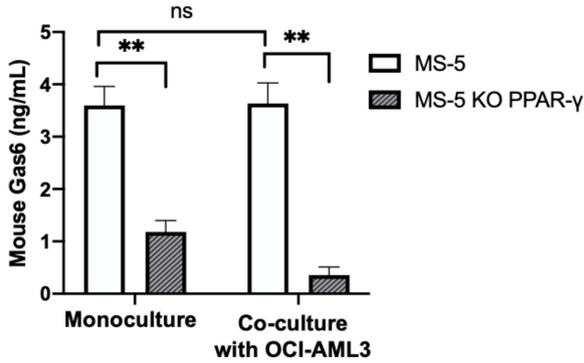
B



C



D



E

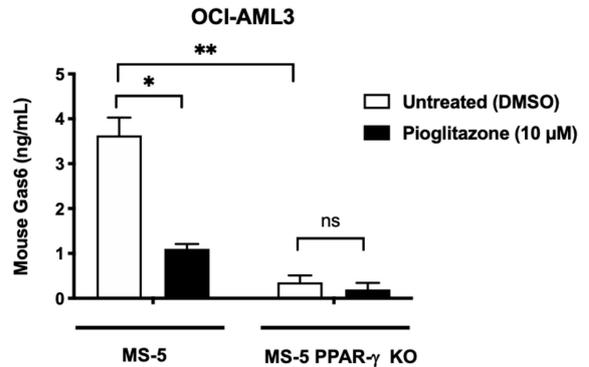
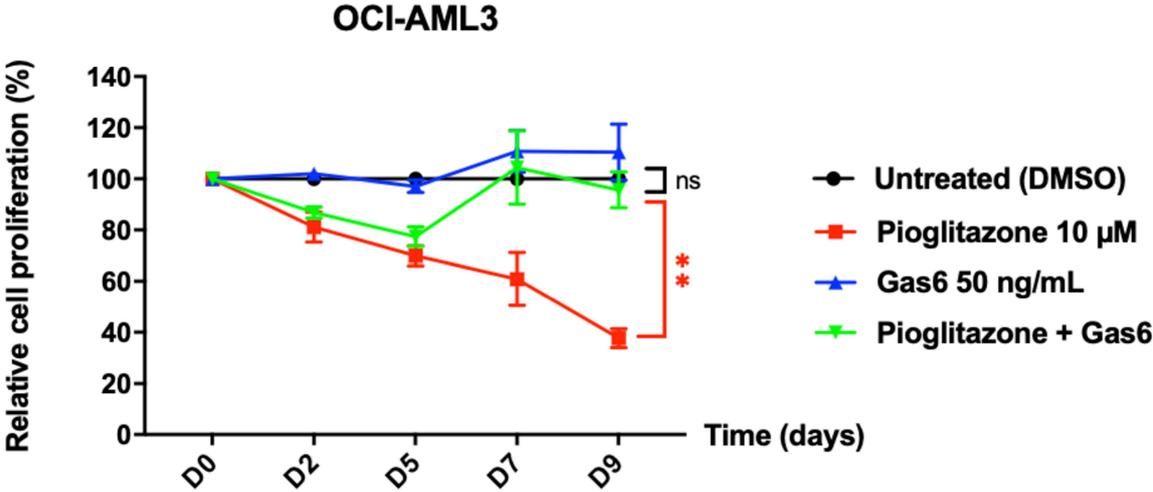
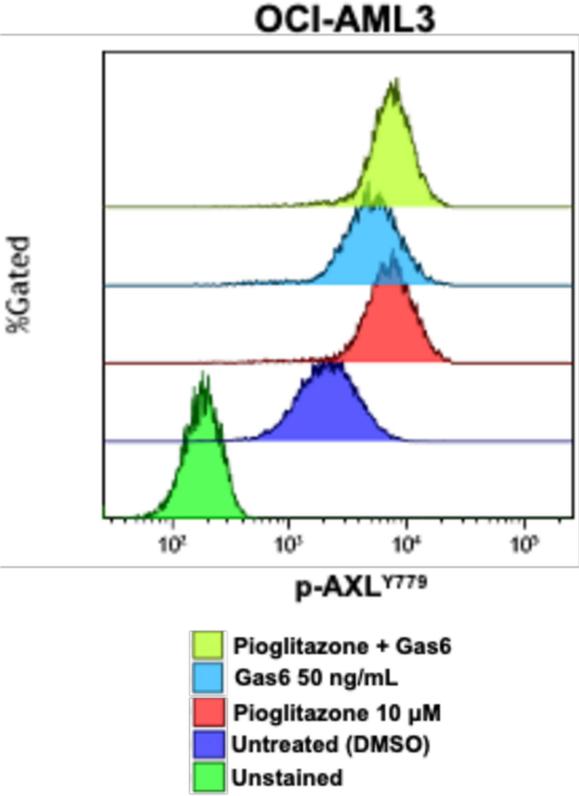


Figure 8

A



B



C

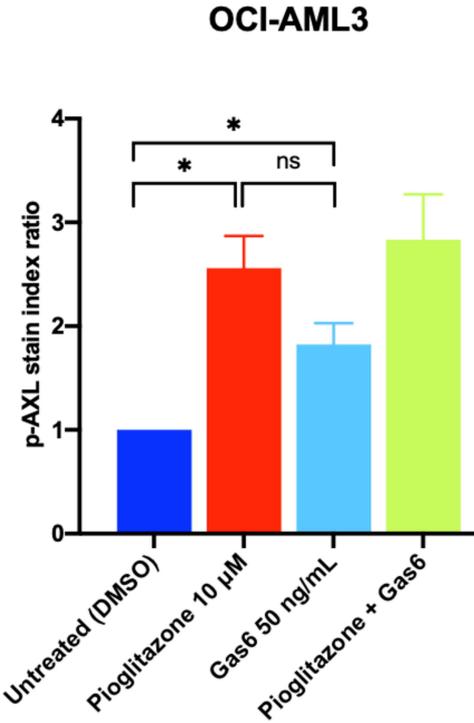
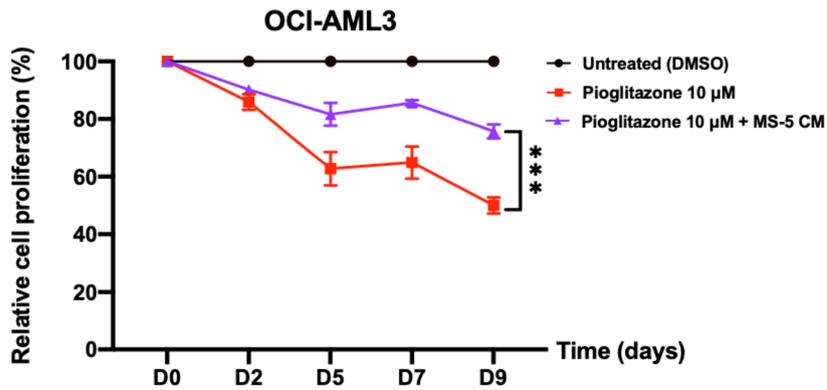
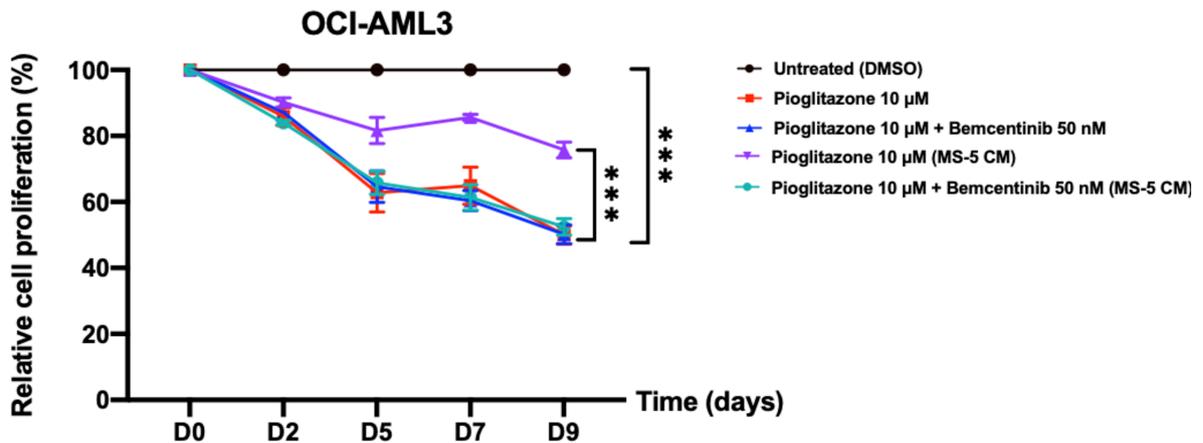


Figure 9

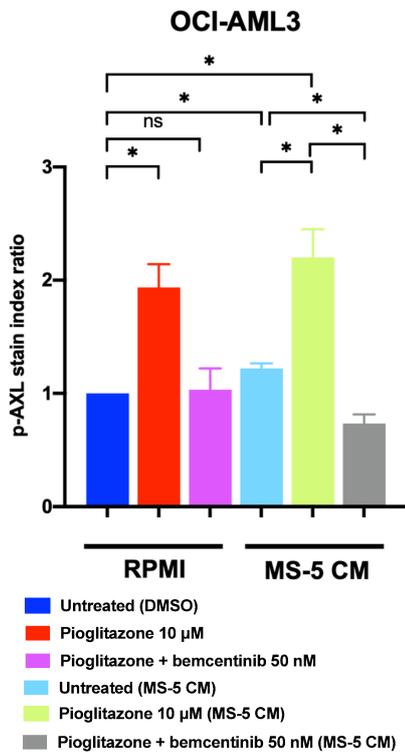
A



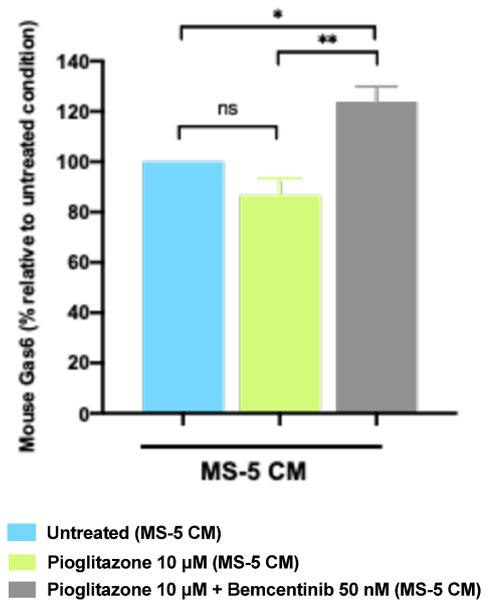
B



C



D



Supplementary information

Supplementary Table 1: Primer sequences for real-time PCR

| Human primers | | |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Gene | Forward primer 5'-3' | Reverse primer 3'-5' |
| <i>AXL</i> | GGT GGC TGT GAA GAC GAT GA | CTC AGA TAC TCC ATG CCA CT |
| <i>Gas6</i> | GCA GCG AGC ACT GTA TCA TCT G | CCG TCA CCG AGA AGC ACT G |
| <i>GAPDH</i> | GTA TCG TGG AAG GAC TCA TGA CC | GTT CAG CTC AGG GAT GAC CTT |
| <i>PLIN2</i> | TGC TGT GAC GAC TAC TGT GAC TG | GAC TGT GTT AAT GCT GCC ACT GAC |
| Murine primers | | |
| Gene | Forward primer 5'-3' | Reverse primer 3'-5' |
| <i>AXL</i> | GAC GGA GCC TGA GAC AAT CTT C | GCC TGG AGT GAC GGA GTG G |
| <i>Gas6</i> | CCG TCG CTT AGC CAG GAT G | CCA GCA GGA GCA GCA GAA G |
| <i>GAPDH</i> | GCA TTG TGG AAG GGC TCA TGA CC | GTT CAG CTC TGG GAT GAC CTT |
| <i>PLIN2</i> | GTG CCA GAG GTG CCG TAA C | AAC TGT ATT GAT GCT GCC ATT GAC |

Supplementary Table 2: Patient characteristics at diagnosis

| Patient number | Age | Gender | Blasts (%) | Leukocytes (10⁹/L) | ELN 2022 subgroup |
|-----------------------|------------|---------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| UPN1 | 89 | M | 81 | 48.6 | Intermediate |
| UPN2 | 79 | F | 96 | 47.3 | Intermediate |
| UPN3 | 66 | F | 84 | 233 | Intermediate |
| UPN4 | 61 | M | 72 | 50.2 | Adverse |
| UPN5 | 86 | F | 85 | 30.1 | Adverse |

Supplementary methods

Cell apoptosis

Cell apoptosis was assessed using an FITC-conjugated Annexin V labeling detection kit (BD Biosciences, San Jose, CA). Cells were harvested and resuspended in binding buffer at a concentration of 1 000 000 cells/mL. Annexin V-FITC (BD Biosciences) and SYTOX™Blue (ThermoFisher) were added according to the manufacturer's instructions. Following a 15-minute incubation at room temperature in the dark, samples were acquired on a FACSCanto II® flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) to determine the percentage of apoptotic cells. The combination of these two markers enables the differentiation of viable cells (negative for Annexin V and SYTOX) from cells undergoing apoptosis (positive for Annexin V and/or SYTOX).

Supplementary Figures

Figure S1: The anti-leukemic effect of pioglitazone is not mediated through a pro-apoptotic mechanism.

Apoptosis measured by Annexin V/SYTOX™Blue labeling after 7 days of treatment with pioglitazone (10 μ M) compared to vehicle (DMSO), was not increased in any AML cell line (KG-1a, MOLM-14, OCI-AML3).

Results expression: mean \pm SD of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant

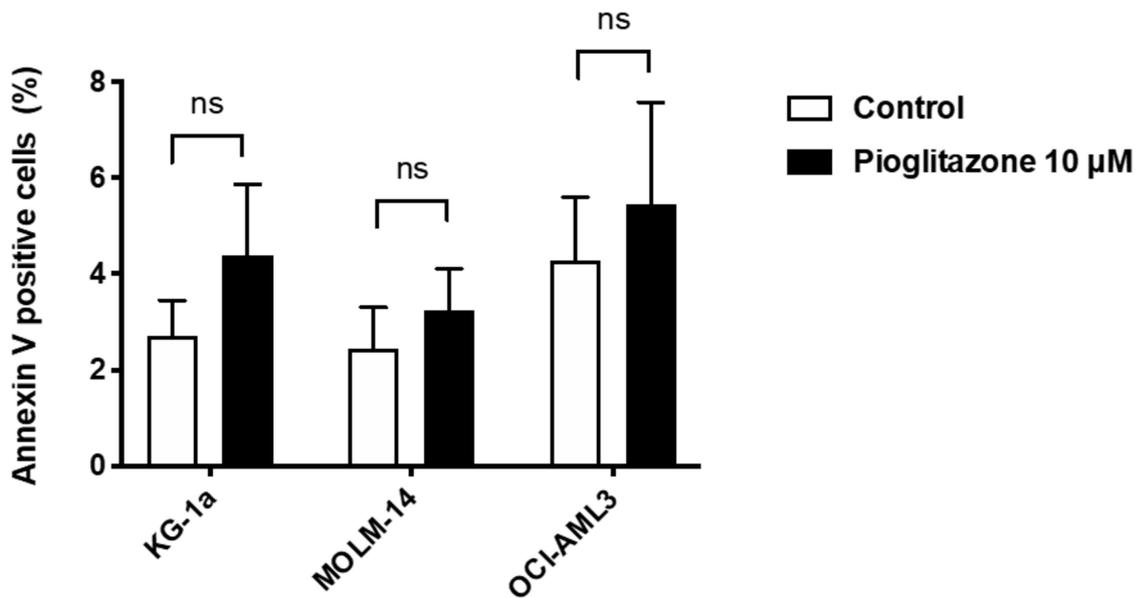
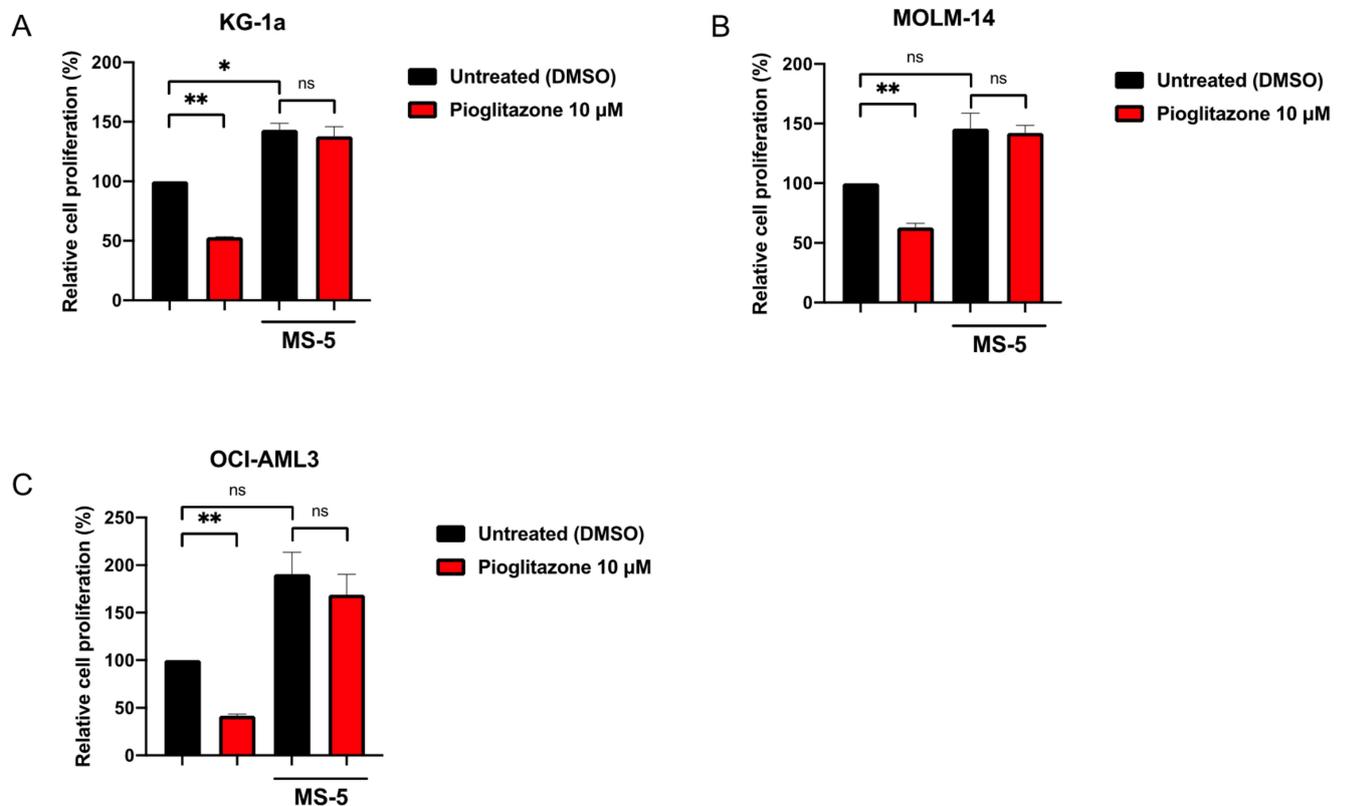


Figure S2: Effect of MS-5 stromal cells on leukemia cell proliferation at day 9

Cell growth reduction induced in AML cell lines A) KG-1a, B) MOLM-14, and C) OCI-AML3 after pioglitazone (10 μ M) incubation compared to vehicle (DMSO). This effect was abolished when co-cultured on wild-type MS-5 stromal cells using Transwell® inserts with 0.4 μ m pore. Cell counts were performed by flow cytometry.

Results expression: mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, non-significant



Partie 2 : PPAR- γ dans les LAM : échappement thérapeutique, inflammation, fibrose, vers une cible thérapeutique potentielle ?

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes attachés à explorer les autres versants de l'activation de la voie de PPAR- γ qui pourraient bénéficier aux LAM : la modulation du phénotype MDR, de l'inflammation et enfin de la fibrose.

En ce qui concerne la modulation du phénotype MDR (*Multidrug resistance*) *in vitro* et évalué au moyen de tests fonctionnels, nous n'avons pas pu reproduire les résultats observés dans la littérature sur la lignée KG-1a qui présente une activité P-gp à l'état basal, quel que soit le ligand PPAR- γ utilisé. L'exposition à la pioglitazone ou à d'autres ligands de PPAR- γ n'a pas permis d'inhiber l'expression d'une P-gp inductible sur nos lignées humaines de LAM. Ces résultats discordants avec ceux observés dans la littérature, peuvent s'expliquer par des doses utilisées plus élevées dans la littérature, exposant à des effets non spécifiques « *off-target* » non reproductibles avec les doses que nous utilisons.

Nous avons étudié et comparé l'expression de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance par méthode Luminex® sur une cohorte bien caractérisée de 53 patients atteints de LAM au diagnostic avec 25 témoins sains. Parmi 22 paramètres étudiés, nous avons pu mettre en évidence une dérégulation du profil d'expression de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance dans les LAM. Cette modulation est caractérisée par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et de certains facteurs de croissance comme SCF dans les LAM, soulignant à la fois la place de l'inflammation dans les LAM et l'importance de l'interaction des cellules leucémiques avec les facteurs sécrétés par leur microenvironnement. Malgré la différence de profil d'expression au sein des patients atteints de LAM, celle-ci ne semble pas être liée à présence d'anomalies associées aux néoplasies myélodysplasiques, ni au caractère secondaire de la LAM, suggérant que le pronostic défavorable ces entités ne dépend pas de la composante inflammatoire sur nos données. Étant donné la grande hétérogénéité des LAM, les données conventionnellement utilisées pour leur caractérisation ne permettent pas d'identifier ces sous-groupes de patients inflammatoires. L'identification de nouveaux biomarqueurs permettrait de mieux cibler les patients susceptibles de bénéficier des propriétés anti-inflammatoires de la pioglitazone.

Nous avons enfin souhaité explorer la globalité des effets induits par l'activation de PPAR- γ *in vivo*, tout en intégrant le mécanisme de résistance impliquant l'axe Gas6/AXL précédemment décrit. Cette partie du travail est toujours en cours. Nous souhaitons évaluer le bénéfice

potentiel de l'association pioglitazone + inhibiteur d'AXL à atteindre et éliminer les CSL au sein de leur microenvironnement tout en analysant le rôle régulateur de PPAR- γ sur l'inflammation et la fibrose.

Parallèlement, nous avons identifié dans les prélèvements médullaires des patients les sous populations de CSL selon le protocole de l'étude BIG-1 (intergroupe FILO-ALFA : CD45/CD34/CD38/CD123/CD90/CD45RA/CD7/CLL-1/TIM-3), dont la quantification nous permettra d'évaluer l'effet des ligands de PPAR- γ dans nos modèles *in vivo* de xénogreffe de cellules primaires. L'étude pilote évaluant le potentiel de greffe des cellules primaires dans les souris NSG nous a permis d'identifier deux patients candidats sur les six testés à ce jour. L'étude princeps évaluant le bénéfice potentiel *in vivo* de l'association pioglitazone + giltéritinib sur ces deux patients est actuellement en cours. En effet, dans le cadre de ces modèles *in vivo*, le bemcentinib n'a pas pu être obtenu, la firme BerGenBio ayant décidé d'arrêter son développement dans les hémopathies malignes pour se concentrer sur les tumeurs solides. Nous avons donc opté pour le giltéritinib qui a l'avantage d'être une molécule approuvée, plus facilement accessible, offrant une perspective d'essais cliniques rapides en cas de résultats positifs des modèles pré-cliniques.

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Lignées cellulaires

Les différentes lignées humaines de LAM utilisées sont représentatives des principales anomalies moléculaires observées dans les LAM. Les principales caractéristiques des lignées utilisées sont résumées dans la table suivante (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Principales caractéristiques des lignées humaines de LAM

| Cellules en suspension – Nom lignée | Classification FAB | Anomalie moléculaire | Temps de doublement | Expression pompe efflux |
|--|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| KG-1a (DSMZ ACC 421) | LAM0 | TP53 | 50 heures | P-gp |
| MOLM-14 (DSMZ ACC 102) | LAM5a | MLL-AF9 FLT3-ITD | 50 heures | / |
| OCI-AML3 (DSMZ ACC 582) | LAM4 | NPM1 et DNMT3A | 35-40 heures | / |
| THP-1 ((DSMZ ACC 16) | LAM5 | MLL-AF9 | 40-50 heures | / |

Ces lignées sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium* - Gibco®) GlutaMAX™ (L-alanyl-L-glutamine) supplémenté en SVF (sérum de veau foetal décomplémenté) à 10%, en incubateur à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO₂. Chaque lignée est cultivée dans des flasques de 25cm² (Corning®) à une concentration de 300 000 cellules/mL qui sera réajustée toutes les 48 à 72h.

2) Échantillons primaires

a) Cellules primaires

Les cellules primaires sont issues d'échantillon de sang ou de moelle osseuse de patients prélevés sur tube anticoagulé (EDTA). L'isolement des cellules a été réalisé grâce à une séparation des cellules mononuclées utilisant un gradient de Ficoll (GE Healthcare®). La collecte a été réalisée en partenariat avec la Direction de la Recherche Clinique du CH André Mignot (Versailles). Il s'agit d'un projet de recherche de type non interventionnel à risque minime impliquant la personne humaine. Ce projet a par ailleurs reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée III en 2018.

b) Plasmathèque

Les plasmas de 53 patients atteints de LAM, au diagnostic et bien caractérisés ont été fournis par l'ALFAthèque après demande auprès du Conseil Scientifique du groupe ALFA, qui a évalué favorablement le projet. Les 53 patients se répartissaient en 27 patients de type « *secondary-like* » ie profil mutationnel comprenant une mutation parmi les gènes suivants : *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2 (471)* dits MRC+ et 26 patients atteints de LAM de risque intermédiaire dits LAM MRC-. Les plasmas de 25 témoins sains ont quant à eux été obtenus au moyen d'une convention INSERM-EFS (Établissement Français du Sang).

