



HAL
open science

Effets régulateurs du ruxolitinib sur l'expression de marqueurs de l'inflammation et de protéines de détoxication des médicaments

Marie Febvre-James

► **To cite this version:**

Marie Febvre-James. Effets régulateurs du ruxolitinib sur l'expression de marqueurs de l'inflammation et de protéines de détoxication des médicaments. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1B043 . tel-02509881

HAL Id: tel-02509881

<https://theses.hal.science/tel-02509881>

Submitted on 17 Mar 2020

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « *Sciences Pharmaceutiques* »

Par

« **Marie FEBVRE-JAMES** »

« **Effets régulateurs du ruxolitinib sur l'expression de marqueurs de l'inflammation et de protéines de détoxication des médicaments** »

Thèse présentée et soutenue à « Rennes », le « 30 Octobre 2019 »

Unité de recherche : Irset - Inserm UMR_S 1085 - 9 avenue du Prof. Léon Bernard - 35000 RENNES

Rapporteurs avant soutenance :

Geneviève UBEAUD-SEQUIER Professeur d'université –Praticien Hospitalier, Université de Strasbourg
Xavier DECLEVES Professeur d'université –Praticien Hospitalier, Université Paris V

Composition du Jury :

Président : Claude BENDAVID Professeur d'université –Praticien Hospitalier, Université de Rennes

Examineurs : Geneviève UBEAUD-SEQUIER Professeur d'université –Praticien Hospitalier, Université de Strasbourg
Léa PAYEN Professeur d'université –Praticien Hospitalier, Université de Lyon 1
Claude BENDAVID Professeur d'université –Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1

Dir. de thèse : Olivier FARDEL Professeur d'université –Praticien Hospitalier, Université de Rennes 1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation qui a permis de financer ce travail.

Je remercie vivement les membres de mon jury de thèse, les Professeurs Geneviève Ubeaud-Séquier et Xavier Declèves d'avoir accepté de lire et de rapporter ce travail ainsi que les Professeurs Léa Payen et Claude Bendavid de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie particulièrement le Professeur Olivier Fardel qui, en tant que directeur de thèse, m'a offert l'opportunité de réaliser cette thèse et m'a partagé sa vision de la recherche. Merci pour votre encadrement et votre confiance.

Un merci chaleureux au Docteur Valérie Lecureur pour son encadrement en master 2 et après. Merci Valérie pour ta pédagogie, ta disponibilité, ta rigueur et ton enthousiasme qui ont joué un rôle majeur dans la réussite de mon Master et ma poursuite en thèse. Et je n'oublierai évidemment pas de te remercier mille fois pour ta tarte aux pralines lyonnaises !

J'adresse aussi mes remerciements au Pr Laurent Vernhet et aux Docteurs Arnaud Bruyère et Audrey Joannes pour leur bienveillance et leur sympathie. Je remercie aussi Patricia, Marc et Elodie, aussi bien pour leur aide au quotidien que leurs conseils, ainsi que tous les membres de l'équipe 1. Un merci tout particulier à Abdullah, pour nos heures passées au microscope, tes conseils précieux et ton soutien.

Un gros merci à Claudie, indispensable à notre survie à la paillasse, pour son aide au quotidien, les connaissances et techniques qu'elle m'a apportées et sans qui les journées au labo n'auraient pas été aussi agréables (Et pas seulement à cause des Chocobons !). Je remercie aussi Yu, grâce à qui j'ai appris à faire une plaque 384 puits à la vitesse lumière.

D'énormes mercis aux Docteurs Michel Samson et Dominique Lagadic-Gossmann, ainsi qu'à notre jolie Brigitte. Merci à vous trois pour la bonne humeur qui règne chaque jour à l'IRSET, pour vos encouragements, votre aide et votre enthousiasme. Merci aussi, bien sûr, pour tous les bons moments passés à table.

Je tiens à remercier l'UFR SVE de m'avoir offert l'opportunité d'enseigner pendant ma thèse et tout particulièrement Christine Le Peron, Cathy Gaillard-Le Goff et Hubert Lerivray de m'avoir accueillie dans les UE APO et CEL. Merci, tout d'abord de votre confiance, mais aussi votre bienveillance et surtout de m'avoir permis de confirmer mon intérêt pour l'enseignement. Merci aussi, de m'accueillir de nouveau parmi vous, pour une nouvelle aventure ! Je remercie aussi l'IUT d'Aurillac de m'avoir permis d'enseigner quelques jours dans mes montagnes.

J'aimerais remercier le Dr Sophie Langouët, Fred et le Dr Medjda Bellamri pour leur encadrement pendant mon Master 1.

Merci à Normand et Eric pour la bonne humeur des pauses déj, même quand Normand fait le malin aux mots croisés.

Merci aux étudiants qui ont rendu chaque jour agréable : Marie et Ghania, merci pour les pauses café et les soirées, je vous souhaite plein de courage pour la suite et fin de thèse ! Promis, je ne vous narguerai pas trop quand on se verra après ma soutenance.

Mais aussi Sophie, Nettie, Manon, Hélène, Nelly, Mélanie et Christelle ainsi que nos bébés stagiaires Mélou et Célia, merci pour les bons moments au labo et en dehors !

Mille énormes merci à mes compagnons de galère (euh pardon, de bureau) Nessrine, Alain, Marissou et Alice. Merci à chacun d'entre vous pour votre aide, votre présence toujours chaleureuse et pour les bons moments passés ensemble. Je ne doute pas du fait que ces moments seront maintes et maintes fois renouvelés (déjà rien qu'au mariage de Nessrine, en bord de mer et avec du henné, c'est ce qu'on a dit non, Nessrine ?). Je souhaite à chacun de vous beaucoup de réussite et de bonheur, aussi bien professionnellement que personnellement. Merci d'être de si bons copains 😊

Nono, my drinking buddy, my work wife, merci pour les pintes de Guinness au Fox, les planches au Saint-Germain, les soirées à la Contre, les apéros au canal, les après-midis films ou dessins. Merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et tout le reste.

Merci à mes copines chéries, mes bb, Cécilia, Chloé, Margaux, Noémie et Floriane. Merci de me faire rire aux larmes chaque fois qu'on se voit.

Cécilia, ma beauté des îles, merci pour nos moments de complicité, nos fous-rires, les crêpes à Saint-Lunaire, les pépites au Tremplin et les brunchs à Oh My Biche, parce que déjà rien que ça !

Je remercie aussi ma Chloé d'am, parce que loin des yeux ne veut pas toujours dire loin du cœur. Merci d'être, malgré la distance, toujours présente depuis toutes ces années. Vivement que l'on se recroise, que ce soit à Brive, au Croisic ou j'espère bien un jour à Rennes !

Je remercie de tout mon cœur mes parents et mes sœurs.

Les Zadultes, merci pour tout. Merci d'être chaque jour là pour nous, de nous avoir toujours soutenues, de nous avoir élevées avec le sentiment que tout est possible du moment qu'on s'en donne les moyens et d'avoir fait de nous les filles que nous sommes aujourd'hui. Merci d'être les deux personnes les plus fortes que je connaisse.

Katezouille, merci d'être « My Mummy » à moi aussi et ça from day one. Merci de m'avoir appris que les courgettes ce n'est pas si terrible, qu'un document signé par la Reine peut être le plus beau de tous, que la récompense est toujours à la hauteur du travail fourni et que non, on ne met pas de limonade dans du gin. Merci pour ta douceur, pour ton amour et merci de m'inspirer au quotidien.

Daddy, merci de m'avoir appris que la Fischer se boit Doreleï, que l'humour s'apprécie fin et plein d'esprit (ça m'a aidé pour ce diplôme, plôme) et que l'andouillette se déguste à la moutarde. Merci de m'avoir toujours encouragée, épaulée et poussée à donner le meilleur de moi-même. Pour finir, merci tout simplement parce que (et c'est pas moi qui l'ai dit c'est Lynda) « Le plus fort c'est mon père ».

My darling sisters, my silly billies, merci d'être les femmes fortes, ambitieuses et généreuses que vous êtes. Mimi, merci pour ta douceur, ta générosité, ta sensibilité. Lolo, merci pour nos moments à Lyon, Grenoble, Perran, Bristol. Mon Lou, merci d'être la jeune femme pleine d'ambitions que tu deviens et pour l'humour qu'on partage. Merci à vous trois d'être mes amours, ma vie, mon tout #cheesy mais surtout merci d'être les personnes sur qui je pourrai toujours compter. Love you millions.

Evidemment, Claire, ma Chachat, merci d'avoir fait en sorte qu'on se retrouve une nouvelle fois dans cette vie-là. Merci d'être toujours là, pour le meilleur et pour le pire. Que ce soit en Irlande, à Saint Lunaire, avec du houmous ou des petites olives, à Toulouse, à Brest ou de l'autre côté du monde, je sais qu'on pourra toujours compter l'une sur l'autre et que tu seras de toute façon la marraine de mon premier fils.

Jordan, thank you for your love and support. Thank you for always pushing me and encouraging me to give the best of myself. You already know all the things I would thank you for, our evenings dancing like mad, our afternoons exploring new places, our shared love for pizza and refined humour, so I'll just say that I am ever so thankful that your crazy matches my crazy. To all the adventures that await. Thank you for being you, my silly billy.

*A celle qui, il y a 25 ans quasiment jour pour jour, était à ma place,
J'aime à croire qu'elle m'a légué le nécessaire pour mener ce travail à bien,
Cette thèse lui est entièrement dédiée,*

Ma maman, Nathalie.

Sommaire

Liste des abréviations	11
Liste des figures	13
Liste des tableaux	14
Contexte bibliographique	15
<i>I. L'inflammation</i>	16
Généralités	17
I.1. Principaux acteurs cellulaires de l'inflammation : les macrophages	20
I.1.1. Les macrophages M1 pro-inflammatoires	21
I.1.2. Les macrophages M2 anti-inflammatoires	22
I.2. Transduction du signal inflammatoire	24
I.2.1. Ligands, initiateurs de la réponse inflammatoire	24
I.2.1.1. Liaison extracellulaire du LPS	24
I.2.1.2. Les cytokines inflammatoires	25
I.2.2. Voie NFκB : Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire	28
I.2.2.1. Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire.	28
I.2.2.2. Activation du facteur de transcription NFκB	35
I.2.3. Voie JAK-STAT : Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire	37
I.2.3.1. Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire	38
I.2.3.2. Transcription de gènes cibles par les STATs	41
<i>II. L'inflammation hépatique</i>	43
Généralités	44
II.1. Le foie, organisation fonctionnelle	44
II.1.1. Structure générale	44
II.1.2. Les cellules hépatiques	45

II.1.3. Les rôles du foie _____	46
II.2. Le foie, acteur de la détoxification _____	47
II.2.1. Les CYPs, enzymes de fonctionnalisation _____	48
II.2.1.1. Le CYP3A4 _____	49
II.2.1.2. Le CYP2C9 _____	50
II.2.1.3. Le CYP1A2 _____	50
II.2.2. Les protéines de transport _____	51
II.2.2.1. La superfamille des SLCs _____	52
II.2.2.2. La superfamille des ABCs _____	55
II.3. Le foie, à la fois victime et acteur de l'inflammation _____	58
II.3.1. Les acteurs moléculaires de l'inflammation hépatique _____	58
II.3.1.1. Les cytokines _____	58
II.3.1.2. Le LPS _____	59
II.3.2. La CRP _____	60
II.3.2.1. Structure _____	60
II.3.2.2. Synthèse hépatique _____	61
II.3.2.3. Rôle dans l'inflammation _____	61
<i>III. Les effets anti-inflammatoires du ruxolitinib _____</i>	<i>64</i>
Généralités _____	65
III.1. Structure, pharmacocinétique et pharmacodynamique _____	65
III.1.1. Membre des Jakinibs _____	65
III.1.2. Indication et caractéristiques pharmacologiques. _____	65
III.1.2.1. Indication _____	65
III.1.2.2. Pharmacocinétique _____	66
III.1.3. Interactions médicamenteuses _____	66
III.2. Le ruxolitinib dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes _____	68
III.2.1. Le ruxolitinib dans les syndromes myéloprolifératifs _____	68
III.2.1.1. Traitement de la myélofibrose _____	70

III.2.1.2. Traitement de la maladie de Vaquez	71
III.2.2. Le ruxolitinib dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes	72
III.2.2.1. Traitement de la maladie du greffon contre l'hôte	72
III.2.2.2. Traitement de maladies auto-immunes et inflammatoires	73
III.2.2.3. Traitement des cancers solides	74
III.3. Le ruxolitinib au niveau hépatique	76
Objectifs du travail	77
Travaux de recherche	78
<i>I. Article 1 : Le ruxolitinib réprime l'expression de cytokines inflammatoires induites en réponse à l'interféron-β, dans le macrophage humain.</i>	
	79
I.1. Résumé	79
I.1.1. Matériel et méthodes	79
I.1.2. Résultats et discussion	80
I.2. Publication	82
<i>II. Article 2 : Le ruxolitinib restaure l'expression de protéines de détoxication des médicaments réprimées par l'IL-6, dans l'hépatocyte humain</i>	
	105
II.1. Résumé	105
II.1.1. Matériel et méthodes	105
II.1.2. Résultats et discussion	106
II.2. Publication	107
<i>III. Article 3 : Effet du ruxolitinib sur l'expression de la CRP</i>	
	123
III.1. Résumé	123
III.1.1. Matériel et méthodes	123
III.1.2. Résultats et discussion	123
III.2. Manuscrit (soumis)	125
Conclusion générale et perspectives	161

I.1. Les apports des études effectuées	161
I.2. Limites de ces études	162
I.2.1. Etude exposée dans l'article 1	162
I.2.2. Etude exposée dans l'article 2	164
I.2.3. Etude exposée dans l'article 3	164
I.3. Les perspectives à approfondir	166
I.3.1. Le ruxolitinib et ses effets secondaires	166
I.3.1.1. Les effets secondaires du ruxolitinib	166
I.3.1.2. Le ruxolitinib et les idDDIs	167
I.3.2. Le ruxolitinib en comparaison aux autres Jakinibs	168
I.3.3. Le ruxolitinib en combinaison d'autres traitements	169
I.3.4. Le ruxolitinib comme anti-fibrosant	169
I.3.5. Conclusion générale	171
Références	172
Activités scientifiques et enseignement	186

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette	GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ADN : acide désoxyribo nucléique	GSTs : glutathion-transférases
ADP : adénosine di phosphate	GvHD : Graft-versus-Host Disease
ARNm : acide ribo nucléique messenger	h : heure
ATP : adénosine tri phosphate	HEL : human erythroleukemia
BCRP : breast cancer resistance protein	ICAM : intercellular adhesion molecule
C1q : complement factor 1q	id-DDIs : inflammatory diseases related DDIs
CBM : cytokine binding module	IFN : interféron
CCD : coiled-coil domain	IFNAR : récepteur aux interférons de type 1
CCL : C-C motif chemokine ligand	Ig : immunoglobuline
CD : cluster de différenciation	IKK : I κ B kinase
CHF : fibrose hépatique congénitale	IKKi : inducible I κ B kinase
ciAPs : cellular inhibitor of apoptosis proteins	IL : interleukine
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	IL-1RAcP : IL-1 receptor accessory protein
CPA : cellules présentatrices d'antigène	IRAKs : IL-1-associated kinases
CRP : C-reactive protein	IRF : interferon response factor
CXCL : C-X-C motif chemokine ligand	ISG : interferon-stimulated genes
CYPs : cytochromes P 450	ISGF : IFN stimulated gene factor
DAMPs : danger-associated molecular patterns	ISRE : interferon-stimulated response element
DBD : DNA binding domain	JAK : Janus kinase
DC : cellule dendritique	Jakinibs : JAK inhibitors
DD : death-domain	JH : Jak homology
DDI : drug-drug interactions	kDa : kilo dalton
E3S : œstrone-3-sulfate	LBP : LPS-binding protein
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay	LMC : leucémie myéloïde chronique
EMA : Agence Européenne des Médicaments	LPC : liver parenchymal cells
Erk : extracellular signal-regulated kinase	LPS : lipopolysaccharide
FASL : fas ligand	LUBAC : linear ubiquitin chain assembly complex
FDA : food and drug administration	Lys : lysine
FNIII : domaine fibronectine de type III-like	LT : lymphocyte T
GAS : γ -activated sites	M : molaire
G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor	Mal : MyD88-adaptor-like

MAPK : mitogen-activated protein kinase	PV : polycythemia vera, polyglobulie primitive ou maladie de Vaquez
MATEs : multidrug and toxin extrusion transporters	RHD : Rel homology domain
M-CSF : macrophage colony-stimulating factor	RIP1 : receptor-interacting serine/threonine- protein kinase 1
Met : méthionine	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
mL millilitre	SH2 : SRC homology
mM : millimolaire	SLC : solute-carrier
MP : myélofibrose primitive	SR : scavenger receptor
MRPs : multidrug resistance-associated proteins	STAT : signal transducers and activators of transcription
MyD : myeloïd differentiation factor	SULTs : sulfo-transférases
NAFLD : non-alcoholic fatty liver disease	TAB : TAK1-binding protein
NASH : non alcoholic steatohepatitis	TAD : transactivation domain
NATs : N-acétyl-transférases	TAK : TGF β -activated kinase
NBD : nucleotide-binding domain	TANK : TRAF family member-associated NF κ B activator
NF κ B : nuclear factor-kappa B	TBK1 : TANK-binding kinase 1
ng : nanogramme	TGF : transforming growth factor
nm : nanomètre	TIR : toll/interleukin-1 receptor
nM : nanomolaire	TLR : Toll-like receptor
NTCP : sodium-taurocholate cotransporting polypeptide	TMD : transmembrane domain
OATPs : organic anion-transporting polypeptides	TNF : tumor necrosis factor
OATs : organic anion transporter	TRADD : TNFR-associated death domain protein
OCTs : organic cation transporter	TRAF : TNF-receptor-associated-factor
OSM : oncostatine M	TRAM : TRIF-related adaptor molecule
PAMPs : pathogen-associated molecular patterns	TRIF : TIR domain-containing adaptor-inducing IFN β
PBS : Phosphate-buffered Saline	TYK : tyrosine kinase
PC : phosphocholine	UGTs : UDP-glucuronyl-transférases
P-gp : P-glycoprotéine	u-STATs : unphosphorylated-STATs
Ph- : Philadelphie-négatif	VCAM : vascular cell adhesion molecule
PI3K : phosphoinositide-3 kinase	μ g : microgramme
PKB : protein kinase b	μ L : microlitre
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate	μ M : micromolaire
PMSF : phenyl methane sulfonyl fluoride	
pTyr : tyrosines phosphorylées	

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes conduisant à l'installation de l'inflammation chronique	18
Figure 2 : Représentation de la structure du LPS	25
Figure 3 : Schéma de la signalisation des récepteurs interleukin-1 receptor et Toll-like receptor 4	31
Figure 4 : Représentation des récepteurs IL-1R et leurs ligands	33
Figure 5 : Schéma de signalisation du TNFR1	34
Figure 6 : Schéma de signalisation de la voie NFκB	36
Figure 7 : Schéma de signalisation de la voie JAK-STAT	39
Figure 8 : Structure et dimérisation des STATs	41
Figure 9 : Représentation de la structure du lobule et de l'acinus hépatique	45
Figure 10 : Représentation des principales cellules retrouvées au niveau du sinusoiide hépatique.	46
Figure 11 : Les phases du métabolisme des xénobiotiques	47
Figure 12 : Proportion de médicaments métabolisés par les CYPs	48
Figure 13 : Représentation des différents mécanismes de transport actif	52
Figure 14 : Expression polarisée des transporteurs SCLs au niveau hépatocytaire.	53
Figure 15 : Mécanisme de transport "rocker-switch" supposé pour les SLCs	54
Figure 16 : Expression polarisée des transporteurs ABCs au niveau hépatocytaire.	56
Figure 17 : Mécanisme de transport supposé pour les ABCs	56
Figure 18 : Représentation de la localisation des différentes formes de CRP	62
Figure 19 : Formule chimique du ruxolitinib	65
Figure 20 : Protocole de différenciation des macrophages humains en culture primaire	79
Figure 21 : Protocole de différenciation des cellules HepaRG	105
Figure 22 : Résultats de pseudo-coculture	165

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Propriétés et marqueurs phénotypiques des macrophages polarisés</i>	23
<i>Tableau 2 : TLRs et ligands associés chez l'Homme</i>	29
<i>Tableau 3 : Liste de ligands connus pour activer les différents JAKs et STATs</i>	37
<i>Tableau 4 : Profils d'expression hépatique des CYPs</i>	49
<i>Tableau 5 : Différences qualitatives dans la production de cytokines inflammatoires dans les syndromes myéloprolifératifs</i>	69

Contexte bibliographique

I. L'inflammation

Généralités

L'inflammation compte parmi les réponses orchestrées par le système immunitaire face à une agression. Le système immunitaire est l'ensemble des mécanismes biologiques mis en place par l'organisme afin de maintenir la cohérence des cellules et des tissus qui le constituent et d'assurer son intégrité. Ceci se fait d'une part en éliminant les substances étrangères et agents infectieux auxquels il est exposé, d'autre part en se débarrassant de cellules endommagées et en limitant la prolifération de cellules cancéreuses. L'efficacité du système immunitaire repose tout d'abord sur sa capacité à distinguer le soi du non-soi afin de reconnaître les agressions auxquelles l'organisme est confronté. En découle alors la mise en place des mécanismes de défense que sont l'immunité innée, réaction immédiate mais non spécifique, et l'immunité adaptative, plus tardive mais spécifiquement dirigée comme l'antigène à éliminer.

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense de l'organisme. Le premier mécanisme mis en place est la barrière que constitue le revêtement cutanéomuqueux dont l'efficacité physique est renforcée par des facteurs mécaniques d'expulsion, la production de facteurs bactéricides et une barrière biologique constituée de la flore bactérienne saprophyte non pathogène en compétition métabolique et physique avec les pathogènes externes. En cas de dommage du revêtement cutanéomuqueux, il y a passage des agents infectieux dans l'organisme et instauration d'une réponse inflammatoire (Figure 1).

L'inflammation est un processus le plus souvent aigu et localisé, ayant pour but de détruire ces éléments étrangers grâce à l'activation d'un certain nombre de médiateurs moléculaires et cellulaires. Elle est caractérisée par trois phases : vasculaire, cellulaire et de résolution.

Au cours de la phase vasculaire, l'augmentation du flux sanguin, suite à la sécrétion de médiateurs vasoactifs tels que l'histamine ou la sérotonine par les mastocytes et les basophiles présents, provoque rougeur et chaleur. L'augmentation de la perméabilité des capillaires permet, en induisant un œdème, le passage du plasma au niveau du foyer

inflammatoire et favorise sa dilution. La vasodilatation brutale de la microcirculation locale, associée à la sécrétion de médiateurs moléculaires et à l'expression de molécules d'adhésion permet le recrutement des phagocytes circulants qui, grâce à leur adhésion aux cellules endothéliales, traversent les parois vasculaires par diapédèse.

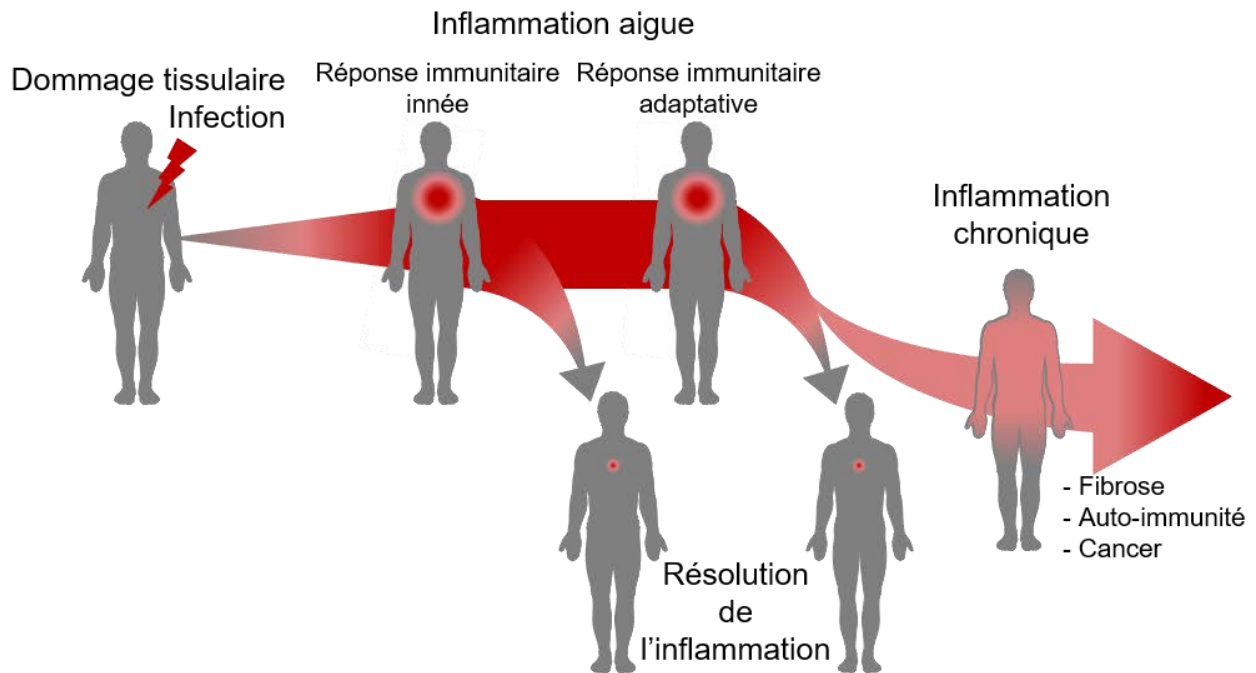


Figure 1 : Les étapes conduisant à l'installation de l'inflammation chronique.