3) Étude du phénotype MDR

a) Étude phénotypique

L'expression de la P-gp a été évaluée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps anti-P-gp (PerCP Cy5.5, clone UIC7, Invitrogen®) selon les recommandations du fabricant. Tous les échantillons ont été acquis à l'aide d'un cytomètre de flux FACSCanto II® (BD Biosciences, San Jose, CA) et analysés sur le logiciel Kaluza® version 2.1 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

b) Test fonctionnel d'accumulation de la Rhodamine 123

Les cellules des différentes lignées humaines de LAM ont été cultivées à une concentration de 300 000 cellules/mL par puits traitées ou non avec de la pioglitazone à une concentration de 10 µM. Après 24h de pré-exposition, la Rhodamine 123, substrat fluorescent de la P-gp a été rajoutée au milieu à une concentration finale de 1 µM en présence ou non de pioglitazone 10 µM pour une incubation pendant 5, 10, 15, 30 ou 60 minutes à 37°C. Le vérapamil, inhibiteur connu de la P-gp (472), a été utilisé en parallèle comme témoin de l'inhibition de l'efflux de la Rhodamine 123. Les résultats sont exprimés en *stain index* (SI) calculé à partir de la MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) des populations positives et négatives.

$$\text{Stain Index (SI)} = \frac{\text{MFI (positif)} - \text{MFI (négatif)}}{2 * \text{Écart type (négatif)}}$$

Le ratio du *stain index* été calculé en divisant le SI de la condition traitée par rapport à sa condition non traitée.

c) Étude du phénotype MDR inducible

La doxorubicine (Adriblastine®) a été utilisée en tant d'inducteur connu de la P-gp. Les cellules KG-1a, MOLM-14 et OCI-AML3 ont été exposées à des concentrations croissantes de doxorubicine (10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM) pendant une semaine. La capacité d'efflux de la doxorubicine a été évaluée en mesurant sa fluorescence intrinsèque (émission entre 560-590 nm) collectée dans le canal FL2 du cytomètre en flux. Comme précédemment, le vérapamil, inhibiteur connu de la P-gp a été utilisé en parallèle comme témoin de l'inhibition de l'efflux de la doxorubicine.

4) ELISA Multiplex

Un ensemble de 22 cytokines, chimiokines ou facteurs de croissance a été dosé dans les plasmas issus de la cohorte ALFA-1200 et des plasmas issus de témoins sains. Les analyses ont été réalisées sur la plateforme technique du département IDMIT (*Infectious Diseases Models for Innovative Therapies*) du CEA, au moyen d'une trousse commerciale basée sur un dosage ELISA Multiplex (*Human ProcartaPlex®*), suivant les instructions du fournisseur avec chaque paramètre dosé en double. Ce dosage est basé sur une technique ELISA en « sandwich », utilisant deux anticorps hautement spécifiques se liant à différents épitopes de chaque protéine. Un premier anticorps fixé à la surface de billes codées par couleur se lie spécifiquement à l'analyte d'intérêt. Une fois l'analyte capturé par le premier anticorps, le second anticorps de détection lui-même couplé à un fluorochrome se lie également à l'analyte, formant ainsi un « sandwich ». Les billes ont été lues un sur un Bio-Plex 200 (Bio-Rad®, Marnes-la-Coquette, France) qui identifie chaque analyte en fonction de la couleur de la bille et quantifie sa concentration en mesurant la fluorescence émise, permettant ainsi la quantification simultanée de plusieurs analytes. Le choix des différents analytes a été en premier lieu déterminé à partir des données transcriptomiques et de celles du sécrétome issus de cellules stromales MS-5 invalidées pour PPAR-γ. Parmi ces paramètres, plusieurs ont été sélectionnés pour leur rôle soit dans le processus inflammatoire (IL1-RA, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, TNF-α, S100A8/A9), soit dans la fibrose (FGF, HGF, PDGF-BB, ostéopontine, TGF-β). Outre l'intérêt porté à la question biologique liée à la nature des cytokines ou des facteurs de croissance dosés, le choix de ces derniers a été conditionné à la fois par une volonté d'optimiser le volume limité de plasma ainsi que par la nécessité d'assurer une compatibilité entre les différentes billes de chaque trousse. Les 22 analytes dosés étaient les suivants :

- Adiponectine
- BAFF (*B-cell activating factor*)
- CXCL-1 (C-X-C motif chemokine ligand 1)
- FGF (*Fibroblast Growth Factor*)
- FLT3-L (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*)
- HGF (*Hepatocyte growth factor*)
- IFN- γ (*Interferon gamma*)
- IL1-RA (*Interleukin-1 receptor antagonist*)
- IL-6 (Interleukine-6)
- IL-7 (Interleukine-7)
- IL-8 (Interleukine-8)
- IL-10 (Interleukine-10)
- MMP-9 (Métalloprotéinase matricielle 9)
- NGAL (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*)
- PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor*)
- Ostéopontine
- S100A8/A9 (calprotectine)
- SCF (*Stem Cell Factor*, KIT ligand)
- SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor 1*)
- TGF- β (*Transforming growth factor β*)
- TNF- α (*Tumor necrosis factor α*)
- VEGF-A (*Vascular endothelial growth factor*)

5) Cytométrie en flux

Les sous-populations de CSL ont été identifiées après marquage des cellules mononucléées isolées par Ficoll selon le panel et le protocole national standardisé pour l'évaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux du protocole BIG-1/ALFA-PPP (473) utilisant la combinaison suivante d'anticorps : CD45/CD34/CD38/CD123/CD90/CD45RA/CLL-1/TIM-3/CD97 (BD®Lyotube Stain 369).

Tous les échantillons de cellules primaires ont été acquis sur un cytomètre de flux FACSCanto II® (BD Biosciences). Les données ont été analysées sur le logiciel BD FACSDiva® (BD Biosciences) ou Kaluza® version 2.1 (Beckman Coulter).

6) Modèles murins

La demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques a été acceptée en 2022 (A23-017). Les expériences ont été réalisées dans l'animalerie située à l'IRSN (Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, bâtiment 05 Henri Jammet) du CEA et placées sous la supervision du Dr Silvia VINCENT-NAULLEAU, vétérinaire responsable de cette structure.

Les modèles de xénogreffes ont été réalisés avec des souris NOD-SCID IL2R γ -/- femelles âgées de 12 semaines non préalablement irradiées, chacune recevant une suspension d'un million de cellules primaires de LAM, injectées par la veine caudale.

La prise de greffe a été évaluée par détermination du chimérisme par cytométrie en flux réalisé sur 30 μ L d'échantillon sanguin prélevé en sous mandibulaire à partir de la 6^{ème} semaine post-injection. Le sang total a été marqué avec un mélange d'anticorps anti-CD45.1 murin 1/200^{ème}

(FITC, A20, BD®) et anti-CD45 humain 1/20^{ème} (APC, HI30, BD®) pendant 15 minutes à l'obscurité. Après marquage, une lyse des globules rouges a été réalisée avec 2 mL de tampon de lyse 1X (NH4Cl 155 mM, KHCO3 10nM, EDTA 0,2 nM, pH = 7,4) pendant 10 minutes à température ambiante. Une fois lavées au PBS, les échantillons ont été repris dans 200 µL de PBS avant acquisition sur un cytomètre de flux FACSCanto II® (BD Biosciences).

Un suivi de la NFS (Numération Formule Sanguine) a été réalisé dès lors que la prise de greffe était détectée, le seuil ayant été fixé à 0,1% de cellules humaines CD45+ parmi les leucocytes totaux sanguins.

La pioglitazone (37,5 mg/kg/j) et/ou le giltéritinib (30mg/kg/j) ont été administrés *per os* dans leur alimentation (croquettes), dès que la détection d'une prise de greffe dépassait 0,5% des leucocytes totaux sanguins et pendant un maximum de 4 semaines selon le schéma expérimental suivant (**Figure 35**).

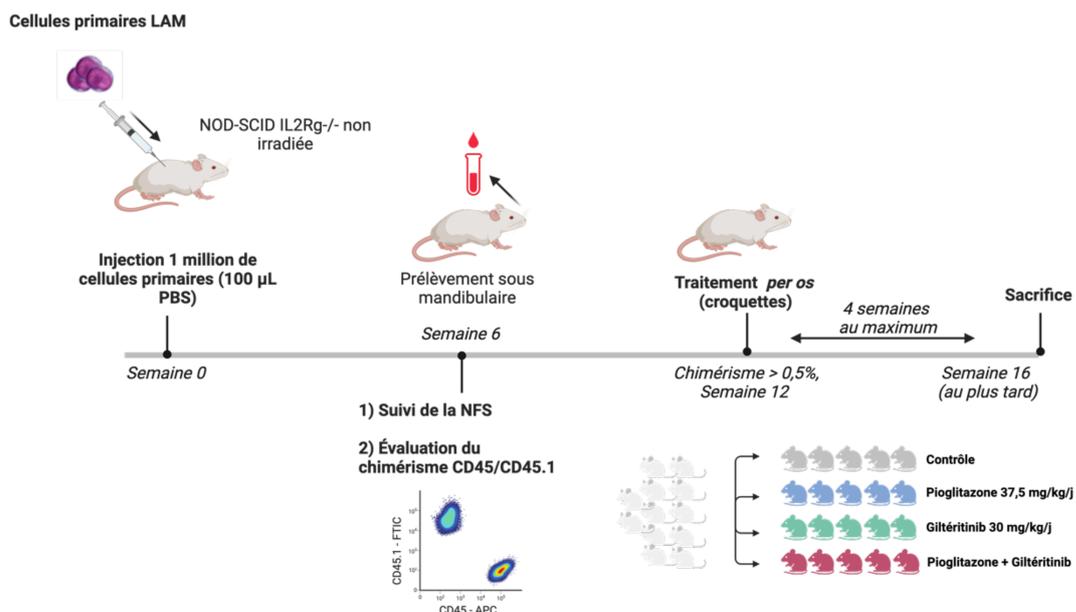


Figure 35 : Schéma expérimental des modèles de xénogreffes.

La confection des croquettes a été réalisée par processus de granulation humide de la poudre de comprimés de pioglitazone (Actos®) et/ou de giltéritinib (Xospata®) obtenue par broyage puis mélangée à un aliment pour souris de cette espèce. Les granulés ont été ensuite irradiés à une dose 25 kGy. La préparation des croquettes a été réalisée par la société SAFE® (Augy). Compte-tenu du poids et de la prise alimentaire moyenne d'une souris adulte, la concentration des granulés a été formulée de manière à assurer une prise de 37,5 mg/kg/j de pioglitazone et 30mg/kg/j de giltéritinib.

À l'issue du traitement, les animaux ont été euthanasiés puis disséqués afin de prélever la rate et les fémurs. Ces prélèvements ont permis de quantifier l'envahissement leucémique, ainsi que le contingent de CSL. Par ailleurs, une analyse histologique des fémurs a été réalisée, incluant une évaluation de la fibrose via la technique de coloration argentique de Gordon et Sweet. Une partie de ces cellules est ensuite greffée dans de nouvelles souris receveuses NOD-SCID IL2R γ ^{-/-} femelles afin d'évaluer l'effet des molécules sur le contingent de CSL en greffe secondaire. L'injection des cellules a été réalisée comme précédemment par injection dans la veine caudale avec un suivi hebdomadaire entre S6 et S12 permettant une analyse du chimérisme par cytométrie en flux et le suivi de la NFS.

7) Analyse

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9 (San Diego, Californie, États-Unis) ou STATA version 14 (College Station, Texas, États-Unis). Les tests de comparaison ont été réalisés selon un Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis. Les corrélations entre les variables continues ont été évaluées par la corrélation de Spearman. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart-type (SD) ou médiane \pm interquartiles, avec un niveau de signification de $p < 0,05$ avec *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, non significatif. L'analyse en composantes principales a été réalisée sur le logiciel R (<http://www.R-project.org/>, version 4.3.1) à l'aide des packages *FactoMineR* et *factoextra*.

II. RÉSULTATS

1) Modulation du phénotype MDR

L'analyse fonctionnelle du phénotype MDR par un test d'accumulation à la Rhodamine 123 a permis de confirmer que parmi les lignées humaines de LAM testées (KG-1a, MOLM-14, OCI-AML3, THP-1), seule la lignée KG-1a présente une activité liée à une pompe d'efflux. En effet, nous avons observé que l'accumulation de la Rhodamine 123 au bout de 60 minutes d'incubation est plus faible dans les KG-1a et dans les OCI-AML3. L'inhibition de la P-gp par le vérapamil a permis d'augmenter significativement l'accumulation de Rhodamine 123 dans les KG-1a, confirmant le phénotype MDR sur cette lignée. L'accumulation de Rhodamine 123 n'a en revanche pas été modifiée pour les autres lignées en présence de vérapamil (**Figure 36A**).

L'analyse par immunophénotypage de la protéine de surface P-gp a permis de confirmer les résultats de l'étude fonctionnelle avec un signal franc uniquement sur les KG-1a. Seules les MOLM-14 sont présentées en comparaison, les OCI-AML3 et THP-1 n'exprimant pas non plus de P-gp (**Figure 36B**).

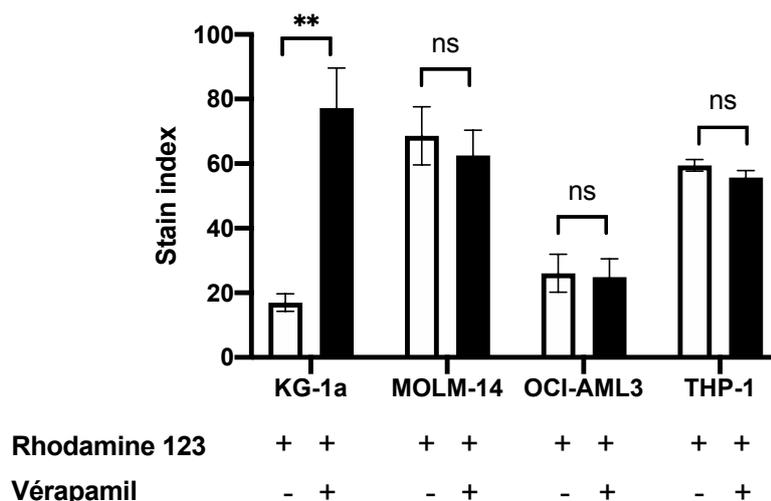
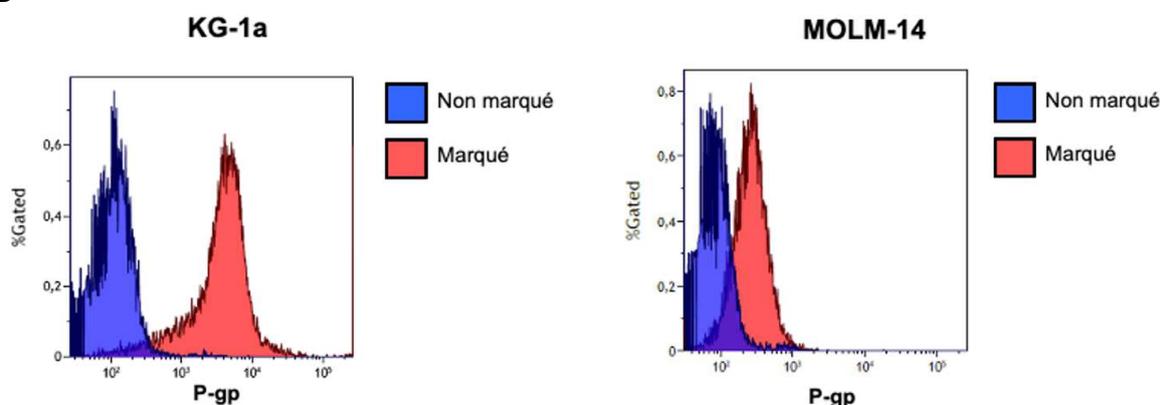
A**B**

Figure 36 : Les KG-1a présentent un phénotype MDR par l'expression de la P-gp.

A) Mesure de l'accumulation de la Rhodamine 123 dans 4 lignées humaines de LAM en présence ou non de vérapamil (moyenne de 3 expériences différentes).

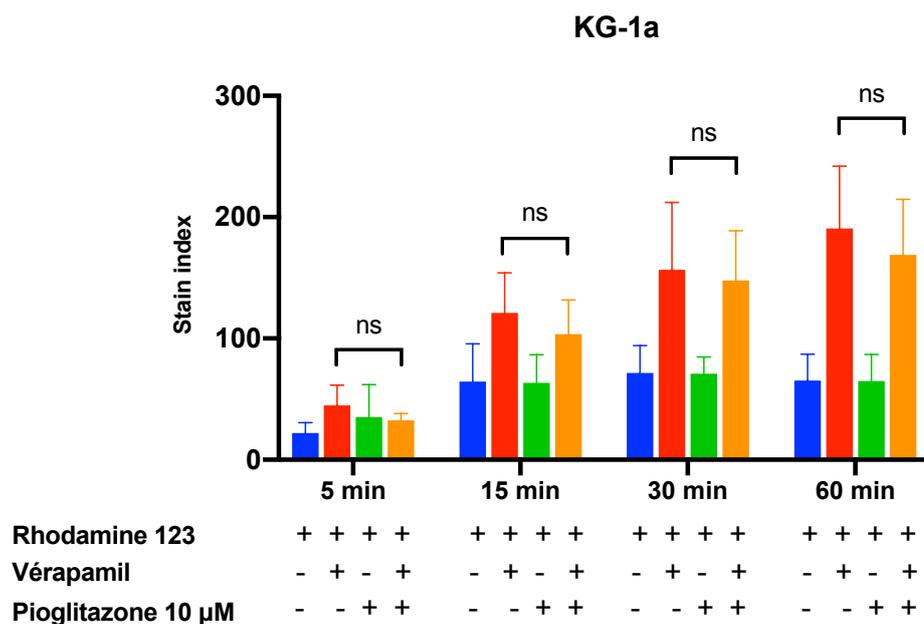
B) Expression phénotypique de la P-gp sur une lignée positive (KG-1a) et négative (MOLM-14).

Nous avons souhaité par la suite évaluer l'effet de la pioglitazone sur la modulation du phénotype MDR des KG-1a. L'accumulation de la Rhodamine 123 n'a pas été modifiée sous pioglitazone par rapport à la condition contrôle, que ce soit après une pré-incubation de 24h ou lors de l'ajout direct de la drogue avec la Rhodamine 123 et quelle que soit la cinétique de lecture. En effet, l'accumulation de la rhodamine 123 en présence de pioglitazone reste modeste et superposable à celle observée sans traitement. Nous observons toujours une augmentation franche de l'accumulation de Rhodamine 123 en présence de vérapamil, cette augmentation étant accentuée par le temps d'incubation (**Figure 37A**).

La pioglitazone ne semblait donc pas moduler l'activité P-gp basale des KG-1a, nous avons donc souhaité également évaluer l'effet de plusieurs agonistes de PPAR- γ sur une P-gp induite par l'exposition à une chimiothérapie. Après une semaine de pré-exposition à des doses

croissantes de doxorubicine pour sélectionner des cellules résistantes et induire la P-gp, la fluorescence intrinsèque de la doxorubicine a été mesurée en présence ou non de vérapamil. Le phénotype MDR n'a pas pu être modulé quel que soit l'agoniste de PPAR- γ testé (10 μ M), l'accumulation de la doxorubicine étant franchement augmentée dans les KG-1a après ajout de vérapamil (**Figure 37B**). Les résultats étaient identiques sur des lignées ne présentant pas de P-gp à l'état basal (MOLM-14 et OCI-AML3, données non présentées).

A



B

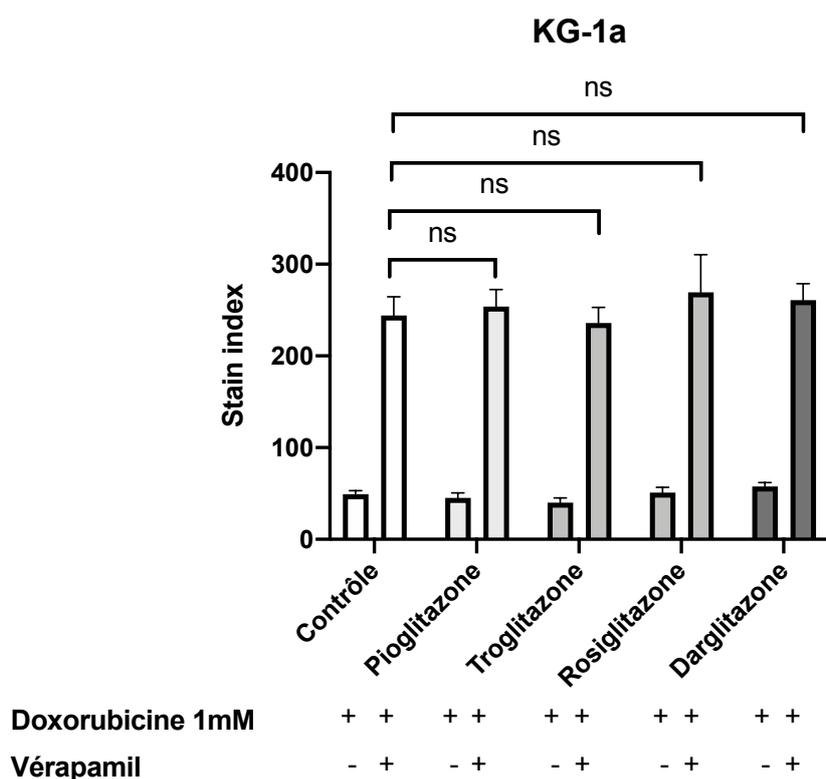


Figure 37 : La modulation par la pioglitazone ne permet pas de neutraliser le phénotype MDR qu'il soit basal ou induit.

A) Mesure de l'accumulation de la Rhodamine 123 dans les KG-1a en présence ou non de vérapamil (moyenne de 3 expériences différentes).

B) Mesure de l'accumulation de la doxorubicine dans les KG-1a après pré-exposition, une semaine à des doses croissantes en présence ou non de vérapamil (moyenne de 3 expériences différentes).

2) Étude de cohorte

a) Description de la cohorte

Tableau 9 : Principales caractéristiques de la cohorte des patients au diagnostic.

| n (%) ou médiane [IQ] | LAM n = 53 |
|----------------------------------|-------------------|
| Age | 67 [64 - 72] |
| Sexe | |
| Femme, n (%) | 27 (51) |
| Homme, n (%) | 26 (49) |
| Leucocytes (x10 ⁹ /L) | 3,7 [2 - 14,7] |
| Blastes médullaires (%) | 48,5 [28,5 - 82] |
| LAM secondaires, n (%) | 16 (20,5) |
| LAM MRC, n (%) | 27 (51) |
| Mutations | |
| <i>ASXL1</i> , n (%) | 9 (17) |
| <i>DNMT3A</i> , n (%) | 15 (28,3) |
| <i>FLT3-ITD</i> , n (%) | 6 (11,3) |
| <i>FLT3-TKD</i> , n (%) | 5 (9,4) |
| <i>IDH1/2</i> , n (%) | 16 (30,2) |
| <i>NPM1</i> , n (%) | 11 (20,8) |
| <i>NRAS</i> , n (%) | 5 (9,4) |
| <i>RUNX1</i> , n (%) | 7 (13,2) |
| <i>SRSF2</i> , n (%) | 5 (9,4) |
| <i>TET2</i> , n (%) | 5 (9,4) |
| <i>TP53</i> , n (%) | 5 (9,4) |
| ELN 2017 | |
| Favorable | 12 (22,6) |
| Intermédiaire | 17 (32,1) |
| Défavorable | 24 (45,3) |
| ELN 2022 | |
| Favorable | 8 (15,1) |
| Intermédiaire | 14 (26,4) |
| Défavorable | 31 (58,5) |

**Toutes les mutations présentant un effectif inférieur à 5 n'ont pas été mentionnées*

b) Dosage des cytokines et facteurs de croissance

Dans l'ensemble des 22 paramètres analysés, 4 n'ont pu être exploités en raison de valeurs en dehors des gammes, que ce soit chez les patients LAM ou le groupe contrôle : l'adiponectine, FGF, IFN- γ et IL-10, ces trois derniers étant indétectables dans la majorité des échantillons.

Tableau 10 : Dosage des différents marqueurs dans les plasmas de patients atteints de LAM en comparaison aux témoins.

| Concentration (pg/mL), moyenne (écart-type) | LAM n = 53 | Contrôles n = 25 | p- value |
|--|-------------------|-------------------------|---------------------|
| Chimiokines et éléments de la matrice extracellulaire | | | |
| CXCL-1 | 19,4 (27,2) | 20,2 (29,4) | 0,441 |
| NGAL | 135362 (340663) | 110250 (44820) | 0,001 |
| MMP-9 | 39675 (93412) | 29698 (23617) | 0,017 |
| SDF-1 | 975,8 (723,9) | 249,6 (221,6) | <0,001 |
| Cytokine anti-inflammatoire | | | |
| IL1-RA | 6047 (13823) | 525,3 (860,6) | 0,006 |
| Cytokines pro-inflammatoires | | | |
| IL-6 | 207,9 (460,3) | 41,4 (107,3) | <0,001 |
| IL-8 | 1363 (2398) | 2,8 (2,1) | <0,001 |
| S100A8/A9 | 12429 (24817) | < 50 | <0,001 |
| TNF- α | 16,3 (31,7) | 10,9 (23,1) | 0,019 |
| Cytokine immunomodulatrice | | | |
| BAFF | 1,24 (2,11) | 1,14 (3,63) | 0,014 |
| IL-7 | 1,9 (1,9) | 3,5 (3,3) | 0,019 |
| Facteurs modulateurs de la fibrose | | | |
| HGF | 1107 (2744) | 104,3 (118,3) | <0,001 |
| Ostéopontine | 47097 (56866) | 17655 (4905) | 0,003 |
| PDGF-BB | 184,4 (248,8) | 318,1 (239,7) | <0,001 |
| TGF- β | 672,4 (351,0) | 1276 (531,6) | <0,001 |
| Facteurs de croissance | | | |
| FLT3-L | 35,8 (82,0) | 17,7 (27,6) | 0,273 |
| SCF | 2,7 (3,4) | 1,8 (2,5) | 0,011 |
| VEGF-A | 1079 (1555) | 255,6 (295,8) | <0,001 |

Dans un premier temps, l'analyse comparative des dosages entre les patients LAM et le groupe contrôle a permis d'identifier 16 analytes présentant une variation significative. Parmi ces derniers, 14 étaient augmentés dans le groupe LAM : BAFF, HGF, IL1-RA, IL-6, IL-8, PDGF-

BB, Ostéopontine, S100A8/A9, SCF, SDF-1, VEGF-A et TNF- α tandis que 4 étaient diminués : IL-7, MMP-9, NGAL, TGF- β (**Tableau 10, Figure 38A**).

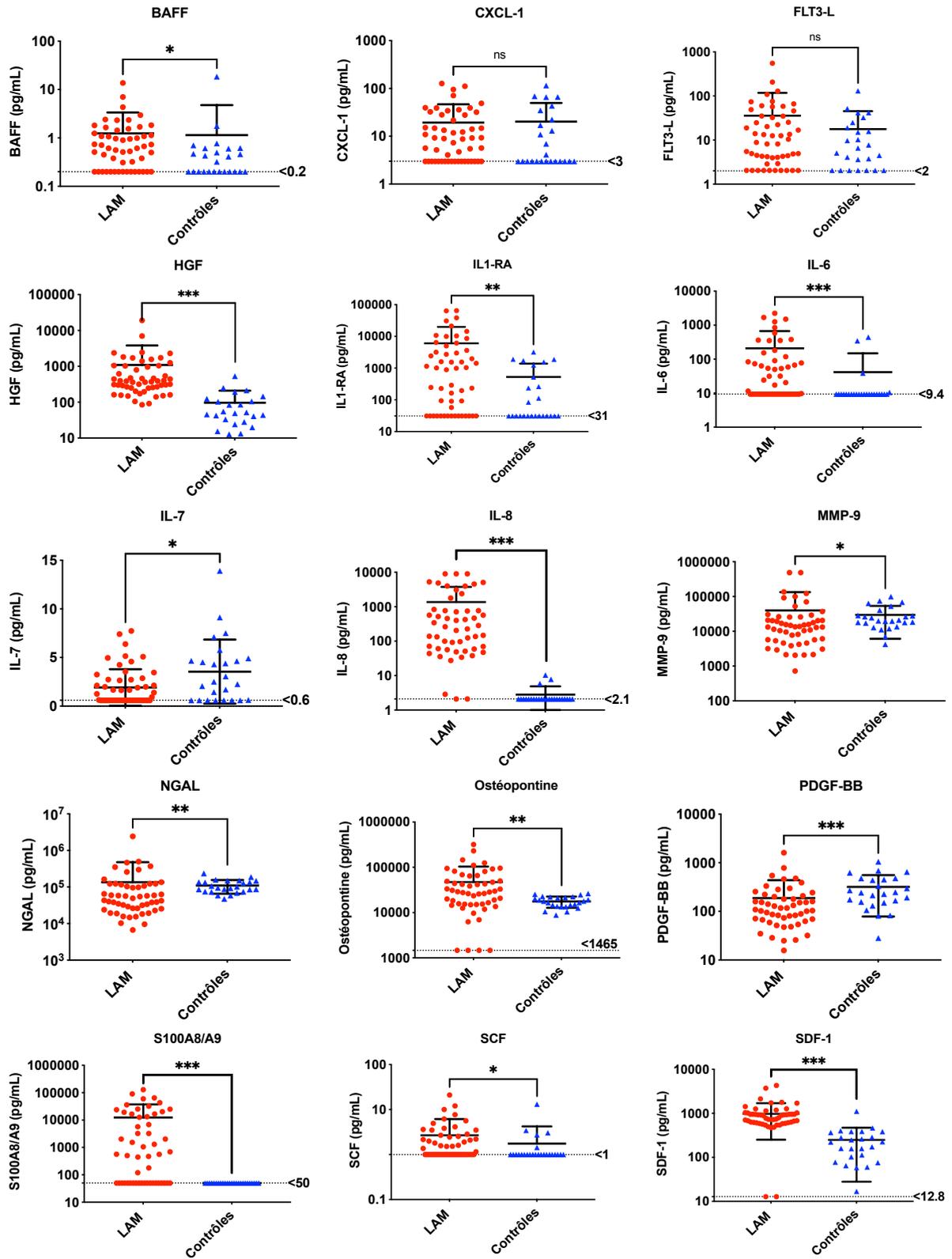
Les patients LAM présentent donc fréquemment un profil d'expression de cytokines et facteurs de croissance dérégulé. Les cytokines et facteurs de croissance significativement augmentés dans le groupe LAM peuvent être classés selon plusieurs « *hallmark of cancer* » fondamentaux pour la progression tumorale (474) : l'IL-6, l'IL-8, S100A8/A9 et le TNF- α présentent principalement une activité pro-inflammatoire, l'ostéopontine, le SCF, SDF-1, et HGF sont associés à la prolifération des cellules leucémiques, le VEGF-A exerce des fonctions pro-angiogéniques tandis que BAFF favorise la résistance à l'apoptose. L'IL-1RA, récepteur antagoniste de l'IL-1 et régulateur négatif de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 est le seul paramètre anti-inflammatoire augmenté dans le groupe LAM.

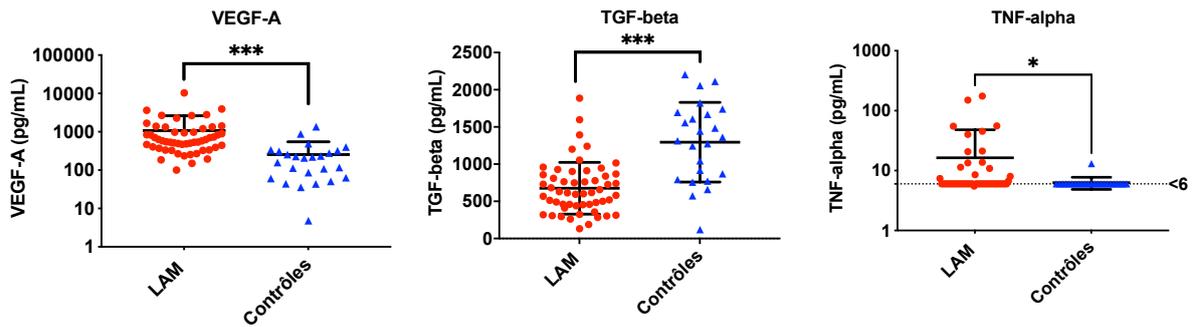
Parmi les paramètres significativement diminués dans les LAM, MMP-9, son partenaire NGAL et le TGF- β sont des paramètres associés à une modification du microenvironnement médullaire. Leur diminution contribue également à la progression tumorale, en particulier celle du TGF- β qui exerce un effet antiprolifératif sur les cellules leucémiques. Enfin la diminution de l'IL-7, cytokine immunomodulatrice peut quant à elle contribuer à l'échappement vis-à-vis de l'immunosurveillance.

En ce qui concerne les modulateurs de la fibrose, seule la concentration de l'ostéopontine, une protéine matricielle exerçant un rôle pro-fibrotique, était augmentée dans le groupe LAM tandis que le PDGF-BB et le TGF- β , acteur majeur de la fibrose étaient diminués. Par ailleurs, le facteur de croissance HGF au potentiel anti-fibrotique était également augmenté dans le groupe LAM.

L'analyse en composantes principales (ACP) appliquée sur l'ensemble des données précédemment analysées a permis de distinguer les patients LAM du groupe contrôle grâce à l'expression différentielle observée sur de nombreux paramètres (**Figure 38B**).

Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les concentrations des divers analytes et les niveaux de blastes ou de leucocytes. Bien que certaines corrélations soient statistiquement significatives (FLT3-L, HGF encore IL-8 avec le taux de blastes et de leucocytes), le coefficient de corrélation ρ était trop faible ($\rho < 0,5$) pour être considéré comme biologiquement pertinent. Nous n'avons pas non plus retrouvé d'association entre les niveaux des différents dosages et la classification pronostique de l'ELN, qu'elle soit de 2017 ou de 2022.

A



B

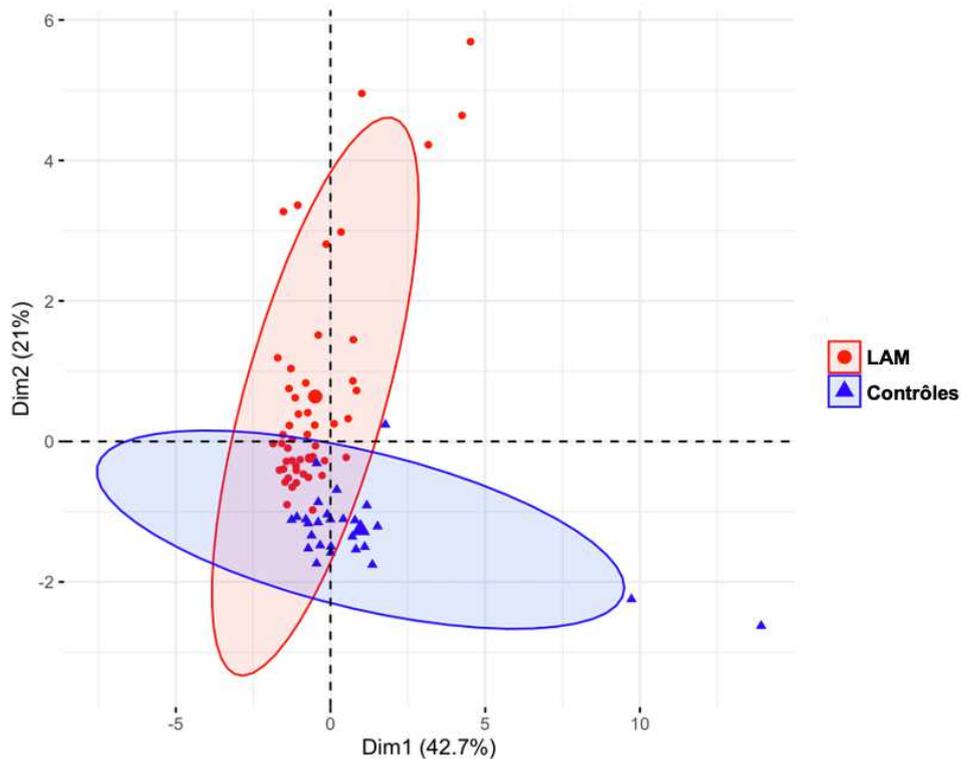


Figure 38 : Le profil d'expression de cytokines et facteurs de croissance est dérégulé dans les LAM.

A) Dosage plasmatique de cytokines et facteurs de croissance par ELISA multiplex dans le groupe LAM comparé au groupe contrôle.

La limite de quantification est indiquée en pointillés pour les paramètres avec des valeurs en deçà de cette dernière.

B) Représentation d'une analyse en composantes principales des dosages de cytokines et facteurs croissance, comparant les profils entre le groupe LAM et le groupe contrôle.

Tableau 11 : Dosage des cytokines pro-inflammatoires dans les plasmas de patients atteints de LAM selon le statut mutationnel *RUNX1* et *TET2*.

| n (%) ou médiane [IQ] Concentration (pg/mL) moyenne (écart-type) | <i>RUNX1</i> muté n = 7 | <i>RUNX1</i> non muté n = 46 | p-value | <i>TET2</i> muté n = 5 | <i>TET2</i> non muté n = 48 | p-value |
|---|----------------------------|------------------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|--------------|
| Age | 65 [64 - 68] | 68 [64 - 72] | 0,368 | 71 [64 - 74] | 67 [64 - 71] | 0,484 |
| Sexe | | | | | | |
| Femme, n (%) | 2 (28,6) | 25 (55,6) | | 4 (80) | 23 (48,9) | |
| Homme, n (%) | 5 (71,4) | 20 (44,4) | | 1 (20) | 24 (51,1) | |
| ELN 2017 | | | | | | |
| Favorable | 0 (0) | 12 (26,7) | | 3 (60) | 9 (19,2) | |
| Intermédiaire | 0 (0) | 16 (35,5) | | 0 (0) | 16 (34) | |
| Défavorable | 7 (100) | 17 (37,8) | | 2 (40) | 22 (46,8) | |
| ELN 2022 | | | | | | |
| Favorable | 0 (0) | 8 (17,8) | | 0 (0) | 8 (17) | |
| Intermédiaire | 0 (0) | 13 (28,9) | | 3 (60) | 10 (21,3) | |
| Défavorable | 7 (100) | 24 (53,3) | | 2 (40) | 29 (61,7) | |
| Cytokines pro-inflammatoires | | | | | | |
| IL-6 | 377,8 (534,4) | 185,9 (453,2) | 0,045 | 528,2 (689,1) | 178,0 (430,4) | 0,146 |
| IL-8 | 1487 (1750) | 1174 (2238) | 0,290 | 1800 (2014) | 1154 (2193) | 0,031 |
| S100A8/A9 | 4977 (7935) | 13854 (26554) | 0,060 | 6247 (8008) | 13341 (26126) | 0,861 |
| TNF- α | 33,6 (53,0) | 13,9 (27,3) | 0,281 | 56,6 (70,0) | 12,3 (22,6) | 0,046 |

Nous avons par la suite comparé les variations des concentrations de chaque analyte avec le statut mutationnel des patients. En analyse univariée, l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-8 étaient associée à la mutation de *RUNX1* ($p = 0,045$ pour l'IL-6) ou de *TET2* ($p = 0,031$ et $0,046$ respectivement pour l'IL-8 et le TNF- α) (**Tableau 11**). Aucune autre association n'a été retrouvée étant donné les effectifs limités.

Nous avons donc souhaité déterminer dans un second temps si les dérégulations décrites dans le groupe LAM permettaient de mieux discriminer le sous-groupe des LAM avec anomalies de type « *secondary-like* » (LAM-MRC+) ou celui des LAM secondaires, tous deux de moins bon pronostic.

Tableau 12 : Dosage des différents marqueurs dans les plasmas de patients atteints de LAM présentant un profil MRC+ *versus* MRC-.

| n (%) ou médiane [IQ] Concentration (pg/mL), moyenne (écart-type) | LAM MRC+ n = 27 | LAM MRC- n = 26 | p-value |
|--|------------------------|------------------------|------------------|
| Âge | 68 [64 - 72] | 67 [64 - 70] | 0,714 |
| Sexe | | | |
| Femme, n (%) | 19 (70,4) | 8 (30,8) | |
| Homme, n (%) | 8 (29,6) | 18 (69,2) | 0,004 |
| ELN 2017 | | | |
| Favorable | 11 (40,7) | 1 (3,9) | |
| Intermédiaire | 12 (44,4) | 5 (19,2) | |
| Défavorable | 4 (14,8) | 20 (76,9) | <0,001 |
| ELN 2022 | | | |
| Favorable | 8 (29,6) | 0 | |
| Intermédiaire | 11 (40,7) | 3 (11,5) | |
| Défavorable | 8 (29,6) | 23 (88,5) | <0,001 |
| Chimiokines et éléments de la matrice extracellulaire | | | |
| CXCL-1 | 14,1 (16,3) | 24,8 (34,6) | 0,513 |
| NGAL | 164124 (462023) | 105496 (132519) | 0,979 |
| MMP-9 | 29698 (23617) | 39826 (95084) | 0,618 |
| SDF-1 | 966,2 (814,9) | 985,9 (631,7) | 0,419 |
| Cytokine anti-inflammatoire | | | |
| IL1-RA | 3383 (8444) | 8813 (17540) | 0,048 |
| Cytokines pro-inflammatoires | | | |
| IL-6 | 169,5 (414,8) | 247,8 (508,4) | 0,064 |
| IL-8 | 1204 (2824) | 1529 (1900) | 0,182 |
| S100A8/A9 | 14582 (31673) | 10194 (15086) | 0,634 |
| TNF- α | 14,9 (33,6) | 17,8 (30,1) | 0,1665 |
| Cytokine immunomodulatrice | | | |
| BAFF | 1,47 (2,51) | 1,01 (1,60) | 0,004 |
| IL-7 | 1,4 (1,2) | 2,5 (2,3) | 0,076 |
| Facteurs modulateurs de la fibrose | | | |
| HGF | 1043 (1405) | 1172 (3687) | 0,253 |
| Ostéopontine | 41295 (46547) | 53121 (66323) | 0,539 |
| PDGF-BB | 149,8 (160,0) | 220,4 (215,4) | 0,101 |
| TGF- β | 754,1 (408,3) | 587,5 (261,0) | 0,101 |
| Facteurs de croissance | | | |
| FLT3-L | 41,7 (110,8) | 29,6 (33,5) | 0,049 |
| SCF | 2,0 (1,7) | 3,4 (4,5) | 0,335 |
| VEGF-A | 896,1 (871,3) | 1270 (2041) | 0,566 |

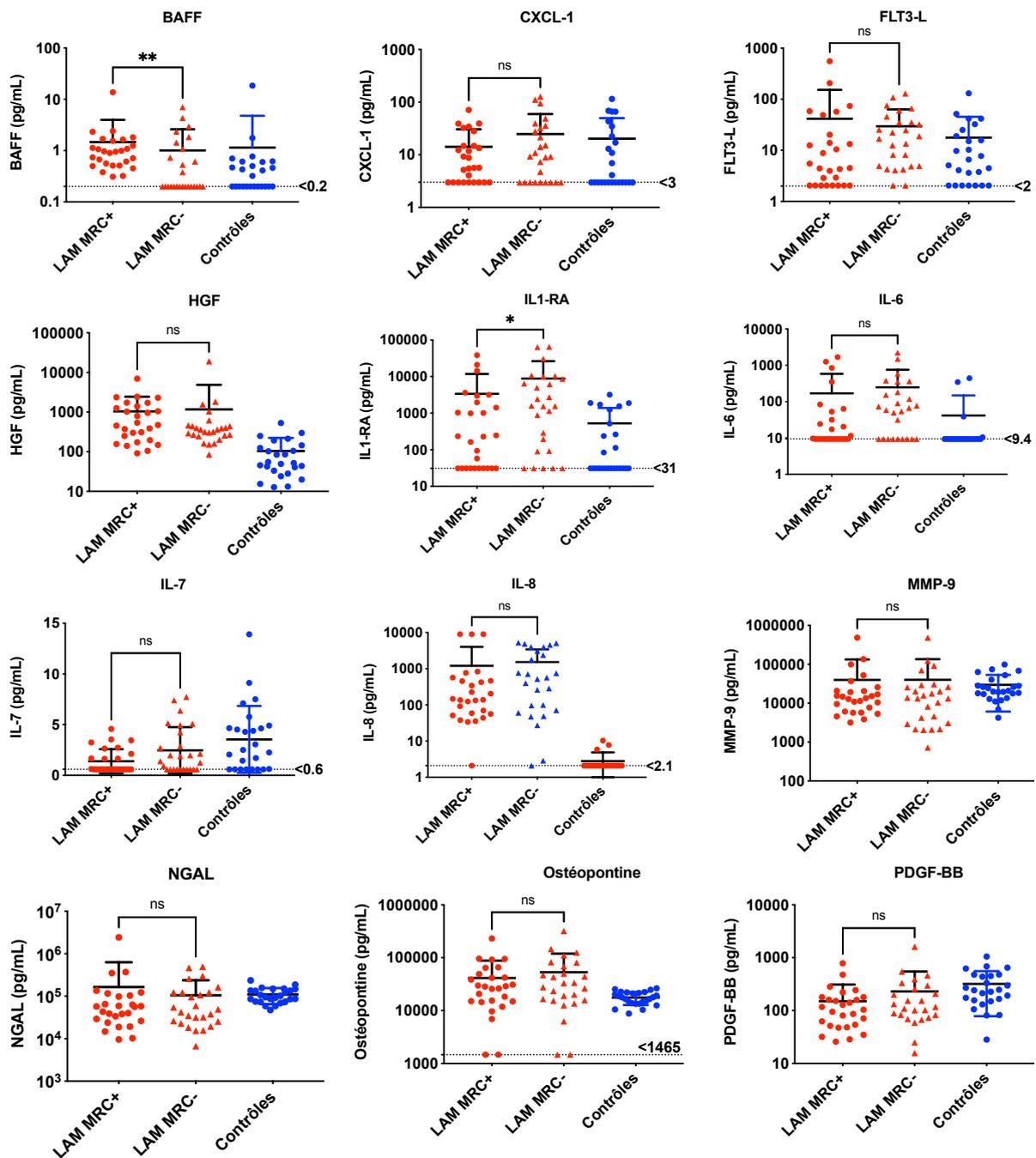
Tableau 13 : Dosage des différents marqueurs dans les plasmas de patients présentant un profil de LAM secondaires *versus* LAM *de novo*.

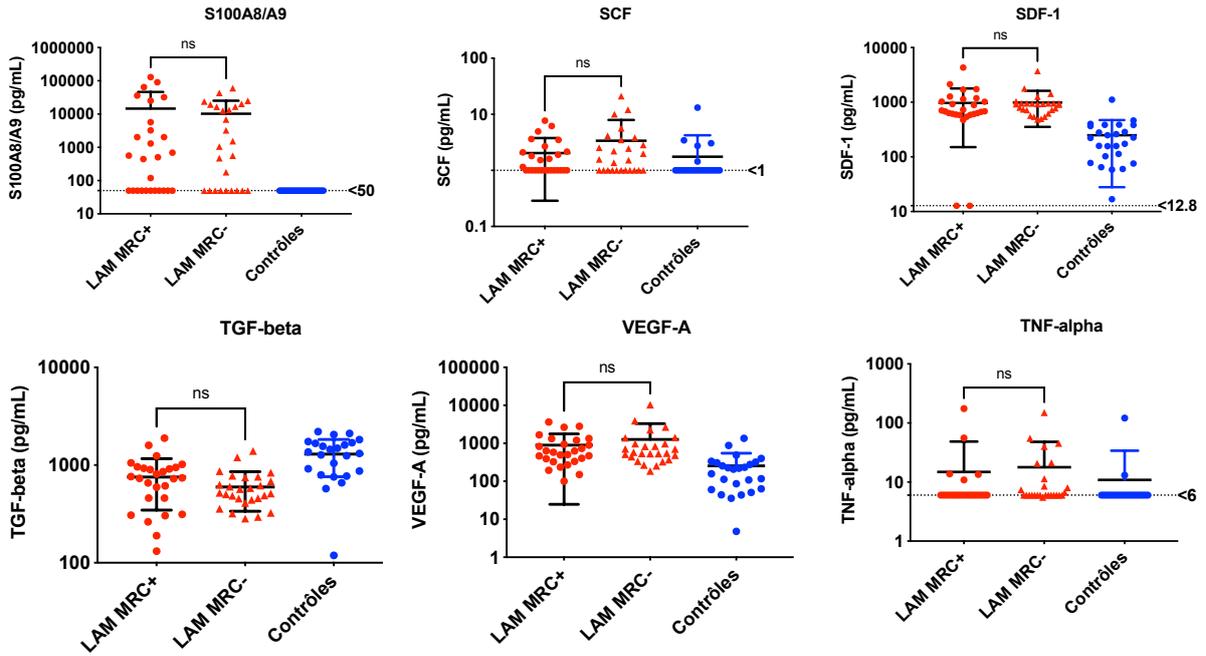
| n (%) ou médiane [IQ] Concentration (pg/mL), moyenne (écart-type) | LAM secondaires n = 16 | LAM <i>de novo</i> n = 37 | p- value |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Âge | 66 [63,5 - 67,5] | 68 [65 - 72] | 0,034 |
| Sexe | | | |
| Femme, n (%) | 5 (31,2) | 22 (59,5) | |
| Homme, n (%) | 11 (68,8) | 15 (40,5) | 0,059 |
| ELN 2017 | | | |
| Favorable | 1 (6,3) | 11 (29,7) | |
| Intermédiaire | 5 (31,2) | 12 (32,4) | |
| Défavorable | 10 (62,5) | 14 (37,8) | 0,121 |
| ELN 2022 | | | |
| Favorable | 0 (0) | 8 (21,6) | |
| Intermédiaire | 3 (18,8) | 11 (29,7) | |
| Défavorable | 13 (81,2) | 18 (48,7) | 0,05 |
| Chimiokines et éléments de la matrice extracellulaire | | | |
| CXCL-1 | 26,0 (33,6) | 16,5 (23,9) | 0,490 |
| NGAL | 121093 (158235) | 141533 (396316) | 0,962 |
| MMP-9 | 121093 (158235) | 141534 (396316) | 0,542 |
| SDF-1 | 1024 (757,4) | 954,9 (718,6) | 0,505 |
| Cytokine anti-inflammatoire | | | |
| IL1-RA | 12618 (21584) | 3205 (7377) | 0,064 |
| Cytokines pro-inflammatoires | | | |
| IL-6 | 355,8 (626,0) | 143,9 (359,0) | 0,044 |
| IL-8 | 1984 (1976) | 1094 (2536) | 0,057 |
| S100A8/A9 | 13953 (17475) | 11770 (27585) | 0,143 |
| TNF- α | 22,1 (36,3) | 13,8 (29,6) | 0,036 |
| Cytokine immunomodulatrice | | | |
| BAFF | 3,0 (0,4) | 3,3 (1,9) | 0,574 |
| IL-7 | 2,7 (2,3) | 1,6 (1,6) | 0,059 |
| Facteurs modulateurs de la fibrose | | | |
| HGF | 507 (514) | 1366 (3246) | 0,214 |
| Ostéopontine | 54321 (79587) | 43973 (44705) | 0,719 |
| PDGF-BB | 224,7 (385,9) | 167,0 (162,3) | 0,882 |
| TGF- β | 549,2 (263,0) | 725,7 (373,4) | 0,053 |
| Facteurs de croissance | | | |
| FLT3-L | 34,5 (34,3) | 36,3 (96,0) | 0,071 |
| SCF | 3,2 (5,0) | 2,5 (2,6) | 0,816 |
| VEGF-A | 1542,6 (2550,3) | 879,4 (804,9) | 0,625 |

Parmi les 18 paramètres étudiés, seuls BAFF et l'IL-1RA étaient significativement augmentés dans le groupe LAM-MRC (**Tableau 12, Figure 39A**). Quant aux LAM secondaires, les paramètres significativement augmentés étaient liés à l'inflammation (IL-6, TNF- α et avec une tendance pour l'IL-8) (**Tableau 13, Figure 39B**).