La phase suivante est alors la phase cellulaire, caractérisée par la mobilisation des phagocytes circulants (neutrophiles, monocytes et macrophages) et la production de médiateurs solubles tels que les protéines du système du complément, les protéines de la phase aiguë de l'inflammation et les cytokines. Les neutrophiles et les macrophages, dont la fonction essentielle est la phagocytose, permettent l'élimination des pathogènes.

Si la réponse innée n'est pas suffisante pour lutter efficacement contre les pathogènes, la mise en place de la réponse immunitaire adaptative spécifique est alors nécessaire. En tant que cellules présentatrices d'antigène (CPA), les cellules dendritiques et les macrophages activent les lymphocytes T (LT) CD₄ en leur présentant les antigènes issus de la dégradation du pathogène. Ces LT se différencient en lymphocytes helper « Th » producteurs de cytokines. En fonction de la nature de l'antigène, deux types de réponses peuvent être mis en œuvre :

- La réponse à médiation cellulaire est basée sur la reconnaissance de cellules du soi et permet ainsi l'élimination de cellules infectées ou tumorales, grâce à l'intervention des LT cytotoxiques CD₈. Les Th1, obtenus grâce à l'interaction directe avec les CPA ou en réponse au à l'interleukine (IL)-12 et à l'interféron (IFN)- γ et caractérisés par la production d'IL2, ont pour rôle d'activer les LT cytotoxiques CD₈ induisant l'apoptose des cellules cibles.

- La réponse à médiation humorale est basée sur la reconnaissance d'agents exogènes. L'activation des lymphocytes B par les Th2 producteurs d'IL4 et d'IL13, différenciés en réponse à l'IL4 ou à l'interaction avec les CPA, permet la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes. Ces anticorps sont alors impliqués dans la neutralisation des bactéries, virus et toxines, par la formation des complexes immuns qui facilitent la phagocytose par les macrophages, l'activation de l'immunité cellulaire et l'activation du complément.

Enfin, suite à l'élimination de l'agression, la phase de résolution de l'inflammation a pour but de restaurer des conditions physiologiques. Celle-ci se caractérise par la diminution de la production de médiateurs pro-inflammatoires, notamment grâce à la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL10 et de glucocorticoïdes par les glandes surrénales, ainsi que l'élimination de l'infiltrat leucocytaire.

Cette phase de résolution est associée à un processus de réparation tissulaire. En cas d'inflammation modérée et contrôlée, l'architecture et la fonction tissulaire peuvent être restaurées. Cependant, il est possible que la phase de résolution de l'inflammation ne soit pas efficace. Cela conduit alors à l'installation d'une inflammation chronique. En plus de l'aspect inflammatoire principalement conduit par les macrophages, celle-ci se caractérise notamment par une transition épithélio-mésenchymateuse conduisant à l'activation des fibroblastes responsables du développement et de la progression d'une réparation tissulaire dérégulée, se traduisant par l'apparition de fibrose.

L'inflammation chronique est retrouvée dans de nombreuses pathologies auto-immunes, cancers et pathologies métaboliques.

I.1. Principaux acteurs cellulaires de l'inflammation : les macrophages

La population cellulaire principalement impliquée dans la médiation de la réponse inflammatoire est celle des monocytes/macrophages. Elle représente 4 à 10 % des cellules nucléées retrouvées dans la circulation périphérique chez l'Homme et impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques.

Les monocytes sont des cellules circulantes servant de pools périphériques de précurseurs myéloïdes pour le renouvellement des macrophages tissulaires et des cellules dendritiques.

Chaque tissu est constitué de macrophages résidents spécifiques. Se distinguent ainsi, entre autres, la microglie dans le système nerveux central, les ostéoclastes dans le tissu osseux, les macrophages alvéolaires dans le poumon et les cellules de Küpffer au niveau hépatique.

L'origine des macrophages tissulaires est principalement embryonnaire. En conditions physiologiques, ils s'auto-renouvellent localement (Ginhoux et al., 2010; Hoeffel et al., 2012).

En cas d'inflammation, ces populations peuvent se voir renforcées par le recrutement et la différenciation de monocytes circulants.

De par leurs fonctions multiples, les macrophages jouent le rôle de sentinelles du système immunitaire et participent au maintien de l'homéostasie tissulaire. Une des propriétés fondamentales des macrophages est la phagocytose, essentielle à la clairance des infections et nécessaire à l'élimination de cellules apoptotiques ou tumorales. En parallèle de cette caractéristique primordiale, les macrophages sont impliqués dans la présentation antigénique, la réponse immunitaire ou encore dans la réparation tissulaire, *via* la production de médiateurs (cytokines, facteurs de croissances, espèces réactives de l'oxygène). Dans ce contexte, il n'est pas surprenant de les retrouver comme acteurs majeurs du développement et la progression de pathologies inflammatoires.

Les macrophages sont des cellules plastiques dont le phénotype dépend du microenvironnement cytokinique. Ainsi, en fonction de l'expression de marqueurs membranaires, la production de cytokines et les activités biologiques, deux principaux phénotypes M1 et M2, se distinguent (Biswas et al., 2012; Mosser and Edwards, 2008; Murray, 2017; Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

1.1.1. Les macrophages M1 pro-inflammatoires

Les macrophages M1 dit « classiquement activés » montrent un phénotype pro-inflammatoire induit en réponse à une co-stimulation par l'IFN γ et le tumor necrosis factor (TNF)- α . Aussi l'engagement de la voie de signalisation du Toll-like receptor (TLR) 4, exprimé à la surface des macrophages, permet la production de TNF α et d'IFN β . De ce fait, les agonistes du TLR4 comme le lipopolysaccharide (LPS) peuvent activer classiquement les macrophages seuls ou combinés à l'IFN γ pour une activation optimale. Aussi, le facteur de croissance GM-CSF (pour granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) permet, *in vitro*, le priming de monocytes en macrophages M0 pré-M1. D'un point de vue morphologique, les macrophages différenciés par le GM-CSF sont des cellules rondes « en œuf sur le plat ».

Chez l'Homme, le phénotype M1 est caractérisé par une forte production de cytokines impliquées dans l'initiation et l'amplification de la réponse inflammatoire, notamment les IL12 et 23, mais aussi le TNF α , l'IL1 β et l'IL6, parallèlement à une très faible expression de la cytokine anti-inflammatoire IL10. Parmi les médiateurs sécrétés par les macrophages M1, se retrouvent de nombreuses chimiokines dont le rôle est de recruter les lymphocytes nécessaires à la réponse immunitaire totale. Le rôle majeur de cellule présentatrice d'antigène des macrophages M1 permet l'activation des lymphocytes grâce à l'expression des protéines de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Pour finir, la polarisation en macrophage M1 apporte d'importantes propriétés bactéricides et cytotoxiques, notamment par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Ces différentes capacités sécrétrices confèrent aux macrophages M1, en conditions contrôlées, des propriétés antimicrobiennes et antitumorales majeures. En cas de dérégulation, se traduisant notamment par une inflammation chronique, les macrophages M1 participent au dommage tissulaire *via* une production excessive de ROS et altèrent les processus de réparation des tissus et de cicatrisation.

1.1.2. Les macrophages M2 anti-inflammatoires

L'activation des macrophages M2 est dite « alternative » et induit un phénotype plutôt anti-inflammatoire impliqué dans la résolution de l'inflammation, en réponse à une co-exposition à l'IL4 et l'IL13. De façon similaire à la pré-polarisation M1 par le GM-CSF, le facteur de croissance M-CSF (pour macrophage colony-stimulating factor) permet de pré-polariser les monocytes en macrophages M0 pré-M2, se présentant sous forme de cellules fusiformes.

Les macrophages M2 sont caractérisés par une sécrétion importante de la cytokine anti-inflammatoire IL10 et de la cytokine pro-fibrosante transforming growth factor (TGF) β , en parallèle d'une faible expression d'IL12. La principale propriété des macrophages M2 est leur importante capacité de phagocytose apportée notamment par les récepteurs scavenger exprimés à leur surface. En effet, ces derniers participent activement à différents processus tels que la phagocytose de débris cellulaires et de cellules apoptotiques, la clairance des pathogènes ou encore le transport des lipides et la présentation antigénique. Les macrophages M2 jouent aussi un rôle important de promotion de la réparation tissulaire et de la cicatrisation, notamment par leurs propriétés pro-fibrosantes et pro-angiogéniques. De ce fait, en cas de dérégulation de la réponse inflammatoire, on les retrouve impliqués dans la formation et la progression tumorale.

Au sein des M2, trois sous-populations peuvent être décrites : les M2a, principalement impliqués dans la réparation tissulaire, et les M2b et M2c dits régulateurs.

Les M2a sont induits par une co-stimulation IL4-IL13 et expriment fortement le récepteur au mannose CD (pour cluster de différenciation) 206, impliqué dans l'absorption et la présentation des antigènes, l'antagoniste à l'IL1 β IL1ra et le récepteur leurre IL1RII. Par leur rôle prépondérant dans la réparation tissulaire, ils contribuent à l'apparition et au développement de fibroses en participant à la production de matrice extracellulaire ainsi qu'à l'exacerbation des réponses allergiques.

Les macrophages régulateurs sont caractérisés par une importante production d'IL10. Ils interviennent principalement lors des étapes tardives de la réponse immunitaire afin d'induire la résolution de l'inflammation. Les M2b et M2c partagent la nécessité de recevoir deux signaux pour être activés. Les M2b, dont le phénotype est induit par les agonistes aux TLRs, les complexes immuns et l'IL1 β , sécrètent, en plus de l'IL10, des cytokines inflammatoires telles que l'IL1 β , l'IL6 et le TNF α . Les M2c sont activés par une co-exposition à l'IL10 et aux glucocorticoïdes et induisent la sécrétion d'IL10 et de TGF β . En cas de dérégulation de la réponse inflammatoire, les macrophages régulateurs peuvent contribuer à la progression tumorale et prédisposer aux infections.

Tableau 1 : Propriétés et marqueurs phénotypiques des macrophages polarisés (D'après : Shapouri-Moghaddam et al., 2018)

Phénotype	Inducteurs	Cytokines et médiateurs sécrétés	Marqueurs membranaires	Propriétés
M1	IFN γ , TNF α , LPS	IL10 ^{low} , IL12 ^{high} , IL23, TNF α , IL1 β , IL6, IL27, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, ROS	CD80, CD86, CD68, CMH-II, IL-1R, TLR2, TLR4	Pro-inflammatoire, antitumoral
M2a	IL-4, IL-13	IL10, TGF β , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24, IL1ra	CD11b, CD206, IL-1RII	Anti-inflammatoire, réparation tissulaire
M2b	Complexes immuns, agonistes aux TLRs, IL1 β	IL10 ^{high} , IL12 ^{low} , TNF α , IL1 β , IL6, IL10, CCL1	CD86	Immuno-régulation
M2c	IL10, glucocorticoïdes	IL10, TGF β , CCL16, CCL18, CXCL13	CD206, TLR1, TLR8	Phagocytose de cellules apoptotiques

Le tableau 1, ci-avant, reprend ces particularités retrouvées au niveau de l'expression de marqueurs membranaires, de la sécrétion cytokinique et des propriétés biologiques qui permettent la caractérisation des différents phénotypes.

Cependant, même une fois polarisé, un macrophage peut voir son phénotype modulé pour un autre si le microenvironnement cytokinique est modifié. De plus, *in vivo*, il n'y a pas séparation nette entre les différentes sous-populations macrophagiques. A un temps donné, il existerait plutôt une importante mixité de phénotypes étendus sur un large spectre en fonction de la distribution des différents marqueurs (Mosser and Edwards, 2008).

1.2. Transduction du signal inflammatoire

L'inflammation, qu'elle soit aiguë suite à une infection bactérienne ou chronique dans les cancers ou pathologies auto-immunes, est médiée par différents acteurs moléculaires au sein des cellules cibles. Les initiateurs de la réponse inflammatoire sont les ligands qui, en se fixant à leurs récepteurs exprimés à la surface des cellules, activent des voies de signalisation spécifiques. Ces voies de signalisation permettent l'activation de gènes cibles caractéristiques de la réponse inflammatoire. Suite à l'activation de ces voies de signalisation, différents mécanismes sont mis en œuvre par la cellule afin de les réguler négativement et permettre de retourner à un état basal.

1.2.1. Ligands, initiateurs de la réponse inflammatoire

1.2.1.1. Liaison extracellulaire du LPS

Le LPS est un constituant majeur de la paroi des bactéries Gram-négative.

Il est composé de 3 parties : une chaîne antigène-O, un domaine core et un lipide A. Le lipide A, ou endotoxine, compose le feuillet externe de la membrane externe des bactéries Gram-négative et sert d'ancre au LPS (Figure 2). Cette région étant la seule reconnue par le système immunitaire adaptatif, c'est elle qui est responsable de la toxicité du LPS.

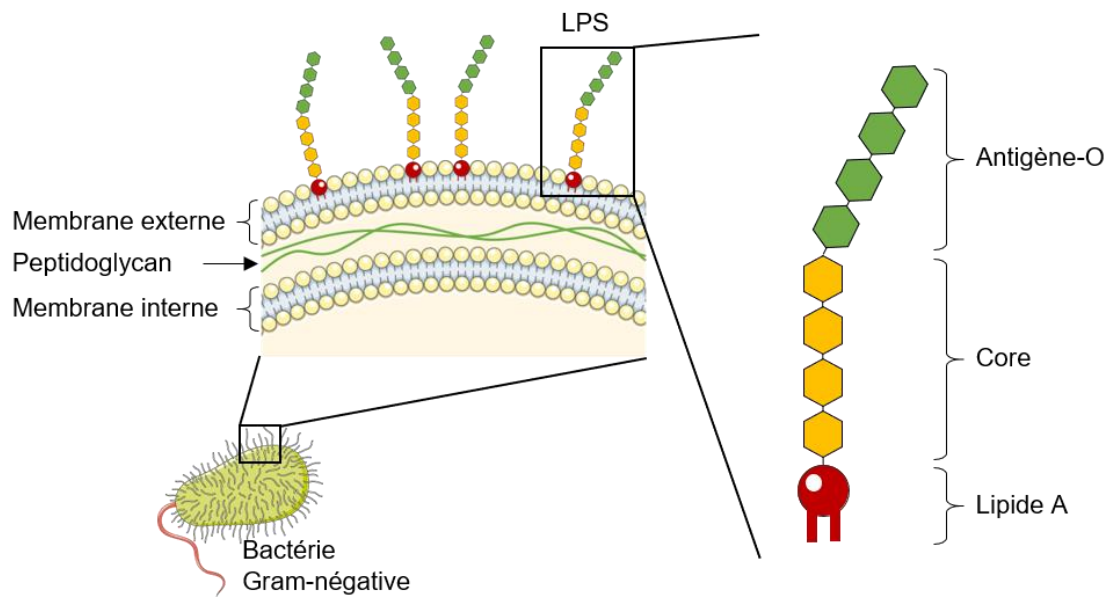


Figure 2 : Représentation de la structure du LPS (D'après Bidne et al., 2018)

C'est par cette région que le LPS est reconnu par un complexe multimérique constitué de quatre protéines que sont LBP (pour LPS-Binding Protein), CD14, MD-2 et TLR4, chacune présente en deux exemplaires. Décrite pour la première fois en 1986 (Tobias et al., 1986), LBP est initialement montrée comme facilitant la liaison du LPS aux macrophages (Wright et al., 1989) et constitue, sous sa forme soluble, un complexe de haute affinité avec le LPS via la région lipide A. Elle favorise le transfert au CD14, fixé à la membrane par une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (Wright et al., 1990). Le complexe LBP/CD14 facilite et renforce la liaison de LPS au récepteur. Le récepteur est alors constitué d'une protéine adaptatrice soluble MD-2 qui lie le LPS et s'associe au TLR4 (Shimazu et al., 1999; Visintin et al., 2001) (Figure 3).

1.2.1.2. Les cytokines inflammatoires

Les cytokines sont des protéines de signalisation qui permettent la communication entre les cellules les ayant produites en réponse à de nombreux stimulus et les cellules cibles. Ces cellules cibles peuvent être les cellules productrices, des cellules voisines ou des cellules distantes, on parle respectivement d'effet autocrine, paracrine et endocrine. La signalisation se fait généralement par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques exprimés à la surface des cellules cibles. La capacité de réponse d'un type cellulaire à un stimulus est dictée par le degré d'expression d'un certain type de récepteur membranaire à sa surface.

Cette superfamille compte de nombreux membres tels que les interleukines et les TNF, principalement représentés par l'IL1 β , l'IL6 et le TNF α et impliqués dans l'induction de la fièvre, l'activation des phagocytes, la production des protéines de la phase aiguë ainsi que l'activation des cellules endothéliales et la réparation tissulaire. Cette superfamille regroupe aussi les interférons qui réduisent la sensibilité des cellules à l'infection virale et sont impliqués dans l'activation des phagocytes, des cellules cytotoxiques et dans la stimulation de l'expression des molécules du CMH ; les facteurs de croissance et les chimiokines, molécules chimiotactiques régulant le recrutement des cellules immunitaires.

D'un point de vue structurel, ce sont des protéines glycosylées de faible poids moléculaire. D'un point de vue fonctionnel, les cytokines sont pléiotropes et redondantes. En effet, une même cytokine peut intervenir dans de nombreux processus biologiques différents et cibler un large nombre de types cellulaires. De plus, des réponses moléculaires et/ou phénotypiques identiques peuvent être dues à des cytokines différentes. Elles permettent ainsi une régulation fine de la réponse immunitaire. Une dérégulation de cet équilibre favorise l'établissement et/ou le développement d'un certain nombre de pathologies notamment auto-immunes, cardiovasculaires et de cancers.

De par la complexité que représente l'ensemble de cette vaste famille protéique, ne seront mentionnées ci-dessous que les cytokines nécessaires à l'appréhension des travaux effectués.

(i) L'IL1 β

La superfamille des ligands IL1 est composée de onze membres, parmi lesquels il y a sept agonistes pro-inflammatoires (IL1 α , IL1 β , IL18, IL33, IL36 α , IL36 β et IL36 γ), trois antagonistes (IL1ra, IL36ra et IL38) et une cytokine anti-inflammatoire (IL37).

L'IL1 β , décrite pour la première fois comme membre de cette superfamille dans les années 80, est produite majoritairement par les monocytes circulants, macrophages et cellules

dendritiques sous forme de pro-IL1 β inactive. Cette forme de 31 kDa est clivée par la caspase 1 activée par l'inflammasome, pour donner une forme active de 17 kDa. En conditions normales, parallèlement à son rôle dans l'activation des lymphocytes T, elle est impliquée dans des processus homéostatiques tels que la régulation du sommeil ou de la température corporelle. De façon pathologique, elle joue un rôle majeur dans les infections de par ses propriétés pyrogéniques et dans l'inflammation aiguë et chronique. Elle est retrouvée surexprimée dans un certain nombre de pathologies inflammatoires et auto-immunes, infectieuses ou dégénératives ainsi que dans les cancers (Garlanda et al., 2013; Ren and Torres, 2009; Sims and Smith, 2010).

(ii) *Le TNF α*

La superfamille du TNF comprend 19 ligands connus actuellement. Parmi ceux-ci, le TNF α , décrit dans les années 80, est particulièrement étudié pour son rôle dans la réponse inflammatoire. Le TNF α est produit sous forme d'homotrimère transmembranaire retrouvé à la surface des monocytes, macrophages et lymphocytes (Tang et al., 1996). Suite au clivage protéolytique par des protéases, la forme soluble constituée de trois sous-unités identiques de 17 kDa joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire. De façon similaire à l'IL1 β , le TNF α est retrouvé surexprimé dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes ainsi que les cancers (Aggarwal, 2003; Croft and Siegel, 2017).

(iii) *L'IL6*

Également identifiée dans les années 80, l'IL6 est une protéine de 26 kDa sécrétée principalement par les monocytes/macrophages et les cellules épithéliales en réponse à une infection ou une inflammation. De façon physiologique, elle est impliquée dans la régulation du système immunitaire, notamment le développement et l'activation des lymphocytes et la différenciation des monocytes en macrophages, du métabolisme, de la fonction neuronale et dans la régénération hépatique. Du point de vue pathologique, elle est associée au risque de développement de pathologies cardiovasculaires. Au niveau hépatique, elle stimule les

hépatocytes, ce qui a pour effet de produire des protéines de la phase aiguë. De plus, elle participe à la pathogénèse de diverses maladies inflammatoires auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et la sclérodermie systémique, ainsi que des cancers, dans lesquels elle est retrouvée comme étant surexprimée (Schett, 2018; Tanaka and Kishimoto, 2014).

(iv) *L'IFN β*

Il existe trois types d'IFNs. Au sein des IFN de type I on compte six protéines chez l'Homme, parmi lesquelles l'IFN β . Mis en évidence à la fin des années 1950 grâce à ses propriétés antivirales, l'IFN β joue un rôle dans un grand nombre de processus pour le développement et la modulation du système immunitaire. Il est majoritairement produit par les macrophages et les cellules dendritiques et intervient dans le développement des cellules NK, des lymphocytes B et T et des macrophages. En plus de son rôle dans la régulation du système immunitaire, l'IFN β montre des propriétés antiprolifératives et bloque la prolifération tumorale. Il est retrouvé, de façon dérégulée, impliqué dans l'infection chronique et les cancers, et de façon similaire aux cytokines précédemment décrites dans un certain nombre de pathologies auto-immunes.

L'IL1 β , le TNF α , l'IL6 et l'IFN β sont tous les quatre induits en réponse à différents stimulus inflammatoires faisant intervenir un certain nombre de voies de signalisation. Parmi celles-ci, on peut notamment mentionner les voies NF κ B (nuclear factor-kappa) et JAK-STAT, qui sont aussi celles utilisées pour transduire le signal propre à ces cytokines.

1.2.2. Voie NF κ B : Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire

1.2.2.1. Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire.

La réponse inflammatoire, contrôlée et aiguë ou dérégulée et chronique, nécessite la transduction du signal depuis la circulation jusqu'aux cellules cibles. Ainsi, le LPS et les

cytokines retrouvés au niveau systémique ou de tissus lésés, induisent une réponse inflammatoire différente et particulière en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques.

(i) *Superfamille TLR/IL1R*

La superfamille des récepteurs IL-1R/TLR est caractérisée par la présence d'un domaine Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) en intracytoplasmique, permettant la transduction du signal. Depuis les années 1990, dix TLRs ont été identifiés chez l'Homme. Ce sont des protéines de 80 à 120 kDa, constituées d'un domaine extracellulaire en région N-terminal, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique TIR en région C-terminal.

Tableau 2 : TLRs et ligands associés chez l'Homme (D'après Akira et al., 2006; Kawai and Akira, 2010; Yu et al., 2010)

TLRs	Localisation	Ligands dérivés de PAMPs	Ligands endogènes	Ligands synthétiques
TLR1/2	Membranaire	Bactéries : Lipoprotéines (Gram-)	-	Pam ₃ CSK ₄
TLR2	Membranaire	Bactéries : Lipoprotéines, glycolipides, peptidoglycane, porines Levures : Glycolipides Parasites : GPI, Virus : Protéines d'enveloppe	Amyloid-β; HMGB1; MEC; Ox-LDL; Versican	-
TLR2/6	Membranaire	Bactéries : Lipoprotéines (Gram+), glycolipides Levures : Zymosane (glycoprotéine)	-	MALP2
TLR3	Endosome	Virus : dsRNA, ssRNA	ARNm	Poly(I:C)
TLR4	Membranaire	Bactéries : LPS Levures : Mannane, Parasites : Glyco-inositol-phospholipides Virus : Protéines d'enveloppe	Amyloid-β; β-defensin 2; Fibrinogène; HMGB1; Hsp; MEC; Ox-LDL; Ox-phospholipide; surfactant protein A; tenascin-C	Lipides A
TLR5	Membranaire	Bactérie : Flagellin	-	-
TLR8	Endosome	Virus : ssRNA	ARN du soi; myosine	Imiquimod; R-848
TLR9	Endosome	Bactéries et virus : CpG-DNA Parasites : Hemozoine Virus : dsDNA	ADN du soi; HMGB1	CpG-ODN
TLR10	Endosome	-	-	-

La présence de motifs leucine en extra-cellulaire confère au récepteur une forme en fer à cheval et permet la reconnaissance de pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), issus de microorganismes (Janeway, 1989), et de danger-associated molecular patterns (DAMPs) provenant de tissus endommagés.

Chaque TLR, qu'il soit membranaire ou localisé dans des vésicules intracellulaires, s'associe à un ligand qui lui est spécifique (Tableau 2) et ainsi permet, *via* son domaine cytoplasmique TIR, la transduction du signal qui conduit à la production de cytokines inflammatoires provoquant une réponse inflammatoire aiguë.

La signalisation TLR4

TLR4 est le premier TLR à avoir été décrit (Medzhitov et al., 1997), avant même d'être montré comme étant le récepteur au LPS (Poltorak et al., 1998). La liaison du LPS permet une homodimérisation du récepteur puis le recrutement de protéines adaptatrices, en intracellulaire, par les domaines cytoplasmiques TIR des TLRs. Ces domaines TIR, communs aux TLRs et aux récepteurs IL-1R, sont indispensables à la transduction du signal TLR4.

En fonction de la localisation cellulaire du TLR4, deux voies de signalisation se distinguent distinctes, respectivement dépendante et indépendante de la protéine myeloïd differentiation factor 88 (MyD88) (Figure 3).

La voie dite « MyD88-dépendante » est activée par les TLR4 exprimés à la surface de la cellule. Suite à la dimérisation du récepteur, la protéine adaptatrice MyD88-adaptor-like (Mal) (Horng et al., 2001) est recrutée sur le site *via* son domaine TIR (Fitzgerald et al., 2001). Cette protéine, dont le domaine PIP2 l'ancre à la membrane (Kagan and Medzhitov, 2006), sert d'adaptateur à MyD88 avec laquelle elle forme un hétérodimère (Dunne et al., 2003). L'interaction entre les deux protéines se fait par leurs domaines TIR respectifs. La protéine MyD88 ainsi localisée et stabilisée au niveau du récepteur sert alors de plateforme de recrutement aux protéines effectrices que sont les IL-1-associated kinases (IRAKs), avec lesquelles elle interagit pour former un large complexe protéique appelé myddosome.