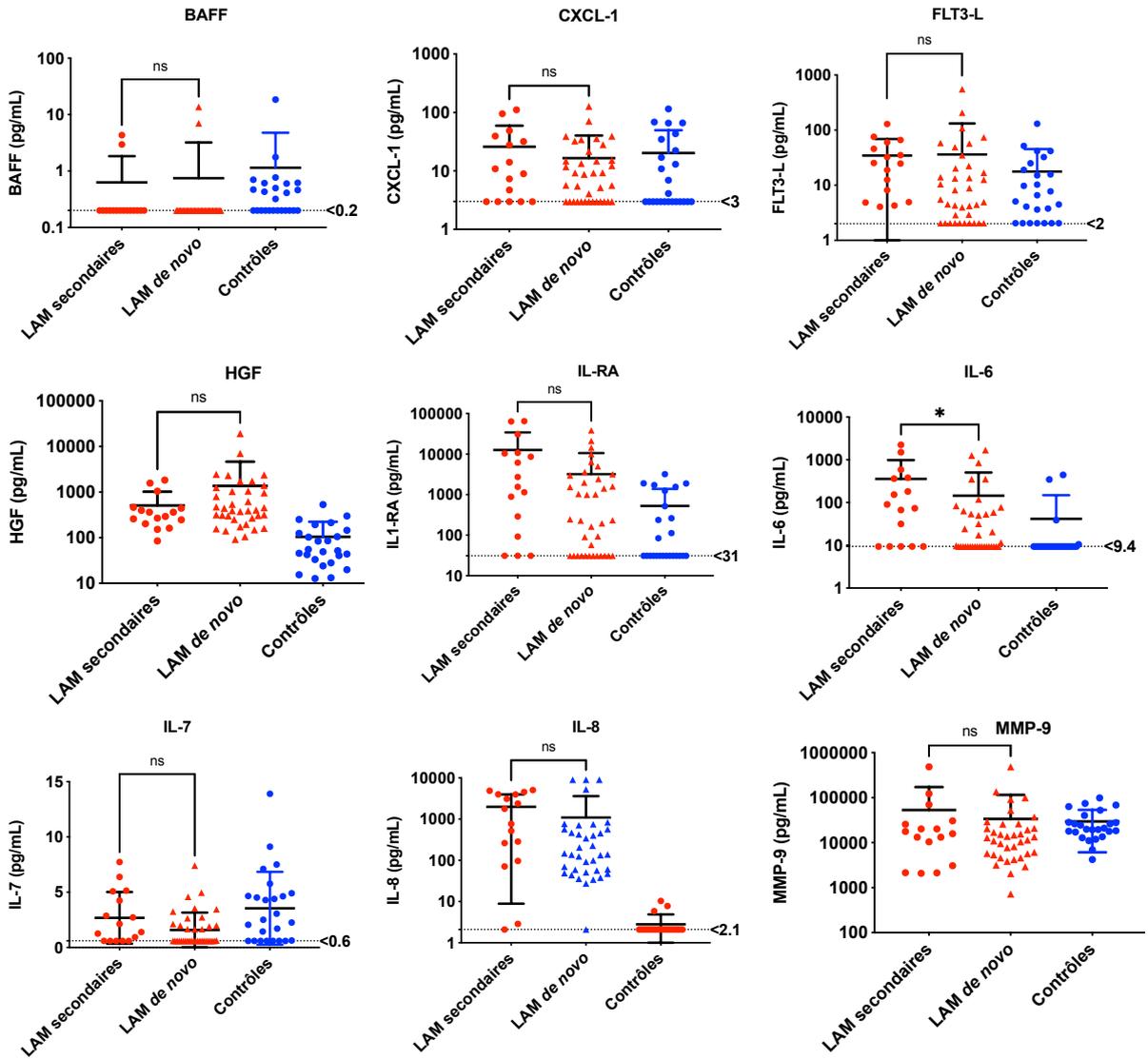
En revanche, et comme attendu étant donné la faible variabilité observée en analyse monoparamétrique, l'ACP n'a pas permis de discriminer les patients LAM-MRC des autres LAM (**Figure 39C**) ni à distinguer les LAM secondaires des LAM *de novo* (**Figure 39D**).

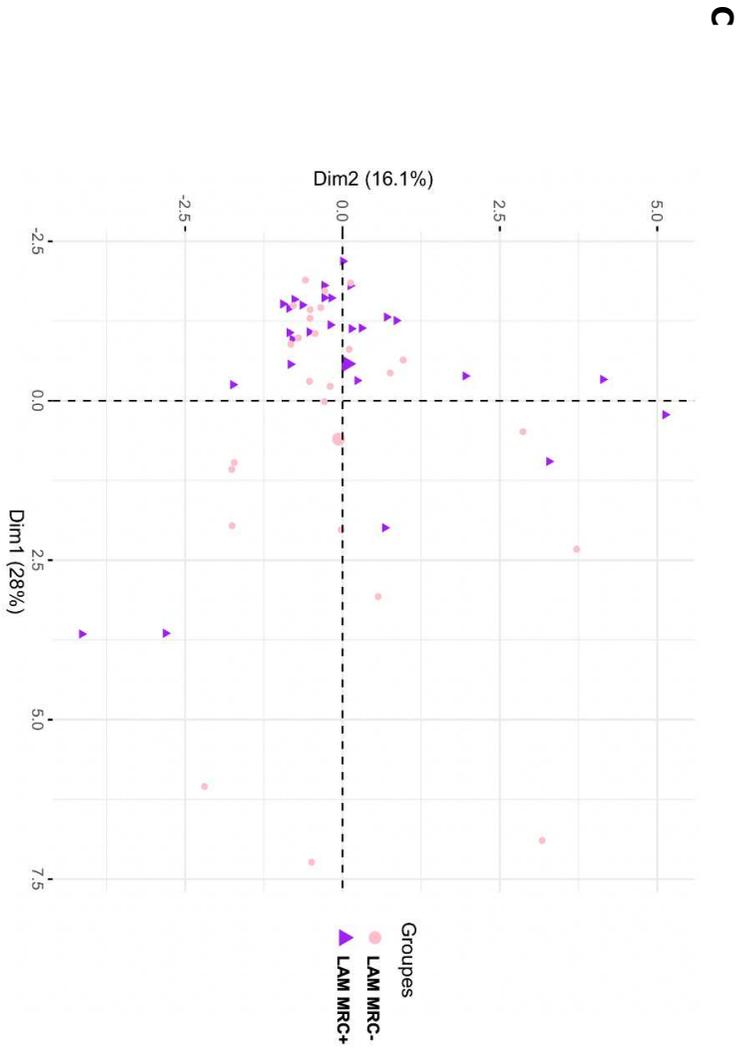
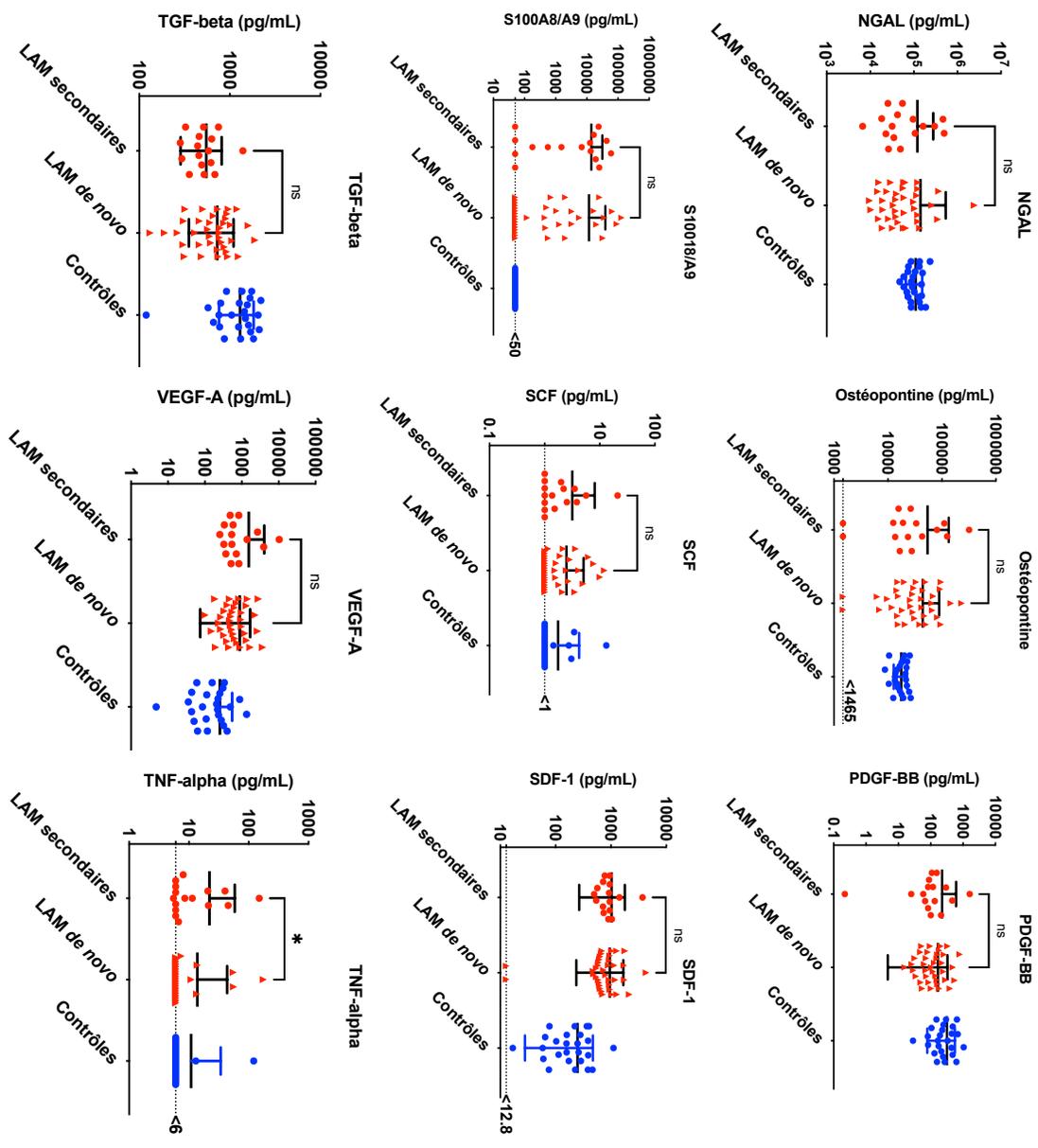
A





B





D

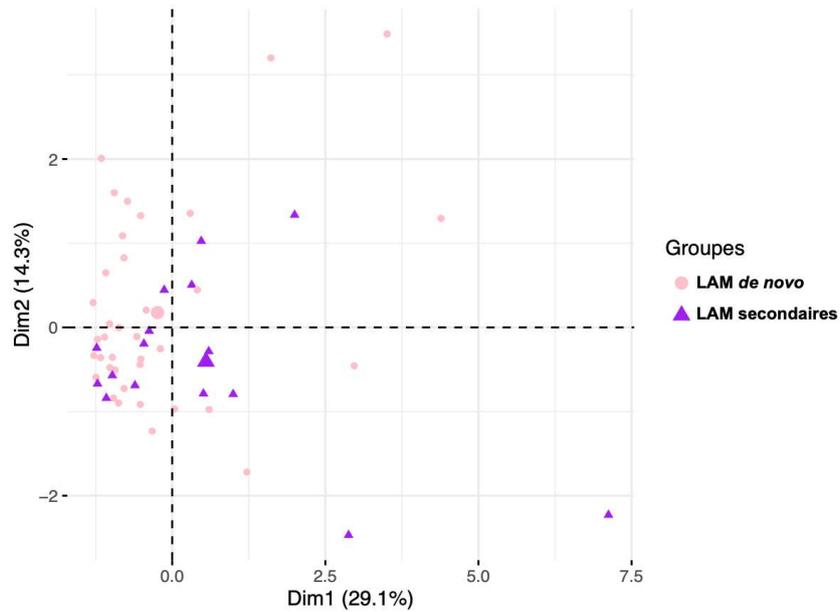


Figure 39 : Le profil d'expression de cytokines et facteurs de croissance ne permet pas d'identifier de profil spécifiquement associé aux LAM-MRC ou aux LAM secondaires.

Dosage plasmatique de cytokines et facteurs de croissance par ELISA multiplex **A**) dans le sous-groupe de LAM-MRC+ comparé aux autres LAM et **B**) dans le sous-groupe de LAM secondaires comparé aux LAM de novo.

La limite de quantification est indiquée en pointillés pour les paramètres avec des valeurs en deçà de cette dernière.

Représentation d'une analyse en composantes principales des dosages de cytokines et facteurs croissance, comparant **C**) les profils entre le sous-groupe de LAM-MRC aux autres LAM et **D**) entre le sous-groupe de LAM secondaires comparé aux LAM de novo.

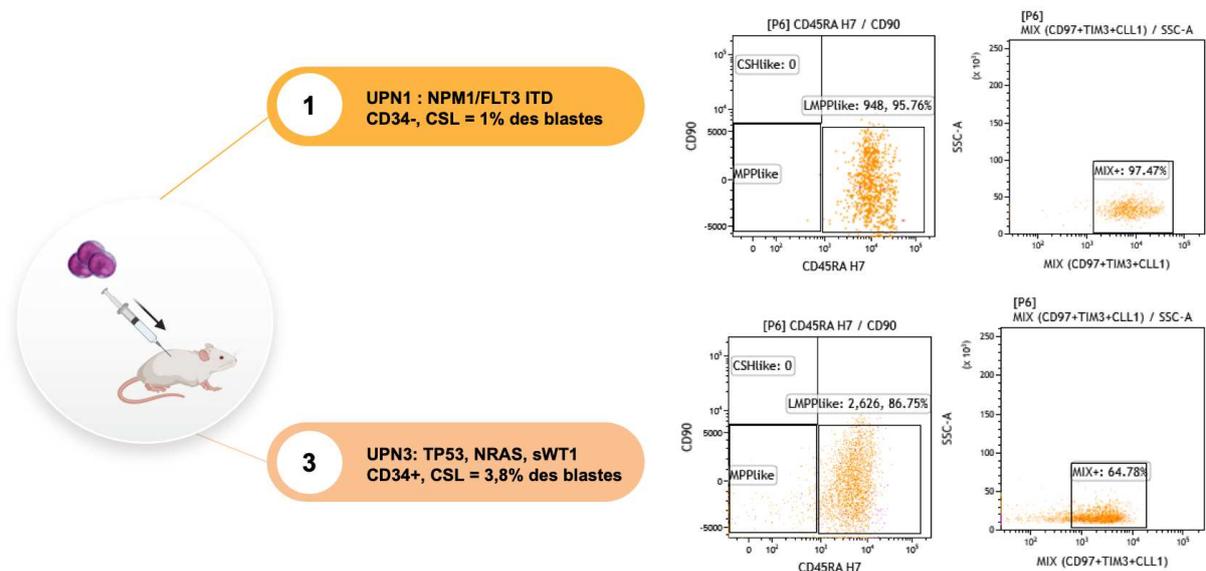
3) Évaluation de l'efficacité de l'association pioglitazone/giltéritinib dans un modèle murin de xénogreffe de LAM humaine.

a) Étude pilote de la prise de greffe

La prise de greffe ne survenant que dans 60% des cas, une première étape pilote a été réalisée afin de déterminer le potentiel de greffe ainsi que la variabilité de la cinétique de la prise de greffe pour chaque échantillon primaire (4 souris NSG par échantillon primaire). Parmi les six échantillons primaires évalués, deux présentaient une greffe homogène à partir de la 16^{ème} semaine et ont été sélectionnés pour l'étude principale. Le contingent de CSL évalué par cytométrie en flux dans ces deux échantillons était évalué respectivement à 1 et 3,8% des blastes.

Tableau 14 : Principales caractéristiques des cellules primaires de LAM.

| Patient | Âge (ans) | Sexe | FAB | Caryotype | Biologie moléculaire |
|---------|-----------|------|------|---------------------------|---|
| UPN1 | 49 | F | LAM5 | Normal | <i>NPM1, FLT3-ITD</i> |
| UPN2 | 81 | F | LAM1 | Normal | <i>NPM1, FLT3-ITD</i> |
| UPN3 | 61 | F | LAM2 | Complexe | <i>KRAS, NRAS et TP53</i> Surexpression <i>WT1</i> |
| UPN4 | 91 | M | LAM0 | Normal | <i>NPM1, FLT3-ITD</i> |
| UPN5 | 73 | M | LAM2 | Normal | <i>NPM1, FLT3-ITD</i> |
| UPN6 | 26 | M | LAM1 | Triplication q31, q32 ch2 | <i>NPM1, KIT, RAS et U2AF1</i> |



b) Étude principale

Dans un second temps, la deuxième partie du projet vise à évaluer l'efficacité de la pioglitazone associée au giltéritinib. Les xénogreffes ont été réalisées dans des souris NSG à partir des cellules leucémiques issues des deux patients sélectionnés pendant l'étude pilote, ce qui a permis de réduire la réduction du nombre de souris nécessaires à 5 par groupe de traitement. Bien que le choix des deux patients sélectionnés ait été motivé par une prise de greffe homogène pendant l'étude pilote, ces deux derniers ne présentaient pas un profil similaire, notamment sur le plan mutationnel, l'un présentant une mutation *FLT3-ITD* et l'autre non. L'étude comparative d'un patient porteur d'une mutation de *FLT3* et d'un autre sans cette mutation était essentielle pour évaluer pleinement l'efficacité de l'association avec le giltéritinib, étant donné sa double spécificité anti-FLT3/AXL.

Comme précisé dans les matériels et méthodes, nous avons évalué la prise de greffe par détermination du chimérisme CD45.1/CD45 par cytométrie en flux réalisé un échantillon sanguin à partir de la 6^{ème} semaine post-injection. La pioglitazone et/ou le giltéritinib ont été administrés *per os*, dès que la détection d'une prise de greffe dépassait 0,5% des leucocytes totaux sanguins et pendant un maximum de 4 semaines.

Cette phase de l'étude est actuellement en cours, et nous espérons être en mesure de présenter des résultats préliminaires lors de la soutenance orale.

DISCUSSION GENERALE

Malgré les avancées réalisées ces dernières décennies dans l'identification de nouvelles cibles pour thérapeutiques, le pronostic des LAM reste aujourd'hui médiocre en raison des rechutes résultant de l'inefficacité des thérapies disponibles sur les CSL. Ce travail se concentre sur l'exploration d'une nouvelle approche thérapeutique ciblant d'une part ces CSL mais également peu toxique, nécessaire afin de traiter efficacement les patients plus âgés et les plus fragiles.

Dans ce contexte, la modulation pharmacologique de la voie de PPAR- γ nous a semblé pertinente dans les LAM, particulièrement à la lumière des résultats obtenus dans la LMC, où la pioglitazone a démontré sa capacité à entraîner l'érosion des CSL en régulant négativement STAT5 (370). Bien qu'exprimé de manière ubiquitaire, le niveau d'expression PPAR- γ est variable selon des patients atteints de LAM, sans qu'il n'y ait pour autant de corrélation entre le niveau d'expression avec le sous-type morphologique ou le pronostic des patients (475). Par ailleurs, nous avons vu que les propriétés pléiotropiques des ligands de PPAR- γ offraient un potentiel thérapeutique intéressant en ciblant à la fois les cellules leucémiques par ses propriétés anti-oncogéniques (248) ou modulateur de pompe d'efflux (470), mais également d'autres composantes dérégulées dans les LAM comme l'inflammation qui participe à la progression tumorale en altérant l'hématopoïèse normale (360) ou encore en restaurant la niche adipocytaire altérée par les cellules leucémiques (41). Outre son potentiel thérapeutique, la pioglitazone présente un profil de toxicité bien connu après des années d'utilisation en clinique, facilitant ainsi la possibilité d'un repositionnement thérapeutique.

Le premier objectif de ce travail était de valider et de caractériser l'action anti-leucémique de la pioglitazone comme cible thérapeutique. Nous avons donc confirmé le potentiel anti-leucémique *in vitro* de l'activation de PPAR- γ par la pioglitazone en monothérapie utilisée à dose thérapeutique (10 μ M), qui exerce un effet antiprolifératif, que ce soit sur des lignées humaines de LAM ou des cellules primaires de patients et réduit également leur potentiel clonogénique sur culture semi-solide. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet pro-apoptotique franc, l'apoptose étant un des mécanismes d'action décrit dans la littérature. Ces observations ont été rapportées dans d'autres études avec des concentrations d'agoniste au-delà des doses utilisées en thérapeutique (80 μ M), entraînant probablement des effets non spécifiques « *off-target* » (350, 351). Plus récemment, Esmaili et al. rapportèrent une augmentation d'expression de *PPARG* sur une cohorte de 30 patients atteints de LAM au

diagnostic comparé à 10 témoins sains, justifiant le potentiel des agonistes de PPAR- γ . Le niveau d'expression de *PPARG* sur cette cohorte était corrélé, bien que non significativement avec la diminution d'expression de *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*), une phosphatase connue pour ses propriétés de régulation négative de la voie de signalisation PI3K/ATK impliquée dans la prolifération cellulaire et la survie. Outre cette corrélation non significative, le lien fonctionnel entre PPAR- γ et PTEN n'a pas été établi dans cet article, d'autant plus que les auteurs rapportent des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques de la pioglitazone sur la lignée U937 (dérivée d'une LAM5b), suggérant au contraire que ces effets seraient indépendants de PTEN (476). Ces données rejoignent celles de Tsao et al. qui montrèrent que ces cellules U937 induites pour surexprimer PPAR- γ , étaient plus sensibles aux effets pro-apoptotiques du CDDO (475). Par ailleurs, une nouvelle étude de l'équipe d'Esmaili publiée en 2023 qui s'intéressait cette fois-ci au potentiel de la pioglitazone dans les LAP, confirmait l'absence de corrélation *in vitro* entre le statut mutationnel de PTEN dans 7 lignées de LAM et de LAL avec la réponse au traitement (477). À l'image des autres études ayant exploré le potentiel *in vitro* des agonistes de PPAR- γ dans les LAM, les doses de pioglitazone utilisées (100 à 250 μ M) étaient bien au-delà des doses envisageables en thérapeutique et de la spécificité de PPAR- γ . Peu de données relatives à l'action *in vitro* des agonistes de PPAR- γ sur des cultures primaires sont disponibles dans la littérature. Boyd et al. n'avaient pas pu confirmer d'effet antiprolifératif du GW1929, un agoniste de PPAR- γ sur plusieurs échantillons de cellules primaires (41). Ces données restaient toutefois évaluées comme la plupart des études seulement 24h de traitement, ce qui était insuffisant étant donné le mécanisme d'action associé à STAT5.

En effet, un mécanisme d'action potentiel de l'activation de la voie de PPAR- γ implique les facteurs de transcription STAT5A et STAT5B, fréquemment surexprimés dans les LAM (70-80%) (372, 373). L'activation de PPAR- γ par la pioglitazone induit la diminution transcriptionnelle de STAT5A/B, qui contribue par ailleurs à la maintenance des CSL (370). Des résultats antérieurs de l'équipe ont pu valider STAT5 comme cible thérapeutique dans les LAM et confirmer la dépendance des CSL *in vitro* à leur expression grâce à une approche d'interférence ARN (**Annexe 1, Figure 1**). Nous avons néanmoins pu observer que la cinétique de réponse des différentes lignées de LAM était variable, les KG-1a répondant plus lentement que les MOLM-14 ou les OCI-AML3, ce qui suggérait des mécanismes d'action STAT5 indépendants. Nous avons réalisé une analyse transcriptomique des lignées traitées par pioglitazone afin de mieux comprendre l'impact des modulations transcriptionnelles en aval de l'activation de la voie PPAR- γ . Nous avons pu observer que le niveau endogène de STAT5

présent dans les cellules était variable d'une lignée à l'autre. En effet les KG-1a présentaient le niveau de STAT5 le plus élevé, pouvant en partie expliquer la cinétique de réponse plus lente étant donné la longue demi-vie de STAT5 (96h) (370) (**Annexe 1, Figure 2**). En parallèle, Ghadiany et al. publiaient un essai clinique intégrant la pioglitazone à la dose de 45 mg/j à la chimiothérapie d'induction standard (cytarabine + daunorubicine) dans les LAM. Bien que non statistiquement significatif, le groupe pioglitazone affichait un taux de rémission complète supérieur au groupe contrôle (50% contre 30%), ce qui pourrait s'expliquer d'une part par les effectifs réduits de cette étude (20 par groupe), mais également par un potentiel mécanisme de résistance *in vivo*. Cette observation couplée à l'absence d'efficacité dans des modèles de xénotransgreffe de cellules primaires dans des souris NSG traitées par un agoniste de PPAR- γ (**Annexe 1, Figure 3**) nous a amenés à explorer cette inefficacité contrastant avec les effets observés *in vitro*, en particulier par le biais d'un mécanisme médié par le microenvironnement médullaire. En effet, la concentration plasmatique des drogues correspondait aux concentrations attendues sur la base des expériences *in vitro* et la franche augmentation des adipocytes sur les coupes d'immunohistochimie des fémurs des souris traitées par un agoniste de PPAR- γ confirmaient la bonne imprégnation des animaux (**Annexe 1, Figure 4**). Cette dernière observation sur les adipocytes médullaires était intéressante étant donné l'importance de la niche adipocytaire sur l'hématopoïèse normale. En effet, dans le contexte des LAM, Boyd et al. ont montré que les cellules leucémiques perturbaient la maturation des lignées myéloïdes et érythroïdes normales en altérant la niche adipocytaire, cette altération étant restaurée en présence d'un agoniste de PPAR- γ (41).

Ainsi, l'analyse de l'expression différentielle des gènes de l'analyse transcriptomique nous a permis d'identifier *AXL* parmi les gènes les plus surexprimés en condition traitée, ce qui a naturellement attiré notre attention, étant donné son implication dans les mécanismes de résistance en oncologie mais surtout dans le contexte des LAM (46, 398, 462). De plus, l'expression d'*AXL* est enrichie dans le compartiment des CSL CD34+CD38- des patients LAM comparé aux CSH issues de donneurs sains et est associée à un pronostic péjoratif indépendamment de l'âge, du traitement ou du statut mutationnel des patients, suggérant un rôle d'*AXL* dans la maintenance et l'expansion des cellules souches (398).

Un autre volet de ce travail a donc été consacré à l'exploration du rôle protecteur du stroma médullaire vis-à-vis des cellules leucémiques ce qui nous a permis de valider la pertinence de l'axe Gas6/*AXL* comme cible dans les mécanismes de résistance à la pioglitazone *in vivo*. Nous avons donc pu confirmer au moyen d'expériences de co-culture sur Transwell® sur cellules stromales MS-5, le rôle protecteur du stroma vis-à-vis des cellules leucémiques traitées par la

pioglitazone. Ce mécanisme de protection repose sur un dialogue paracrine et bidirectionnel médié par des facteurs solubles entre les deux types cellulaires. D'une part, la pioglitazone amplifie l'expression d'AXL sur les cellules leucémiques tandis que parallèlement, ces dernières par le biais de la sécrétion de GM-CSF et d'IL-10 sont capables d'éduquer les cellules stromales à sécréter davantage de Gas6 pour leur propre survie (398), et ainsi d'activer les voies de signalisation en aval d'AXL contrecarrant l'effet antiprolifératif de la pioglitazone.

Afin de contourner l'imprécision du décompte des cellules leucémiques dans un système de co-culture, en particulier en raison de leur nichage au sein des cellules stromales, nous avons opté pour un système de co-culture avec un Transwell® de 0,4 µm. Le choix de cellules stromales d'origine murine (MS-5) dans ce système de co-culture a été motivé par leur capacité d'inhibition de contact que ne possèdent pas les cellules stromales HS-5 d'origine humaine. En effet, le délai d'action lent de la pioglitazone nous contraint à mener des expériences sur au moins 7 à 9 jours avec une sous couche stromale plantée le premier jour à 60 à 70% de confluence, ce qui était peu conciliable avec notre protocole expérimental en l'absence d'inhibition de contact. L'irradiation des cellules HS-5 aurait pu être envisagée afin de limiter leur croissance, cependant cette approche aurait pu altérer leur sécrétome dont la production de Gas6, qui est essentiel au soutien hématopoïétique. Nos essais de co-culture en Transwell avec les cellules HS-5 furent par ailleurs infructueux, celles-ci présentant une forte mortalité cellulaire dans ce système de co-culture. Bien que d'autres comme Hou et al. aient utilisé un système similaire avec succès, leur protocole expérimental ne s'étendait que sur 24h (478). Par ailleurs, la protéine Gas6 humaine présentant 81% d'homologie avec son homologue murin et le domaine SHGB de liaison au récepteur AXL étant conservé, cela permet l'activation d'AXL dans ce système hétérologue (395, 479).

Le traitement par la pioglitazone n'augmente en revanche pas la sécrétion de Gas6 murin par les cellules stromales MS-5 et Gas6 était même diminué dans les surnageants de culture, qu'ils soient issus d'une co-culture ou non. Nous avons également réalisé des dosages séquentiels de Gas6 murin dans les surnageants de co-culture qui montraient une diminution de la concentration en Gas6 murin à partir du 5^{ème} jour d'exposition à la pioglitazone, jour à partir duquel les cellules stromales commencent à se différencier en adipocytes. L'analyse de l'expression différentielle des gènes dans les cellules souches mésenchymateuses différenciées en adipocytes à partir de données transcriptomiques publiées (480) a mis en évidence une répression transcriptionnelle de *GAS6*, suggérant que la diminution de sécrétion de Gas6 est liée à l'état de différenciation adipocytaire. Néanmoins, étant donné la haute affinité de Gas6 pour AXL (de l'ordre du nM), les niveaux de Gas6 restaient suffisamment élevés pour activer

AXL et ses voies de signalisation en aval. Ces données renforcent le rôle de Gas6 dans la protection stromale par voie paracrine des cellules leucémiques, rôle qui avait également été rapporté par Dumas et al. sur des modèles *in vitro* de lignées de LAM *FLT3-ITD* mutées (46). En effet, l'expression de *GAS6* sur plusieurs lignées de cellules stromales est corrélée avec leur capacité à soutenir l'hématopoïèse *in vitro*. La surexpression par transfection de *GAS6* permettant même à une lignée normalement incapable de soutenir l'hématopoïèse de soutenir une culture à long terme (448).

Bien que les cellules stromales représentent la principale source de Gas6 médullaire, le rôle pronostique défavorable de Gas6 a été également rapporté dans des cellules issues de patients atteints de LAM, suggérant une boucle d'activation autocrine d'AXL (458). La concentration de la protéine Gas6 humaine dans les surnageants de culture de lignées de LAM traitées par pioglitazone était relativement faible comparée aux niveaux de Gas6 murin sécrétés par les cellules stromales MS-5, suggérant ainsi une contribution modeste de la part autocrine dans la régulation de la boucle Gas6/AXL. Cette contribution modeste de la régulation autocrine est également confirmée par des tests de prolifération réalisés sur les lignées de LAM en présence ou non d'un récepteur leurre anti-ligand AXL-Fc, où aucune différence n'avait été observée (données non présentées).

Toutefois, il est fort probable que la protection stromale *in vivo* ne soit pas uniquement médiée par une composante soluble, mais passe également par un mécanisme dépendant d'un contact direct entre les cellules leucémiques et le microenvironnement. Plusieurs travaux soulignent le rôle crucial du microenvironnement dans la chimiorésistance, avec notamment la molécule d'adhésion CD44 exprimé à la surface des cellules leucémiques (159), l'axe CXCL-12/CXCR4 impliqué dans la reprogrammation métabolique (481) ou encore le transfert de mitochondries (40). Dans notre contexte, le décompte des cellules leucémiques en l'absence de Transwell® aurait été difficile techniquement et imprécis en raison leur nichage au sein des cellules stromales. Néanmoins, nous avons pu reproduire l'effet de protection stromale vis-à-vis de la pioglitazone sur les cellules leucémiques cultivées seules, grâce à l'adjonction de Gas6 humain exogène à dose physiologique mais également de milieu conditionné sur cellules stromales MS-5, suggérant une grande dépendance du mécanisme de protection à cette fraction soluble. De manière plus surprenante, malgré l'absence de co-culture avec des cellules stromales, nous avons pu observer une augmentation de la phosphorylation d'AXL sur les cellules leucémiques en condition pioglitazone alors que nos observations précédentes suggéraient une contribution autocrine plutôt modeste dans la régulation de la boucle Gas6/AXL. Une hypothèse pourrait être que l'activation d'AXL, qui rappelons-le est surexprimé sur les cellules leucémiques en

présence de pioglitazone, soit induite par la protéine Gas6 bovine issue de la supplémentation en SVF dans tous nos milieux de culture. Cette dernière présente 80% d'homologie (vérifiée à l'aide de l'outil BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) avec la protéine humaine et est indétectable avec nos ELISA spécifiques à chaque espèce. Cette phosphorylation d'AXL reste toutefois partiellement dissociée de l'effet antiprolifératif exercé par la pioglitazone, suggérant que la seule étude de la signalisation d'AXL comme « *readout* » est insuffisante. En effet, le traitement par pioglitazone induit la surexpression d'AXL, tant au niveau transcriptomique que protéique, ce qui pourrait justifier en partie l'augmentation de sa phosphorylation. Néanmoins, les effets fonctionnels observés sur la prolifération des cellules leucémiques résultent d'un ensemble de voies de signalisation en aval comme la voie PI3K/AKT ou la voie des MAP kinases, qui nécessiteraient également d'être explorées.

Cet effet de protection stromale des cellules leucémiques vis-à-vis de la pioglitazone est quant à lui aboli sur cellules stromales MS-5 invalidées pour PPAR- γ , dont l'une des explications est la modification importante de leur sécrétome, dont la sécrétion de Gas6. En effet, la concentration de Gas6 murin dans les surnageants de culture était très inférieure à celle observée avec les MS-5 sauvages et probablement insuffisante donc pour induire une sur-activation de l'axe Gas6/AXL. Une démonstration plus élégante aurait été de réaliser un modèle de co-culture sur cellules stromales MS-5 invalidées pour *GAS6*, modèle que nous avons tenté de réaliser par technologie CRISPR/Cas9. Ces dernières ne sécrétaient effectivement pas de Gas6 mais leur cinétique de croissance extrêmement ralentie les rendaient très difficiles à entretenir en particulier une fois trypsinées, étape pourtant indispensable à chaque expérience. Les données de la littérature rapportent bien des expériences avec des MS-5 invalidées par ARN interférent mais sur des durées d'expérimentations plus réduites de 24 à 48h (46). Une autre alternative serait soit d'utiliser un récepteur leurre anti-ligand de manière à dépléter les ligands d'AXL par compétition, soit d'utiliser un anticorps neutralisant anti-Gas6. Bien que Gas6 soit le seul ligand capable d'activer AXL (388), ce récepteur leurre pourrait également dépléter autres ligands des autres récepteurs TAM (TYRO-3, MER) dont nous n'avons pas exploré le rôle, bien que leur implication reste moins rapportée au regard d'AXL dans les LAM. Par ailleurs, l'expression d'AXL est variable selon les lignées de LAM (**Annexe 2, Figure 1**). Dans ce contexte, l'utilisation d'une lignée invalidée pour AXL ou ne l'exprimant *a priori* pas, à l'image de la lignée Kasumi-1 (452) nous aurait offert un contrôle plus robuste pour évaluer le rôle d'AXL dans la perte d'activité de la pioglitazone. Dans cet objectif, nous avons privilégié une approche par inhibition pharmacologique plus aisée à mettre en œuvre et offrant des perspectives d'association pour les modèles pré-cliniques. Nous avons pu montrer *in vitro*,

l'efficacité de l'association de la pioglitazone avec un inhibiteur d'AXL, le bemcentinib à faible dose (50 nM), qui a permis de restaurer d'une part l'activité antiproliférative de la pioglitazone sur les cellules leucémiques en condition de co-culture mais également de rétablir la phosphorylation d'AXL à son état basal. Le choix de cette dose infra-thérapeutique, 10 fois inférieure à la concentration plasmatique observée chez les patients traités, nous a permis de cibler spécifiquement AXL (IC50 = 14 nM) tout en nous affranchissant des effets « *off-target* » des ITK alors qu'aux doses thérapeutiques, d'autres récepteurs auraient été ciblés, tels que FLT3 ou encore JAK2.

Ces résultats restent bien sûr à évaluer sur des modèles *in vivo* de xéno greffe de cellules primaires dans des souris NSG. Dans cette optique, le bemcentinib n'a pas pu être obtenu pour la formulation des croquettes. Nous avons contacté la firme Bergenbio, mais celle-ci ayant décidé d'interrompre le développement dans les hémopathies malignes pour se concentrer sur les tumeurs solides, nous n'avons pas pu obtenir le produit. D'autres inhibiteurs étant disponibles en clinique, nous nous sommes orientés vers le giltéritinib. Bien que les résultats *in vitro* aient été obtenus avec le bemcentinib, le giltéritinib est un inhibiteur d'AXL tout aussi puissant (IC50 0,29 à 1 nM selon les études (432)) et a l'avantage d'être une molécule approuvée, plus facilement accessible, offrant une perspective d'essais cliniques rapides en cas de résultats positifs des modèles pré-cliniques. Compte-tenu de sa double spécificité FLT3/AXL, nous évaluerons l'association pioglitazone + giltéritinib sur des modèles de xéno greffe issus de deux patients, l'un présentant une mutation de *FLT3* et l'autre non. Ces modèles murins permettront de confirmer le potentiel thérapeutique de la combinaison pioglitazone + giltéritinib, en particulier sur l'éradication des CSL en greffe secondaire.

Les objectifs de ce travail étaient également d'explorer les autres versants de l'activation de la voie de PPAR- γ qui pourraient bénéficier aux LAM, en particulier la modulation du phénotype MDR et de l'inflammation. L'évaluation de la modulation du phénotype MDR *in vitro* a été réalisée au moyen de tests fonctionnels à la Rhodamine 123, molécule fluorescente lipophile qui rentre passivement dans les cellules mais qui est également un substrat de la P-gp. Ainsi, sa fluorescence est à la fois le reflet de l'accumulation passive de la molécule mais également de l'activité des pompes d'efflux. L'adjonction d'un inhibiteur de P-gp (vérapamil) nous a permis d'évaluer la contribution relative de l'accumulation et de l'efflux spécifiquement médié par la P-gp, pompe dont l'activité était modulée par la balaglitazone, un agoniste de PPAR- γ selon l'étude de Yousefi et al. (470). En effet ces derniers rapportent une régulation négative de la P-gp après 48h d'exposition à la balaglitazone, suggérant un mécanisme transcriptionnel, mais observent un effet significatif sur l'accumulation de la Rhodamine 123 dès 2h d'incubation, ce

qui semble plutôt suggérer une interaction directe avec la pompe à l'image du vérapamil. Afin d'explorer ces deux potentiels mécanismes d'action, nous avons réalisé diverses cinétiques d'incubation avec la pioglitazone (5 minutes à 72h) sur la lignée KG-1a qui présente une activité P-gp à l'état basal et nous n'avons pas pu reproduire les résultats observés dans la littérature. L'exposition à la pioglitazone ainsi qu'à d'autres agonistes de PPAR- γ n'a pas non plus permis d'inhiber l'expression d'une P-gp inductible sur nos lignées humaines de LAM. La rifampicine aurait pu être une alternative à la doxorubicine en tant qu'agent inducteur de la P-gp, étant donné que la doxorubicine interagit avec PPAR- γ par l'intermédiaire de la surexpression du miR-130a. Cette surexpression conduit à une répression transcriptionnelle de *PPARG*, ce qui pourrait potentiellement restreindre l'action des ligands de PPAR- γ . Ces résultats discordants, peuvent s'expliquer par des doses utilisées plus élevées dans ces travaux (25 μ M alors que la molécule est prescrite à une posologie 4 fois inférieure à celle de la pioglitazone), exposant à des effets non spécifiques « *off-target* » non reproductibles avec la dose thérapeutique que nous utilisons. Il serait toutefois intéressant d'explorer de façon plus large les autres pompes d'efflux (MRP, BCRP...), soit par un test fonctionnel d'efflux évaluant uniquement l'activité des pompes d'efflux (482), soit par analyse des transcrits des gènes codant pour ces dernières par RT-qPCR.

La composante soluble du microenvironnement médullaire est constituée d'un ensemble complexe de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance qui joue un rôle clé dans l'hématopoïèse physiologique mais dont la dérégulation peut créer un environnement plus permissif à la progression tumorale, en favorisant la survie et la prolifération des cellules leucémiques. À partir d'un panel de cytokines et facteurs de croissance sélectionnés pour leur sensibilité à la modulation par la pioglitazone, nous avons pu mettre en évidence une dérégulation de ces facteurs chez les patients atteints de LAM. Cette dérégulation est caractérisée par une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, S100A8/A9 et TNF- α) et des facteurs favorisant la prolifération (ostéopontine, SCF, SDF-1 et HGF) ou l'angiogénèse (VEGF-A et le PDGF-BB), ces processus étant considérés comme des « *hallmark of cancer* » fondamentaux pour la progression tumorale (474). Dans notre cohorte, l'IL-1RA est le seul paramètre anti-inflammatoire augmenté dans le groupe LAM, mais cette augmentation pourrait être une conséquence de la surproduction d'IL-6 qui régule la sécrétion d'IL-1RA (483). De manière plus surprenante, l'HGF figure parmi les facteurs qui présente la plus forte augmentation dans les LAM. Cette observation n'est en réalité pas récente puisque rapportée dès 1996 dans les LAM, mais également les LAL ou encore les LMC et dont la signalisation via son récepteur MET favorise la survie et la prolifération des cellules

leucémiques (484, 485). Les cellules stromales médullaires sont la principale source d'HGF, les cellules hématopoïétiques n'en produisant pas ou peu (486), confirmant ainsi une altération du microenvironnement dans ces pathologies. De manière intéressante, HGF est capable d'interagir de manière paracrine avec d'autres cellules du microenvironnement telles que les macrophages mais également de manière autocrine, régulant notamment la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-8, de facteurs de croissance comme SCF, SDF-1 ou VEGF (486-488). L'ensemble de ces facteurs constitue donc un réseau complexe et dynamique, régi par de multiples interactions. Plus récemment, Ravalet et al. ont publié des valeurs de référence pour 49 analytes sur une cohorte de sujets sains âgés de 18 à 80 ans. Le niveau d'un certain nombre de ces cytokines et facteurs de croissance est donc modifié avec l'âge indépendamment d'une hémopathie sous-jacente, en particulier pour HGF (489). Une cohorte témoin appariée selon l'âge des patients LAM aurait été plus adaptée, néanmoins, les valeurs dans notre cohorte LAM restent supérieures à ces valeurs de référence, bien que cela nécessite d'être confirmé par un test statistique. Malgré la différence de profil d'expression au sein des patients atteints de LAM, celle-ci ne semble pas être liée à présence d'anomalies associées aux néoplasies myélodysplasiques, ni au caractère secondaire de la LAM, suggérant que le pronostic défavorable de ces entités ne dépend pas de la composante inflammatoire. Étant donné la grande hétérogénéité des LAM, les données conventionnellement utilisées pour leur caractérisation ne permettent pas d'identifier ces sous-groupes de patients inflammatoires. L'identification de nouveaux biomarqueurs permettrait de mieux cibler les patients susceptibles bénéficier des propriétés anti-inflammatoires de la pioglitazone.

Nos résultats sont concordants avec d'autres cohortes publiées dans la littérature (490, 491) et soulignent l'importance de l'inflammation dans les LAM, qui est par ailleurs associée à un pronostic péjoratif (490, 492), justifiant le rationnel de la modulation anti-inflammatoire de la pioglitazone dans les LAM. Une analyse corrélée à la survie globale aurait été intéressante pour compléter ces données. Bien que nous ne disposions pas des données de survie, elles sont accessibles et pourront être récupérées pour des analyses futures.

La prévalence réelle de la fibrose dans les LAM est difficile à évaluer en raison de l'absence de biopsie ostéo-médullaire de manière systématique. Néanmoins, la présence d'une fibrose est associée à un pronostic péjoratif et semble être plus élevée dans certains sous-groupes de LAM comme les LAM-MRC (468). En ce qui concerne les modulateurs de la fibrose, seule la concentration de l'ostéopontine, une protéine matricielle exerçant un rôle pro-fibrotique, était augmentée dans le groupe LAM tandis que le PDGF-BB et le TGF- β , également pro-fibrotiques étaient diminués. Par ailleurs, comme décrit précédemment, le facteur de croissance HGF au

potentiel anti-fibrotique était également augmenté dans le groupe LAM. Au-delà de leur rôle dans la modulation de la fibrose, ces facteurs sont également impliqués dans d'autres processus biologiques. Entre autres, le TGF- β exerce outre son rôle pro-fibrotique, des propriétés anti-inflammatoires ou antiprolifératives alors que HGF exerce à l'inverse une activité pro-proliférative. Ainsi, l'interprétation de ces variations doit être considérée comme la résultante de l'interaction entre plusieurs processus biologiques et pas uniquement le reflet de la fibrose.

Étant donné le faible effectif de la cohorte, la recherche de corrélation avec le taux de blastes, de leucocytes ou le statut mutationnel s'est également révélée non contributive, à l'exception d'un signal pro-inflammatoire chez les patients présentant une mutation pour *RUNX1* ou *TET2*. La mutation de *RUNX1* est associée à un score élevé de mauvais pronostic basé de la signature transcriptomique liée à l'inflammation rapporté par Lasry et al. (361). Par ailleurs, la mutation perte de fonction de *TET2* dans un modèle murin, est associée à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6 par les progéniteurs hématopoïétiques (493). Ces données nécessitent d'être confirmées sur des cohortes plus larges mais également sur des surnageants médullaires. En effet, ces surnageants directement issus du microenvironnement médullaire seraient une matrice plus pertinente et sensible pour étudier ces variations.

Pour le dernier volet de ce travail, nous avons souhaité tester l'association de la pioglitazone associée au giltéritinib, dans un modèle murin de xénogreffe de cellules primaires de patients sur la prolifération et la fibrose en greffe primaire ainsi que le contingent de CSL en greffe secondaire. Bien que les NSG soient immunodéprimées, ces modèles restent pertinents pour l'étude de la fibrose. En effet, Sanchez et al. qui ont pu mettre en évidence de la fibrose sur des xénogreffes de cellules primaires de LAM dans des souris NSG, 12 semaines après injection, dans une procédure semblable à la nôtre par injection dans la veine caudale (494).

Enfin, des travaux récents ont rapporté le rôle d'AXL sur l'immunité anti-tumorale et ont montré que l'inhibition d'AXL par le bemcentinib dans un modèle syngénique de LAM dans des souris immunocompétentes, permet de restaurer l'immunité anti-tumorale médiée par les lymphocytes NK par déplétion des cellules myéloïdes suppressives dérivées des monocytes (457). L'exploration du versant immunitaire n'est pas possible avec nos modèles de NSG immunodéprimées, néanmoins, une telle exploration serait pertinente dans le cadre d'un d'essai clinique comme le suggèrent déjà les données de la phase I/II du bemcentinib dans les SMD/LAM (434).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Bien que les résultats de ce travail apportent des éléments de réponse aux objectifs posés, un certain nombre d'interrogations restent en suspens, ouvrant la voie à de nouvelles investigations et perspectives.

Nous avons confirmé le potentiel thérapeutique *in vitro* de la pioglitazone en monothérapie dans les LAM. Parallèlement, nous avons également identifié et démembré un mécanisme de résistance *in vivo* médié par le microenvironnement médullaire et l'axe Gas6/AXL. Sur ce volet, nos données nécessiteraient d'être confirmées en utilisant un modèle de cellules stromales invalidées pour *GAS6*. Dans ce contexte, une approche par interférence ARN pourrait s'avérer moins délétère pour les cellules stromales, étant donné la réversibilité de cette approche. L'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-Gas6 ou d'un récepteur-leurre AXL-Fc serait également une autre alternative, plusieurs références étant disponibles sur le marché.

L'étude des voies dérégulées dans les LAM, telles que l'inflammation, offre des perspectives de nouvelles cibles thérapeutiques. Le dosage des cytokines pro-inflammatoires à la fois dans les surnageants de culture de lignées de LAM (495) mais également dans diverses cohortes de patients a confirmé la présence fréquente d'état inflammatoire dans les LAM (490, 491). Ainsi, de premières approches visant à moduler pharmacologiquement cet environnement pro-inflammatoire, telles que l'utilisation de la dexaméthasone sont actuellement à l'étude (362), ouvrant également des perspectives pour les ligands de PPAR- γ . Dans notre étude, l'utilisation d'une méthode de quantification plus précise et plus sensible aurait été intéressante pour un certain nombre de marqueurs où les valeurs étaient en deçà du seuil de quantification (alarmines, FGF, IFN- γ). La sensibilité accrue (en fg/mL) de la technologie d'électrochimiluminescence de Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, Maryland) nous permettrait peut-être d'identifier des variations plus fines, offrant ainsi une image plus détaillée de la dynamique des cytokines et facteurs de croissance dans les LAM. Cette meilleure sensibilité offre également une possibilité de détection de facteurs typiquement localisés dans la moelle osseuse directement dans le sang, une matrice biologique plus aisément accessible.

Dans notre contexte, l'inhibition d'AXL constitue une approche thérapeutique intéressante, permettant d'une part de restaurer l'efficacité de la pioglitazone sur les cellules leucémiques au sein de leur microenvironnement, mais également de moduler la réponse anti-tumorale. Un futur axe d'étude serait d'explorer ce versant en utilisant un modèle syngénique de LAM FTL3-

ITD/NPMc que nous pourrions obtenir au moyen d'une collaboration avec l'UMR INSERM 1163 (Pr Hermine, Institut Imagine) dans des souris C57BL/6 immunocompétentes.

Il est par ailleurs de plus en plus admis que les cytopénies observées au cours des LAM ne sont pas uniquement liées à l'envahissement médullaire, ce dernier contrastant fréquemment avec la profondeur des cytopénies, suggérant une altération de l'hématopoïèse résiduelle en lien avec une altération de la niche hématopoïétique. Les bases de ce travail sur le rôle de la modulation de PPAR- γ sur les cellules leucémiques ouvrent également la question de son impact sur l'hématopoïèse normale résiduelle dans les LAM. En effet, Boyd et al. ont montré que les cellules leucémiques perturbaient la maturation des lignées myéloïdes et érythroïdes normales en altérant la niche adipocytaire et qu'un agoniste de PPAR- γ s'opposait à la disparition des cellules souches hématopoïétiques normales dans un modèle murin de double xénogreffe de cellules souches hématopoïétiques humaines normales et leucémiques (41). Nous pourrions ainsi envisager un modèle de double xénogreffe de cellules CD34+ humaines normales et leucémiques, sélectionnées pour leur expression différentielle des antigènes HLA dans des souris NSG W41. Ce modèle actuellement disponible sur le site du CEA (collaboration Dr Françoise Pflumio, UMR U1274) permet une meilleure prise de greffe ainsi qu'une meilleure différenciation des progéniteurs en particulier érythroïdes, le rendant plus pertinent pour évaluer l'impact des ligands PPAR- γ sur l'hématopoïèse normale.

Annexe 1 : Validation de STAT5 comme cible thérapeutique dans les LAM

L'activation de PPAR- γ implique la diminution transcriptionnelle de STAT5A/B, deux facteurs de transcription fréquemment surexprimés dans les LAM (70%). Étant donné les résultats prometteurs obtenus sur l'érosion des cellules souches dans la LMC en modulant le niveau de STAT5 (370), une étape préalable de ce projet a été d'évaluer l'intérêt thérapeutique de la modulation de STAT5 dans les LAM. Ces expériences ont été réalisées au sein de l'unité INSERM U1173 dans les locaux de l'UFR des Sciences de la Santé (Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines) sous forme d'une collaboration avec l'équipe du Dr Prost (Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives, Fontenay aux Roses).

1) Modèles *in vitro*

La dépendance des lignées de LAM *in vitro* à l'expression des facteurs de transcription STAT5A et STAT5B a été établie grâce à une approche d'interférence ARN (shRNA anti STAT5A et STAT5B en vecteur lentiviral, les plasmides ayant été fournis par le Dr Isabelle Dusanter, Institut Cochin). Les plasmides contenant les ARN interférents ont été d'abord co-transfectés dans des cellules productrices (cellules HEK 293T) avec les autres plasmides nécessaires à la production des particules lentivirales. Ces particules ont été par la suite collectées, purifiées et concentrées pour transfection des lignées humaines de LAM. Le modèle de KG-1a n'a pas pu être mené à terme en raison d'un problème technique. L'inactivation de STAT5A et STAT5B dans les lignées MOLM-14 et OCI-AML3 induisait une forte diminution de la prolifération ainsi que la clonogénicité cellulaire (**Figure 1A et 1B**).