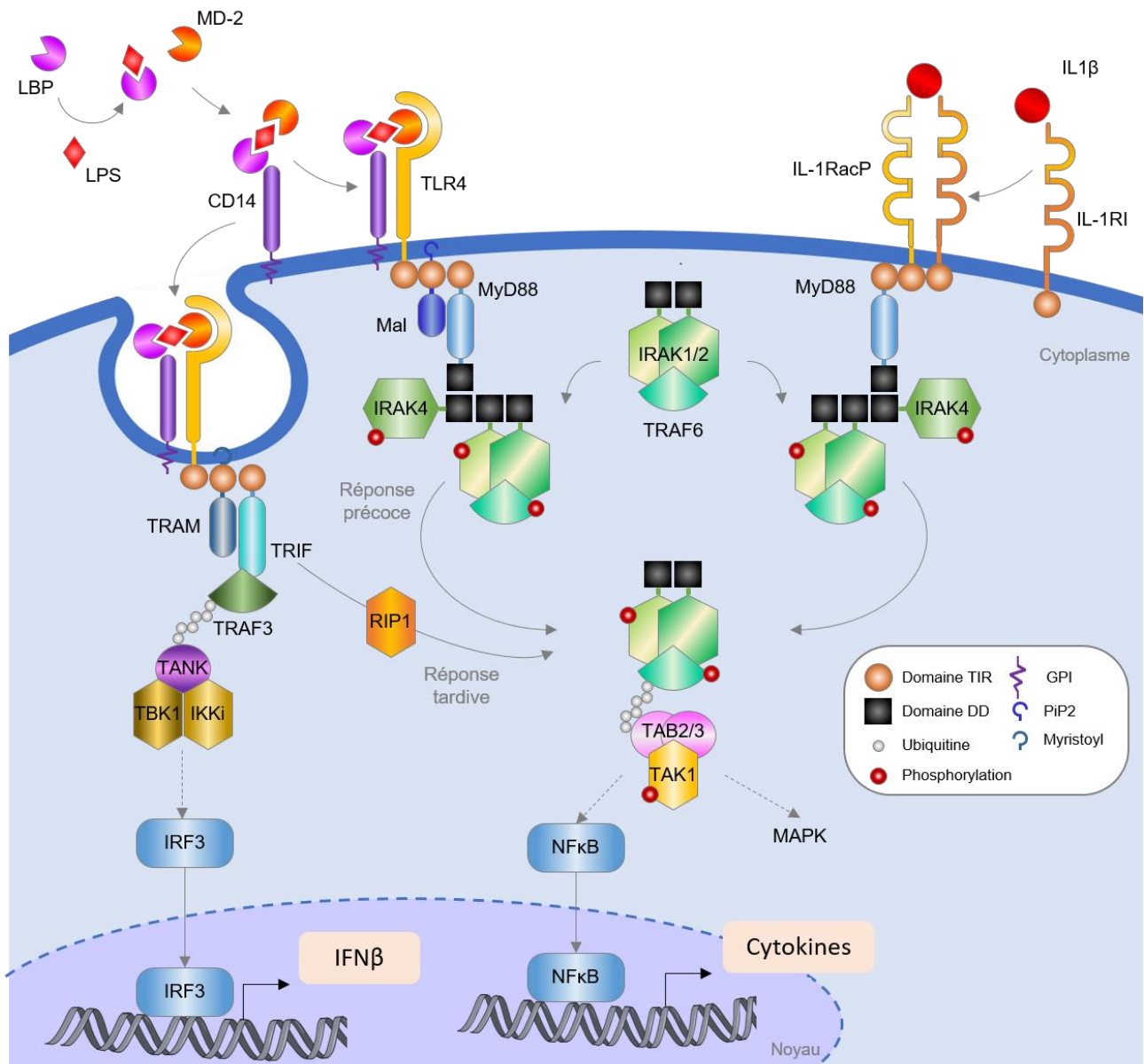


Figure 3 : Schéma de la signalisation du LPS et de l'IL1β par leurs récepteurs spécifiques

L'assemblage du myddosome se fait par les domaines death-domain (DD) des différents constituants du complexe que sont MyD88, IRAK4 et IRAK2, et permet une proximité des domaines kinase des IRAKs, facilitant ainsi leur phosphorylation (Lin et al., 2010). La kinase IRAK4, directement associée à MyD88 et activée par une autophosphorylation (Ferrao et al., 2014), permet le recrutement du complexe IRAK1/IRAK2/TRAF6. Il en découle une cascade de phosphorylations activatrices de IRAK1 puis de TNF-receptor-associated-factor (TRAF) 6. TRAF6 est une E3 ubiquitin-ligase dont l'association aux E2 ubiquitin-ligase Ubc13/Uev1A engendre son activation et une auto-ubiquitylation. Le complexe alors activé se dissocie d'IRAK4. L'ubiquitylation particulière de TRAF6 en lysine 63 (Lys63-polyUb) sert de plateforme

d'ancrage à un nouvel ensemble de protéines, notamment la kinase TAK1, carrefour de signalisation vers les voies NFκB et MAPK (Mitogen-activated protein kinases).

La protéine TGFβ-activated kinase (TAK) 1 est constitutivement associée à TAK1-binding protein (TAB) 1, nécessaire à son activité kinase. Les domaines en doigt de zinc des adaptateurs TAB2 et TAB3 leur permettent de se fixer à la chaîne d'ubiquitines de TRAF6 et d'y recruter TAK1 (Kanayama et al., 2004). Cette interaction avec la chaîne de poly-ubiquitines permet l'activation par autophosphorylation de TAK1 (Wang et al., 2001) qui entraîne l'activation des voies de signalisation des MAPK et NFκB. Ceci conduit à l'expression de cytokines inflammatoires suite à la translocation nucléaire des facteurs de transcription AP (pour activator protein)-1 et NFκB.

La voie dite « MyD88-independante » est, quant à elle, activée par les TLR4 retrouvés au niveau des endosomes. En effet, l'internalisation du complexe protéique CD14/TLR4/MD2/LPS est nécessaire à l'activation de cette voie (Kagan et al., 2008). La protéine adaptatrice TRAM (pour TRIF-related adaptor molecule), associée à la membrane par un groupement myristoyl et recrutée au niveau du complexe, contient un domaine TIR qui lui permet de d'interagir avec TLR4 et de recruter la protéine TIR domain-containing adaptor-inducing IFNβ (TRIF) (Rowe et al., 2006). TRAF3 s'associe alors au complexe, s'auto-ubiquityle pour former une chaîne de Lys63-polyUb servant d'ancrage au complexe TBK (TANK-binding kinase)-1/IKKi (inducible IκB kinase) grâce à la protéine adaptatrice TANK (pour TRAF family member-associated NFκB activator). Les kinases TBK1 et IKKi permettent la phosphorylation activatrice de l'interferon response factor (IRF)-3 qui « transloque » au noyau pour induire l'expression de l'IFNβ (Fitzgerald et al., 2003).

Cette voie est aussi connue pour induire une réponse NFκB tardive (Cusson-Hermance et al., 2005) *via* la kinase RIP (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase)-1 qui s'associe à TRIF et active le complexe IRAK1/IRAK2/TRAF6 (Ofengeim and Yuan, 2013).

De la même façon que les TLRs, les IL-1Rs sont des protéines transmembranaires dotées d'un domaine TIR en région C-terminal. Ils diffèrent des TLRs de par leur région extracellulaire qui comprend trois domaines immunoglobuline (Ig). Depuis la fin des années 80, six membres ont été mis en évidence et identifiés comme récepteurs aux IL1 α/β , à l'IL18, à l'IL33 et aux IL36 α/β et γ (Figure 4-A). On compte, de plus, trois récepteurs orphelins (Figure 4-B) et deux membres dépourvus de domaine TIR, IL-1R2 et IL-18BP, qui agissent respectivement comme récepteurs leurres à l'IL1 et l'IL18 (Figure 4-C).

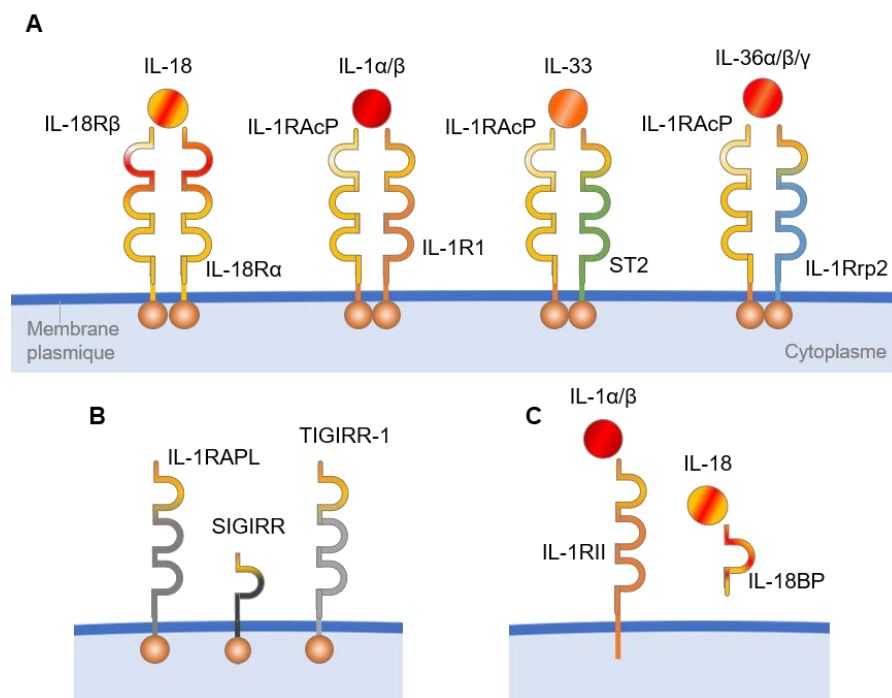


Figure 4 : Représentation des récepteurs IL-1R et leurs ligands (D'après O'Neill, 2008)

La signalisation IL-1RI

Le récepteur de type I à l'IL1 (IL-1RI) de 80 à 85 kDa, mis en évidence à la fin des années 80, est constitué de trois domaines Ig en N-terminal, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique TIR en C-terminal. Il fixe sans distinction d'affinité les isoformes IL1 α et IL1 β . Cette affinité de liaison est augmentée par la formation d'un hétérodimère avec la seconde chaîne du récepteur, IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP). Suite, à la formation de ce complexe, MyD88 est recrutée, *via* une interaction TIR-TIR, au niveau d'IL-1RAcP, sans qui le signal n'est pas transmis. S'en suit alors la formation du complexe protéique avec les IRAKs,

de façon tout à fait identique à la voie MyD88-dépendante du TLR4, conduisant à l'activation de NFκB et AP-1 (Figure 3).

(ii) *Le TNFR1*

La famille des TNFR comprend actuellement 29 récepteurs connus dont les 2 les plus étudiés sont TNFR1 et TNFR2.

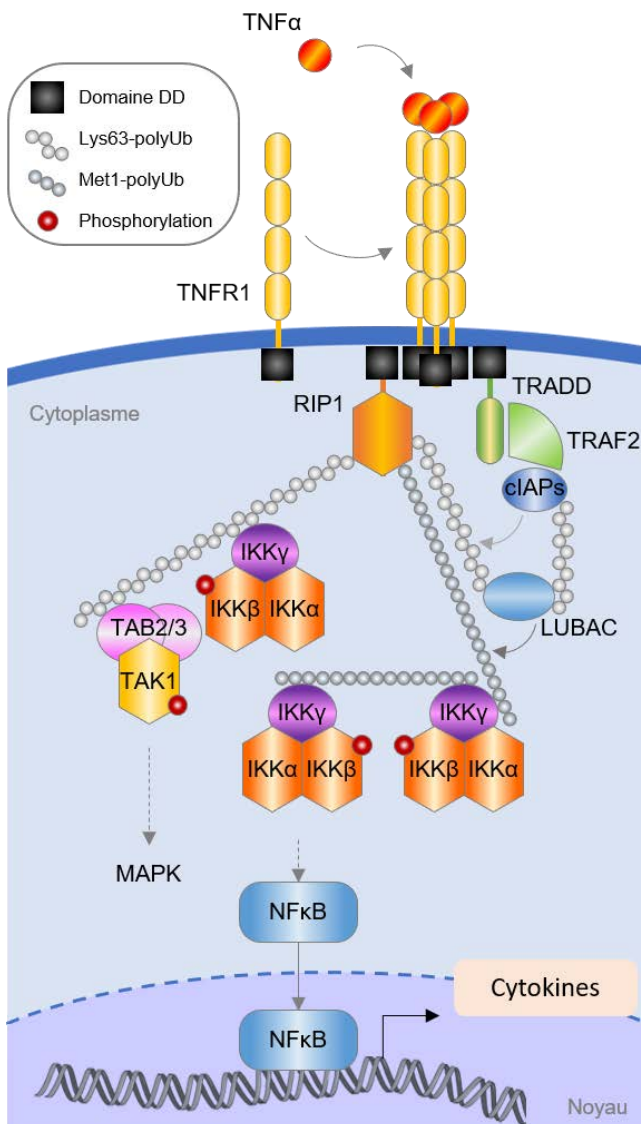


Figure 5 : Schéma de signalisation du TNFR1 (D'après Seo et al., 2019; Shi and Sun, 2018; Wertz, 2014)

Ce complexe protéique constitué de TNFR1, TRADD, RIP1 et TRAF2 est appelé Complexe I. Au sein de ce complexe, la kinase RIP1 joue seulement un rôle de plateforme. En effet, son activité kinase n'est aucunement nécessaire au recrutement ou à l'activation des membres de la voie de signalisation (Brenner et al., 2015). TRAF2 permet le recrutement des protéines

Le TNFR1 est une protéine transmembranaire de 55 à 60 kDa constituée en extracellulaire, de 4 domaines riches en cystéines en région N-terminale, permettant la reconnaissance du ligand, un domaine intermembranaire, et un domaine DD intracytoplasmique en C-terminal.

La liaison du TNFα au TNFR1 sous sa forme trimérique, entraîne un changement de conformation des domaines cytoplasmiques du récepteur, permettant le recrutement de la protéine adaptatrice TNFR-associated death domain protein (TRADD) par son domaine DD. Ce même domaine favorise le recrutement de RIP1 qui à son tour recrute TRAF2 (Figure 5).

activatrices de la voie, les E3 ligases cIAPs (pour cellular inhibitor of apoptosis proteins). Une fois sur le site, les cIAPs forment des chaînes de Lys63-polyUb au niveau de RIP1 et des cIAPs elles-mêmes. Ces chaînes permettent le recrutement de différents partenaires que sont TAK1 *via* TAB2, le complexe I κ B Kinase (IKK) activateur de NF κ B, et le linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), une E3 ligase qui renforce la stabilité du complexe en catalysant la formation de chaînes de méthionine (Met)¹-polyUb linaires sur RIP1. De façon similaire à ce qui est observé dans la signalisation IL1R/TLR, la fixation de TAB2 aux Lys63-polyUb induit l'activation de TAK1, conduisant à l'activation de NF κ B et la voie MAPK.

1.2.2.2. Activation du facteur de transcription NF κ B

(i) Structure

La famille de NF κ B est constituée de 5 membres nommés p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF κ B1) et p100/52 (NF κ B2). Tous partagent en N-terminal un domaine RHD (pour Rel homology domain) impliqué dans leur dimérisation, leur interaction avec I κ B et leur fixation à l'ADN. En plus de ce domaine, p65, RelB et c-Rel présentent un domaine de transactivation (TAD) nécessaire à la transcription des gènes cibles.

Les deux membres classiquement impliqués dans la réponse à un stimulus inflammatoire sont p65 et p50 associés sous forme d'hétérodimère. La forme latente du complexe NF κ B est composé de p65, p50 et de I κ B, la sous-unité inhibitrice du complexe.

(ii) Activation

NF κ B doit son activation au complexe IKK constitué d'une sous-unité adaptatrice IKK γ et de 2 sous-unités activatrices IKK α et IKK β . L'activation du complexe IKK nécessite la phosphorylation de IKK β par TAK1. De façon similaire dans les signalisations IL1R/TLR et TNFR, TAK1 est recrutée sur le site grâce à l'interaction de sa protéine adaptatrice TAB2 avec une chaîne de Lys63-polyUb.

Dans la voie de IL1R, cette même chaîne, suite à une hybridation par LUBAC avec une chaîne Met1-polyUb linéaire (Cohen and Strickson, 2017), permettrait le recrutement du complexe IKK *via* sa sous-unité adaptatrice IKK γ (Shi and Sun, 2018). Cette hypothèse est soutenue par le fait que IKK γ , montre une affinité 100 fois plus importante pour les chaînes d'ubiquitylation en Met1 plutôt qu'en Lys63. Dans la signalisation TNFR1, la sous-unité IKK γ peut elle-même subir une poly-ubiquitylation en Met1, ce qui semblerait favoriser le recrutement et l'auto activation de plusieurs complexes IKK (Seo et al., 2019). Dans les deux cas, ces différents types d'échafaudage offre une proximité entre TAK1 et la sous-unité IKK β , favorisant ainsi la phosphorylation activatrice du complexe IKK.

I κ B, dont l'association au complexe masque le NLS (nuclear localisation sequence) de p65 mais pas celui de p50, porte un NES (pour nuclear export signal). L'exposition simultanée de ces deux séquences permet le transit constant du complexe entre le cytoplasme et le noyau. La chaîne de K48-polyUb générée suite à la phosphorylation par IKK β , induit le recrutement du protéasome et la dégradation de I κ B. Cette protéolyse permet d'une part de révéler le NLS de p50 et d'autre part la dégradation du NES. Le déplacement de cet équilibre dynamique conduit à la rétention nucléaire de NF κ B, qui induit alors l'expression de gènes cibles impliqués dans les réponses immunitaire et inflammatoire (Figure 6).

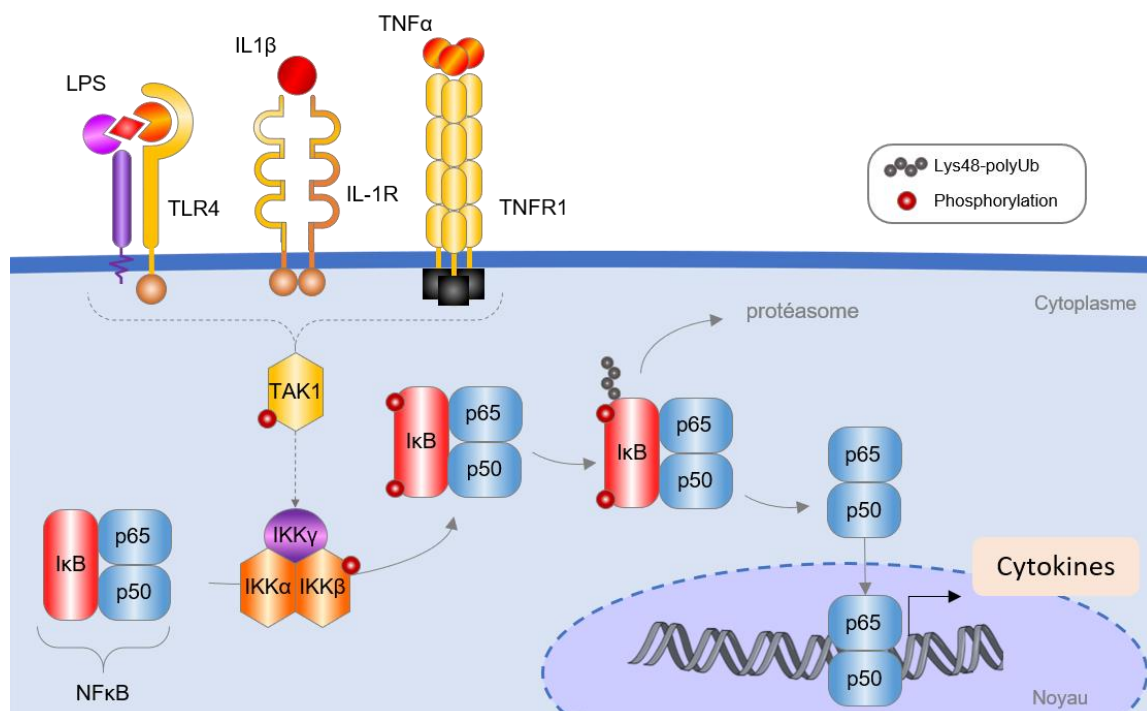


Figure 6 : Schéma de signalisation de la voie NF κ B

1.2.3. Voie JAK-STAT : Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire

La famille des JAKs (pour Janus kinases) compte quatre membres, JAK1, JAK2, JAK3 et TYK (pour tyrosine kinase)-2, identifiés dans le début des années 90. Les JAKs sont des tyrosines kinases de 120-130 kDa possédant un domaine de liaison au récepteur en N-terminal et en C-terminal un domaine à activité tyrosine-kinase Jak homology (JH) 1 très conservé, ainsi qu'un domaine pseudo-kinase JH2 impliqué dans l'auto-inhibition de l'activité kinase. Suite à la liaison de la cytokine, la dimérisation de son récepteur provoque un changement de conformation de la région cytoplasmique à laquelle s'associent les JAK, favorisant la juxtaposition des domaines JH1 et l'autophosphorylation des JAKs.

Les ligands (cytokines, facteurs de croissance et hormones) dont le signal est transduit par la voie JAK-STAT sont nombreux (Tableau 3). Ainsi, on retrouve différentes combinaisons d'homo- ou hétérodimères propres à chaque récepteur et induisant l'activation spécifique de différents STATs.

Tableau 3 : Liste de ligands connus pour activer les différents JAKs et STATs (Abroun et al., 2015)

Cytokines	Interferons			gp130 family			βc family		γc family		Homodimeric receptors			GPCRs	
	Type I IFNα/β	Type II IFN γ	Type III IL-10	IL-6, 11, LIF, G-CSF, OSM	IL-12	Leptin	IL-3, IL-5, GM-CSF	IL-2, 7 IL-9, 15	IL-4	IL-13	GH	EPO Prl	TPO	Angi.	Serot.
JAK1	*	*	*	*				*	*	*					
JAK2		*		*	*	*	*				*	*	*	*	*
JAK3								*	*						
TYK2	*		*	*	*					*					*
STAT1	*	*	*	*				*			*		*	*	*
STAT2	*														*
STAT3	*		*	*		*		*			*		*	*	*
STAT4					*			*							
STAT5a/b	*	*		*			*	*			*	*	*	*	*
STAT6									*	*					

IFN; Interferon, IL; Interleukin, βc family; Common beta receptor subunit, γc family; Common gamma receptor subunit, G-CSF; Granulocyte colony stimulating factor, GH; Growth hormone, GM-CSF; Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, EPO; Erythropoietin, TPO; Thrombopoietin, Prl; Prolactin, Angi.; Angiotensin, Serot.; Serotonin, *; Activation by cytokine, LIF; Leukemia inhibitory factor, GPCRs; G-protein-coupled receptors and TYK2; Tyrosine kinase 2.

1.2.3.1. Activation des récepteurs et signalisation intracellulaire

(i) L'IL6R

Le récepteur à l'IL6 est une protéine transmembranaire comprenant deux chaînes.

La chaîne α de 80 kDa, appelée IL6R α , constituée d'un domaine Ig en N-terminal, une région CBM (pour cytokine binding module) constituée de deux domaines fibronectine de type III-like (FNIII) permettant le recrutement de l'IL6, un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique, non impliqué dans la transduction du signal, en C-terminal. IL6R α est seulement exprimé à la surface des hépatocytes et de certains leucocytes et induit la signalisation dite « classique ».

La protéine gp130 de 130 kDa, formant la chaîne β du récepteur, assure la transduction du signal. Sa structure est relativement similaire à celle de l'IL6R α puisqu'elle comprend un domaine Ig en N-terminal, une région CBM aussi constituée de deux domaines FNIII, un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique en C-terminal. Cependant, gp130 diffère de IL6R α sur plusieurs points. Notamment, la région CBM de gp130, qui est suivie de trois domaines FNIII, n'a de forte affinité de liaison qu'avec le complexe IL6-IL6R α , mais ne lie ni l'IL6 libre ni IL6R α libre. De plus, sa région intracytoplasmique sert de plateforme aux protéines activatrices de la voie. Aussi, cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire et sert à de nombreuses cytokines (Hunter and Jones, 2015).

Le récepteur IL6R α se retrouve aussi sous forme soluble (sIL6R) dans la circulation. Cette forme de 50 kDa est principalement produite suite au clivage protéolytique des formes membranaires par les métalloprotéases ADAM10 et ADAM17 à la surface des monocytes et LT, mais aussi par épissage alternatif du transcrit IL6R. Ce récepteur soluble joue un rôle d'agoniste puisqu'il permet la transduction du signal en se liant à gp130 avec la même affinité que sa forme membranaire. La principale propriété de cette forme soluble est qu'elle permet à des cellules, n'exprimant pas le récepteur membranaire, de pouvoir toute de même répondre à un stimulus IL6, par « trans-stimulation » (Scheller et al., 2011) (Figure 7).

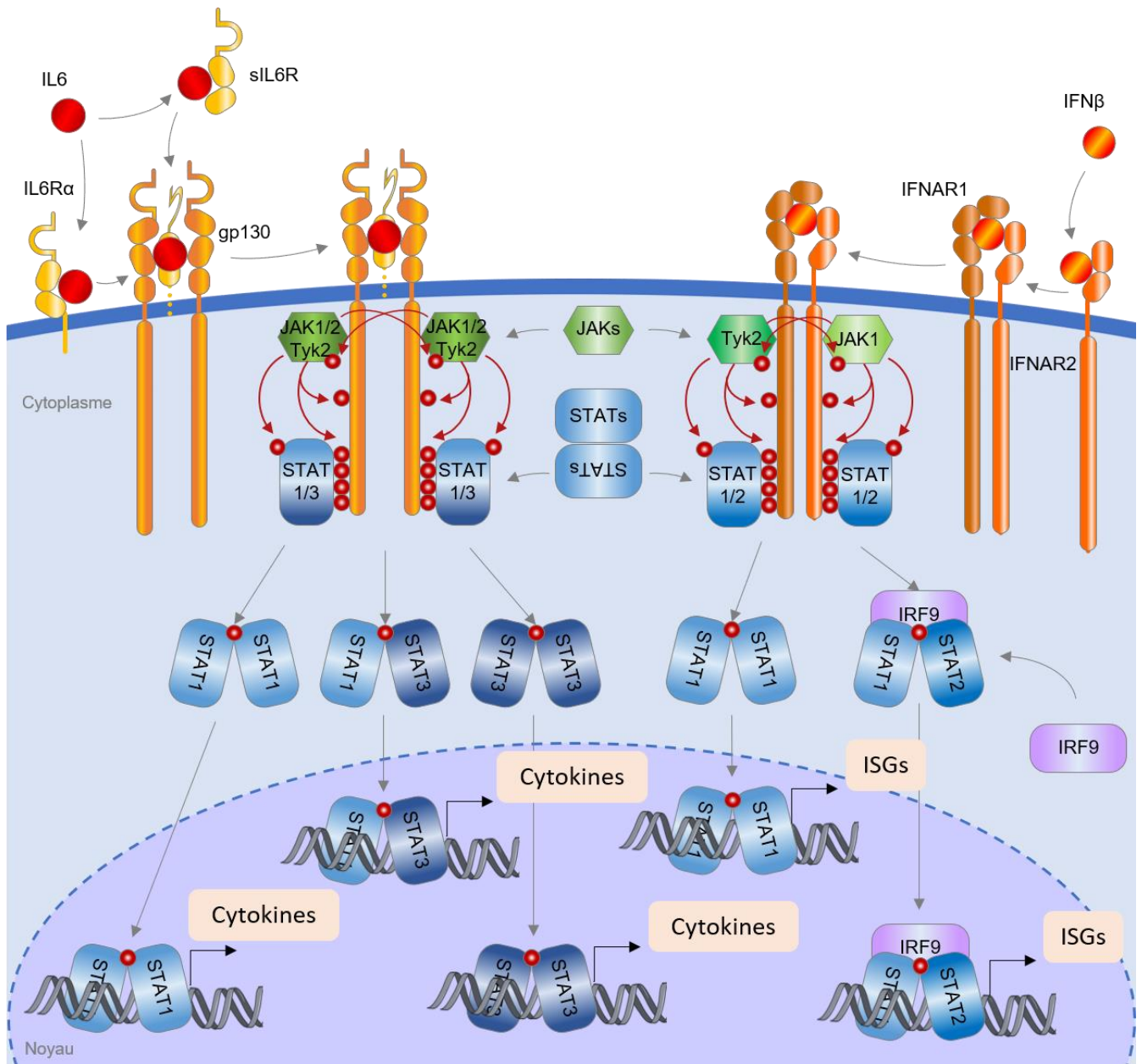


Figure 7 : Schéma de signalisation de la voie JAK-STAT (D'après Blaszczyk et al., 2016; Johnson et al., 2018)

D'un côté, la stimulation classique serait plutôt anti-inflammatoire avec un rôle important dans les processus centraux d'homéostasie, l'hématopoïèse, la régénération hépatique, la production hépatique de protéines de la phase aiguë et la défense contre les infections bactériennes. De l'autre, la trans-stimulation serait pro-inflammatoire et jouerait un rôle important dans différentes pathologies, notamment dans le microenvironnement tumoral en favorisant le recrutement lymphocytaire (Johnson et al., 2018). Cela s'expliquerait notamment d'un point de vue stœchiométrique. En effet, pour un IL6Rα exprimé à la surface cellulaire, on retrouve dix gp130. Dans ces conditions, l'IL6 ne peut conduire à l'activation que de quelques

gp130, induisant ainsi un signal de faible amplitude. Cependant, en cas d'inflammation ou d'infection, les taux d'IL6 circulante augmentent drastiquement pouvant passer du pg/mL à plus de 100 ng/mL. La forme soluble du récepteur, étant constitutivement en excès dans le plasma (50 à 80 ng/mL), peut alors se lier à l'IL6 circulante et, théoriquement, activer la totalité des gp130 présentes à la surface cellulaire, induisant ainsi un signal de très forte amplitude (Rose-John, 2017).

Pour en revenir à la signalisation proprement dite, l'association de deux gp130 au complexe IL6-IL6R α , comme au complexe IL6-sIL6R, induit alors le recrutement et l'activation par autophosphorylation de JAK1, JAK2 et/ou Tyk2. Suite à cette activation, les JAKs phosphorylent différents résidus tyrosines qui peuvent alors servir de points d'ancrage aux facteurs de transcription STATs, ainsi qu'à certains membres des voies ERK et Pi3K.

(ii) *L'IFNAR*

Le récepteur aux interférons de type 1 (IFNAR) est composé de deux membres. Les sous-unité IFNAR1 et IFNAR2 sont des protéines transmembranaires de, 120 kDa et 100 kDa respectivement, constituées de sous-domaines FNIII extracellulaires permettant la liaison du ligand en N-terminal, un domaine intermembranaire et un domaine cytoplasmique auquel s'associent Tyk2 et JAK1 en C-terminal (Weerd et al., 2007). IFNAR2 ayant une affinité plus importante qu'IFNAR1 pour les IFN de type I, c'est lui qui se lie à l'IFN β . L'activation du récepteur se fait alors par l'association de IFNAR1 au complexe IFN β -INFAR2. (Haji Abdolvahab et al., 2016).

De façon relativement similaire à la signalisation IL6, l'association des deux sous-unités du récepteur induit alors le recrutement et l'activation par autophosphorylation de JAK1 et Tyk2. Les JAKs ainsi activés phosphorylent différents résidus tyrosines servant au recrutement des facteurs de transcription STATs, et de certains membres des voies ERK (Platanias, 2005) et Pi3K (Kaur et al., 2008).

1.2.3.2. Transcription de gènes cibles par les STATs

La famille des STATs (pour signal transducers and activators of transcription) est constituée de sept membres que sont STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6.

(i) Structure

Les STATs sont des protéines de 30 à 110 kDa dont la structure 2D est aujourd'hui bien décrite : une région N-terminal, un domaine coiled-coil (CCD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) s'organisant en feuillets β identiques à ceux d'autres facteurs de transcription tels que NF κ B, un domaine de liaison, un domaine SRC homology 2 (SH2) impliqué dans leur recrutement au niveau des récepteurs et leur dimérisation, un site de phosphorylation et en C-terminal un domaine TAD (Shuai and Liu, 2003). Les formes latentes et inactives les plus décrites sont les monomères non-phosphorylés des STATs (u-STATs pour unphosphorylated-STATs). Cependant, de plus en plus de données tendent à montrer l'existence et l'importance, si bien en quantité qu'en fonctionnalité, d'homo- ou hétérodimères préformés et inactifs de u-STATs, associés en N-terminal, en conformation antiparallèle (Domoszalai et al., 2014; Mertens et al., 2006; Neculai et al., 2005) (Figure 8).

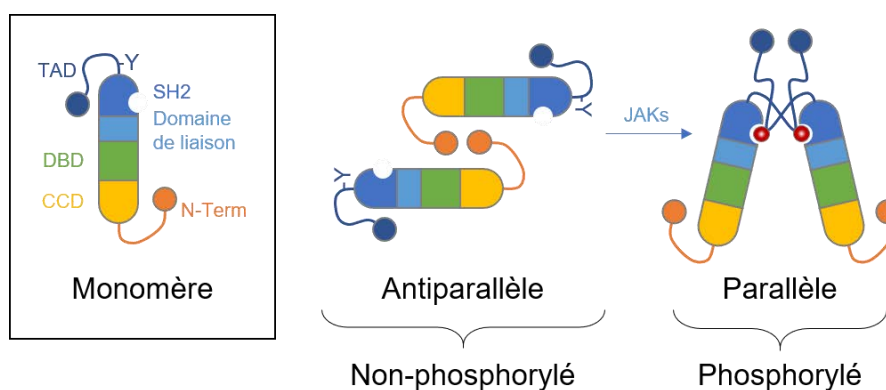


Figure 8 : Structure et dimérisation des STATs (D'après Domoszalai et al., 2014)

(ii) Activation

De manière générale l'activation des STATs se fait suite à leur recrutement grâce à l'interaction entre leurs domaines SH2 et les résidus tyrosines phosphorylées (pTyr) des récepteurs. Une fois recrutés sur le site, les STATs sont alors phosphorylés par les JAKs, ce qui permet leur homo- ou hétérodimérisation. La forme active des STATs nécessite une conformation en

dimères parallèles possible *via* l'interaction du domaine SH2 de l'un avec la pTyr de l'autre (Levy and Darnell, 2002).

Dans la signalisation IL6, la forme majoritairement retrouvée est l'homodimère de STAT3, bien que la formation d'hétérodimères STAT1-STAT3 ou d'homodimères de STAT1-STAT1 ait aussi été observée. Dans la signalisation IFN β , ce sont STAT1 et 2 qui sont phosphorylés par JAK1 et Tyk2. Ici, u-STAT2 est constitutivement associé à IRF9 par son CCD. Ainsi, l'hétérodimérisation avec STAT1 *via* les SH2, suite à la stimulation IFN de Type I, induit la formation du complexe ISGF (IFN stimulated gene factor)-3 constitué de STAT1-STAT2-IRF9. Des homodimères de STAT1 peuvent aussi se former suite à l'activation de cette voie.

Les dimères parallèles, activés quelle que soit la voie, sont alors reconnus par des complexes d'importines permettant la translocation nucléaire des STATs. Ce processus de transport serait hautement dynamique. En effet, il semblerait que des formes dimériques parallèles de u-STATs soient constitutivement présentes dans la cellule, reconnues par les complexes importines et continuellement en transit entre le cytoplasme et le noyau (Reich, 2013). Ce processus de navette serait alors déséquilibré par l'activation de la voie JAK-STAT comme cela a pu être observé pour STAT3 dont l'export est réduit suite à une stimulation IL6, conduisant ainsi à son accumulation dans le noyau (Pranada et al., 2004).

(iii) *Fixation aux éléments de réponse*

Une fois dans le noyau, les STATs vont pouvoir fixer deux types d'éléments de réponse. La majorité des stimulus vont induire la fixation d'homo- et d'hétérodimères aux éléments GAS (pour γ -activated sites) retrouvés au niveau du promoteur d'un large panel de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques, notamment la réponse l'inflammatoire et l'immunité. Parallèlement, en réponse aux interférons de type I, le complexe ISGF3 fixe les interferon-stimulated response element (ISRE), grâce à IRF9 qui porte le domaine de fixation à ces éléments de réponse, pour induire l'expression des ISGs (interferon-stimulated genes) largement impliqué dans la réponse immunitaire.

II. L'inflammation hépatique

Généralités

Le foie est le plus gros organe chez l'Homme, comptant pour 2 à 3 % de la masse totale du corps humain. De par son importante vascularisation, il effectue de nombreux échanges avec le sang. De ce fait, n'importe quel composé retrouvé dans la circulation est pris en charge par le foie. Ainsi, en plus de ses rôles dans la digestion et le métabolisme de composés endogènes, il joue un rôle primordial dans la détoxification des composés exogènes et, notamment, des médicaments.

II.1. Le foie, organisation fonctionnelle

II.1.1. Structure générale

Du point de vue structurel, le foie est divisé en deux lobes asymétriques entourés de tissu conjonctif. L'unité structurale du foie est le lobule hépatique. Cette structure hexagonale est composée, au centre, de la veine centro-lobulaire, et en périphérie, d'espaces porte constitués d'artères hépatiques, de veines portes et de canaux biliaires. Le sang fourni par l'artère hépatique, environ 20 à 25 % de l'apport sanguin hépatique, est riche en oxygène et provient de la circulation systémique (Figure 9, flèches rouges). En parallèle, 75 à 80 % de l'apport sanguin est effectué par le système porte qui distribue du sang provenant du système digestif (Figure 9, flèches bleues). Les sangs veineux et artériel se mélangent au niveau des capillaires sinusoides qui assurent la circulation de l'espace porte jusqu'à la veine centro-lobulaire et, de par l'endothélium fenestré qui les constituent, permettent une communication directe entre les hépatocytes et le sang. Au niveau du lobule hépatique et de façon opposée à la circulation sanguine au sein des capillaires, les canaux biliaires assurent la distribution de la bile vers les systèmes portes (Figure 9, flèches vertes).

Du point de vue fonctionnel, l'unité de base est l'acinus hépatique. Par cette organisation particulière en lobules, on observe une zonation métabolique des acini hépatiques, due aux différences d'activités métaboliques exercées par les hépatocytes en fonction de leur position.

La zone centrale de l'acinus (Figure 9, zone rouge la plus sombre), correspondant à la zone périportale du lobule, est spécialisée dans le métabolisme oxydatif et la néoglucogénèse alors que la zone périphérique centro-lobulaire (Figure 9, zone rouge la plus claire) assure préférentiellement la glycolyse et le métabolisme des xénobiotiques (Hijmans et al., 2014).

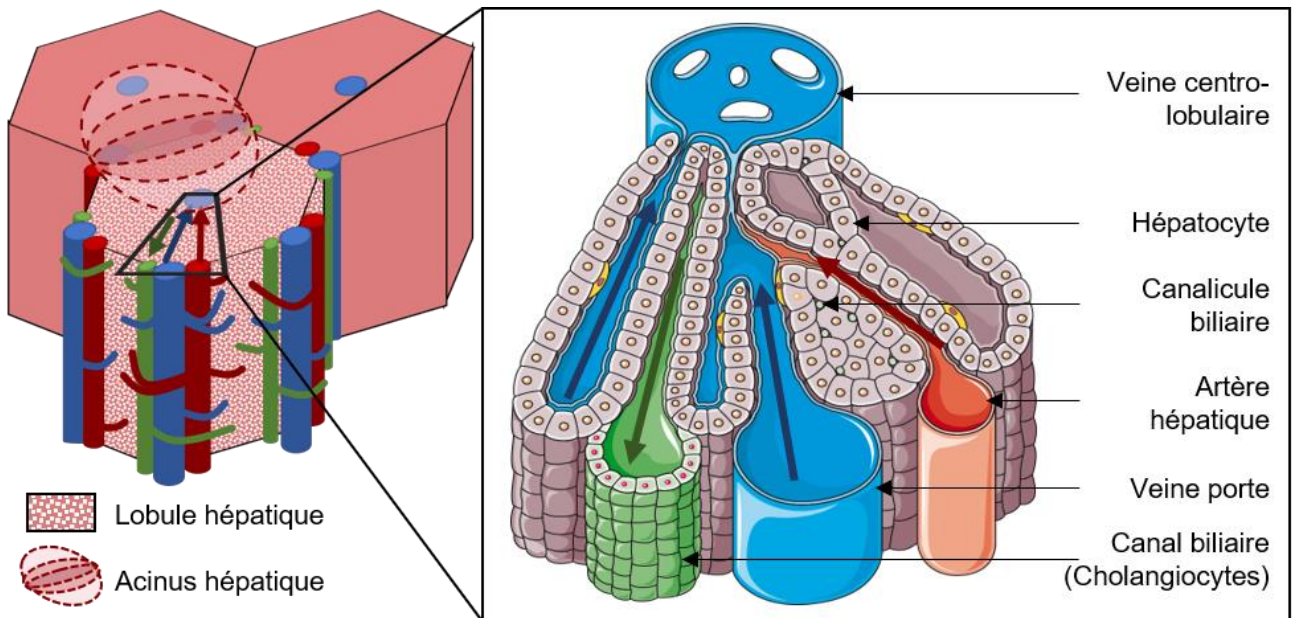


Figure 9 : Représentation de la structure du lobule et de l'acinus hépatique.

II.1.2. Les cellules hépatiques

Le foie est composé de cellules parenchymateuses, appelées LPC (pour Liver Parenchymal Cells) comprenant les hépatocytes et les cholangiocytes, et de cellules non-parenchymateuses. Les plus représentées sont les hépatocytes qui comptent pour 70 à 80 % du volume hépatique. Les hépatocytes sont des cellules épithéliales polarisées présentant un pôle sinusoidal, aussi appelé basolatéral, qui représente 85 % de la surface cellulaire et permet de nombreux échanges avec le sang, et un pôle canaliculaire, ou apical, assurant la sécrétion des acides biliaires ainsi que l'élimination de composés métabolisés. Ce sont les hépatocytes qui assurent la majorité des fonctions métaboliques du foie. Les cholangiocytes quant à eux forment les canaux biliaires et assurent la distribution de la bile vers l'intestin.

Au niveau du sinusoïde hépatique, on retrouve les cellules endothéliales formant les capillaires. Ces cellules forment une paroi endothéliale discontinue permettant aux hépatocytes d'être constamment en contact avec le sang au niveau de leur pôle sinusoïdal et ainsi de prendre en charge les nutriments ou xénobiotiques apportés par la veine porte. Les cellules non-parenchymateuses retrouvées au niveau du sinusoïde hépatique sont les cellules de Kupffer, qui sont les macrophages résidents du foie, et les cellules étoilées, présentes à l'état de quiescence en conditions normales et localisées dans l'espace de Disse (Figure 10).

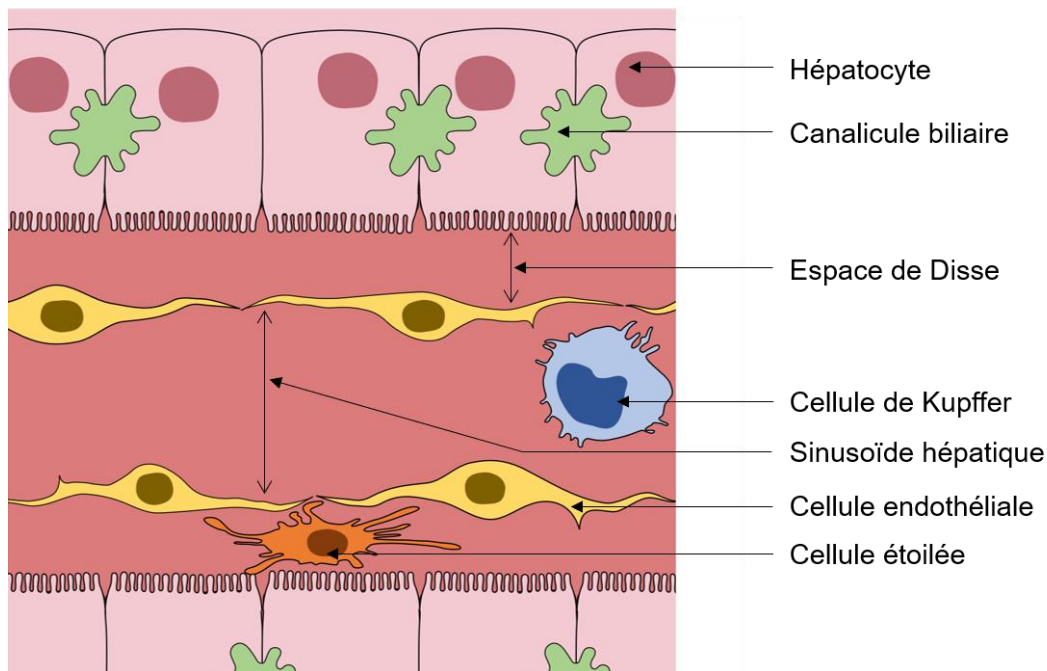


Figure 10 : Représentation des principales cellules retrouvées au niveau du sinusoïde hépatique.

II.1.3. Les rôles du foie

Le foie exerce de nombreux rôles que ce soit dans l'homéostasie glucidique (néoglucogenèse, glycogénolyse, glycogénogenèse) ; le métabolisme énergétique, en participant à l'anabolisme des lipides (synthèse du cholestérol) et des protéines (synthèse de l'albumine) ; le stockage du fer ; ou, de par la synthèse et la sécrétion de bile, dans la digestion. Associé à ses rôles dans le métabolisme énergétique et la digestion, le foie joue un rôle majeur dans la détoxification des composés exogènes apportés *via* la circulation par la veine porte.

II.2. Le foie, acteur de la détoxification

Une des principales caractéristiques communes à l'ensemble des xénobiotiques (contaminant environnemental, toxine ou médicament) est leur importante hydrophobicité. Ainsi, pour que leur élimination puisse se faire, il est d'abord nécessaire d'augmenter leur hydrophilie. De ce fait, l'hépatocyte est doté d'un large panel de protéines dont le rôle est de faciliter le métabolisme des xénobiotiques qui se fait en quatre phases (Figure 11).

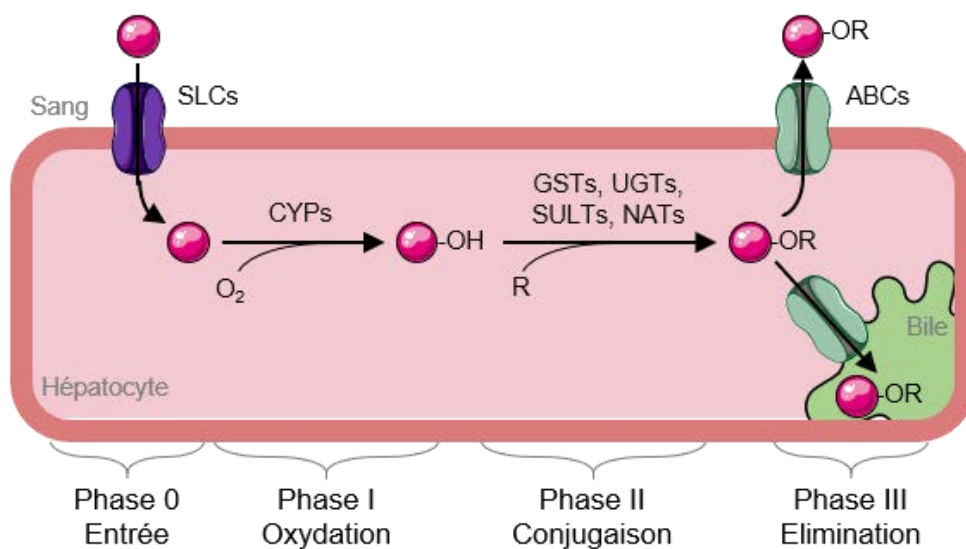


Figure 11 : Les phases du métabolisme des xénobiotiques

La phase 0 est une phase de transport permettant l'influx de composés de la circulation vers les hépatocytes *via* des transporteurs membranaires exprimés au pôle basolatéral des hépatocytes. La phase I de fonctionnalisation fait intervenir les cytochromes P 450 (CYPs). Ces enzymes catalysent des réactions d'oxydoréductions, ce qui a pour effet d'augmenter la solubilité des composés. Au cours de la phase II, les xénobiotiques alors oxydés sont pris en charges par les enzymes de conjugaison, que sont les glutathion-transférases (GSTs), les UDP-glucuronyl-transférases (UGTs), les sulfo-transférases (SULTs) et les N-acétyl-transférases (NATs). La conjugaison des composés à de petites molécules endogènes (glutathion, l'acide glucuronique, sulfate, N-acétyl) augmente ainsi leur hydrophilie. Les métabolites ainsi rendu plus solubles sont excrétés hors de l'hépatocyte lors de la phase III. Cette phase dépend de transporteurs membranaires d'efflux étant, pour certains, localisés au pôle canaliculaire des hépatocytes et permettant une élimination biliaire (Phase IIIa), et pour

d'autres, retrouvés au pôle apical et impliqués dans le rejet dans la circulation pour une élimination rénale (Phase IIIb) (Döring and Petzinger, 2014).

II.2.1. Les CYPs, enzymes de fonctionnalisation

Chez l'Homme, la superfamille des CYPs comprends 57 isoformes classés en familles et sous-familles. Les CYPs sont des hémoprotéines à activité monooxygénase, d'environ 55 kDa, qui catalysent des réactions d'oxydoréductions sur un très grand nombre de substrats. Ces réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse permettent d'améliorer la solubilité des molécules et ainsi de faciliter leur élimination.

Ainsi, les CYPs, notamment les isoformes des familles 1, 2 et 3, sont fortement impliqués dans le métabolisme de xénobiotiques tels que des polluants environnementaux, des pesticides et surtout des médicaments. En effet, 10 isoformes, que sont les CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2 et 3A4, sont principalement impliquées dans le métabolisme des médicaments (Figure 12).