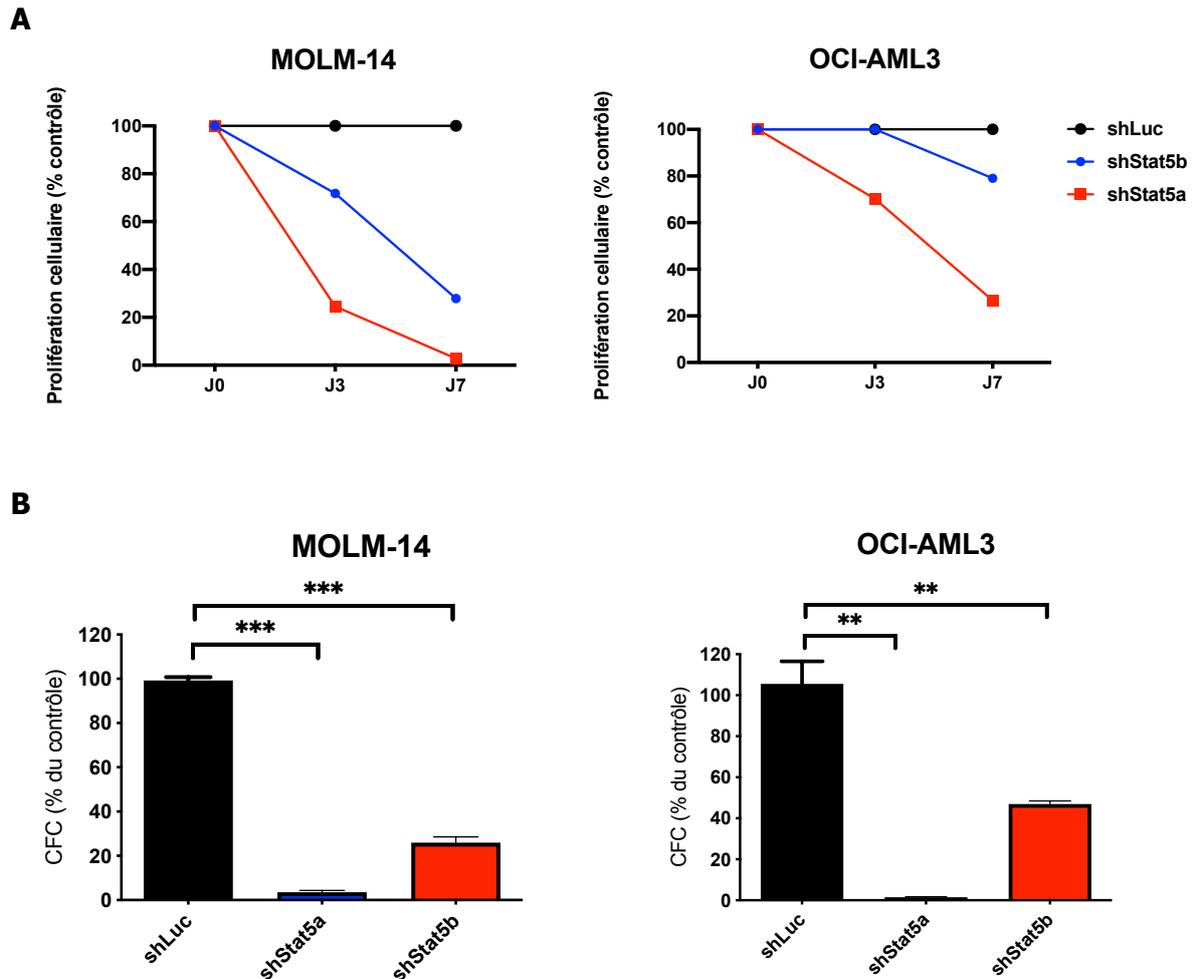


Figure 1 : Diminution de STAT5 par stratégie d'interférence ARN.

A) Diminution de la prolifération cellulaire en culture liquide induite par l'interférence ARN. Décompte de lignées par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage du puits contrôle. **B)** Diminution de la clonogénicité cellulaire en milieu semi-liquide (méthylcellulose) induite par l'interférence ARN

Par ailleurs la cinétique de réponse à la pioglitazone était variable selon les lignées, les KG-1a répondant plus lentement que les OCI-AML3. Le niveau endogène de STAT5 présent dans les cellules était également variable d'une lignée à l'autre, les KG-1a présentant le niveau de STAT5 le plus élevé (**Figure 2**), pouvant en partie expliquer la cinétique de réponse plus lente étant donné la longue demi-vie de STAT5 (96h).

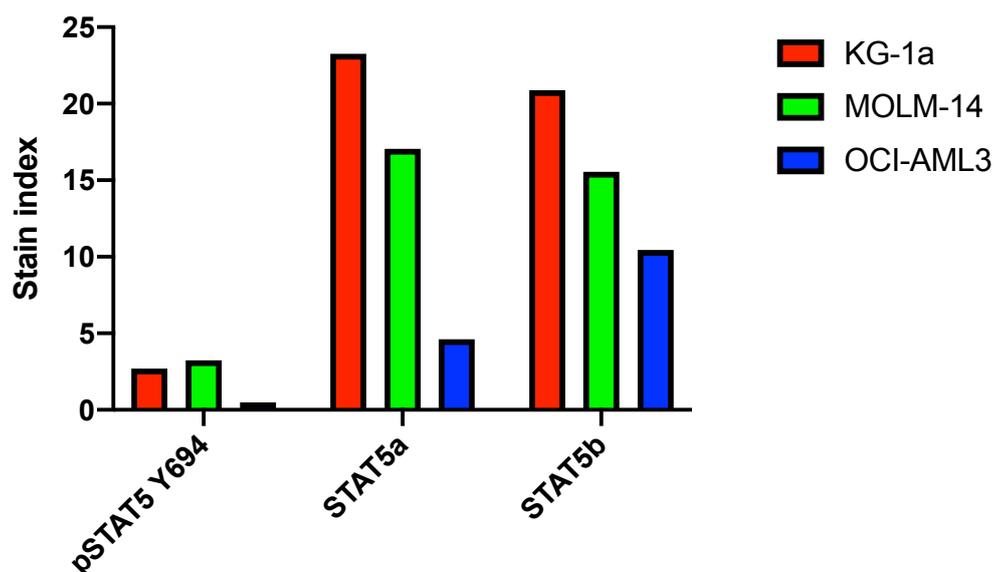


Figure 2 : Niveaux d'expression et d'activation de STAT5 (pSTAT Y694, STAT5A et STAT5B) par cytométrie en flux dans les lignées de LAM

2) Modèles *in vivo*

En parallèle, plusieurs modèles de xénogreffes primaires et secondaires de cellules primaires de LAM avaient été réalisés dans des souris immunodéprimées NSG. Les cellules humaines ont été détectées dans le sang à 9 semaines post-greffe par étude du chimérisme par cytométrie en flux et le traitement par la darglitazone, agoniste de PPAR- γ conduit de la semaine 9 à la semaine 14. Il n'a pas été détecté de différence significative entre le groupe contrôle et le groupe traité (10 souris par groupe) que ce soit en greffe primaire au niveau sanguin (**Figure 3A**), médullaire (**Figure 3B**) ou en greffe secondaire (**Figure 3C**).

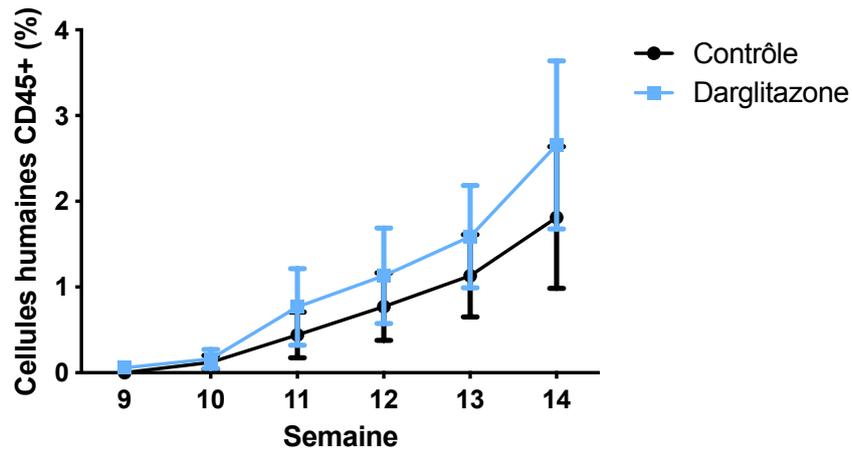
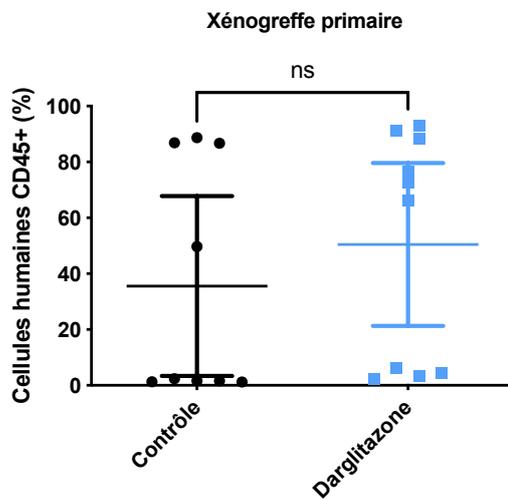
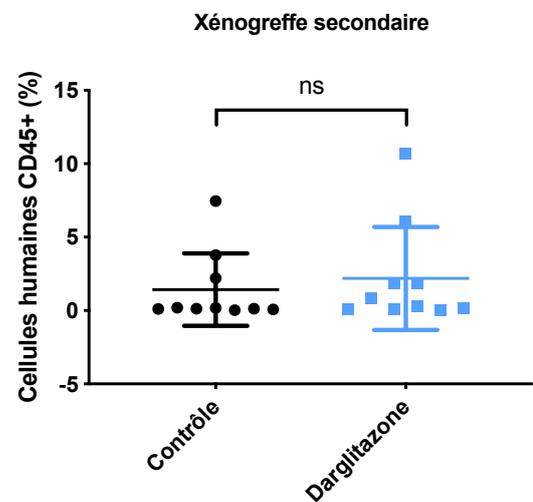
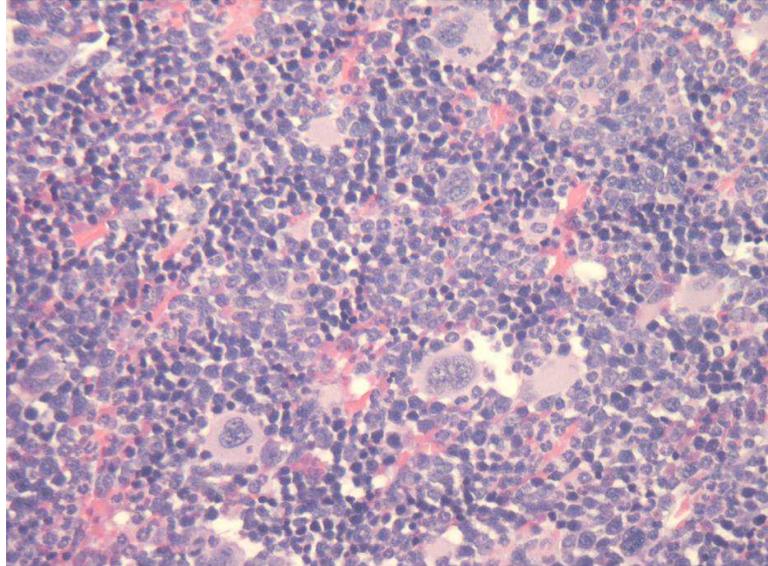
A**B****C**

Figure 3 : Chimérisme (pourcentage de cellules humaines CD45+) dans un modèle de xénogreffe de cellules primaires.

(A) Dans le sang au décours du traitement **(B)** Dans la moelle en greffe primaire au moment du sacrifice (S14) et **(C)** Dans la moelle en greffe secondaire

Néanmoins, l'absence d'efficacité *in vivo* contrastait fortement avec les effets observés *in vitro*. Étant donné que les dosages sériques étaient dans les valeurs attendues et que nous avons pu observer sur les coupes d'immunohistochimie des fémurs de souris traitées par agoniste de PPAR- γ une augmentation franche du nombre d'adipocytes (**Figure 4A et 4B**), l'hypothèse la plus probable était celle d'un mécanisme de résistance induit par le microenvironnement médullaire.

A



B

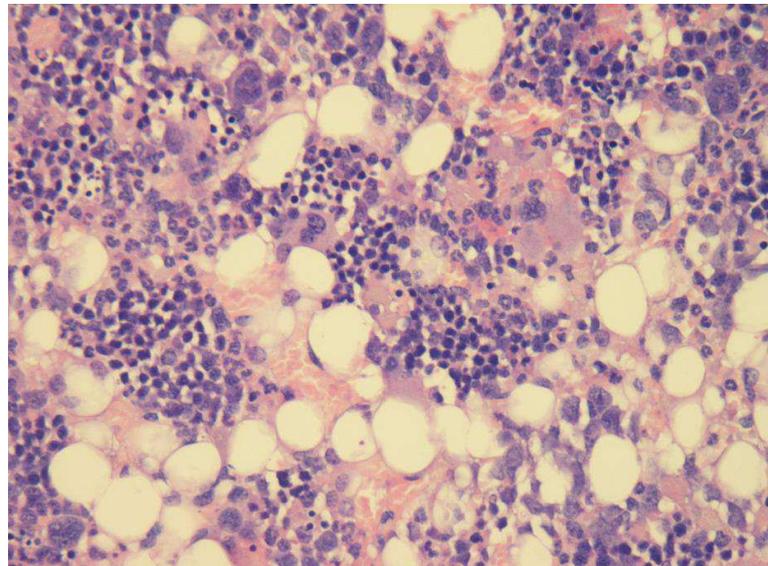


Figure 4 : *Infiltration blastique médullaire des coupes de fémur (coloration HES).*

(A) *Groupe contrôle présentant une forte infiltration blastique médullaire*

(B) *Groupe traité par darglitazone montrant une franche augmentation des adipocytes médullaires*

Annexe 2 : Expression d'AXL dans les lignées de LAM

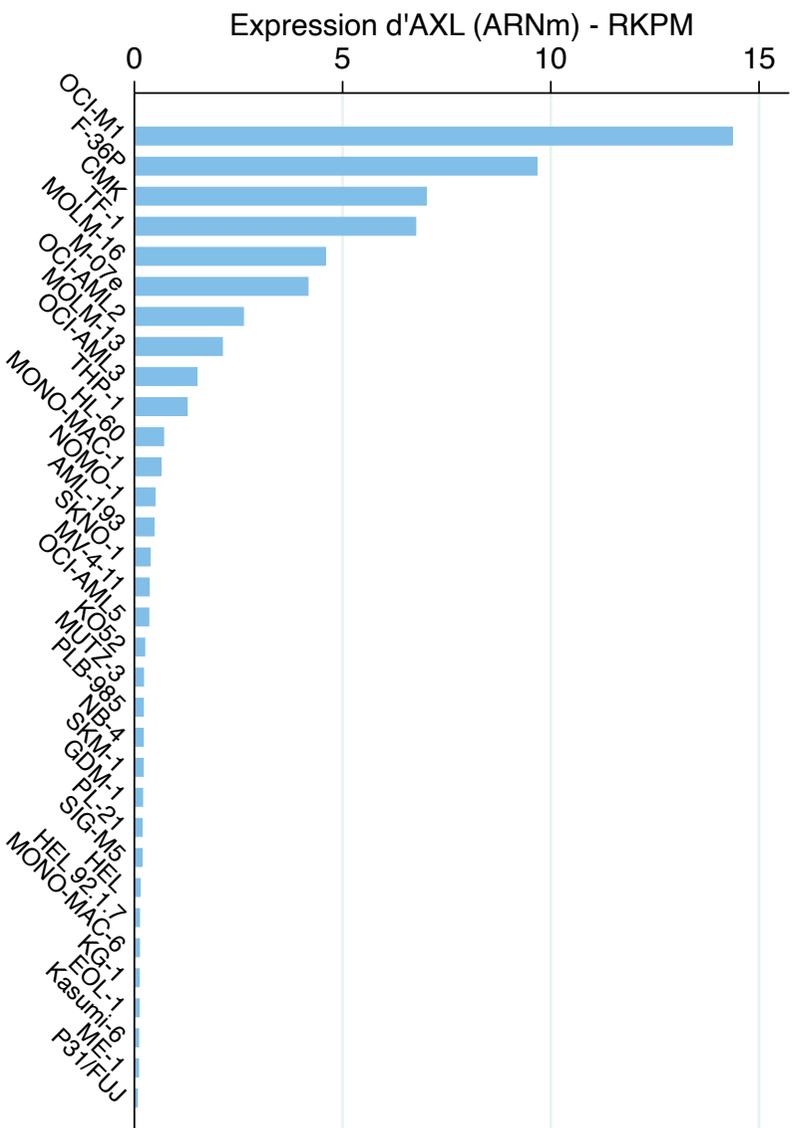


Figure 1 : Expression d'AXL au sein de 33 lignées cellulaires de LAM d'après les données issues de <https://cbioportal.org>).

BIBLIOGRAPHIE

1. Le Guyader-Peyrou S DG, Dantony E, Mounier M, Cornet E, Uhry Z, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Santé publique France. 2019:169.
2. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19.
3. Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*. 1987;28(1):55-76.
4. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*. 1994;137(2 Suppl):S68-97.
5. Pui CH, Relling MV, Rivera GK, Hancock ML, Raimondi SC, Heslop HE, et al. Epipodophyllotoxin-related acute myeloid leukemia: a study of 35 cases. *Leukemia*. 1995;9(12):1990-6.
6. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*. 2006;354(19):2034-45.
7. Haeckel EHPA. *Natürliche schöpfungsgeschichte*: Verlag von Georg Keimer; 1872.
8. Pappenheim A. *Atlas der menschoichen Blutzellen*: G. Fischer; 1905.
9. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*. 1951;12(1):197-201.
10. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethard WF, Gaston EO. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med*. 1950;35(5):746-70.
11. Mathe G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1959;4(3):226-38.
12. Laurenti E, Gottgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018;553(7689):418-26.
13. Rodrigues CP, Shvedunova M, Akhtar A. Epigenetic Regulators as the Gatekeepers of Hematopoiesis. *Trends Genet*. 2020.
14. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*. 1978;4(1-2):7-25.
15. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005;106(4):1232-9.
16. Klamer S, Voermans C. The role of novel and known extracellular matrix and adhesion molecules in the homeostatic and regenerative bone marrow microenvironment. *Cell Adh Migr*. 2014;8(6):563-77.
17. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-

88.

18. Blank U, Karlsson S. TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2015;125(23):3542-50.

19. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000;192(9):1365-72.

20. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-21.

21. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 2013;502(7473):637-43.

22. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra CN, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015;526(7571):126-30.

23. Lee D, Kim DW, Cho JY. Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. *Cell Biol Toxicol*. 2020;36(2):131-44.

24. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(5):303-20.

25. Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grunewald E, et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*. 2005;201(11):1781-91.

26. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011;147(5):1146-58.

27. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2014;20(11):1321-6.

28. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, Jacobsen RN, Forristal CE, Patton JT, et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med*. 2012;18(11):1651-7.

29. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9647-51.

30. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:349-56.

31. Fialkow PJ, Thomas ED, Bryant JI, Neiman PE. Leukaemic transformation of engrafted human marrow cells in vivo. *Lancet*. 1971;1(7693):251-5.

32. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8(2):98-101.

33. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-7.

34. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJG, Mylona MA, Sanders MA, et al. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):613-27.
35. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008;322(5909):1861-5.
36. Borella G, Da Ros A, Borile G, Porcu E, Tregnago C, Benetton M, et al. Targeting the plasticity of mesenchymal stromal cells to reroute the course of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2021;138(7):557-70.
37. Kumar B, Garcia M, Weng L, Jung X, Murakami JL, Hu X, et al. Acute myeloid leukemia transforms the bone marrow niche into a leukemia-permissive microenvironment through exosome secretion. *Leukemia*. 2018;32(3):575-87.
38. Desbourdes L, Javary J, Charbonnier T, Ishac N, Bourgeois J, Iltis A, et al. Alteration Analysis of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells from De Novo Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis. *Stem Cells Dev*. 2017;26(10):709-22.
39. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007;25(11):1315-21.
40. Moschoi R, Imbert V, Nebout M, Chiche J, Mary D, Prebet T, et al. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood*. 2016;128(2):253-64.
41. Boyd AL, Reid JC, Salci KR, Aslostovar L, Benoit YD, Shapovalova Z, et al. Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nat Cell Biol*. 2017;19(11):1336-47.
42. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood*. 2017;129(10):1320-32.
43. Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell*. 2016;19(1):23-37.
44. Takam Kamga P, Bassi G, Cassaro A, Midolo M, Di Trapani M, Gatti A, et al. Notch signalling drives bone marrow stromal cell-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(16):21713-27.
45. Orlova A, Neubauer HA, Moriggl R. The stromal microenvironment provides an escape route from FLT3 inhibitors through the GAS6-AXL-STAT5 axis. *Haematologica*. 2019;104(10):1907-9.
46. Dumas PY, Naudin C, Martin-Lannere S, Izac B, Casetti L, Mansier O, et al. Hematopoietic niche drives FLT3-ITD acute myeloid leukemia resistance to quizartinib via STAT5-and hypoxia-dependent upregulation of AXL. *Haematologica*. 2019;104(10):2017-27.
47. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
48. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:179-98.
49. Cancer Genome Atlas Research N, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger

- BA, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet.* 2013;45(10):1113-20.
50. Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer.* 2012;12:304.
51. Chen SJ, Shen Y, Chen Z. A panoramic view of acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(6):586-7.
52. Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech.* 2014;7(8):941-51.
53. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-98.
54. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-87.
55. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2424-33.
56. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet.* 2011;44(1):23-31.
57. Chou WC, Chou SC, Liu CY, Chen CY, Hou HA, Kuo YY, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood.* 2011;118(14):3803-10.
58. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell.* 2011;20(1):11-24.
59. Takahashi K, Jabbour E, Wang X, Luthra R, Bueso-Ramos C, Patel K, et al. Dynamic acquisition of FLT3 or RAS alterations drive a subset of patients with lower risk MDS to secondary AML. *Leukemia.* 2013;27(10):2081-3.
60. Jin L, Wu L. Recent advances in characterization of pre-leukemic/leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Cellular and Molecular Medicine Research.* 2018;1(2):44-51.
61. Fisher JN, Kalleda N, Stavropoulou V, Schwaller J. The Impact of the Cellular Origin in Acute Myeloid Leukemia: Learning From Mouse Models. *Hemasphere.* 2019;3(1):e152.
62. Griffin JD, Lowenberg B. Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 1986;68(6):1185-95.
63. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-8.
64. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730-7.
65. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008;112(13):4793-807.
66. Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood.* 1997;89(9):3104-12.
67. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute

myeloid leukemic stem cells. *Nat Med.* 2006;12(10):1167-74.

68. Kersten B, Valkering M, Wouters R, van Amerongen R, Hanekamp D, Kwidama Z, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2016;173(2):219-35.

69. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2011;19(1):138-52.

70. Martin GH, Roy N, Chakraborty S, Desrichard A, Chung SS, Woolthuis CM, et al. CD97 is a critical regulator of acute myeloid leukemia stem cell function. *Journal of Experimental Medicine.* 2019;216(10):2362-77.

71. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2000;14(10):1777-84.

72. Barreyro L, Will B, Bartholdy B, Zhou L, Todorova TI, Stanley RF, et al. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood.* 2012;120(6):1290-8.

73. van Rhenen A, van Dongen GA, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood.* 2007;110(7):2659-66.

74. Jan M, Chao MP, Cha AC, Alizadeh AA, Gentles AJ, Weissman IL, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):5009-14.

75. Kikushige Y, Miyamoto T, Yuda J, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Shima T, Takayanagi S, et al. A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell Stem Cell.* 2015;17(3):341-52.

76. Mitchell K, Steidl U. Targeting immunophenotypic markers on leukemic stem cells: how lessons from current approaches and advances in the leukemia stem cell (LSC) model can inform better strategies for treating acute myeloid leukemia (AML). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2020;10(1).

77. Hanekamp DW. MEASURABLE RESIDUAL DISEASE AND LEUKEMIC STEM CELLS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA. 2021.

78. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2021;138(26):2753-67.

79. Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood.* 2008;112(3):568-75.

80. Plesa A, Dumontet C, Mattei E, Tagoug I, Hayette S, Sujobert P, et al. High frequency of CD34+CD38-/low immature leukemia cells is correlated with unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells.* 2017;9(12):227-34.

81. Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature.* 2016;540(7633):433-7.

82. Docking TR, Parker JDK, Jadersten M, Duns G, Chang L, Jiang J, et al. A clinical transcriptome approach to patient stratification and therapy selection in acute myeloid leukemia. *Nat Commun.*

2021;12(1):2474.

83. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.

84. Rohnert MA, Kramer M, Schadt J, Ensel P, Thiede C, Krause SW, et al. Reproducible measurable residual disease detection by multiparametric flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2022;36(9):2208-17.

85. Pinero P, Morillas M, Gutierrez N, Barragan E, Such E, Brena J, et al. Identification of Leukemia-Associated Immunophenotypes by Database-guided Flow Cytometry Provides a Highly Sensitive and Reproducible Strategy for the Study of Measurable Residual Disease in Acute Myeloblastic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022;14(16).

86. Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.

87. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.

88. Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nat Genet*. 2017;49(3):332-40.

89. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.

90. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):620-5.

91. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. 1991;78(3):325-9.

92. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-302.

93. Montalban-Bravo G, Kanagal-Shamanna R, Sasaki K, Patel K, Ganon-Gomez I, Jabbour E, et al. NPM1 mutations define a specific subgroup of MDS and MDS/MPN patients with favorable outcomes with intensive chemotherapy. *Blood Adv*. 2019;3(6):922-33.

94. Zeidan AM, Bewersdorf JP, Buckstein R, Sekeres MA, Steensma DP, Platzbecker U, et al. Finding consistency in classifications of myeloid neoplasms: a perspective on behalf of the International Workshop for Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia*. 2022;36(12):2939-46.

95. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013;369(2):111-21.

96. Monnereau A UZ, Bossard N, Cowppli-Bony A, Voirin N, Delafosse P, et al. *Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine, 1989-2013. Partie 2 – Hémopathies malignes. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire ; 2016. p144. 2016.*

97. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin

- plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454-64.
98. Angenendt L, Rollig C, Montesinos P, Martinez-Cuadron D, Barragan E, Garcia R, et al. Chromosomal Abnormalities and Prognosis in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Pooled Analysis of Individual Patient Data From Nine International Cohorts. *J Clin Oncol*. 2019;37(29):2632-42.
99. Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77.
100. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 2016;374(5):422-33.
101. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1189-99.
102. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34(+)CD38(-) leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33(5):1102-12.
103. Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018;2(11):1356-66.
104. Li Y, Solis-Ruiz J, Yang F, Long N, Tong CH, Lacbawan FL, et al. NGS-defined measurable residual disease (MRD) after initial chemotherapy as a prognostic biomarker for acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2023;13(1):59.
105. Heuser M, Heida B, Buttner K, Wienecke CP, Teich K, Funke C, et al. Posttransplantation MRD monitoring in patients with AML by next-generation sequencing using DTA and non-DTA mutations. *Blood Adv*. 2021;5(9):2294-304.
106. Levis MJ, Perl AE, Altman JK, Gocke CD, Bahceci E, Hill J, et al. A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations. *Blood Adv*. 2018;2(8):825-31.
107. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Bene MC, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):1275-91.
108. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2001;20(49):7186-203.
109. Testa U, Lo-Coco F. Targeting of leukemia-initiating cells in acute promyelocytic leukemia. *Stem Cell Investig*. 2015;2:8.
110. Yates JW, Wallace HJ, Jr., Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep*. 1973;57(4):485-8.
111. Jaramillo S, Schlenk RF. Update on current treatments for adult acute myeloid leukemia: to treat acute myeloid leukemia intensively or non-intensively? That is the question. *Haematologica*. 2023;108(2):342-52.
112. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):986-96.