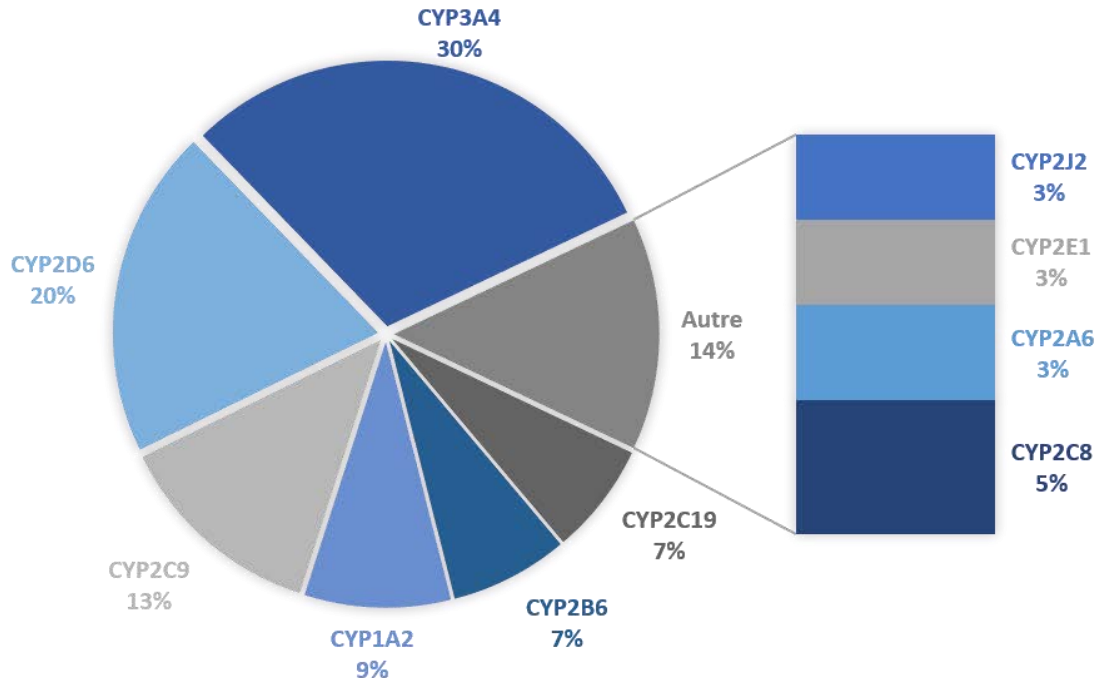


Figure 12 : Proportion de médicaments métabolisés par les CYPs (D'après Zanger and Schwab, 2013)

En termes d'expression protéique, les CYPs sont principalement retrouvés au niveau du réticulum endoplasmique de plusieurs tissus tels que l'intestin, le poumon, le rein, le cerveau

et la peau mais majoritairement au niveau hépatique. Ceux exprimés le plus abondamment dans le foie sont les CYP3A4, 2E1, 2C9 et 1A2. (Tableau 4).

Tableau 4 : Profils d'expression hépatique des CYPs (D'après Zanger and Schwab, 2013)

CYPs	Abondance hépatique (pmol/mg)	Pourcentage par rapport au pool de CYPs hépatiques (%)
CYP3A4	58–146	14.5–37
CYP2E1	22–66	5.5–16.5
CYP2C9	18–116	4.5–29
CYP1A2	17.7–65	4.4–16.3
CYP2A6	14–56	3.5–14
CYP2C8	29.3–30	~ 7.5
CYP2B6	6.9–21	1.7–5.3
CYP2D6	5–17	1.3–4.3
CYP2C19	3.6–15	0.9–3.8
CYP2J2	1–2	<1

Outre les xénobiotiques, les CYPs sont également impliqués dans le métabolisme de nombreux composés endogènes tels que le cholestérol et les acides biliaires, les stéroïdes, les prostaglandines et les leucotriènes. Il s'agit là principalement de CYPs de familles différentes des CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.

Aux vues de leur abondance au niveau hépatique et de la proportion de médicaments qu'ils prennent en charge, on comprend l'importance des CYP3A4, 2C9 et 1A2.

II.2.1.1. Le CYP3A4

Le CYP3A4 joue un rôle majeur dans le métabolisme des médicaments, tout d'abord puisque l'on estime son implication dans le métabolisme de 30% des médicaments actuellement utilisés en clinique (Figure 12). De plus, il s'agit de l'isoforme la plus représentée au niveau hépatique. En effet, en fonction des différentes études, il représente en moyenne entre 14 et 37% du pool total de CYPs hépatiques (Tableau 4).

Ainsi, les nombreux médicaments pris en charge par le CYP3A4 se retrouvent au sein de quasiment toutes les catégories thérapeutiques et incluent notamment des

immunosuppresseurs, des antibiotiques, des anticancéreux (tamoxifène), des anxiolytiques, des opioïdes, des statines et le midazolam, utilisé pour quantifier l'activité du CYP3A4. Ce dernier est aussi impliqué dans le catabolisme de composés endogènes, tels que des hormones (testostérone, progestérone, cortisol) et des acides biliaires (Lamba et al., 2002).

II.2.1.2. Le CYP2C9

Derrière le CYP3A4, le CYP2C9 est le 3ème plus important, en termes de nombre de médicaments pris en charges comme en termes d'abondance. En effet, il est impliqué dans le métabolisme de 13% des médicaments (Figure 12) et compte pour environ 20 % du nombre total de CYPs hépatiques (Tableau 4).

Le CYP2C9 intervient notamment dans le métabolisme d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, comme diclofénac qui est utilisé pour mesurer son activité enzymatique, et d'anticoagulants (warfarine). Les composés endogènes pris en charge par cet isoforme sont, entre autres, des stéroïdes et des acides gras polyinsaturés (acides arachidonique et linoléique) (Daly et al., 2017).

II.2.1.3. Le CYP1A2

Le CYP1A2 représente 4 à 16 % des CYPs hépatiques et prend en charge environ 9 % des médicaments utilisés actuellement. Ces médicaments incluent notamment des analgésiques, comme la phénacétine couramment utilisée comme substrat pour le dosage de l'activité enzymatique, des anti-inflammatoires et des antidépresseurs. Parmi les substrats endogènes du CYP1A2, on compte de nombreuses hormones (mélatonine, œstradiol, œstrone), la bilirubine et l'acide arachidonique (Sridhar et al., 2017).

Le CYP1A2 intervient aussi dans le métabolisme de la caféine, largement utilisée pour l'évaluation de son activité.

Ces trois isoformes présentent une très forte variabilité inter-individuelle au niveau de leur expression. En effet, on peut notamment observer des différences d'expression protéique ou

d'activité du CYP3A4 variant entre des facteurs 10 et 100 et pouvant se traduire *in vivo* par des variations du métabolisme des médicaments avec des facteurs supérieurs à 10 (Lamba et al., 2002). Cette variabilité entre les individus s'explique par un important polymorphisme génétique mais aussi par des variations d'expositions à différents inducteurs ou répresseurs. Ces expositions pouvant avoir lieu de façon relativement ponctuelle, *via* différents traitements médicamenteux, ou de façon plus quotidienne. Par exemple, l'exposition à la fumée de cigarette ou aux hydrocarbures et amines retrouvés dans l'air ou dans la nourriture, qui ont un effet inducteur sur l'expression des CYPs ou, à l'opposé, l'effet répresseur de l'exposition au pamplemousse ou à des contraceptifs hormonaux sur l'activité du CYP3A4 (Koonrungsesomboon et al., 2018).

II.2.2. Les protéines de transport

Les transporteurs hépatiques sont des protéines membranaires prenant en charge le transport de molécules au travers des membranes plasmiques. Ils sont principalement exprimés au niveau des organes impliqués dans la disposition et l'élimination de molécules endogènes mais aussi de médicaments et substances toxiques, notamment les reins et le foie. Ils ont pour substrats endogènes des molécules telles que des sucres, des vitamines, des protéines, des nucléotides ou des hormones. Cependant, leur implication dans le rôle de détoxification du foie est attribuée à leur capacité à transporter de nombreux xénobiotiques que ce soit médicaments, polluants environnementaux ou toxines, dans le but premier de faciliter leur élimination. De ce fait, les transporteurs hépatiques jouent un rôle très important dans l'absorption, la disposition et l'élimination des médicaments. Ainsi, toute altération de leur expression et/ou de leur activité peut aboutir à une perturbation du processus de détoxification du foie, et moduler la pharmacocinétique de certains médicaments. Ces médicaments peuvent alors voir leurs effets minimisés, s'ils sont éliminés trop rapidement, ou au contraire, engendrer des effets toxiques s'ils sont accumulés au niveau du foie ou au niveau systémique (Jetter and Kullak-Ublick, 2019). De plus, certains médicaments peuvent directement altérer l'activité des transporteurs et ainsi être à l'origine d'interactions médicamenteuses.

Il existe deux superfamilles de transporteurs que sont les transporteurs de solutés (SLC pour solute-carrier) et les transporteurs à cassette ATP (ABC pour ATP-Binding Cassette). Au niveau hépatique, les SLC sont principalement retrouvés au pôle basolatéral des hépatocytes et majoritairement impliqués dans l'influx des xénobiotiques et molécules endogènes. Les ABC, retrouvés au niveau basolatéral et canaliculaire, sont responsables de l'efflux de ces différents composés.

Les SLC comme les ABC permettent le transport actif de leurs substrats. Ce transport actif peut être primaire, dépendant alors de l'hydrolyse d'ATP et permettant le transport du substrat contre son gradient de concentration, ou secondaire. Le transport actif secondaire repose sur le cotransport d'une molécule suivant son gradient de concentration et d'une autre molécule contre son gradient de concentration que ce soit dans le même sens (symport) ou dans des directions opposées (antiport) (Figure 13).

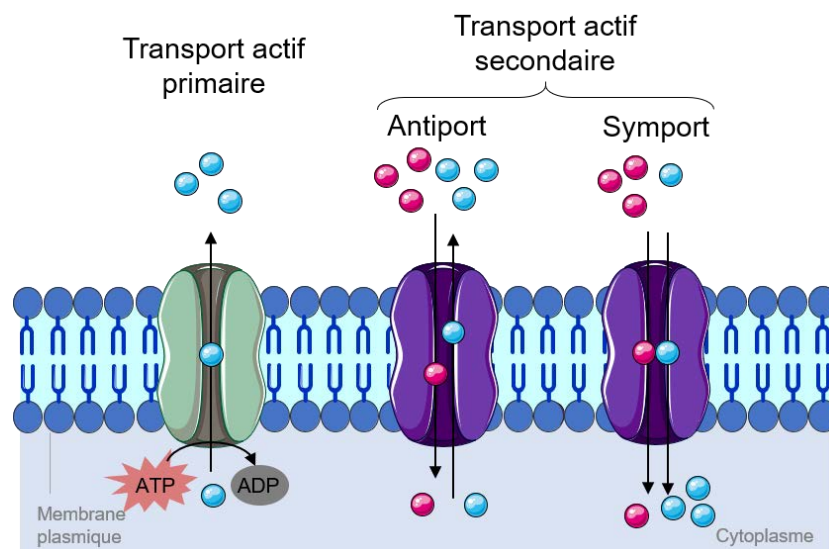


Figure 13 : Représentation des différents mécanismes de transport actif

Comme précédemment, aux vues de la complexité que représente l'ensemble de ces deux superfamilles, ne seront détaillés ci-dessous que les transporteurs mentionnés dans les études effectuées.

II.2.2.1. La superfamille des SLCs

Actuellement, la superfamille des transporteurs SLCs compte plus de 400 membres, classés en 52 familles. Les SLCs impliqués dans le métabolisme hépatique des xénobiotiques sont les

organic anion-transporting polypeptides (OATPs), les organic anion transporters (OATs), les organic cation transporters (OCTs), les multidrug and toxin extrusion transporters (MATEs) et le sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) (Figure 14).

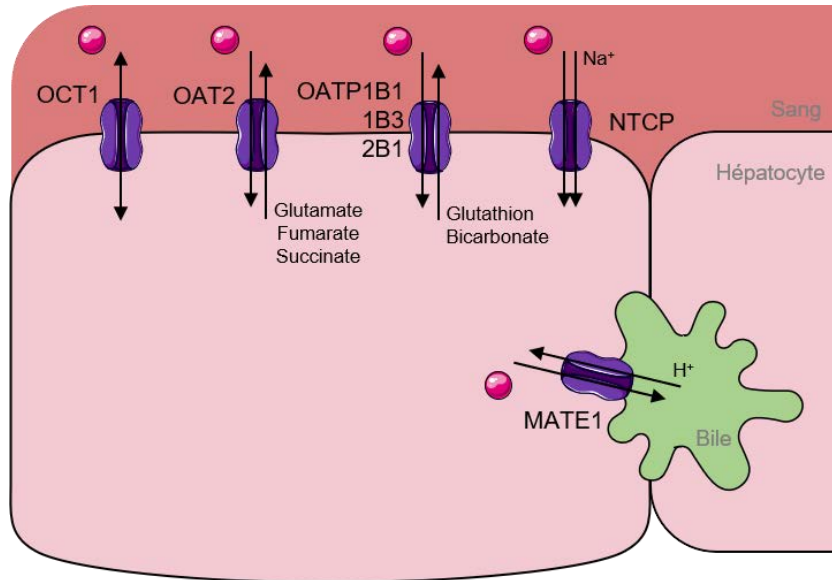


Figure 14 : Expression polarisée des transporteurs SCLs au niveau hépatocytaire.

Ces transporteurs ont deux modes d'action. Ils peuvent soit favoriser la diffusion passive des substrats par transport facilité en suivant leur gradient de concentration, soit permettre le transport actif secondaire de certains substrats contre leur gradient de concentration en suivant le gradient de concentration d'ions qu'ils co-transportent. Quel que soit le mécanisme employé et à l'exception de MATE1, l'ensemble des SLCs hépatiques sont des transporteurs d'influx localisés au pôle apical de l'hépatocyte.

D'un point de vue structurel, les OCTs, OATs et OATPs sont constitués de 12 domaines transmembranaires et de régions cytoplasmiques en C-terminal et N-terminal. Les MATEs quant à eux possèdent 13 segments transmembranaires, une région cytoplasmique en N-terminal et une région extracellulaire en C-terminal. NTCP constitué de 7 domaines transmembranaires, un domaine extracellulaire en N-terminale et un domaine cytoplasmique en C-terminale.

Le mécanisme de transport qui semble le plus probable serait le mécanisme « rocker-switch », dont la fixation du ligand au transporteur dans sa conformation face à l'extérieur engendre un changement de conformation face à l'intérieur (Figure 15).

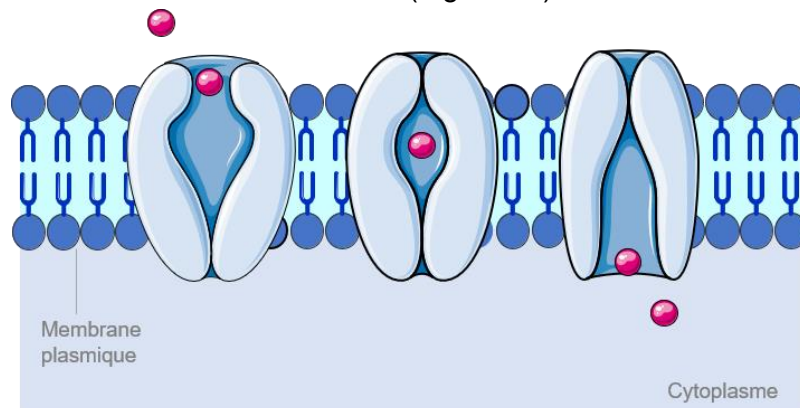


Figure 15 : Mécanisme de transport "rocker-switch" supposé pour les SLCs

Cependant, pour l'ensemble de ces protéines, les structures cristallines n'ayant pas été déterminées, l'agencement et le rôle de chaque domaine dans la liaison et le transport des substrats sont à ce jour peu élucidés.

(i) Les OCTs

Il existe trois isoformes d'OCTs pouvant transporter les composés à travers la membrane plasmique par diffusion facilitée et ce de façon bidirectionnelle, la force motrice étant uniquement fournie par le gradient électrochimique des composés transportés.

L'isoforme hépatique OCT1, d'environ 60 kDa, facilite l'influx de molécules endogènes comme certaines hormones (prostaglandine, œstrone-3-sulfate (E3S), œstradiol) ou neurotransmetteurs (acétylcholine, adrénaline, dopamine) (Li and Shu, 2014). Aussi, OCT1 est impliqué dans le transport de médicaments antidiabétiques (metformine), antinéoplasiques (cisplatine), antiviraux et antiparasitaires, ainsi que de l'aflatoxine B1 (Koepsell, 2013; The International Transporter Consortium, 2010).

(ii) Les OATPs

Les OATPs sont des transporteurs actifs secondaires, d'environ 60 kDa. Leur mécanisme antiport repose sur l'influx d'anions organiques en échange de l'efflux de composés endogènes comme le glutathion (The International Transporter Consortium, 2010).

Les principaux isoformes hépatiques, que sont OATP1B1, 1B3 et 2B1, sont impliqués dans le transport de substrats endogènes comme les acides biliaires, la bilirubine simple et sous ses formes conjuguées, de leucotriènes et de nombreuses hormones (prostaglandines, E3S, œstradiol conjugué, hormones thyroïdiennes) (Hagenbuch and Stieger, 2013). Les OATPs assurent le transport d'un des plus importants groupes de médicaments, les statines, mais aussi le méthotrexate (largement utilisé dans le traitement des maladies auto-immunes et certains cancers), des antibiotiques et des toxines naturelles comme la phalloïdine (Jetter and Kullak-Ublick, 2019)

(iii) *NTCP*

NTCP est un transporteur actif secondaire de 40 à 50 kDa, permettant l'influx de substrats en symport, dépendamment du cotransport d'ions Na⁺. En plus de ses principaux substrats que sont les sels biliaires (taurocholate et cholate), NTCP permet le transport de composés endogènes tels que des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes et de médicaments, notamment des statines. Certains médicaments peuvent se retrouver sous forme conjuguée à un acide biliaire (chlorambucil-taurocholate (anticancéreux)). Aussi, la protéine NTCP a récemment été mise en évidence en tant que récepteur et transporteur de virus des hépatites B et D (Anwer and Stieger, 2014).

En favorisant l'influx de nombreux médicaments et xénobiotiques au niveau des hépatocytes, les OCTs, OATs, OATPs et NTCP jouent un rôle majeur dans la première étape d'élimination hépatique.

II.2.2.2. La superfamille des ABCs

La superfamille des transporteurs ABCs comprend 49 membres, classés dans sept sous-familles. Les ABCs retrouvés comme impliqués dans le métabolisme hépatique des xénobiotiques sont la P-glycoprotéine (P-gp), les multidrug resistance-associated proteins (MRPs) et la breast cancer resistance protein (BCRP).

L'ensemble des ABCs sont ainsi des transporteurs d'efflux, localisés au niveau du pôle canaliculaire des hépatocytes pour MRP2, P-gp, et BCRP et du pôle apical pour MRP3, 4 et 6 (Figure 16).

Au niveau structurel, les ABCs sont des protéines transmembranaires ayant toutes en commun une unité structurale de base constituée de deux domaines transmembranaires, comprenant chacun six

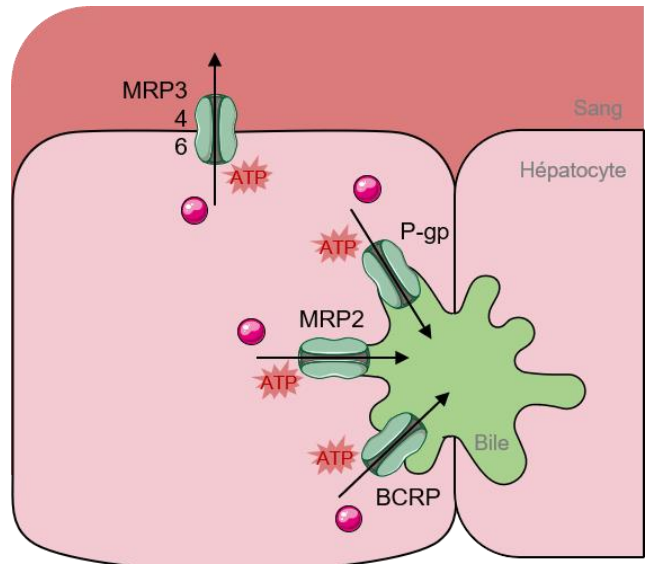


Figure 16 : Expression polarisée des transporteurs ABCs au niveau hépatocytaire.

sous-domaines transmembranaires, et de deux nucléotide-binding domains (NBD) en intracytoplasmique. Les domaines transmembranaires participent à la liaison et au transport du substrat pendant que les NBD lient et hydrolysent l'ATP.

Ces transporteurs agissent d'après un mécanisme de transport actif nécessitant l'hydrolyse d'ATP pour permettre l'efflux de substrats en dehors de la cellule contre leur gradient de concentration. Il existe différentes propositions quant aux détails de ce mécanisme, mais toutes conçoivent que la dimérisation ATP-dépendante des NBD entraîne un changement de conformation des domaines transmembranaires qui se traduit par une conformation du transporteur faisant face à l'extérieur. L'hydrolyse de l'ATP en ADP induit la dissociation des NBD et le retour à une conformation faisant face à l'intérieur (Figure 17).

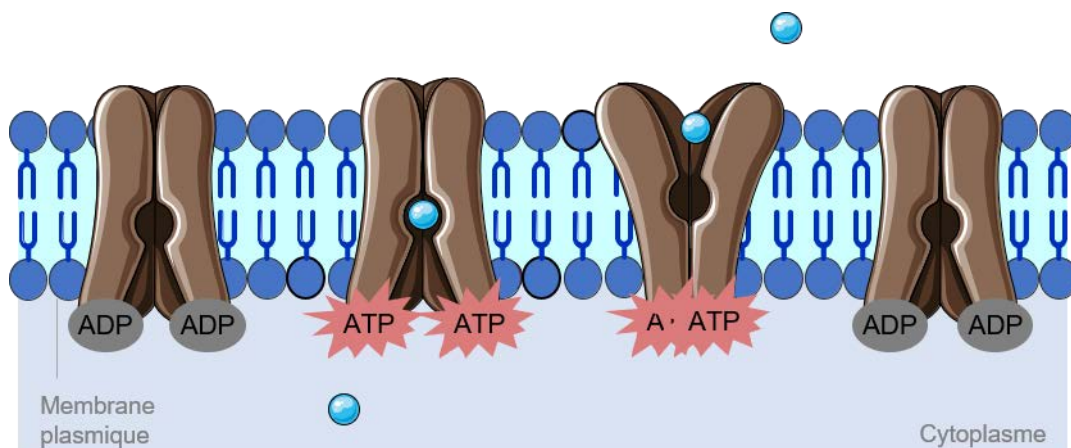


Figure 17 : Mécanisme de transport supposé pour les ABCs (D'après Wilkens, 2015)

La P-gp, protéine transmembranaire de 170 kDa, est le transporteur le plus étudié des ABCs. En effet, son implication dans le phénotype de résistance de lignées cellulaires à certains médicaments antinéoplasiques en a fait une cible d'intérêt dans les traitements anticancéreux. Localisée au niveau du pôle canaliculaire de l'hépatocyte, elle favorise l'excrétion des composés dans la bile.

Les substrats endogènes de la P-gp comprennent des peptides, des lipides, des hormones stéroïdiennes (corticostérone) ou des cytokines (IL2, IL4, IFN γ). Ses substrats exogènes incluent, entre autres, de nombreux médicaments anticancéreux (méthotrexate), des inhibiteurs de kinases (imatinib), de topoisomérases et de protéases, des antiparasitaires et des immunosuppresseurs (Döring and Petzinger, 2014).

Les transporteurs ABCs, jouant un rôle primordial dans l'élimination des xénobiotiques, sont retrouvés surexprimés suite à des traitements anticancéreux et sont très fortement impliqués dans les processus de résistance à ces traitements.

II.3. Le foie, à la fois victime et acteur de l'inflammation

Différents stimulus inflammatoires peuvent cibler le foie. Parmi ceux-ci, peuvent être mentionnées les cytokines inflammatoires, telles que l'IL6, l'IL1 β et le TNF α , retrouvées circulantes dans le sang. De façon physiopathologique, le foie peut aussi être directement en contact avec du LPS amené par la circulation (Jirillo et al., 2002). Les hépatocytes sont alors les premiers acteurs de l'uptake et de la clairance du LPS suite à une septicémie bactérienne (Deng et al., 2013) ou retrouvé, suite à une perméabilisation intestinale, circulant dans le plasma de patients souffrant d'obésité, de stéatohépatite non alcoolique (NASH) ou de maladie alcoolique du foie (Miele et al., 2009; Sharifnia et al., 2015; Szabo et al., 2011).

Au niveau du foie, les acteurs principaux de la réponse inflammatoire sont les macrophages résidents appelés cellules de Kupffer. Cependant, bien que longtemps considérés comme passifs d'un point de vue immunitaire, de récentes données tendent à montrer l'importance des hépatocytes comme acteurs majeurs de la réponse inflammatoire hépatique.

II.3.1. Les acteurs moléculaires de l'inflammation hépatique

II.3.1.1. Les cytokines

Les cytokines produites lors de la réponse inflammatoire impactent la physiologie hépatique de façon majeure. Au niveau du foie, ces cytokines, notamment l'IL6, l'IL1 β et le TNF α , induisent la production des protéines plasmatiques de la phase aiguë et leur sécrétion dans la circulation (Gabay and Kushner, 1999).

Parallèlement à ce rôle primordial dans l'expression des protéines de la phase aiguë, les cytokines altèrent la physiologie hépatique en modulant notamment l'expression et l'activité des protéines du métabolisme des médicaments. Ainsi, il est largement décrit que les cytokines inflammatoires ont la capacité à réprimer fortement l'expression de CYPs hépatiques majeurs tels que les CYP3A4, 2C9 et 2B6, aussi bien chez l'humain, dans des modèles animaux ou dans des cultures primaires d'hépatocytes humains (Abdel-Razzak et al., 1993;

Aitken and Morgan, 2007; Jover et al., 2002; Morgan, 2001; Rubin et al., 2015). De façon similaire, l'expression et l'activité des transporteurs SLC et ABC sont altérées par l'inflammation *via* l'effet des cytokines, notamment de l'IL6 (Aitken et al., 2006; Hartmann et al., 2001; Morgan et al., 2008; Vee et al., 2009).

Cette altération des protéines du métabolisme des médicaments en cas d'inflammation affecte la pharmacocinétique d'un certain nombre de médicaments. Ainsi, si l'inflammation survient pendant le traitement, ceci peut se traduire par une toxicité due à une diminution de la clairance des médicaments concernés. De façon opposée, dans les cas d'inflammation chronique, une amélioration de l'inflammation durant le traitement, se traduisant d'un point de vue moléculaire par une restauration des taux normaux de protéines du métabolisme, peut alors induire une diminution de l'efficacité de par une augmentation de la clairance du médicament utilisé (Aitken et al., 2006; Mallick et al., 2017; Morgan et al., 2008).

II.3.1.2. Le LPS

Une exposition au LPS induit de façon similaire la sécrétion des protéines de la phase aiguë. En effet, cette exposition se traduisant notamment par la production de cytokines inflammatoires au niveau systémique, celles-ci sont à l'origine de l'induction hépatique de sécrétion des protéines plasmatiques. Les effets du LPS sur les protéines du métabolisme des médicaments sont donc comparable à ceux des cytokines.

De plus, il est maintenant connu que les hépatocytes possèdent l'ensemble de la machinerie nécessaire à une réponse au LPS, soient les TLR1 à 9, MyD88 et MD-2 (Liu et al., 2002), que le LPS altère directement l'expression de gènes hépatiques (Lee et al., 2017b) et qu'il induit l'expression de la CRP *via* la sécrétion et la signalisation autocrine d'IL6 dans les hépatocytes (Aninat et al., 2008). Ainsi, les effets du LPS sur le foie, longtemps décrits comme secondaires aux cytokines retrouvées au niveau systémiques ou sécrétées par les cellules de Kupffer, semblent être, du moins en partie, dus à une réponse directe des hépatocytes.

II.3.2. La CRP

La C-reactive protein (CRP) est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Découverte en 1930, elle est aujourd'hui utilisée comme un des principaux marqueurs de l'inflammation. En effet, la CRP voit ses taux plasmatiques augmentés d'au moins 25 % par l'inflammation, d'origine infectieuse ou suite à un dommage tissulaire, au point où son expression peut être induite jusqu'à un facteur 1000 en cas d'inflammation aiguë sévère. Elle est retrouvée élevée dans un certain nombre de pathologies associées à une inflammation chronique comme la polyarthrite rhumatoïde. Aussi, une élévation mineure mais chronique de son expression plasmatique, historiquement considérée comme cliniquement insignifiante, est aujourd'hui montrée comme associée au développement de pathologies cardiovasculaires (Ridker Paul M, 2003; Verma and Yeh, 2003).

II.3.2.1. Structure

La CRP se retrouve sous deux isoformes majoritaires : une forme monomérique et une forme pentamérique. Sous sa forme native pentamérique de 120 kDa (pCRP), elle est constituée de cinq sous-unités identiques d'environ 23 kDa chacune, organisées autour d'un pore central et suivant la même orientation. Ainsi, la face dite « de reconnaissance » du pentamère est impliquée dans la liaison Ca^{2+} -dépendante au ligand, notamment la phosphocholine (PC), alors que l'autre face dite « effectrice » interagit avec les récepteurs Fc aux IgG et le complément factor 1q (C1q) du système du complément. Le système du complément est un ensemble d'une vingtaine de protéines produites par le foie et impliquées dans la lyse et la phagocytose de pathogènes, de cellules apoptotiques et nécrotiques, jouant un rôle majeur dans la défense contre les agents infectieux ainsi que dans la réponse inflammatoire.

La forme monomérique (mCRP), constituée d'une seule sous-unité, est la forme obtenue après dissociation de la pCRP.

II.3.2.2. Synthèse hépatique

La CRP est majoritairement synthétisée par les hépatocytes suite à la stimulation par des cytokines proinflammatoires. L'IL6 est le principal inducteur de l'expression de la CRP (Zhang et al., 1996). En se liant à son récepteur à la surface des hépatocytes, l'IL6 induit l'activation des facteurs de transcription STAT3, C/EBPs et NFκB qui se fixent au promoteur de la CRP. D'autres cytokines peuvent aussi jouer un rôle dans la synthèse de la CRP, telles que l'IL17, TNFα et IL1β qui agissent en synergie avec IL6 pour induire l'expression de la CRP (Kramer et al., 2008).

II.3.2.3. Rôle dans l'inflammation

Il est de plus en plus admis que la CRP n'est pas qu'un marqueur de l'inflammation, mais bien un acteur jouant un rôle actif dans la réponse inflammatoire, exerçant des rôles à la fois pro- et anti-inflammatoires.

Comme mentionné précédemment, un des principaux ligands de la pCRP est la phosphocholine. De part cette particularité, la CRP intervient dans l'opsonisation et la phagocytose de pathogènes. La face de reconnaissance de la CRP permet la formation d'agrégats autour des pathogènes, *via* les PC constituant leur membrane. La face opposée de la pCRP permet d'une part l'interaction directe avec C1q, favorisant l'activation de la voie classique du système du complément, et d'autre part la liaison aux récepteurs Fc aux IgG retrouvés au niveau des cellules phagocytaires.

De par son affinité pour la PC, la CRP joue par ailleurs un rôle majeur dans la reconnaissance de membranes cellulaires endommagées. En effet, les phosphatidylcholines, normalement exprimées au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique des cellules eucaryotes, se retrouvent exposées dans les cellules apoptotiques et nécrotiques et sont ainsi reconnues par la pCRP. De façon similaire à ce qui est observé avec les pathogènes, la liaison de la CRP à ces membranes endommagées entraîne l'activation du système du complément *via* C1q

ainsi que leur opsonisation et phagocytose par les macrophages (Black et al., 2004; Marnell et al., 2005; Pepys and Hirschfield, 2003; Sproston and Ashworth, 2018).

Ses effets sur l'inflammation dépendent de l'isoforme sous lequel la CRP se trouve.

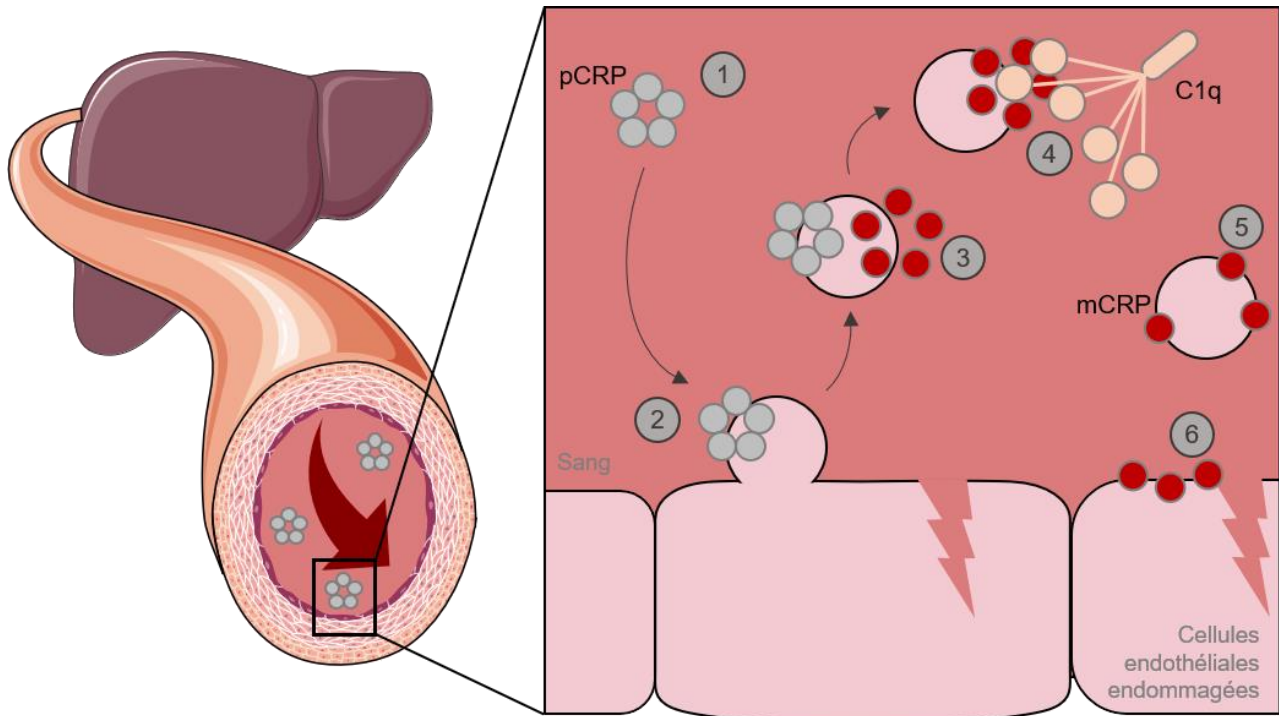


Figure 18 : Représentation de la localisation des différentes formes de CRP (D'après Braig et al., 2017)

La pCRP, forme soluble et inerte de la CRP (Figure 18 (1)), est la forme synthétisée par le foie et retrouvée dans la circulation en conditions normales. Les résidus permettant la liaison avec C1q sont dits cryptiques, de par la conformation rapprochée des sous-unités qui les rends inaccessibles. La pCRP montre des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* en protégeant du LPS, d'infection bactérienne et d'autres médiateurs de l'inflammation (Mold et al., 2002). *In vitro*, la pCRP favorise la polarisation des macrophages en M2 (Del Giudice and Gangestad, 2018), stimule la sécrétion de protéines anti-inflammatoires telles que IL10 et IL1ra, réprime l'adhérence des plaquettes au neutrophiles, et recrute un certain nombre d'inhibiteurs de la voie du complément (Mihlan et al., 2011).

La mCRP est la forme active de la CRP. Etant faiblement soluble, elle est principalement retrouvée liée aux tissus endommagés (Figure 18 (5)), notamment au niveau des plaques d'athérome, du tissu cérébral endommagé par un accident vasculaire chez les patients atteints

de maladie d'Alzheimer ou encore du choroïde de patients souffrant de dégénérescence maculaire liée à l'âge. Au niveau plasmatique, elle est retrouvée à la surface de microparticules de 100 à 1000 nm (Trial et al., 2016) (Figure 18 (6)). La mCRP est la forme pro-inflammatoire la plus décrite. Elle favorise la polarisation des macrophages en M1 (Del Giudice and Gangestad, 2018), l'activation des leucocytes et des cellules endothéliales facilitant ainsi l'adhésion des leucocytes (McFadyen et al., 2018), l'activation du système du complément ainsi que la sécrétion d'IL1, IL6, IL8, CCL2 et TNF α .

Il existe une conformation intermédiaire à ces deux formes, la pCRP*, qui est une forme relâchée de la pCRP. Au niveau de tissus endommagés, la pCRP lie les PC des monocytes, plaquettes ou cellules endothéliales activées (Figure 18 (2)). Elle se retrouve ensuite relarguée à la surface de microparticules issues du bourgeonnement de la membrane plasmique. Au niveau de ces microparticules, elle subit un changement de conformation pour devenir pCRP* (Figure 18 (3)). Sous cette forme, les épitopes cryptiques nécessaires à la liaison au C1q sont rendus accessibles. Ainsi, la pCRP*, qui est parmi les trois, l'isoforme le plus représenté au niveau des tissus endommagés, montre des propriétés pro-inflammatoires. Elle favorise l'activation du système du complément (Figure 18 (4)), active les cellules endothéliales pour médier le recrutement des leucocytes *via* une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion ICAM et VCAM (Braig et al., 2017; McFadyen et al., 2018).

Pour une majorité des études s'étant jusqu'à consacrées aux propriétés inflammatoires de la CRP, les anticorps utilisés pour détecter la mCRP fixe les épitopes cryptiques et reconnaissent ainsi aussi la forme pCRP*. Il est donc probable que de nombreux effets pro-inflammatoires alloués à la mCRP soit, du moins en partie, dus à la pCRP*.

Ainsi, les effets pro-inflammatoires des formes mCRP et la pCRP* sont de plus en plus étudiés, notamment dans un contexte de pathologies cardiovasculaires. Cependant, le rôle exact de la CRP dans le développement et la progression d'infections et de pathologies inflammatoires demande encore à être décrit plus en détails.

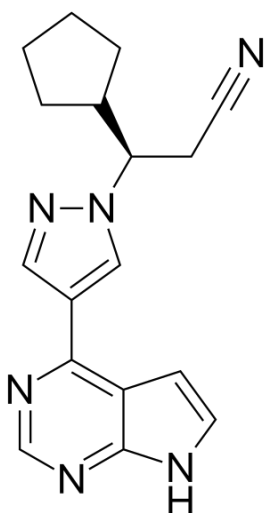
III. Les effets anti-inflammatoires du ruxolitinib

Généralités

Le ruxolitinib, commercialisé sous le nom Jakavi®, est le premier inhibiteur de JAK approuvé par la US Food and Drug Administration (FDA) en 2011 et par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en 2012 pour le traitement de syndromes myéloprolifératifs présentant une mutation de JAK2.

III.1. Structure, pharmacocinétique et pharmacodynamique

III.1.1. Membre des Jakinibs



Le ruxolitinib est une petite molécule de 312 Da, appartenant à la classe des inhibiteurs de type I (Figure 19). De ce fait, il se fixe au niveau du site de liaison à l'ATP des kinases cibles sous leur conformation active (Zhou et al., 2014). Initialement décrit comme inhibiteur spécifique de JAK2 ($IC_{50} = 2,8$ nM) et de JAK1 ($IC_{50} = 3,3$ nM), pouvant aussi affecter JAK3 et Tyk2 de façon moindre (Quintás-Cardama et al., 2010), le ruxolitinib, à la concentration de 1 μ M atteinte au niveau plasmatique chez les patients, agit sur de nombreuses autres kinases (Green et al.,

Figure 19 : Formule chimique du ruxolitinib

2016; Rudolph et al., 2016; Zhou et al., 2014). Classé parmi les Jakinibs (pour JAK inhibitors) de première génération, il est aujourd'hui considéré comme inhibiteur pan-JAKs.

III.1.2. Indication et caractéristiques pharmacologiques.

III.1.2.1. Indication

Le ruxolitinib est indiqué dans le traitement de la myélofibrose de risque intermédiaire et de haut risque depuis 2011 ainsi que le traitement de la maladie de Vaquez chez les patients réfractaires à l'hydroxyurée depuis 2014.

III.1.2.2. Pharmacocinétique

Les propriétés pharmacocinétiques du ruxolitinib sont déterminées d'après le système ADMET (administration, distribution, métabolisme, élimination et transport).

Absorption. Chez des volontaires sains, la concentration plasmatique maximale est atteinte 2 h après l'administration orale de ruxolitinib. Cette concentration est de 649 nM et 1160 nM après administration multiple de respectivement 15 mg et 25 mg toutes les 12 h, sachant que la posologie habituelle pour le ruxolitinib est de 15 mg à 20 mg deux fois par jour. (Shi et al., 2011).

Distribution. Le taux de liaison du ruxolitinib aux protéines plasmatiques, notamment l'albumine, est de 97 %, *in vitro*.

Métabolisme. Le ruxolitinib est principalement métabolisé par le CYP3A4 et secondairement par le CYP2C9. Au niveau plasmatique, le ruxolitinib est majoritairement retrouvé sous sa forme non métabolisée. Celle-ci représente 60 % de formes totales qui comprennent notamment deux métabolites actifs et majoritaires dont les effets comptent pour 18 % de la pharmacodynamie globale du ruxolitinib.

Élimination. Le ruxolitinib est éliminé de façon prédominante par excrétion rénale (74 %) ainsi que par excrétion biliaire (22 %).

Transport. A ce jour, il ne semble pas exister d'étude permettant d'indiquer quels transporteurs favorisent l'efflux ou l'influx du ruxolitinib, si ce n'est qu'il n'est pas connu comme étant substrat de la P-gp (FDA; EMA; Hussaarts et al., 2019). De plus, sa structure et de ses propriétés chimiques indiquent sa capacité à diffuser au travers des membranes cellulaires (Telliez, 2016).

III.1.3. Interactions médicamenteuses

Les interactions médicamenteuses (DDI pour Drug-Drug interactions) se traduisent par une modification des effets d'un médicament par un médicament associé. Une des causes des DDIs est la modulation de l'expression ou de l'activité de protéines de détoxification et de

transport des médicaments, par un médicament auteur, induisant ainsi une altération positive ou négative du métabolisme et de la clairance de médicaments victimes auxquels ils sont associés.

In vitro, le ruxolitinib ne module pas l'activité des CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ou CYP3A4, ni des transporteurs OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, OAT1 ou OAT3 à des concentrations cliniquement pertinentes, mais serait un potentiel inhibiteur des isoformes intestinales de la P-gP et de BCRP (FDA; EMA).

Il peut être lui-même victime d'interactions médicamenteuses s'il est associé à des médicaments inducteurs ou inhibiteurs du CYP3A4 et son dosage chez les patients doit être adapté en conséquence. *In vivo*, il n'est associé à aucune interaction médicamenteuse directe en tant qu'acteur (Coutant and Hall, 2018; Husaarts et al., 2019) et aucun cas de potentielle interaction médicamenteuse n'a été relevé dans la littérature.

Cependant, aux vues de ces effets anti-inflammatoires décrits dans le chapitre suivant, il est important de considérer son rôle potentiel dans les id-DDIs (pour inflammatory diseases related DDIs). En effet, comme mentionné précédemment, une réduction de l'inflammation se traduit par une restauration des taux de protéines du métabolisme des médicaments. De ce fait, le ruxolitinib, en ciblant les cytokines inflammatoires, pourrait conduire à une modulation de la pharmacocinétique de médicaments associés. Des protéines thérapeutiques utilisées dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde dirigées contre la signalisation IL6, telles que le tocilizumab dirigé contre le récepteur de l'IL6, sont connues pour réduire l'exposition à des médicaments coadministrés et ce, en restaurant l'expression des CYPs réprimés par l'IL6 (Jiang et al., 2016; Lee et al., 2017a; Schmitt et al., 2011; Zhuang et al., 2015). De ce fait, bien que ceci ne soit pas décrit à ce jour dans la littérature, il est possible que le ruxolitinib montre des effets similaires dans certains cas particuliers.

III.2. Le ruxolitinib dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes

Le ruxolitinib est actuellement utilisé en clinique pour le traitement des patients présentant des myélofibroses de haut risque et de risque intermédiaire (Harrison et al., 2012; Verstovsek et al., 2012) et des maladies de Vaquez (Vannucchi, 2015; Verstovsek et al., 2016). Outre ses effets cliniques bénéfiques dans ces pathologies, le ruxolitinib exerce des propriétés anti-inflammatoires dans différents types cellulaires, notamment les cellules immunitaires tels que les macrophages (Maschalidi et al., 2016), les lymphocytes (Paramalli Yajnanarayana et al., 2015), les cellules NK (Schönberg et al., 2015) et les cellules dendritiques (Heine et al., 2013). De plus en plus d'études tendent à étendre les effets bénéfiques du ruxolitinib à des pathologies variées telles que certaines formes de pelade, la maladie du greffon contre l'hôte ou même certains cancers solides. Les effets bénéfiques du ruxolitinib dans l'ensemble de ces différentes pathologies sont principalement attribués à ses propriétés anti-inflammatoires.

III.2.1. Le ruxolitinib dans les syndromes myéloprolifératifs

Les syndromes myéloprolifératifs sont des pathologies hématologiques rares et hétérogènes, caractérisées par la prolifération clonale avec maintien de la maturation de cellules appartenant à la lignée myéloïde (Campbell and Green, 2006). D'après la classification de 2016 de l'Organisation Mondiale de la Santé, les principales pathologies considérées comme syndromes myéloprolifératifs sont les suivantes : la leucémie myéloïde chronique (LMC) *BCR-ABL*-positive, la maladie de Vaquez (polycythemia vera ou polyglobulie primitive), la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose (Arber et al., 2016). La LMC est définie par la translocation chromosomique t(9;22) ou chromosome de Philadelphie portant le gène de fusion *BCR-ABL*. La maladie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose ne présentant pas la translocation *BCR-ABL* sont dites Philadelphie-négatifs. Cependant, ces trois pathologies présentent fréquemment une mutation de JAK2 (*JAK2V617F*), identifiée de façon concomitante par quatre équipes en 2005, localisée sur le domaine pseudo-kinase JH2

de la protéine JAK2 rendant ainsi la voie JAK-STAT constitutivement active (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005).

Certains symptômes retrouvés dans les syndromes myéloprolifératifs, tels que la fatigue, la cachexie, la perte de poids, la splénomégalie ou les sueurs nocturnes, sont possiblement en lien avec l'inflammation chronique observée chez les patients. En effet, de nombreuses cytokines et des protéines de la phase aiguë se retrouvent en excès dans la maladie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose (Hermouet et al., 2002; Lussana and Rambaldi, 2017; Panteli et al., 2005; Vaidya et al., 2012). De plus, la présence de cytokines en excès est associée à certaines manifestations biologiques et histologiques retrouvées au cours de ces pathologies, notamment la fibrose de la moëlle osseuse (Lussana and Rambaldi, 2017; Tefferi et al., 2011; Vaidya et al., 2012). Les cytokines produites de façon spécifique à chaque pathologie et les principales sources cellulaires sont résumées ci-après.

Tableau 5 : Différences qualitatives dans la production de cytokines inflammatoires dans les syndromes myéloprolifératifs (Hermouet et al., 2015)

HGF : hepatocyte growth factor, MF : myélofibrose, MO : moëlle osseuse, PDGF : platelet-derived growth factor, PV : maladie de Vaquez, SMP : syndromes myéloprolifératifs, TE : thrombocytémie essentielle, VEGF : vascular endothelium growth factor.

SMP	Cytokines produites en excès	Principales sources cellulaires
Tous	IL6, IL8, IL12, IL2R soluble, HGF, TNF α , TGF β , GM-CSF, VEGF, bFGF	Fibroblastes de la MO, cellules endothéliales, monocytes, macrophages, lymphocytes T, progéniteurs hématopoïétiques, hépatocytes
TE	IL4, IL10, IFN γ , IL6R soluble, CCL2, PDGFbb,	Macrophages M2, plaquettes, lymphocytes T
PV	IL11, IL12, IL13, IL5, IL7	Fibroblastes de la MO, lymphocytes T, macrophages M1, progéniteurs hématopoïétiques
MF	IL1 β , IL10, IL12, IL13, IL15, IL33, G-CSF, IFN α , CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10, PDGFbb	Fibroblastes de la MO, lymphocytes T activés, neutrophiles, macrophages, progéniteurs hématopoïétiques, mégacaryocytes, plaquettes

Bien qu'il n'y ait pas de lien entre la charge allélique et le taux plasmatique de cytokines chez ces patients, la mutation *JAK2V617F* induit la production de cytokines *in vitro* (Hermouet et al., 2015). Aussi, au cours de la myélofibrose, la présence de la mutation *JAK2V617F* est

associée à une augmentation de la production de nombreuses cytokines et protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Lussana and Rambaldi, 2017; Tefferi et al., 2011).

III.2.1.1. Traitement de la myélofibrose

Le ruxolitinib est aujourd'hui le seul inhibiteur de JAK pour lequel il existe des données sur le suivi à long-terme pour son utilisation dans le traitement de la myélofibrose.

La première étude préclinique à montrer les effets bénéfiques du ruxolitinib chez l'animal date de 2010 (Quintás-Cardama et al., 2010). La même année, un essai clinique de phase I/II a permis d'évaluer l'efficacité et la sécurité du ruxolitinib chez les patients et de démontrer une amélioration significative de la taille de la rate et des symptômes globaux (Verstovsek et al., 2010). Par la suite, les essais de phase III COMFORT-I et -II (pour Controlled Myelofibrosis Study with Oral JAK Inhibitor Treatment) ont évalué respectivement l'efficacité du ruxolitinib par rapport au placebo ou au traitement de référence, ici l'hydroxyurée, pour le traitement de la myélofibrose. Il est retrouvé que pour les patients souffrant de myélofibrose de risque intermédiaire-2 et de haut risque, le ruxolitinib permet une réduction de la taille de la rate, d'au moins 35 % pour plus de la moitié des patients traités, ainsi qu'une nette amélioration des symptômes généraux (Harrison et al., 2012; Verstovsek et al., 2012). Le suivi de ces deux cohortes sur cinq ans confirme que les effets bénéfiques du ruxolitinib, notamment sur la réduction du volume de la rate, sont maintenus et durables. Ainsi, par rapport au placebo ou au traitement de référence, les patients traités au ruxolitinib présentent une meilleure médiane de survie sans événement et une diminution du risque de décès (Harrison et al., 2016; Verstovsek et al., 2017). Ces résultats ont de plus été étendus aux myélofibroses de faible risque et de risque intermédiaire-1, à travers les essais JUMP et ROBUST (Al-Ali et al., 2016; Mead et al., 2015). Cependant, le ruxolitinib ne semble pas impacter la charge allélique *JAK2V617F* ni améliorer la fibrose de la moelle osseuse. Les effets bénéfiques du ruxolitinib dans le traitement de la myélofibrose sont ainsi principalement alloués à sa capacité à réprimer l'expression des cytokines inflammatoires de façon peu spécifique.

III.2.1.2. Traitement de la maladie de Vaquez

Ainsi, le ruxolitinib est actuellement utilisé pour le traitement de patients présentant une maladie de Vaquez et étant résistants ou intolérants à l'hydroxyurée.

Les essais RESPONSE et RESPONSE-2 menés respectivement sur des patients réfractaires ou intolérants à l'hydroxyurée et sur des patients réfractaires à l'hydroxyurée mais ne présentant pas de splénomégalie, ont montrés l'efficacité du ruxolitinib dans ces populations. En effet, le traitement par le ruxolitinib offre une amélioration par rapport à l'hydroxyurée vis-à-vis du contrôle de l'hématocrite, de la réduction de la taille de la rate et de l'amélioration des symptômes généraux tels que la fatigue, les démangeaisons, les céphalées et les étourdissements (Passamonti et al., 2017; Vannucchi, 2015). Le suivi de chaque cohorte confirme le maintien des bénéfices du ruxolitinib sur 80 semaines (Griesshammer et al., 2018; Verstovsek et al., 2016). L'essai RELIEF, portant sur l'étude des symptômes liés à la maladie de Vaquez chez des patients traités à l'hydroxyurée, montre que le ruxolitinib améliore ces symptômes. En effet, plus de 40 % des patients montrent une amélioration du score total des symptômes de 50 % ou plus après 16 semaines de traitement. Cependant, l'amélioration constatée suite au traitement par le ruxolitinib n'est pas significativement supérieure à l'amélioration observée chez les patients traités par l'hydroxyurée (Mesa et al., 2017).