113. Castaigne S, Pautas C, Terre C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie JN, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2012;379(9825):1508-16.
114. Lambert J, Pautas C, Terre C, Raffoux E, Turlure P, Caillot D, et al. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica*. 2019;104(1):113-9.
115. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016;127(1):62-70.
116. Lowenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(1):26-8.
117. El Chaer F, Hourigan CS, Zeidan AM. How I treat AML in 2023 incorporating the updated classifications and guidelines. *Blood*. 2023.
118. Mayer LD, Tardi P, Louie AC. CPX-351: a nanoscale liposomal co-formulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3819-30.
119. Lancet JE, Uy GL, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, Stuart RK, et al. CPX-351 versus 7+3 cytarabine and daunorubicin chemotherapy in older adults with newly diagnosed high-risk or secondary acute myeloid leukaemia: 5-year results of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2021;8(7):e481-e91.
120. Lund K, Cole JJ, VanderKraats ND, McBryan T, Pchelintsev NA, Clark W, et al. DNMT inhibitors reverse a specific signature of aberrant promoter DNA methylation and associated gene silencing in AML. *Genome Biol*. 2014;15(8):406.
121. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(4):562-9.
122. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 2015;126(3):291-9.
123. Savona MR, Kolibaba K, Conkling P, Kingsley EC, Becerra C, Morris JC, et al. Extended dosing with CC-486 (oral azacitidine) in patients with myeloid malignancies. *Am J Hematol*. 2018;93(10):1199-206.
124. Rosnet O, Buhring HJ, deLapeyriere O, Beslu N, Lavagna C, Marchetto S, et al. Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol*. 1996;95(3-4):218-23.
125. Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N Engl J Med*. 2019;381(18):1728-40.
126. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2003;101(6):2125-31.
127. Mehta SV, Shukla SN, Vora HH. Overexpression of Bcl2 protein predicts chemoresistance in acute myeloid leukemia: its correlation with FLT3. *Neoplasma*. 2013;60(6):666-75.
128. Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, Bucci D, Han L, Borthakur G, et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*. 2014;4(3):362-75.

129. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* 2016;6(10):1106-17.
130. Wei AH, Montesinos P, Ivanov V, DiNardo CD, Novak J, Laribi K, et al. Venetoclax plus LDAC for newly diagnosed AML ineligible for intensive chemotherapy: a phase 3 randomized placebo-controlled trial. *Blood.* 2020;135(24):2137-45.
131. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2020;383(7):617-29.
132. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell.* 2011;19(1):17-30.
133. Losman JA, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C, et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science.* 2013;339(6127):1621-5.
134. Silva P, Neumann M, Schroeder MP, Vosberg S, Schlee C, Isaakidis K, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly is characterized by a distinct genetic and epigenetic landscape. *Leukemia.* 2017;31(7):1640-4.
135. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, Fathi AT, Roboz GJ, Altman JK, et al. Enasidenib in mutant IDH2 relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;130(6):722-31.
136. de Botton S, Montesinos P, Schuh AC, Papayannidis C, Vyas P, Wei AH, et al. Enasidenib vs conventional care in older patients with late-stage mutant-IDH2 relapsed/refractory AML: a randomized phase 3 trial. *Blood.* 2023;141(2):156-67.
137. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Roboz GJ, Altman JK, Mims AS, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *N Engl J Med.* 2018;378(25):2386-98.
138. Montesinos P, Recher C, Vives S, Zarzycka E, Wang J, Bertani G, et al. Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2022;386(16):1519-31.
139. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature.* 2009;458(7239):776-9.
140. Queiroz KC, Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Aberson HL, Ferreira CV, Peppelenbosch MP, et al. Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells. *Oncogene.* 2010;29(48):6314-22.
141. Fukushima N, Minami Y, Kakiuchi S, Kuwatsuka Y, Hayakawa F, Jamieson C, et al. Small-molecule Hedgehog inhibitor attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Sci.* 2016;107(10):1422-9.
142. Cortes JE, Dombret H, Merchant A, Tauchi T, DiRienzo CG, Sleight B, et al. Glasdegib plus intensive/nonintensive chemotherapy in untreated acute myeloid leukemia: BRIGHT AML 1019 Phase III trials. *Future Oncol.* 2019;15(31):3531-45.
143. DiNardo CD, Wei AH. How I treat acute myeloid leukemia in the era of new drugs. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2020;135(2):85-96.
144. Stein EM, Tallman MS. Remission induction in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2012;96(2):164-70.
145. Othus M, van Putten W, Lowenberg B, Petersdorf SH, Nand S, Erba H, et al. Relationship between event-free survival and overall survival in acute myeloid leukemia: a report from SWOG,

HOVON/SAKK, and MRC/NCRI. *Haematologica*. 2016;101(7):e284-6.

146. Oliva EN, Ronnebaum SM, Zaidi O, Patel DA, Nehme SA, Chen C, et al. A systematic literature review of disease burden and clinical efficacy for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Am J Blood Res*. 2021;11(4):325-60.

147. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-41.

148. da Silveira Junior LS, Soares VL, Jardim da Silva AS, Gil EA, Pereira de Araujo MDG, Merces Goncalves CA, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-1 expression in acute myeloid leukemia: Biological and prognosis implications. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(5):594-603.

149. Kaufmann SH, Karp JE, Svingen PA, Krajewski S, Burke PJ, Gore SD, et al. Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood*. 1998;91(3):991-1000.

150. Carter BZ, Mak PY, Tao W, Warmoes M, Lorenzi PL, Mak D, et al. Targeting MCL-1 dysregulates cell metabolism and leukemia-stroma interactions and resensitizes acute myeloid leukemia to BCL-2 inhibition. *Haematologica*. 2022;107(1):58-76.

151. Bogenberger JM, Kornblau SM, Pierceall WE, Lena R, Chow D, Shi CX, et al. BCL-2 family proteins as 5-Azacytidine-sensitizing targets and determinants of response in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2014;28(8):1657-65.

152. Lam SSY, Leung AYH. Overcoming Resistance to FLT3 Inhibitors in the Treatment of FLT3-Mutated AML. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).

153. Puissant A, Fenouille N, Alexe G, Pikman Y, Bassil CF, Mehta S, et al. SYK is a critical regulator of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2014;25(2):226-42.

154. Green AS, Maciel TT, Hospital MA, Yin C, Mazed F, Townsend EC, et al. Pim kinases modulate resistance to FLT3 tyrosine kinase inhibitors in FLT3-ITD acute myeloid leukemia. *Sci Adv*. 2015;1(8):e1500221.

155. Gabra MM, Salmena L. microRNAs and Acute Myeloid Leukemia Chemoresistance: A Mechanistic Overview. *Front Oncol*. 2017;7:255.

156. Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood*. 2002;99(6):2179-84.

157. Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, Molon B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol Lett*. 2016;177:6-15.

158. Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol*. 1999;52(4):189-96.

159. Yu X, Munoz-Sagredo L, Streule K, Muschong P, Bayer E, Walter RJ, et al. CD44 loss of function sensitizes AML cells to the BCL-2 inhibitor venetoclax by decreasing CXCL12-driven survival cues. *Blood*. 2021;138(12):1067-80.

160. Binder S, Luciano M, Horejs-Hoek J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;43:8-15.

161. Hatfield KJ, Hovland R, Oyan AM, Kalland KH, Rynningen A, Gjertsen BT, et al. Release of angiopoietin-1 by primary human acute myelogenous leukemia cells is associated with mutations of nucleophosmin, increased by bone marrow stromal cells and possibly antagonized by high systemic angiopoietin-2 levels. *Leukemia*. 2008;22(2):287-93.

162. Duarte D, Hawkins ED, Akinduro O, Ang H, De Filippo K, Kong IY, et al. Inhibition of Endosteal Vascular Niche Remodeling Rescues Hematopoietic Stem Cell Loss in AML. *Cell Stem Cell*. 2018;22(1):64-77 e6.
163. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. 2014;508(7495):269-73.
164. Drolle H, Wagner M, Vasold J, Kutt A, Deniffel C, Sotlar K, et al. Hypoxia regulates proliferation of acute myeloid leukemia and sensitivity against chemotherapy. *Leuk Res*. 2015;39(7):779-85.
165. Schodel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011;117(23):e207-17.
166. Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting HIF1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):399-411.
167. Velasco-Hernandez T, Soneji S, Hidalgo I, Erlandsson E, Cammenga J, Bryder D. Hif-1alpha Deletion May Lead to Adverse Treatment Effect in a Mouse Model of MLL-AF9-Driven AML. *Stem Cell Reports*. 2019;12(1):112-21.
168. Megias-Vericat JE, Montesinos P, Herrero MJ, Moscardo F, Boso V, Martinez-Cuadron D, et al. Influence of cytarabine metabolic pathway polymorphisms in acute myeloid leukemia induction treatment. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(12):2880-94.
169. Cheng H, Huang C, Tang G, Qiu H, Gao L, Zhang W, et al. Emerging role of EPHX1 in chemoresistance of acute myeloid leukemia by regulating drug-metabolizing enzymes and apoptotic signaling. *Mol Carcinog*. 2019;58(5):808-19.
170. Alvares K, Carrillo A, Yuan PM, Kawano H, Morimoto RI, Reddy JK. Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP70 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(14):5293-7.
171. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347(6294):645-50.
172. Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol*. 1992;6(10):1634-41.
173. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992;68(5):879-87.
174. Takada I, Yu RT, Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Kliewer SA, et al. Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Mol Endocrinol*. 2000;14(5):733-40.
175. 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):5598-604.
176. Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, Xing GQ, Leach RJ, Detera-Wadleigh SD. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2. *Genomics*. 1996;35(3):637-8.
177. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, 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):281-99.

178. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*. 1997;46(8):1319-27.
179. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 1992;358(6389):771-4.
180. A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem*. 1997;272(32):20108-17.
181. Jay MA, Ren J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev*. 2007;3(1):33-9.
182. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113(2):159-70.
183. Mandard S, Muller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(4):393-416.
184. Peeters A, Baes M. Role of PPARalpha in Hepatic Carbohydrate Metabolism. *PPAR Res*. 2010;2010.
185. Liu S, Hatano B, Zhao M, Yen CC, Kang K, Reilly SM, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor delta/beta in hepatic metabolic regulation. *J Biol Chem*. 2011;286(2):1237-47.
186. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013;19(5):557-66.
187. Hong F, Pan S, Guo Y, Xu P, Zhai Y. PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules*. 2019;24(14).
188. Hernandez-Quiles M, Broekema MF, Kalkhoven E. PPARgamma in Metabolism, Immunity, and Cancer: Unified and Diverse Mechanisms of Action. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:624112.
189. Bugge A, Mandrup S. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res*. 2010;2010.
190. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest*. 1997;99(10):2416-22.
191. 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.
192. Napimoga MH, Vieira SM, Dal-Secco D, Freitas A, Souto FO, Mestriner FL, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. *J Immunol*. 2008;180(1):609-17.
193. Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, et al. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem*. 2000;275(7):4541-4.
194. Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*. 2000;448(2):121-38.

195. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*. 2008;456(7220):350-6.
196. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999;20(5):649-88.
197. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. 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):20230-5.
198. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1997;272(16):10811-6.
199. Ohshima T, Koga H, Shimotohno K. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29551-7.
200. 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):27988-97.
201. Khorasanizadeh S, Rastinejad F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(6):384-90.
202. Umemoto T, Fujiki Y. Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPARalpha and PPARgamma. *Genes Cells*. 2012;17(7):576-96.
203. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-43.
204. Uppenberg J, Svensson C, Jaki M, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J Biol Chem*. 1998;273(47):31108-12.
205. Sheu SH, Kaya T, Waxman DJ, Vajda S. Exploring the binding site structure of the PPAR gamma ligand-binding domain by computational solvent mapping. *Biochemistry*. 2005;44(4):1193-209.
206. Chen S, Johnson BA, Li Y, Aster S, McKeever B, Mosley R, et al. Both coactivator LXXLL motif-dependent and -independent interactions are required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) function. *J Biol Chem*. 2000;275(6):3733-6.
207. Kojetin DJ, Burris TP. Small molecule modulation of nuclear receptor conformational dynamics: implications for function and drug discovery. *Mol Pharmacol*. 2013;83(1):1-8.
208. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Bostrom P, Laznik D, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5. *Nature*. 2010;466(7305):451-6.
209. Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem*. 2005;280(18):17880-90.
210. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, et al. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25252-9.
211. Ricci CG, Silveira RL, Rivalta I, Batista VS, Skaf MS. Allosteric Pathways in the PPARgamma-RXRalpha nuclear receptor complex. *Sci Rep*. 2016;6:19940.

212. Nagy L, Schwabe JW. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(6):317-24.
213. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 1997;89(3):373-80.
214. Treuter E, Albrechtsen T, Johansson L, Leers J, Gustafsson JA. A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol.* 1998;12(6):864-81.
215. Kalkhoven E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1145-55.
216. Koppen A, Kalkhoven E. Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS Lett.* 2010;584(15):3250-9.
217. Lemon B, Inouye C, King DS, Tjian R. Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription. *Nature.* 2001;414(6866):924-8.
218. Yuan CX, Ito M, Fondell JD, Fu ZY, Roeder RG. The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):7939-44.
219. Grontved L, Madsen MS, Boergesen M, Roeder RG, Mandrup S. MED14 tethers mediator to the N-terminal domain of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and is required for full transcriptional activity and adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 2010;30(9):2155-69.
220. Conaway RC, Sato S, Tomomori-Sato C, Yao T, Conaway JW. The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(5):250-5.
221. Aouali N, Broukou A, Bosseler M, Keunen O, Schlessner V, Janji B, et al. Epigenetic Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonists Increases the Anticancer Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on Multiple Myeloma Cells. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130339.
222. Floyd ZE, Stephens JM. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(6):4062-8.
223. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18527-33.
224. Oberfield JL, Collins JL, Holmes CP, Goreham DM, Cooper JP, Cobb JE, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(11):6102-6.
225. Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol.* 1997;11(6):779-91.
226. 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):229-40.
227. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 1995;83(5):813-9.
228. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995;83(5):803-12.

229. Schupp M, Lazar MA. Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper. *J Biol Chem*. 2010;285(52):40409-15.
230. Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA. Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest*. 2003;112(6):945-55.
231. Wang B, Wu L, Chen J, Dong L, Chen C, Wen Z, et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):94.
232. Sauer S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(10):688-704.
233. Sohda T, Mizuno K, Imamiya E, Sugiyama Y, Fujita T, Kawamatsu Y. Studies on antidiabetic agents. II. Synthesis of 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)-benzyl]thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878) and its derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1982;30(10):3580-600.
234. Fujita T, Sugiyama Y, Taketomi S, Sohda T, Kawamatsu Y, Iwatsuka H, 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):804-10.
235. Shibuya A, Watanabe M, Fujita Y, Saigenji K, Kuwao S, Takahashi H, et al. An autopsy case of troglitazone-induced fulminant hepatitis. *Diabetes Care*. 1998;21(12):2140-3.
236. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007;356(24):2457-71.
237. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Curtis PS, Gomis R, Hanefeld M, et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet*. 2009;373(9681):2125-35.
238. Tang H, Shi W, Fu S, Wang T, Zhai S, Song Y, et al. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*. 2018;7(4):1070-80.
239. Mehtala J, Khanfir H, Bennett D, Ye Y, Korhonen P, Hoti F. Pioglitazone use and risk of bladder cancer: a systematic literature review and meta-analysis of observational studies. *Diabetol Int*. 2019;10(1):24-36.
240. Sinha B, Ghosal S. Assessing the need for pioglitazone in the treatment of patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of its risks and benefits from prospective trials. *Sci Rep*. 2020;10(1):15781.
241. Devchand PR, Liu T, Altman RB, FitzGerald GA, Schadt EE. The Pioglitazone Trek via Human PPAR Gamma: From Discovery to a Medicine at the FDA and Beyond. *Front Pharmacol*. 2018;9:1093.
242. Bento AP, Gaulton A, Hersey A, Bellis LJ, Chambers J, Davies M, et al. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D1083-90.
243. Balint BL, Nagy L. Selective modulators of PPAR activity as new therapeutic tools in metabolic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006;6(1):33-43.
244. Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, Busby SA, Chalmers MJ, Kumar N, et al. Antidiabetic actions of a non-agonist PPARgamma ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature*. 2011;477(7365):477-81.
245. Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, et al. Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes*. 2005;54(12):3442-52.

246. Wang Y, Porter WW, Suh N, Honda T, Gribble GW, Leesnitzer LM, et al. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Endocrinol.* 2000;14(10):1550-6.
247. Suh N, Wang Y, Honda T, Gribble GW, Dmitrovsky E, Hickey WF, 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):336-41.
248. Ryu S, Kim DS, Lee MW, Lee JW, Sung KW, Koo HH, et al. Anti-leukemic effects of PPARgamma ligands. *Cancer Lett.* 2018;418:10-9.
249. Fuhr L, Rousseau M, Plauth A, Schroeder FC, Sauer S. Amorfrutins Are Natural PPARgamma Agonists with Potent Anti-inflammatory Properties. *J Nat Prod.* 2015;78(5):1160-4.
250. Weidner C, de Groot JC, Prasad A, Freiwald A, Quedenau C, Kliem M, et al. Amorfrutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(19):7257-62.
251. Pourcet B, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Selective PPAR modulators, dual and pan PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2006;11(3):379-401.
252. Sakamoto J, Kimura H, Moriyama S, Odaka H, Momose Y, Sugiyama Y, et al. Activation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtypes by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278(3):704-11.
253. Agrawal R. The first approved agent in the Glitazar's Class: Saroglitazar. *Curr Drug Targets.* 2014;15(2):151-5.
254. Siddiqui MS, Idowu MO, Parmar D, Borg BB, Denham D, Loo NM, et al. A Phase 2 Double Blinded, Randomized Controlled Trial of Saroglitazar in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;19(12):2670-2.
255. Francque SM, Bedossa P, Ratziu V, Anstee QM, Bugianesi E, Sanyal AJ, et al. A Randomized, Controlled Trial of the Pan-PPAR Agonist Lanifibranor in NASH. *N Engl J Med.* 2021;385(17):1547-58.
256. Prost S, Le Dantec M, Auge S, Le Grand R, Derdouch S, Auregan G, 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):1765-75.
257. Guo B, Huang X, Lee MR, Lee SA, Broxmeyer HE. Antagonism of PPAR-gamma signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. *Nat Med.* 2018;24(3):360-7.
258. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, et al. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* 2001;7(1):41-7.
259. 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):1224-34.
260. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79(7):1147-56.
261. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, 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):151-8.
262. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 2002;16(1):22-6.

263. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular cell*. 1999;4(4):585-95.
264. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, et al. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell*. 1999;4(4):611-7.
265. Metzger D, Imai T, Jiang M, Takukawa R, Desvergne B, Wahli W, et al. Functional role of RXRs and PPAR γ in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005;73(1):51-8.
266. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, et al. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 1996;15(19):5336-48.
267. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem*. 1999;274(7):3970-7.
268. Chui PC, Guan HP, Lehrke M, Lazar MA. PPAR γ regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2244-56.
269. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15712-7.
270. Agarwal AK, Garg A. A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):408-11.
271. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, et al. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 2003;52(4):910-7.
272. Madsen MS, Broekema MF, Madsen MR, Koppen A, Borgman A, Grawe C, et al. PPAR γ lipodystrophy mutants reveal intermolecular interactions required for enhancer activation. *Nat Commun*. 2022;13(1):7090.
273. Armoni M, Harel C, Karnieli E. Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(3):100-7.
274. Kim HI, Ahn YH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1:S60-5.
275. Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR. Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14751-6.
276. Rosen ED, Kulkarni RN, Sarraf P, Ozcan U, Okada T, Hsu CH, et al. Targeted elimination of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in beta cells leads to abnormalities in islet mass without compromising glucose homeostasis. *Mol Cell Biol*. 2003;23(20):7222-9.
277. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, et al. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. 2003;52(7):1655-63.
278. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-12.
279. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107(2):119-25.

280. . !!! INVALID CITATION !!! (277, 278).
281. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1595-9.
282. . !!! INVALID CITATION !!! (280).
283. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem.* 2006;281(5):2654-60.
284. Korbecki J, Bobinski R, Dutka M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflamm Res.* 2019;68(6):443-58.
285. Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol.* 1999;66(5):733-9.
286. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391(6662):82-6.
287. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature.* 2005;437(7059):759-63.
288. Hou Y, Moreau F, Chadee K. PPARgamma is an E3 ligase that induces the degradation of NFkappaB/p65. *Nat Commun.* 2012;3:1300.
289. Scirpo R, Fiorotto R, Villani A, Amenduni M, Spirli C, Strazzabosco M. Stimulation of nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma limits NF-kappaB-dependent inflammation in mouse cystic fibrosis biliary epithelium. *Hepatology.* 2015;62(5):1551-62.
290. Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev.* 2005;208:126-40.
291. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):926-35.
292. Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes.* 2002;51(5):1507-14.
293. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 2018;122(6):877-902.
294. Khoo NK, Hebbar S, Zhao W, Moore SA, Domann FE, Robbins ME. Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists: implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy. *Redox Biol.* 2013;1(1):70-9.
295. Ding G, Fu M, Qin Q, Lewis W, Kim HW, Fukai T, et al. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc Res.* 2007;76(2):269-79.
296. Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, et al. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells.

Metabolism. 2001;50(1):3-11.

297. Nakahira K, Kim HP, Geng XH, Nakao A, Wang X, Murase N, et al. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *J Exp Med*. 2006;203(10):2377-89.

298. Kronke G, Kadl A, Ikonomu E, Bluml S, Furnkranz A, Sarembock IJ, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(6):1276-82.

299. Jansen T, Daiber A. Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? *Front Pharmacol*. 2012;3:30.

300. Lin CC, Yang CC, Chen YW, Hsiao LD, Yang CM. Arachidonic Acid Induces ARE/Nrf2-Dependent Heme Oxygenase-1 Transcription in Rat Brain Astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2018;55(4):3328-43.

301. van Wijk J, Coll B, Cabezas MC, Koning E, Camps J, Mackness B, et al. Rosiglitazone modulates fasting and post-prandial paraoxonase 1 activity in type 2 diabetic patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(12):1134-7.

302. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Paraoxonase 2 (PON2) expression is upregulated via a reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH)-oxidase-dependent mechanism during monocytes differentiation into macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(12):2052-63.

303. Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR gamma and AP-1 pathway activation. *Atherosclerosis*. 2007;195(2):313-21.

304. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7355-9.

305. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7614-9.

306. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93(2):241-52.

307. Schneider C, Nobs SP, Kurrer M, Rehrauer H, Thiele C, Kopf M. Induction of the nuclear receptor PPAR-gamma by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1026-37.

308. . !!! INVALID CITATION !!! .

309. Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007;6(2):137-43.

310. Gallardo-Soler A, Gomez-Nieto C, Campo ML, Marathe C, Tontonoz P, Castrillo A, et al. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol Endocrinol*. 2008;22(6):1394-402.

311. Daniel B, Nagy G, Czimmerer Z, Horvath A, Hammers DW, Cuaranta-Monroy I, et al. The Nuclear Receptor PPARgamma Controls Progressive Macrophage Polarization as a Ligand-Insensitive Epigenomic Ratchet of Transcriptional Memory. *Immunity*. 2018;49(4):615-26 e6.

312. Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol.* 2000;164(3):1364-71.
313. . !!! INVALID CITATION !!! (311).
314. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Hucke S, 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):2079-89.
315. Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(10):2857-65.
316. Szatmari I, Gogolak P, Im JS, Dezso B, Rajnavolgyi E, Nagy L. Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity.* 2004;21(1):95-106.
317. Boers M, Verhoeven AC, Markusse HM, van de Laar MA, Westhovens R, van Denderen JC, et al. Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1997;350(9074):309-18.
318. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut.* 2019;68(Suppl 3):s1-s106.
319. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med.* 2005;201(8):1205-15.
320. Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Peyrin-Biroulet L, Romano O, Chavatte P, et al. PPARgamma as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut.* 2006;55(9):1341-9.
321. Hazra S, Miyahara T, Rippe RA, Tsukamoto H. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. *Comp Hepatol.* 2004;3 Suppl 1(Suppl 1):S7.
322. Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF, Jr., Motomura K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem.* 2000;275(46):35715-22.
323. Yu J, Zhang S, Chu ES, Go MY, Lau RH, Zhao J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma reverses hepatic nutritional fibrosis in mice and suppresses activation of hepatic stellate cells in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(6):948-57.
324. Hansmann G, Zamanian RT. PPARgamma activation: a potential treatment for pulmonary hypertension. *Sci Transl Med.* 2009;1(12):12ps4.
325. Calvier L, Chouvarine P, Legchenko E, Kokeny G, Mozes MM, Hansmann G. Chronic TGF-beta1 Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension Induces Sustained Canonical Smad3 Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;61(1):121-3.
326. Calvier L, Chouvarine P, Legchenko E, Hoffmann N, Geldner J, Borchert P, et al. PPARgamma Links BMP2 and TGFbeta1 Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells, Regulating Cell Proliferation and Glucose Metabolism. *Cell Metab.* 2017;25(5):1118-34 e7.
327. Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, Docherty NG, Watson RW, O'Connell PR. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(2):439-48.
328. Scharl M, Huber N, Lang S, Furst A, Jehle E, Rogler G. Hallmarks of epithelial to mesenchymal

transition are detectable in Crohn's disease associated intestinal fibrosis. *Clin Transl Med.* 2015;4:1.

329. Rousseaux C, Dubuquoy C, Bellinva S, Viti F, Colombel J-F, Chavatte P, et al. 1080 Preclinical and Toxicological Assessments of the Novel Orally Bioavailable PPAR Ligand GED-0507-34-Levo for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2010;5(138):S-157.

330. Specia S, Rousseaux C, Dubuquoy C, Rieder F, Vetusch A, Sferra R, et al. Novel PPARgamma Modulator GED-0507-34 Levo Ameliorates Inflammation-driven Intestinal Fibrosis. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(2):279-92.

331. Di Gregorio J, Sferra R, Specia S, Vetusch A, Dubuquoy C, Desreumaux P, et al. Role of glycogen synthase kinase-3beta and PPAR-gamma on epithelial-to-mesenchymal transition in DSS-induced colorectal fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171093.

332. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med.* 2000;342(17):1255-65.

333. Dong M, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood.* 2006;107(12):4589-96.

334. Agarwal A, Morrone K, Bartenstein M, Zhao ZJ, Verma A, Goel S. Bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis: pathogenic mechanisms and the role of TGF-beta. *Stem Cell Investig.* 2016;3:5.

335. Lambert J, Saliba J, Calderon C, Sii-Felice K, Salma M, Edmond V, et al. PPARgamma agonists promote the resolution of myelofibrosis in preclinical models. *J Clin Invest.* 2021;131(11).

336. Berria R, Glass L, Mahankali A, Miyazaki Y, Monroy A, De Filippis E, et al. Reduction in hematocrit and hemoglobin following pioglitazone treatment is not hemodilutional in Type II diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(3):275-81.

337. Nagasawa E, Abe Y, Nishimura J, Yanase T, Nawata H, Muta K. Pivotal role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in regulation of erythroid progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp Hematol.* 2005;33(8):857-64.

338. Okreglicka K, Iten I, Pohlmeier L, Onder L, Feng Q, Kurrer M, et al. PPARgamma is essential for the development of bone marrow erythroblastic island macrophages and splenic red pulp macrophages. *J Exp Med.* 2021;218(5).

339. Chow A, Huggins M, Ahmed J, Hashimoto D, Lucas D, Kunisaki Y, et al. CD169(+) macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med.* 2013;19(4):429-36.

340. Chen Y, Xiang J, Qian F, Diwakar BT, Ruan B, Hao S, et al. Epo receptor signaling in macrophages alters the splenic niche to promote erythroid differentiation. *Blood.* 2020;136(2):235-46.

341. Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, Blumberg N, Francis CW, Phipps RP. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood.* 2004;104(5):1361-8.

342. O'Brien JJ, Spinelli SL, Tober J, Blumberg N, Francis CW, Taubman MB, et al. 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 enhances platelet production from megakaryocytes. *Blood.* 2008;112(10):4051-60.

343. Ray DM, Spinelli SL, Pollock SJ, Murrant TI, O'Brien JJ, Blumberg N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles. *Thromb Haemost.* 2008;99(1):86-95.

344. Morganti C, Cabezas-Wallscheid N, Ito K. Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells. *Hemasphere.* 2022;6(7):e740.

345. Sertorio M, Du W, Amarachintha S, Wilson A, Pang Q. In Vivo RNAi Screen Unveils PPARgamma

- as a Regulator of Hematopoietic Stem Cell Homeostasis. *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1242-55.
346. . !!! INVALID CITATION !!! (253).
347. Blanquicett C, Roman J, Hart CM. Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther*. 2008;6(A):25-34.
348. Wu J, Zhang M, Faircloth A. Role of PPAR Receptor and Ligands in the Pathogenesis and Therapy of Hematologic Malignancies. *Hemato*. 2022;3(3):422-33.
349. Tabe Y, Konopleva M, Andreeff M, Ohsaka A. Effects of PPARgamma Ligands on Leukemia. *PPAR Res*. 2012;2012:483656.
350. Liu JJ, Huang RW, Lin DJ, Peng J, Wu XY, Lin Q, et al. Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Ann Oncol*. 2005;16(3):455-9.
351. Liu JJ, Liu PQ, Lin DJ, Xiao RZ, Huang M, Li XD, et al. Downregulation of cyclooxygenase-2 expression and activation of caspase-3 are involved in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induced apoptosis in human monocyte leukemia cells in vitro. *Ann Hematol*. 2007;86(3):173-83.
352. Chen YC, Shen SC, Tsai SH. Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1743(3):291-304.
353. Hirase N, Yanase T, Mu Y, Muta K, Umemura T, Takayanagi R, et al. Thiazolidinedione induces apoptosis and monocytic differentiation in the promyelocytic leukemia cell line HL60. *Oncology*. 1999;57 Suppl 2:17-26.
354. Saiki M, Hatta Y, Yamazaki T, Itoh T, Enomoto Y, Takeuchi J, et al. Pioglitazone inhibits the growth of human leukemia cell lines and primary leukemia cells while sparing normal hematopoietic stem cells. *Int J Oncol*. 2006;29(2):437-43.
355. Sun C, Zhang G, Luan S, Luan C, Shao H, Dong F, et al. Evodiamine inhibits the proliferation of leukemia cell line K562 by regulating peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARgamma) pathway. *J Recept Signal Transduct Res*. 2016;36(4):422-8.
356. Konopleva M, Elstner E, McQueen TJ, Tsao T, Sudarikov A, Hu W, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(10):1249-62.
357. Hui H, Chen Y, Yang H, Zhao K, Wang Q, Zhao L, et al. Oroxylin A has therapeutic potential in acute myelogenous leukemia by dual effects targeting PPARgamma and RXRalpha. *Int J Cancer*. 2014;134(5):1195-206.
358. Konopleva M, Tsao T, Ruvolo P, Stiouf I, Estrov Z, Leysath CE, et al. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2002;99(1):326-35.
359. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, et al. Positive feedback between NF-kappaB and TNF-alpha promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest*. 2014;124(2):528-42.
360. Pietras EM. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. *Blood*. 2017;130(15):1693-8.
361. Lasry A, Nadorp B, Fornerod M, Nicolet D, Wu H, Walker CJ, et al. An inflammatory state

remodels the immune microenvironment and improves risk stratification in acute myeloid leukemia. *Nat Cancer*. 2023;4(1):27-42.

362. Recher C. Clinical Implications of Inflammation in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2021;11:623952.

363. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060-72.

364. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(2):161-70.

365. Schepers H, Wierenga AT, Vellenga E, Schuringa JJ. STAT5-mediated self-renewal of normal hematopoietic and leukemic stem cells. *JAKSTAT*. 2012;1(1):13-22.

366. Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y, Shimoda K, Minoguchi M, Akira S, 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):169-79.

367. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):402.

368. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 1996;13(2):247-54.

369. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, et al. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med*. 2010;2(3):98-110.

370. Prost S, Relouzat F, Spentchian M, Ouzegdouh Y, Saliba J, Massonnet G, et al. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPARgamma agonists. *Nature*. 2015;525(7569):380-3.

371. Rousselot P, Prost S, Guilhot J, Roy L, Etienne G, Legros L, et al. Pioglitazone together with imatinib in chronic myeloid leukemia: A proof of concept study. *Cancer*. 2017;123(10):1791-9.

372. Birkenkamp KU, Geugien M, Lemmink HH, Kruijer W, Vellenga E. Regulation of constitutive STAT5 phosphorylation in acute myeloid leukemia blasts. *Leukemia*. 2001;15(12):1923-31.

373. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud O, Gjertsen BT, et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*. 2004;118(2):217-28.

374. Kornblau SM, Minden MD, Rosen DB, Putta S, Cohen A, Covey T, et al. Dynamic single-cell network profiles in acute myelogenous leukemia are associated with patient response to standard induction therapy. *Clin Cancer Res*. 2010;16(14):3721-33.

375. Brady A, Gibson S, Rybicki L, Hsi E, Sauntharajah Y, Sekeres MA, et al. Expression of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 5 is associated with an increased risk of death in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2012;89(4):288-93.

376. Redell MS, Ruiz MJ, Gerbing RB, Alonzo TA, Lange BJ, Twardy DJ, et al. FACS analysis of Stat3/5 signaling reveals sensitivity to G-CSF and IL-6 as a significant prognostic factor in pediatric AML: a Children's Oncology Group report. *Blood*. 2013;121(7):1083-93.

377. Graham DK, Bowman GW, Dawson TL, Stanford WL, Earp HS, Snodgrass HR. Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene*. 1995;10(12):2349-59.

378. Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ*. 1994;5(6):647-57.

379. Kasper C, Rasmussen H, Kastrup JS, Ikemizu S, Jones EY, Berezin V, et al. Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat Struct Biol.* 2000;7(5):389-93.
380. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-34.
381. Liu E, Hjelle B, Bishop JM. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(6):1952-6.
382. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, et al. *axl*, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 1991;11(10):5016-31.
383. Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, et al. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene.* 1991;6(11):2113-20.
384. Rescigno J, Mansukhani A, Basilico C. A putative receptor tyrosine kinase with unique structural topology. *Oncogene.* 1991;6(10):1909-13.
385. Schulz AS, Schleithoff L, Faust M, Bartram CR, Janssen JW. The genomic structure of the human UFO receptor. *Oncogene.* 1993;8(2):509-13.
386. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
387. Rothlin CV, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:355-91.
388. Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Gohring W, Ullrich A, et al. Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J.* 2006;25(1):80-7.
389. McCloskey P, Fridell YW, Attar E, Villa J, Jin Y, Varnum B, et al. GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J Biol Chem.* 1997;272(37):23285-91.
390. Divine LM, Nguyen MR, Meller E, Desai RA, Arif B, Rankin EB, et al. AXL modulates extracellular matrix protein expression and is essential for invasion and metastasis in endometrial cancer. *Oncotarget.* 2016;7(47):77291-305.
391. Auyez A, Sayan AE, Kriajevska M, Tulchinsky E. AXL Receptor in Cancer Metastasis and Drug Resistance: When Normal Functions Go Askew. *Cancers (Basel).* 2021;13(19).
392. O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET. The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 1995;270(2):551-7.
393. Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature.* 1995;373(6515):623-6.
394. Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, et al. Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29411-4.
395. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (*gas6*) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol.* 1993;13(8):4976-85.
396. Wu G, Ma Z, Hu W, Wang D, Gong B, Fan C, et al. Molecular insights of Gas6/TAM in cancer development and therapy. *Cell Death Dis.* 2017;8(3):e2700.

397. Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, Ziegler AM, Havens AM, Jung Y, et al. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia*. 2010;12(2):116-27.
398. Ben-Batalla I, Schultze A, Wroblewski M, Erdmann R, Heuser M, Waizenegger JS, et al. Axl, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood*. 2013;122(14):2443-52.
399. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, Lutgens E, Plaisance S, Bono F, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood*. 2008;111(8):4096-105.
400. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1280-6.
401. Furukawa M, Ohkawara H, Ogawa K, Ikeda K, Ueda K, Shichishima-Nakamura A, et al. Autocrine and Paracrine Interactions between Multiple Myeloma Cells and Bone Marrow Stromal Cells by Growth Arrest-specific Gene 6 Cross-talk with Interleukin-6. *J Biol Chem*. 2017;292(10):4280-92.
402. Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bieche I, Bissery A, Remones V, et al. Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34(1):219-22.
403. Griffin JH, Gruber A, Fernandez JA. Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood*. 1992;79(12):3203-11.
404. Hafizi S, Dahlback B. Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J*. 2006;273(23):5231-44.
405. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(12):769-85.
406. Geng K, Kumar S, Kimani SG, Kholodovych V, Kasikara C, Mizuno K, et al. Requirement of Gamma-Carboxyglutamic Acid Modification and Phosphatidylserine Binding for the Activation of Tyro3, Axl, and MerTK Receptors by Growth Arrest-Specific 6. *Front Immunol*. 2017;8:1521.
407. Caberoy NB, Zhou Y, Li W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J*. 2010;29(23):3898-910.
408. Ikeda S, Shiva N, Ikeda A, Smith RS, Nusinowitz S, Yan G, et al. Retinal degeneration but not obesity is observed in null mutants of the tubby-like protein 1 gene. *Hum Mol Genet*. 2000;9(2):155-63.
409. Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowsk PJ. Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem*. 1996;271(16):9785-9.
410. Meyer AS, Zweemer AJ, Lauffenburger DA. The AXL Receptor is a Sensor of Ligand Spatial Heterogeneity. *Cell Syst*. 2015;1(1):25-36.
411. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*. 2008;100:35-83.
412. Zhu C, Wei Y, Wei X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer*. 2019;18(1):153.
413. Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol*. 1995;15(2):614-25.

414. Brown JE, Krodel M, Pazos M, Lai C, Prieto AL. Cross-phosphorylation, signaling and proliferative functions of the Tyro3 and Axl receptors in Rat2 cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e36800.
415. Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S, et al. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Mol Endocrinol*. 2008;22(11):2481-95.
416. Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, Lauffenburger DA. The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Sci Signal*. 2013;6(287):ra66.
417. Goyette MA, Duhamel S, Aubert L, Pelletier A, Savage P, Thibault MP, et al. The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression. *Cell Rep*. 2018;23(5):1476-90.
418. Park IK, Trotta R, Yu J, Caligiuri MA. Axl/Gas6 pathway positively regulates FLT3 activation in human natural killer cell development. *Eur J Immunol*. 2013;43(10):2750-5.
419. Thien CB, Langdon WY. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):294-307.
420. Valverde P. Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333(1):180-5.
421. Li N, Lorinczi M, Ireton K, Elferink LA. Specific Grb2-mediated interactions regulate clathrin-dependent endocytosis of the cMet-tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 2007;282(23):16764-75.
422. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72.
423. Gustafsson A, Bostrom AK, Ljungberg B, Axelson H, Dahlback B. Gas6 and the receptor tyrosine kinase Axl in clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2009;4(10):e7575.
424. Rankin EB, Fuh KC, Castellini L, Viswanathan K, Finger EC, Diep AN, et al. Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(37):13373-8.
425. Hafizi S, Alindri F, Karlsson R, Dahlback B. Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299(5):793-800.
426. Hafizi S, Ibraimi F, Dahlback B. C1-TEN is a negative regulator of the Akt/PKB signal transduction pathway and inhibits cell survival, proliferation, and migration. *FASEB J*. 2005;19(8):971-3.
427. Flem-Karlsen K, Nyakas M, Farstad IN, McFadden E, Wernhoff P, Jacobsen KD, et al. Soluble AXL as a marker of disease progression and survival in melanoma. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227187.
428. Loges S, Heuser M, Chromik J, Vigil CE, Paschka P, Ben-Batalla I, et al. Final analysis of the dose escalation, expansion and biomarker correlations in the Ph I/II trial BGBC003 with the selective oral AXL inhibitor bemcentinib (BGB324) in relapsed/refractory AML and MDS. *Blood*. 2018;132:2672.
429. Mudduluru G, Ceppi P, Kumarswamy R, Scagliotti GV, Papotti M, Allgayer H. Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene*. 2011;30(25):2888-99.
430. Mudduluru G, Allgayer H. The human receptor tyrosine kinase Axl gene--promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation. *Biosci Rep*.

2008;28(3):161-76.

431. Mudduluru G, Vajkoczy P, Allgayer H. Myeloid zinc finger 1 induces migration, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol Cancer Res.* 2010;8(2):159-69.
432. Malvankar C, Kumar D. AXL kinase inhibitors- A prospective model for medicinal chemistry strategies in anticancer drug discovery. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2022;1877(5):188786.
433. Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70(4):1544-54.
434. Loges S, Sutamtewagul G, Heuser M, Chromik J, Kapp-Schwoerer S, Crugnola M, et al. Bemcentinib (Oral AXL Inhibitor) in Combination with Low-Dose Cytarabine Is Well Tolerated and Efficacious in Older Relapsed AML Patients. Updates from the Ongoing Phase II Trial (NCT02488408) and Preliminary Translational Results Indicating Bemcentinib Elicits Anti-AML Immune Responses. *Blood.* 2021;138:3410.
435. Dumas PY, Villacreces A, Guitart AV, El-Habhab A, Massara L, Mansier O, et al. Dual Inhibition of FLT3 and AXL by Gilteritinib Overcomes Hematopoietic Niche-Driven Resistance Mechanisms in FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2021;27(21):6012-25.
436. Dumas PY, Raffoux E, Berard E, Bertoli S, Hospital MA, Heiblig M, et al. Gilteritinib activity in refractory or relapsed FLT3-mutated acute myeloid leukemia patients previously treated by intensive chemotherapy and midostaurin: a study from the French AML Intergroup ALFA/FILO. *Leukemia.* 2023;37(1):91-101.
437. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, et al. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature.* 1995;378(6555):390-4.
438. Faust M, Ebensperger C, Schulz AS, Schleithoff L, Hameister H, Bartram CR, et al. The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene.* 1992;7(7):1287-93.
439. Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature.* 1999;398(6729):723-8.
440. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science.* 2001;293(5528):306-11.
441. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature.* 2001;411(6834):207-11.
442. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell.* 2007;131(6):1124-36.
443. Carrera Silva EA, Chan PY, Joannas L, Errasti AE, Gagliani N, Bosurgi L, et al. T cell-derived protein S engages TAM receptor signaling in dendritic cells to control the magnitude of the immune response. *Immunity.* 2013;39(1):160-70.
444. Chiu KC, Lee CH, Liu SY, Chou YT, Huang RY, Huang SM, et al. Polarization of tumor-associated macrophages and Gas6/Axl signaling in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2015;51(7):683-9.
445. Kim EM, Lee EH, Lee HY, Choi HR, Ji KY, Kim SM, et al. Axl signaling induces development of natural killer cells in vitro and in vivo. *Protoplasma.* 2017;254(2):1091-101.
446. Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, Barckow P, et al. Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood.*

1994;84(6):1931-41.

447. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Lambrechts D, Fish RJ, Tjwa M, Plaisance S, et al. Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(2):583-96.

448. Dormady SP, Zhang XM, Basch RS. Hematopoietic progenitor cells grow on 3T3 fibroblast monolayers that overexpress growth arrest-specific gene-6 (GAS6). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12260-5.

449. Tang H, Chen S, Wang H, Wu H, Lu Q, Han D. TAM receptors and the regulation of erythropoiesis in mice. *Haematologica.* 2009;94(3):326-34.

450. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med.* 2001;7(2):215-21.

451. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest.* 2005;115(2):237-46.

452. Schultze A, Ben-Batalla I, Heuser M, Weber K, Erdmann R, Holland S, et al. Prognostic Significance and Target Potential of Axl in Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2011;118(21):940.

453. Rochlitz C, Lohri A, Bacchi M, Schmidt M, Nagel S, Fopp M, et al. Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia.* 1999;13(9):1352-8.

454. Niu X, Rothe K, Chen M, Grasedieck S, Li R, Nam SE, et al. Targeting AXL kinase sensitizes leukemic stem and progenitor cells to venetoclax treatment in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2021;137(26):3641-55.

455. Manesia JK, Almoflehi S, Pasha R, Jahan S, Blake J, Audet J, et al. Stringent Small Molecule Dose Requirements for the Optimal Expansion of Hematopoietic Stem Cells Revealed By Predictive Analytics and Xenotransplants. *Blood.* 2019;134:1185.

456. Maganti HB, Manesia J, Hasan T, Mcgregor C, Pasha R, Allan D, et al. GAS6 Promotes Robust Expansion of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells with High Serial Engraftment Activity. *Blood.* 2022;140(Supplement 1):1979-80.

457. Tirado-Gonzalez I, Descot A, Soetopo D, Nevmerzhitskaya A, Schaffer A, Kur IM, et al. AXL Inhibition in Macrophages Stimulates Host-versus-Leukemia Immunity and Eradicates Naive and Treatment-Resistant Leukemia. *Cancer Discov.* 2021;11(11):2924-43.

458. Whitman SP, Kohlschmidt J, Maharry K, Volinia S, Mrozek K, Nicolet D, et al. GAS6 expression identifies high-risk adult AML patients: potential implications for therapy. *Leukemia.* 2014;28(6):1252-8.

459. Yang X, Shi J, Zhang X, Zhang G, Zhang J, Yang S, et al. ssExpression level of GAS6-mRNA influences the prognosis of acute myeloid leukemia patients with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biosci Rep.* 2019;39(5).

460. Tang Y, Zang H, Wen Q, Fan S. AXL in cancer: a modulator of drug resistance and therapeutic target. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023;42(1):148.

461. Ben-Batalla I, Erdmann R, Jorgensen H, Mitchell R, Ernst T, von Amsberg G, et al. Axl Blockade by BGB324 Inhibits BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitor-Sensitive and -Resistant Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2017;23(9):2289-300.

462. Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, et al. Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett.* 2008;268(2):314-24.
463. Park IK, Mundy-Bosse B, Whitman SP, Zhang X, Warner SL, Bearss DJ, et al. Receptor tyrosine kinase Axl is required for resistance of leukemic cells to FLT3-targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015;29(12):2382-9.
464. Anam K, Davis TA. Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5):112.
465. Holtzhausen A, Harris W, Ubil E, Hunter DM, Zhao J, Zhang Y, et al. TAM Family Receptor Kinase Inhibition Reverses MDSC-Mediated Suppression and Augments Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(10):1672-86.
466. Konoplev S, Rassidakis GZ, Estey E, Kantarjian H, Liakou CI, Huang X, et al. Overexpression of CXCR4 predicts adverse overall and event-free survival in patients with unmutated FLT3 acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Cancer.* 2007;109(6):1152-6.
467. Du W, Lu C, Zhu X, Hu D, Chen X, Li J, et al. Prognostic significance of CXCR4 expression in acute myeloid leukemia. *Cancer Med.* 2019;8(15):6595-603.
468. Zhang X, Wang F, Yu J, Jiang Z. Significance of bone marrow fibrosis in acute myeloid leukemia for survival in the real-world. *Front Oncol.* 2022;12:971082.
469. Orazi A. Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. *Pathobiology.* 2007;74(2):97-114.
470. Yousefi B, Azimi A, Majidinia M, Shafiei-Irannejad V, Badalzadeh R, Baradaran B, et al. Balaglitazone reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via upregulation of PTEN in a PPARgamma-dependent manner in leukemia cells. *Tumour Biol.* 2017;39(10):1010428317716501.
471. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood.* 2015;125(9):1367-76.
472. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 1981;41(5):1967-72.
473. Plesa A, Dumezy F, Mathis S, Lhoumeau A-C, Bardet V, Saada V, et al. AML MRD By Multiparameter Flow Cytometry Using Laip/Dfn and LSC: Methodological Aspects in a Multicentric Study of the French-Flow MRD AML ALFA Network. *Blood.* 2022;140(Supplement 1):6279-81.
474. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
475. Tsao T, Kornblau S, Safe S, Watt JC, Ruvolo V, Chen W, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its coactivator DRIP205 in cellular responses to CDDO (RTA-401) in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2010;70(12):4949-60.
476. Esmaeili S, Salari S, Kaveh V, Ghaffari SH, Bashash D. Alteration of PPAR-GAMMA (PPARG; PPARgamma) and PTEN gene expression in acute myeloid leukemia patients and the promising anticancer effects of PPARgamma stimulation using pioglitazone on AML cells. *Mol Genet Genomic Med.* 2021;9(11):e1818.
477. Esmaeili S, Yousefi AM, Delshad M, Bashash D. Synergistic effects of PI3K inhibition and pioglitazone against acute promyelocytic leukemia cells. *Mol Genet Genomic Med.* 2023;11(3):e2106.

478. Hou D, Wang B, You R, Wang X, Liu J, Zhan W, et al. Stromal cells promote chemoresistance of acute myeloid leukemia cells via activation of the IL-6/STAT3/OXPHOS axis. *Ann Transl Med.* 2020;8(21):1346.
479. Kariolis MS, Miao YR, Jones DS, 2nd, Kapur S, Mathews, II, Giaccia AJ, et al. An engineered Axl 'decoy receptor' effectively silences the Gas6-Axl signaling axis. *Nat Chem Biol.* 2014;10(11):977-83.
480. Casado-Diaz A, Anter J, Muller S, Winter P, Quesada-Gomez JM, Dorado G. Transcriptomic Analyses of Adipocyte Differentiation From Human Mesenchymal Stromal-Cells (MSC). *J Cell Physiol.* 2017;232(4):771-84.
481. Braun M, Qorraj M, Buttner M, Klein FA, Saul D, Aigner M, et al. CXCL12 promotes glycolytic reprogramming in acute myeloid leukemia cells via the CXCR4/mTOR axis. *Leukemia.* 2016;30(8):1788-92.
482. Marcelletti JF, Sikic BI, Cripe LD, Paietta E. Evidence of a role for functional heterogeneity in multidrug resistance transporters in clinical trials of P-glycoprotein modulation in acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019;96(1):57-66.
483. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(2):E433-7.
484. Hino M, Inaba M, Goto H, Nishizawa Y, Tatsumi N, Nishino T, et al. Hepatocyte growth factor levels in bone marrow plasma of patients with leukaemia and its gene expression in leukaemic blast cells. *Br J Cancer.* 1996;73(1):119-23.
485. Kentsis A, Reed C, Rice KL, Sanda T, Rodig SJ, Tholouli E, et al. Autocrine activation of the MET receptor tyrosine kinase in acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2012;18(7):1118-22.
486. Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y, et al. Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. *Exp Hematol.* 2004;32(10):955-61.
487. Coudriet GM, He J, Trucco M, Mars WM, Piganelli JD. Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: implications for inflammatory mediated diseases. *PLoS One.* 2010;5(11):e15384.
488. Boissinot M, Vilaine M, Hermouet S. The Hepatocyte Growth Factor (HGF)/Met Axis: A Neglected Target in the Treatment of Chronic Myeloproliferative Neoplasms? *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1631-69.
489. Ravalet N, Guermouche H, Hirsch P, Picou F, Foucault A, Gallay N, et al. Modulation of bone marrow and peripheral blood cytokine levels by age and clonal hematopoiesis in healthy individuals. *Clin Immunol.* 2023;255:109730.
490. Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, Gayoso I, Arcos MJ, Banas H, et al. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine.* 2013;61(3):885-91.
491. Islam M, Mohamed EH, Esa E, Kamaluddin NR, Zain SM, Yusoff YM, et al. Circulating cytokines and small molecules follow distinct expression patterns in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer.* 2017;117(10):1551-6.
492. Peterlin P, Gaschet J, Guillaume T, Garnier A, Eveillard M, Le Bourgeois A, et al. A new cytokine-based dynamic stratification during induction is highly predictive of survivals in acute myeloid leukemia. *Cancer Med.* 2021;10(2):642-8.
493. Cai Z, Kotzin JJ, Ramdas B, Chen S, Nelanuthala S, Palam LR, et al. Inhibition of Inflammatory Signaling in Tet2 Mutant Preleukemic Cells Mitigates Stress-Induced Abnormalities and Clonal

Hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2018;23(6):833-49 e5.

494. Sanchez PV, Perry RL, Sarry JE, Perl AE, Murphy K, Swider CR, et al. A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(11):2109-17.

495. Kuett A, Rieger C, Perathoner D, Herold T, Wagner M, Sironi S, et al. IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia. *Scientific reports*. 2015;5(1):18411.