Il n'existe pour le moment pas de résultats cohérents permettant de confirmer l'avantage du ruxolitinib par rapport au traitement de référence pour les patients souffrant de thrombocytémie essentielle résistants ou intolérants à l'hydroxyurée. L'essai MAJIC-ET, mené sur cinq ans, ne permet pas de conclure à une supériorité du ruxolitinib. En effet, dans cette étude, le ruxolitinib n'améliore ni les taux de réponse complète (numération plaquettaire $\leq 400.10^9/L$, taille de la rate normale et numération leucocytaire $\leq 10.10^9/L$) ou partielle par rapport au traitement de référence, ni les taux de thromboses ou d'hémorragies (Harrison et al., 2017).

III.2.2. Le ruxolitinib dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes

Outre les études portant sur des pathologies hématologiques, le ruxolitinib est actuellement évalué dans une quarantaine d'essais cliniques pour le traitement d'affections variées telles que des pathologies inflammatoires chroniques, auto-immunes, ou encore néoplasiques.

III.2.2.1. Traitement de la maladie du greffon contre l'hôte

La maladie du greffon contre l'hôte ou GvHD (pour Graft-versus-Host Disease) survient suite à une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Ces transplantations sont utilisées comme moyen de traitement curatif pour de nombreuses pathologies, en particulier hématologiques, et se soldent dans 50 à 60 % des cas par une GvHD, aiguë ou chronique, malgré l'utilisation préventive d'immunosuppresseurs. La GvHD aiguë se caractérise par (i) l'activation des cellules présentatrices d'antigènes, notamment en réponse au LPS ayant traversé la barrière intestinale, et aux cytokines inflammatoires IL1 et TNF α , (ii) l'activation des lymphocytes T greffés en réponses aux cytokines IL6, IL12 et IL23 *via* la signalisation JAK2 et (iii) l'activation d'une phase inflammatoire effectrice se traduisant par la lyse des cellules du foie, de la peau et de l'intestin de l'hôte par les lymphocytes T cytotoxiques greffés et recrutés au niveau des tissus par de nombreuses chimiokines. La forme chronique de la GvHD se traduit par une dérégulation des lymphocytes B, une inflammation tissulaire chronique associée à une fibrose, notamment médiées par les macrophages producteurs de PDGFbb et de TGF β , et un défaut de sélection au niveau du thymus conduisant à la sélection positive de cellules auto-réactives.

Le traitement de première ligne est la corticothérapie par voie générale. Pour les patients réfractaires aux corticoïdes, les traitements de seconde ligne sont multiples et montrent peu de résultats satisfaisants. La voie JAK-STAT étant impliquée dans chacune des étapes caractérisant cette maladie, les Jakinibs se sont rapidement montrés comme des molécules d'intérêt. Ainsi, certains inhibiteurs de JAK sont à l'essai aussi bien pour le traitement que pour

la prévention de la GvHD. Le ruxolitinib offre des résultats prometteurs (Zeiser et al., 2015) et est actuellement à l'étude dans une dizaine d'essais de phase II ou III. Parmi ces essais, les études REACHs évaluent son efficacité en combinaison avec les corticoïdes (REACH 1) et par rapport au traitement de référence chez les patients souffrant de GvHD aiguë (REACH 2 et RIG) et chronique (REACH 3) réfractaires à la corticothérapie (von Bubnoff et al., 2018; Jagasia et al., 2018; Mannina and Kröger, 2019; Neumann et al., 2019; Vicent et al., 2019).

III.2.2.2. Traitement de maladies auto-immunes et inflammatoires

Les pathologies dermatologiques que sont le psoriasis, la pelade, le vitiligo et la dermatite atopique sont caractérisées par une composante auto-immune médiée par une grande variété de cytokines inflammatoires pouvant être dépendantes de la signalisation JAK-STAT, et sont classiquement traités par des corticoïdes. Actuellement, une dizaine d'études de phases II ou III évaluent les effets bénéfiques du ruxolitinib dans ces pathologies.

Le psoriasis est caractérisé par des lésions de la peau la rendant rouge, squameuse et prurigineuse. De plus, 20 à 30 % des patients développent des complications rhumatologiques. Les principaux médiateurs moléculaires du psoriasis sont l'IL12 et l'IL23 ainsi que le TNF α et l'IL6 retrouvés en excès dans le plasma. Le ruxolitinib montre des effets bénéfiques en traitement local grâce à l'application d'une formule en crème à 1 % et 1.5 %, deux fois par jours, qui permet de réduire la taille des lésions cutanées (Punwani et al., 2015).

La pelade se traduit par une perte de la pilosité et des cheveux due à l'auto-réactivité des lymphocytes T envers les follicules pileux. Les cytokines IFN γ et IL15 induisent l'activation et la prolifération de ces lymphocytes. Un certain nombre d'études rapportent des effets bénéfiques du ruxolitinib sur la repousse des cheveux chez l'animal comme chez les patients. Ainsi, une méta-analyse regroupant les résultats obtenus à partir de 30 études montre le bénéfice que représentent les Jakinibs (tofacitinib, ruxolitinib et baricitinib) pour le traitement de la pelade, avec de meilleurs résultats lorsque administrés par voie orale que locale (Phan

and Sebaratnam, 2019). Le ruxolitinib par voie orale permet notamment une repousse des cheveux à 92 % pour 75 % des patients impliqué dans une étude pilote publiée en 2016 (Mackay-Wiggan et al., 2016). De plus, plusieurs case-reports rapportent une repousse complète en seulement quelques mois après introduction du ruxolitinib (Oliveira et al., 2019).

Le vitiligo est dû à la destruction ciblée des mélanocytes par les lymphocytes T autoréactifs, notamment médiée par l'IFN γ . Deux études pilotes menées sur 12 et 9 patients, montre que l'utilisation locale de ruxolitinib en crème à 1,5 % deux fois par jours permet une re-pigmentation significative chez les patients (Joshi et al., 2018; Rothstein et al., 2017). Un autre case-report démontre l'efficacité du ruxolitinib par voie orale chez un patient souffrant à la fois de vitiligo et de pelade, dont la re-pigmentation du visage et la repousse des cheveux étaient significativement améliorées après 20 semaines de traitement (Harris et al., 2016). De plus, deux essais de phase III, TRuE-V1 et -V2, menés sur 300 patients sont actuellement en cours d'inclusion pour l'utilisation du ruxolitinib en crème à 1,5 % (Identifiant ClinicalTrials : NCT04052425 et NCT04057573).

Le ruxolitinib est aussi actuellement à l'étude dans un essai de phase III pour le traitement de la dermatite atopique, mais aucun résultat n'est disponible à ce jour.

III.2.2.3. Traitement des cancers solides

Les effets du ruxolitinib comme inhibiteur d'un large nombre de cytokines inflammatoires pourraient être intéressants pour le traitement de certains cancers solides.

Les études *in vitro* semblent montrer le potentiel bénéfique apporté par le ruxolitinib pour le traitement de certains cancers pulmonaires (Hu et al., 2014; Mohrher et al., 2019; Patel et al., 2019). Cependant, parmi les essais cliniques menés, un ne montre qu'une efficacité modeste du ruxolitinib combiné à l'afatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, pour le traitement de cancers bronchiques non à petites cellules présentant une mutation *EGFR* (récepteur à l'épidermal growth factor) et résistants aux inhibiteurs de tyrosine kinase-EGFR. En effet, la

durée de survie sans progression des patients traités par le ruxolitinib et l'afatinib (4,9 mois) est inférieure à celle obtenue par le traitement de référence (9,6 mois) (Park et al., 2019). Deux autres essais ont été interrompus par manque d'efficacité (Giaccone et al., 2018) ou par soucis de sécurité (Identifiant ClinicalTrials : NCT02711137).

De façon similaire, d'après les études *in vitro* et chez l'animal, il semblerait que le ruxolitinib puisse offrir un traitement pour certains cancers mammaires. En effet, il inhibe la croissance tumorale dans certains modèles de cancers mammaires triples négatifs, résistants au tamoxifène ou encore aux inhibiteurs d'aromatase. Ces résultats se retrouvent principalement dans des lignées cellulaires mais aussi chez l'animal où le ruxolitinib induit l'apoptose des cellules tumorales et bloque la formation et la croissance de tumeurs mammaires (Chen et al., 2018; Escher et al., 2019; Kim et al., 2019; Li et al., 2019; Lim et al., 2018). Cependant, deux essais de phase II, l'un mené dans des cancers HER-négatifs en combinaison avec la capécitabine, un médicament cytostatique, l'autre dans des cancer du sein métastatique triple négatif (Stover et al., 2018), ne montrent pas ou peu d'efficacité du ruxolitinib. En combinaison avec la capécitabine dans des cancers HER-négatifs et présentant des taux élevés de CRP, le ruxolitinib améliore le taux de réponse globale, ainsi que la qualité de vie liée à la santé des patients par rapport à ceux traités par la capécitabine seule, mais ne montre pas d'amélioration significative de la survie globale ni de la survie sans progression (O'Shaughnessy et al., 2018). D'autres études de phase I et II sont actuellement en cours, notamment en combinant l'utilisation du ruxolitinib à celle d'autres traitements.

Dans le cancer du pancréas, l'essai de phase II RECAP montre un effet significatif du ruxolitinib sur la survie globale des patients par rapport au placebo (Hurwitz et al., 2015). Cependant, les études de phase III JANUS1 et 2, dans lesquelles le ruxolitinib est utilisé en combinaison de la capécitabine, la survie globale, le taux de réponse globale, la survie sans progression et la qualité de vie liée à la santé des patients souffrant de cancer du pancréas avancés ou métastatiques, ne sont pas améliorés par l'addition de ruxolitinib au traitement de

référence (Hurwitz et al., 2018). Devant ce manque d'efficacité du ruxolitinib par rapport à la capécitabine seule, l'étude s'est vue interrompue. Il en va de même pour les études de phase II menées dans le cancer de la prostate (Identifiant ClinicalTrials : NCT00638378) et colorectal (Identifiant ClinicalTrials : NCT02119676).

Malgré les résultats prometteurs obtenus *in vitro*, chez l'animal ou lors d'essais cliniques de phase I, le ruxolitinib ne semble pour le moment pas offrir d'alternative que ce soit en traitement seul ou combiné aux agents couramment utilisés.

III.3. Le ruxolitinib au niveau hépatique

A part la réduction du taux de CRP circulante observée chez les patients traités au ruxolitinib (Verstovsek et al., 2010) et le fait qu'il soit pris en charge par des enzymes hépatiques du métabolisme des médicaments, il n'existe que très peu de données sur les effets du ruxolitinib au niveau hépatique.

A la rédaction de ce manuscrit, seulement deux études portent sur ces effets dans le foie. Réalisées l'une et l'autre chez la souris, elles montrent que le ruxolitinib protège de l'hépatotoxicité induite par certains toxiques. En effet, dans un modèle d'hépatotoxicité induite par le CCl₄, un pré-traitement au ruxolitinib réduit l'infiltration de cellules immunitaires au niveau du foie, favorise l'apoptose des hépatocytes et d'inhibe l'activation de NFκB et l'expression des cytokines inflammatoires qui en découlent (Hazem et al., 2014).

Les effets observés dans un modèle d'hépatotoxicité induite par le thioacétamide sont similaires, le ruxolitinib permettant notamment de réduire les dommages tissulaires et d'augmenter l'apoptose des hépatocytes et des cellules immunitaires. De plus, le ruxolitinib inhibe la signalisation NFκB ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1β et le TNFα et réduit le stress oxydant. En plus des effets protecteurs du ruxolitinib sur les dommages tissulaires en pré-traitement, celui-ci offre aussi une protection envers ces dommages lorsqu'il est administré après le toxique hépatique (Shaker et al., 2016).

Objectifs du travail

C'est dans ce large contexte de pathologies inflammatoires chroniques que nous nous sommes intéressés au ruxolitinib. Les différentes études réalisées au cours de cette thèse et faisant l'objet de publications sont présentées ci-après.

L'objectif global de l'ensemble de nos travaux est d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires du ruxolitinib *in vitro* dans différents types cellulaires dans le but de mieux appréhender ses effets chez les patients.

Le but du premier travail effectué dans le cadre de cette thèse est de décrire les effets du ruxolitinib dans un modèle de macrophages humains en culture primaire. L'objectif est de dépeindre un tableau global des cytokines ciblées par le ruxolitinib dans des macrophages placés en conditions inflammatoires, puis d'évaluer l'impact de ruxolitinib d'un point de vue mécanistique, sur certaines cibles majeures.

La deuxième étude a pour but d'évaluer le potentiel du ruxolitinib à engendrer des idDDIs, en montrant ses effets sur les taux d'expression et l'activité des CYPs et transporteurs de médicaments dans un modèle de culture primaire d'hépatocytes humains et de lignée hépatocytaire placés en conditions inflammatoires. L'objectif plus large de cette étude est de montrer que l'utilisation du ruxolitinib en clinique pourrait nécessiter d'adapter les doses de médicaments associés dont le métabolisme et/ou la clairance sont susceptibles d'être modulés par une diminution de l'inflammation du fait des effets de l'inhibiteur de JAK.

La dernière étude est à portée plus générale, l'objectif étant de montrer les effets du ruxolitinib sur l'expression de protéines de la phase aiguë, principalement la CRP, dans des hépatocytes humains et des cellules d'hépatome humain placés en conditions inflammatoires. De plus, l'intérêt est porté sur l'aspect mécanistique afin de mieux appréhender les effets du ruxolitinib dans le modèle hépatique.

Travaux de recherche

I. Article 1 : Le ruxolitinib réprime l'expression de cytokines inflammatoires induites en réponse à l'interféron- β , dans le macrophage humain.

I.1. Résumé

L'objectif de ce travail est d'obtenir une vision globale des effets du ruxolitinib dans le macrophage humain en culture primaire placé en conditions inflammatoires ainsi que sur la signalisation de certains cytokines cibles.

I.1.1. Matériel et méthodes

Les monocytes sont isolés à partir de concentrés leuco-plaquettaires de donneurs sains après plusieurs étapes de centrifugation et d'adhésion. Les macrophages sont obtenus après 6 jours de traitement au GM-CSF permettant leur différenciation en phénotype pré-M1 (Figure 20).

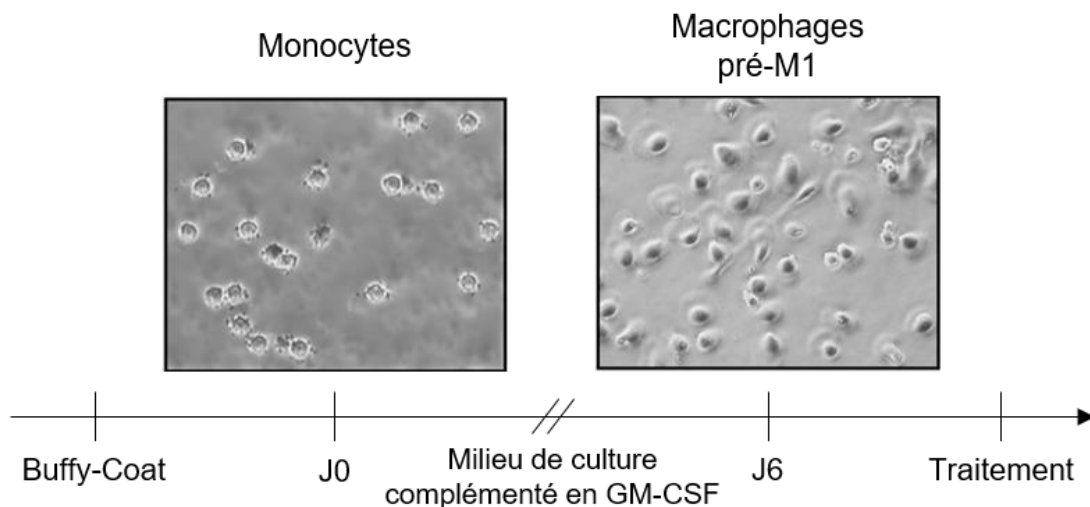


Figure 20 : Protocole de différenciation des macrophages humains en culture primaire
(Images : Lemarie et al., 2006)

Ces macrophages sont prétraités au ruxolitinib pendant 1 h puis placés en conditions inflammatoires par un traitement au LPS. Afin d'analyser de façon globale les effets du ruxolitinib dans le macrophage inflammatoire, un criblage transcriptomique RT²-profiler PCR Array "Human cytokines and chemokines", permettant d'évaluer l'expression de 84 cytokines simultanément, est effectué. Cette analyse est réalisée sur un pool équimolaire de transcrits

issus de cinq cultures indépendantes de macrophages afin de s'affranchir de la variabilité inter-individuelle.

1.1.2. Résultats et discussion

De part cette analyse, on constate que parmi les 44 cytokines induites par un traitement au LPS, 27 d'entre elles, soit 61,4% sont réprimées par le ruxolitinib.

Afin de confirmer ces résultats, seulement les cytokines les plus notablement régulées sont prises en compte pour la suite de l'étude et analysées en qPCR à partir de macrophages issus de différents individus. Ainsi, ces cytokines voient leur expression significativement réprimée par le ruxolitinib aussi bien au niveau transcriptomique que protéique. Il est intéressant de noter que ces cibles comptent notamment l'IL6 et le TNF α , et que pour un nombre important d'entre-elles, le traitement au ruxolitinib permet de restaurer les niveaux d'expressions en ARNm à des taux basaux. De plus, le ruxolitinib agit de façon dose dépendante et est efficace à de très faibles concentrations atteintes dans le plasma des patients.

Dans le macrophage humain, la réponse au LPS se fait *via* la signalisation TLR4, laquelle ne fait pas intervenir de protéine JAK. L'hypothèse émise est alors que les effets du ruxolitinib sont dus à l'inhibition d'un signal secondaire au LPS. Comme décrit précédemment, il existe deux voies de signalisation TLR4, MyD88-dépendante et MyD88-indépendante. La voie MyD88-indépendante conduisant à la synthèse d'IFN β dont la signalisation se fait par la voie JAK-STAT suggère qu'une partie des effets du ruxolitinib passent par un inhibition de la signalisation interféron secondaire à la réponse LPS.

Dans un premier temps, la banque de données Interferome, regroupant l'ensemble des gènes connus comme étant régulés par les interférons, confirme qu'une grande majorité des cytokines décrites ici comme cibles du ruxolitinib présentent une signature interféron. Par la suite, l'activation de la voie IFN β /JAK/STAT en réponse au LPS est confirmée par l'induction de la sécrétion d'IFN β , la phosphorylation et translocation nucléaire de STAT1 et l'induction

de l'expression des ISG. Ces résultats confirment de plus, l'effet inhibiteur du ruxolitinib sur cette voie en bloquant la sécrétion d'IFN β , l'activation de pSTAT1 et l'expression des ISG.

Cette étude est complétée par la confirmation de l'induction des cytokines montrées comme cibles du ruxolitinib par un stimulus IFN β et l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le récepteur à l'IFN β , dont les effets montrent un profil d'inhibition similaire au ruxolitinib.

L'ensemble de ces résultats permettent d'affirmer que dans le macrophage humain en culture primaire, le ruxolitinib bloque la réponse inflammatoire induite par une stimulation par le LPS, en inhibant la réponse secondaire orchestrée par l'IFN β .



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimpRepression of interferon β -regulated cytokines by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human macrophagesMarie Febvre-James^a, Valérie Lecreur^a, Yu Augagneur^a, Abdullah Mayati^a, Olivier Fardel^{a,b,*}^a Institut de Recherches en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Faculté de Pharmacie, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France^b Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 2 rue Henri Le Guilloux, 35033 Rennes, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Ruxolitinib
JAK
Macrophage
Inflammation
Cytokine

ABSTRACT

Ruxolitinib is a Janus kinase (JAK) 1/2 inhibitor, currently used in the treatment of myeloproliferative neoplasms. It exerts potent anti-inflammatory activity, but the involved molecular and cellular mechanisms remain poorly understood. In order to gain insights about this point, ruxolitinib effects towards expression of main inflammatory cytokines were studied in human macrophages, which constitute a key-cell type implicated in inflammation. Analysis of mRNA expression of cytokines ($n = 84$) by PCR array indicated that, among those induced by the pro-inflammatory stimulus lipopolysaccharide (LPS) ($n = 44$), 61.4% ($n = 27$) were repressed by 5 μ M ruxolitinib. The major inflammatory cytokines, interleukin (IL) 6 and tumor necrosis factor α , were notably down-regulated by ruxolitinib at both the mRNA and protein level. Other repressed cytokines included IL27 and the chemokines CCL2, CXCL9, CXCL10 and CXCL11, but not IL1 β . The interferon (IFN) β /JAK/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway, well-activated by LPS in human macrophages as demonstrated by increased secretion of IFN β , STAT1 phosphorylation, and up-regulation of reference IFN β -responsive genes, was concomitantly blocked by the JAK inhibitor. Most of cytokines targeted by ruxolitinib were shown to be regulated by IFN β in a JAK-sensitive manner. In addition, counteracting the IFN β /JAK/STAT cascade using a blocking monoclonal antibody directed against IFN β receptor resulted in a similar profile of cytokine repression to that observed in response to the JAK inhibitor. Overall, these data provide evidence for ruxolitinib-mediated repression of inflammatory cytokines in human macrophages through inhibition of the LPS/IFN β /JAK/STAT signalling pathway, which probably contributes to the anti-inflammatory effects of the JAK inhibitor.

1. Introduction

Ruxolitinib (also known as INCB018424) is a small drug belonging to the emerging class of Janus kinase (JAK) inhibitors and currently clinically used in the treatment of JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms, including intermediate or high risk myelofibrosis and polycythemia vera [1,2]. Besides the JAK2 isoform, primarily associated with receptors for the hematopoietic growth factors erythropoietin and thrombopoietin, the JAK1 isoform, which plays a major role in the signalling pathway of inflammatory cytokines, is also potently inhibited by ruxolitinib [3]. By contrast, the two other members of the JAK family, JAK3 and tyrosine kinase 2 (TYK2), are less sensitive to ruxolitinib [4].

Ruxolitinib exerts anti-inflammatory activity, which may contribute to its beneficial effects towards myeloproliferative neoplasms [5] and is likely also implicated in the suppression by ruxolitinib of the harmful consequences of macrophage activation hemophagocytic lymphohistiocytosis [6] and of age-related inflammation [7]. Among the

inflammatory cell types targeted by ruxolitinib, macrophage, a key cell type involved in inflammation [8,9], may likely be a major one, even if the exact effects of the JAK1/2 inhibitor towards this cell remain to be clarified. Indeed, ruxolitinib has been demonstrated to rather increase the inflammatory potential of mouse macrophages stimulated with Toll-like receptor (TLR) 4 agonists such as lipopolysaccharide (LPS) [10], through stimulating secretion of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF) α , interleukin (IL) 6 and IL12, whereas, by contrast, it suppresses production of IL1 β , TNF α , IL6, chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 10 and CXCL11 in TNF α -treated human macrophages [11]. CXCL10 and CXCL11 expressions, but not those of IL1 β , IL6 and TNF α , were also repressed by ruxolitinib in rheumatoid arthritis synovial macrophages [11]. The reasons for such discrepancies with respect to ruxolitinib effects towards cytokine regulation in macrophages remain unknown, but they could notably reflect differences related to the species [12] or to the nature of the inflammatory stimulus and the treatment conditions. To gain insights into ruxolitinib and cytokine regulation in inflammatory macrophages, in the present study

* Corresponding author at: IRSET, Faculté de Pharmacie, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France.

E-mail address: olivier.fardel@univ-rennes1.fr (O. Fardel).

we have analysed the expression of the main cytokine/chemokines in LPS-stimulated human macrophages in the presence and absence of this JAK1/2 inhibitor. Our data demonstrate that ruxolitinib was able to markedly suppress LPS-mediated induction of various human inflammatory cytokines, through antagonizing the autocrine interferon (IFN) β -related regulatory signalling pathway secondary triggered by LPS in human macrophages. Such effects of ruxolitinib may contribute in a major way to its anti-inflammatory properties.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Ruxolitinib, AT9283 and TG101209 were provided by Selleckchem (Houston, TX, USA), whereas LPS (*Escherichia coli* O55:B5) was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF, also known as sargramostim) was obtained from Sanofi-Aventis (Montrouge, France), whereas IFN β was from Peprotech (Neuilly-sur-Seine, France). The blocking anti-human IFN α/β receptor subunit 2 (IFNAR2) monoclonal antibody (clone MMHAR-2) was purchased from Tebu-bio (Le Perray-en-Yvelines, France), whereas those against phosphorylated (Tyr701)-signal transducer and activator of transcription (STAT) 1, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and phosphorylated (Ser172) -TANK-binding kinase 1 (TBK1) were from Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The anti-rabbit IgG antibody coupled to Alexa Fluor was from Cell Signalling (Leiden, The Netherlands). Other chemicals and reagents were of the highest available grade.

2.2. Cell culture

Macrophages were generated from peripheral blood monocytes, as previously described [13]. Briefly, peripheral blood mononuclear cells were first isolated from blood buffy coats of healthy donors through Ficoll gradient centrifugation. Human monocytes were then prepared by a 1 h adhesion step, which routinely obtained > 90% of adherent cells expressing the prototypical monocytic marker CD14 [14]. These monocytic cells were next cultured for 6 days in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 20 IU/mL penicillin and 20 μ g/mL streptomycin, in the presence of 400 IU/mL GM-CSF; this protocol led to obtain pure macrophage cultures, with < 1% of contaminating cells [15]. Cultured macrophages were then used for experiments, notably for treatment with LPS and/or ruxolitinib. Ruxolitinib and other chemicals were routinely used as stock solutions in dimethylsulfoxide (DMSO) and were commonly added 1 h before exposure to LPS, as a pre-treatment. Final concentrations of DMSO in culture medium did not exceed 0.2% (vol/vol) and control cultures were exposed to the same concentration of solvent as chemical-treated cultures.

Human highly-differentiated hepatoma HepaRG cells were cultured in Williams' E medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum, 20 IU/mL penicillin, 20 μ g/mL streptomycin, 5 μ g/mL insulin, and 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate; their hepatocytic differentiation was induced by addition of 2% (vol/vol) DMSO for 2 weeks, as previously described [16].

2.3. Cell viability assay

The effect of ruxolitinib on cell viability was analysed using the tetrazolium salt WST-1 reagent, as previously reported [17].

2.4. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) experiments

Total RNAs were extracted using the TRI reagent (Sigma-Aldrich).

Table 1
Number of genes whose mRNA expression is impaired in response to LPS or ruxolitinib in human macrophages^a.

Condition	Number of regulated genes	
	Induction	Repression
LPS-treated/untreated ^b	<i>n</i> = 44 (52.4%) ^c	<i>n</i> = 3 (3.6%)
Ruxolitinib-treated/untreated ^c	<i>n</i> = 4 (4.8%)	<i>n</i> = 8 (9.5%)
(LPS + Ruxolitinib)-treated/LPS-treated ^d	<i>n</i> = 8 (9.5%)	<i>n</i> = 27 (32.1%)

^a mRNA expression was considered impaired when it was induced or repressed by at least a 2-fold factor according to PCR array data.

^b Comparison of mRNA expression in LPS-treated macrophages versus untreated counterparts.

^c Comparison of mRNA expression in ruxolitinib-treated macrophages versus untreated counterparts.

^d Comparison of mRNA expression in ruxolitinib/LPS-treated macrophages versus LPS-treated counterparts.

^e Numbers in parentheses indicated % of regulated genes comparatively to the total number of genes (*n* = 84) analysed in the PCR array.

Table 2
List of genes whose mRNA expression is repressed by ruxolitinib in LPS-treated macrophages.

Gene	Gene family	Repression factor ^a
CXCL10	Chemokines	996.0
CXCL11	Chemokines	451.9
TRAIL	TNF receptor superfamily members	388.0
IFN- γ	Interferons	72.5
IL27	Interleukins	61.4
CXCL9	Chemokines	51.3
CCL2	Chemokines	44.3
FASLG	TNF receptor superfamily members	35.5
CCL8	Chemokines	19.3
CCL7	Chemokines	12.9
BMP2	Growth factors	10.9
C5	Other cytokines	7.5
CXCL13	Chemokines	6.5
TNFSF13B	TNF receptor superfamily members	5.6
TNFRSF11B	TNF receptor superfamily members	4.6
CD40LG	TNF receptor superfamily members	4.4
IL7	Interleukins	4.1
IL12A	Interleukins	3.9
XCL1	Chemokines	3.4
IL15	Interleukins	3.3
TNF- α	TNF receptor superfamily members	3.1
IL1RN	Interleukins	2.9
IL10	Interleukins	2.7
IL6	Interleukins	2.6
LTA	TNF receptor superfamily members	2.2
CCL19	Chemokines	2.1
CXCL16	Chemokines	2.1

^a Ratio of mRNA expression in LPS-treated macrophages versus that in LPS/ruxolitinib-co-treated macrophages according to PCR array data.

RNAs were then reverse transcribed using the RT kit from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). PCR were next performed using the fluorescent dye SYBR Green methodology and a CFX384 real-time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), as described previously [18]. Predesigned primers for gene expression analysis were provided by Sigma-Aldrich. The specificity of each gene amplification was verified at the end of qPCR reactions through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were analysed with CFX Manager software (Bio-Rad), using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to the 18S rRNA endogenous reference, using the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method. Data were finally commonly expressed as mRNA expression fold change compared to untreated macrophages, i.e., the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells, or as repression

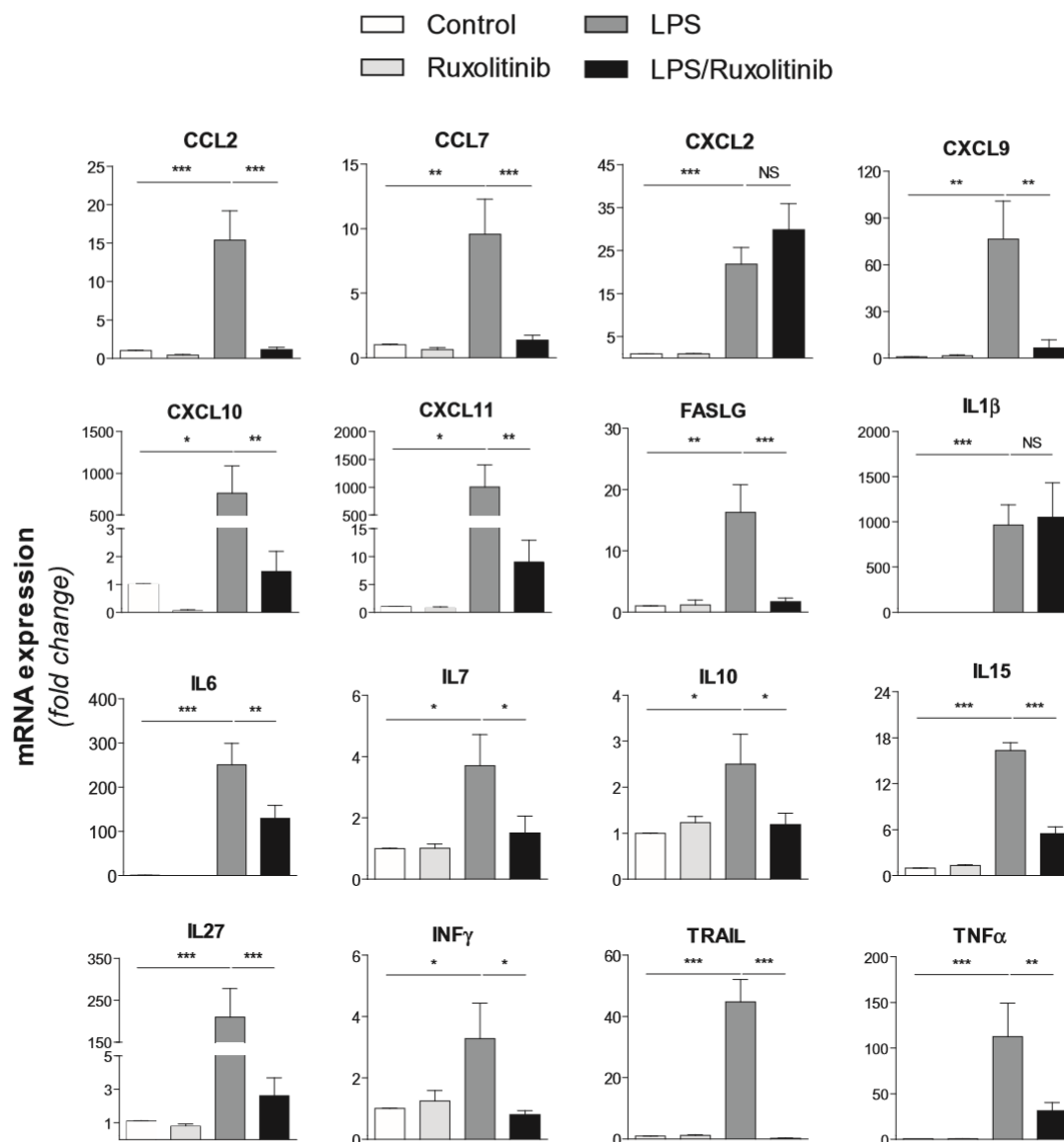


Fig. 1. Effects of ruxolitinib on LPS-induced mRNA expression of cytokines in human macrophages.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 6 h. mRNA expression of cytokines was next determined by single RT-qPCR assays. Data are expressed as mRNA expression fold change compared to untreated macrophages, i.e., the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells; they are the means \pm SEM of at least 4 independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, not statistically significant.

factor, i.e., the ratio mRNA level in control condition versus that found in treatment conditions.

2.5. RT-PCR array

The RT² Profiler™ PCR array “Human cytokines and chemokines” was obtained from Qiagen (Hilden, Germany). This PCR array contains gene-specific qPCR assays for a thoroughly researched set of 84 genes relevant to cytokine/chemokine area as well as for 5 various house-keeping genes, put into 96-well plates (See Table S1 for the complete list of genes investigated in the array). Total RNAs were extracted as described above and then purified using the spin column-based RNeasy Mini Kit (Qiagen). For each condition, an equimolecular pool of RNAs from five independent assays (5 \times 80 ng total RNA) was prepared and was reverse transcribed. PCR experiments were next performed and analysed according to manufacturer instructions. Levels of mRNA expression were normalized to mRNA expression of β 2-microglobulin, used here as a house-keeping gene, and were commonly expressed as

induction factor, i.e., the ratio mRNA level in treatment condition versus that found in control or reference conditions, or as repression factor, i.e., the ratio mRNA level in control condition versus that found in treatment conditions.

2.6. In silico analysis of type I IFN inducibility

The putative inducibility by type I IFN (IFN α and IFN β) of LPS-regulated cytokines was studied online using the interferome database (<http://www.interferome.org/interferome/home.jsp>) [19]. Cytokine was considered as type I IFN-inducible when at least one condition of type I IFN-treatment reported in the database results in increased mRNA expression by at least a 2-fold factor. It was considered as putatively non-inducible when the criteria of type I IFN-responsiveness described above was not reached or when no data concerning potential regulation by type I IFN was available in the database.

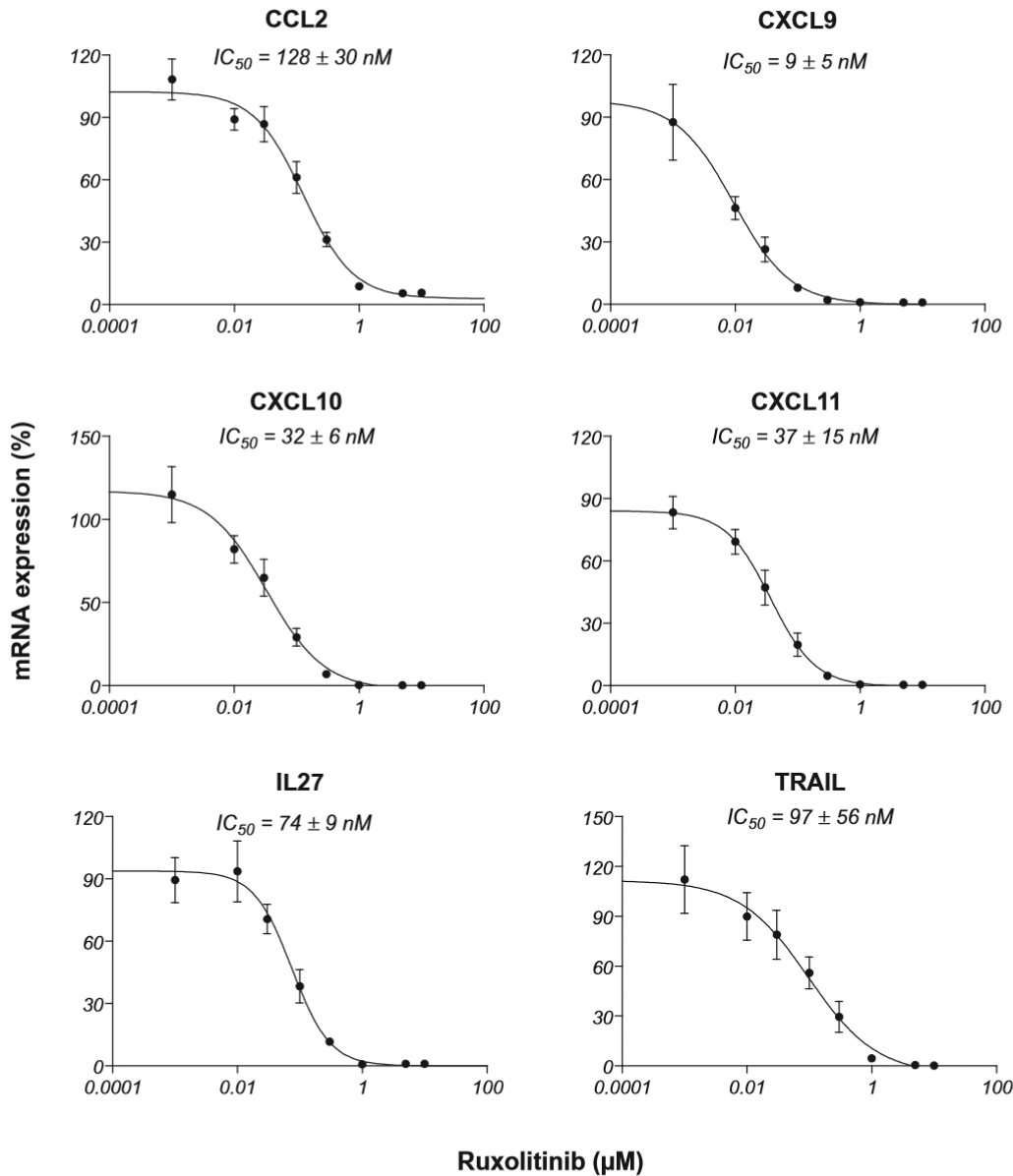


Fig. 2. Dose-dependent effects of ruxolitinib on LPS-induced mRNA expression of cytokines in human macrophages. Primary human macrophages were exposed to 10 ng/mL LPS in the absence or presence of various concentrations of ruxolitinib (from 1 nM to 10 µM) for 6 h. mRNA expression of cytokines was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as percentages of mRNA expression found in LPS-treated cells not exposed to ruxolitinib, arbitrarily set at 100% for each cytokine; they are the means ± SEM of at least 3 independent experiments. Ruxolitinib IC_{50} values are indicated on the top of the graphs.

2.7. Quantification of cytokine levels

The levels of cytokines secreted in culture medium of macrophage cultures were quantified by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using specific human DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the instructions of the manufacturer. Data were finally collected by spectrophotometry using a SPECTROstar Nano microplate reader (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France).

2.8. Immunocytochemistry

Macrophages were fixed with a cold solution of acetone for 10 min on ice. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in PBS containing 4% bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Cells were next incubated with primary antibody against phosphorylated-STAT1, NF-κB or phosphorylated-TBK1 overnight. After two washes with PBS, the primary antibody was detected with anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor from Cell Signalling (Leiden, The Netherlands), whereas nuclei were stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), for 1 h at room temperature.

Immunofluorescence images were finally acquired with a confocal fluorescence microscope LEICA DMI 6000 CS (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France).

2.9. Statistical analysis

Quantitative data were routinely expressed as means ± SEM of at least three independent assays. They were statistically analysed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls' post-hoc test. Linear correlation between quantitative data was investigated using the Pearson correlation coefficient. Chi-square analysis was conducted to examine association between categorical data. The criterion of significance was $p < 0.05$. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of ruxolitinib towards cytokine mRNA expression were determined using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA), through nonlinear regression based on the four parameter logistic function.

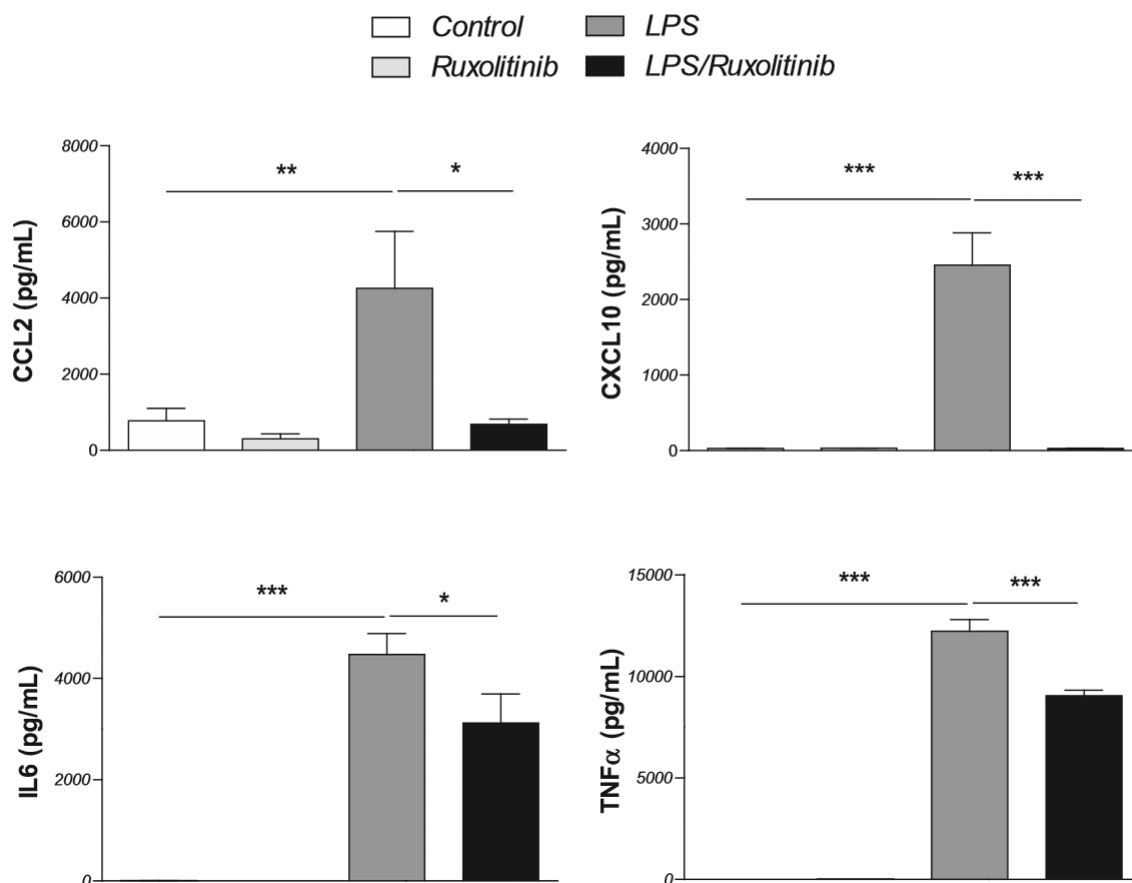


Fig. 3. Effects of ruxolitinib on LPS-induced secretion of cytokines in human macrophages.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 6 h. Cytokine secretion in culture medium was next determined by ELISA. Data, expressed in pg/mL, are the means \pm SEM of at least 4 independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Repression of LPS-induced cytokine expression by ruxolitinib

The RT² Profiler™ PCR array “Human cytokines and chemokines” was firstly applied to characterise cytokine mRNA expression in primary human macrophages exposed to 10 ng/mL LPS for 6 h, in the absence or presence of 5 μ M ruxolitinib. This concentration of ruxolitinib was initially used because it is in the range of in vitro concentrations previously shown to be fully active towards JAKs [20,21]. This 5 μ M concentration of ruxolitinib, as well as those of 1 and 10 μ M, did not alter viability of macrophages in response to a 7 h or 24 h exposure (Fig. S1). The time of exposure to LPS (6 h) was chosen for the study because it is representative of the peak of inflammatory gene responses, whereas a shorter time (2 h) or a longer time (24 h) of LPS treatment reflect, respectively, early gene response or subsequent resolution phase [12,22]. The number of genes whose mRNA expression was induced or repressed by LPS or ruxolitinib using a threshold value of 2 is indicated in Table 1. LPS treatment was found to alter mRNA expression of 56.0% of analysed genes, most of them being induced (See Table S2 for the complete list of induction factors for genes whose mRNA expression was increased by LPS). By contrast, ruxolitinib only minimally affected constitutive cytokine mRNA expression, i.e., only 14.3% of analysed genes has impaired mRNA expression in ruxolitinib-exposed macrophages when compared to untreated counterparts (Table 1). However, ruxolitinib more obviously affected cytokine mRNA expression in LPS-exposed macrophages, with a total of 41.6% of targeted genes, most of them being repressed (Table 1). The complete

list of repression factors for the genes down-regulated by ruxolitinib in inflammatory LPS-treated macrophages is provided in Table 2; these ruxolitinib-sensitive genes belong to various families of cytokines (i.e., chemokines, interleukins, growth factors...), and include major inflammatory cytokines such as IL6 and TNF α (Table 2). The number of these ruxolitinib-repressed genes ($n = 27$) represents 61.4% of the total number of genes up-regulated by LPS ($n = 44$) (Table 1 and Table S2). A notable proportion of LPS-up-regulated cytokines, corresponding to 38.6% ($n = 17$) of the total number of LPS-up-regulated cytokines ($n = 44$), was consequently not repressed by ruxolitinib. These ruxolitinib-unresponsive genes notably included some cytokines highly inducible by LPS such as IL12B, GM-CSF, CCL20, CXCL2 and IL1 β (Table S2).

To validate the results of the PCR array, single qPCR experiments were then performed using macrophages derived from monocytes of various individuals. As shown in Fig. 1, the LPS-mediated up-regulation of various cytokines such as CCL2, CCL7, CCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, FASLG, IL6, IL7, IL10, IL15, IL27, IFN γ , TNF α and TRAIL were fully confirmed to be repressed by ruxolitinib. Such repression was almost complete for most cytokines; LPS-mediated inductions of cytokines such as TNF α and IL6 were nevertheless only partly repressed by the JAK inhibitor (Fig. 1). Single qPCR assays additionally confirmed the fact that LPS-mediated up-regulations of IL1 β and CXCL2 were not impaired by ruxolitinib (Fig. 1). Repression factors due to ruxolitinib and determined from single qPCR assays were finally shown to be highly correlated with those from the PCR array (Fig. S2), thus likely fully validating the data from the PCR array.

The repressing effects of ruxolitinib towards mRNA expression of

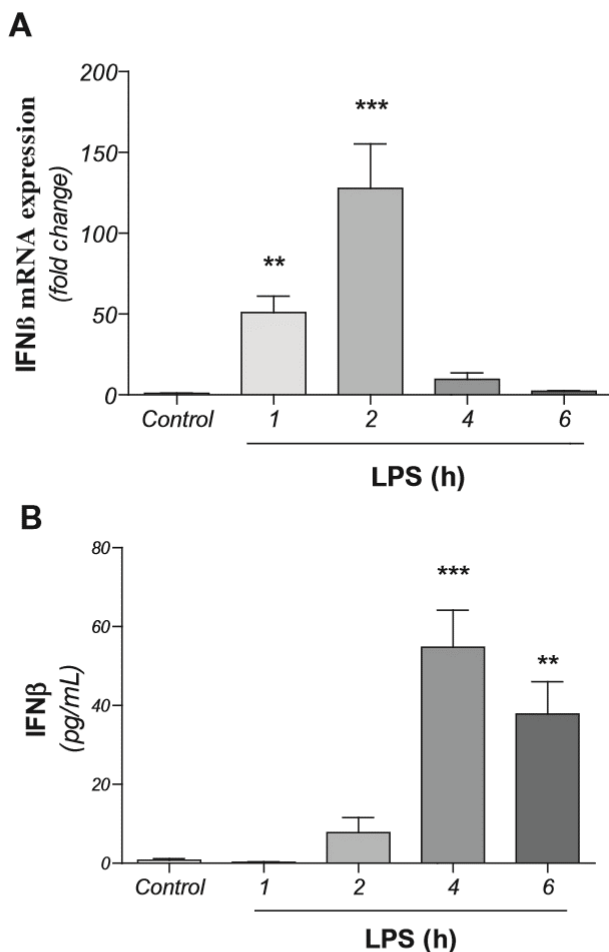


Fig. 4. Kinetics of LPS-induced mRNA expression and secretion of IFN β . Primary human macrophages were either untreated (control), or exposed to 10 ng/mL LPS for 1, 2, 4 or 6 h. (A) IFN β mRNA expression was determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated macrophages, i.e., the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells. (B) IFN β secretion in culture medium was determined by ELISA. Data are expressed as pg/mL. (A, B) Data are the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ when compared to control.

cytokines were next shown to be dose-dependent with IC₅₀ values ranging from 9 nM (for CXCL9) to 128 nM (for CCL2) (Fig. 2). They were moreover associated with concomitant significant repression of LPS-induced cytokine secretion in supernatants of macrophage cultures for CXCL10, TNF α , IL6 and CCL2 (Fig. 3).

Because ruxolitinib may exert JAK-independent effects [23], the effects of JAK inhibitors structurally unrelated to ruxolitinib, such as AT9283 and TG101209, were studied. As indicated in Fig. S3, these JAK inhibitors used at 5 μ M were found to fully repress LPS-mediated mRNA induction of cytokines such as CCL2, CXCL10, IL27 and TRAIL in primary macrophages. Like ruxolitinib (Fig. 1), they also partly decreased LPS-triggered TNF α mRNA induction (Fig. S3).

To determine whether ruxolitinib may also counteract pro-inflammatory factors which do not primarily signal via JAKs, such as IL1 β and TNF α , its putative effect towards IL1 β - and TNF α -mediated up-regulation of the inflammatory chemokine IL8 was studied in human hepatoma HepaRG cells, used here as a reference cellular model responsive to inflammatory cytokines [24,25]. As indicated in Fig. S4, ruxolitinib failed to impair IL1 β - and TNF α -induced IL8 mRNA expression in HepaRG cells.

3.2. Repression of LPS-mediated activation of IFN β signalling pathway by ruxolitinib

LPS is known to regulate cytokine production through activation of its receptor, i.e., the Toll-like receptor (TLR) 4, and the subsequent activation of two main distinct signalling cascades: (1) a myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent pathway, which notably results in nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B through phosphorylation/inactivation of inhibitors of κ B (I κ Bs) and subsequent production of NF- κ B-responsive cytokines like IL1 β , and (2) a MyD88-independent pathway involving the TLR4 adaptor TIR-domain-containing adapter-inducing IFN β (TRIF), which triggers activation/phosphorylation of TBK1, following by that of the transcription factor interferon regulatory factor (IRF) 3, and finally resulting in production of IFN β . IFN β up-regulated by LPS/TLR4/TRIF/TBK1/IRF3 pathway secondary induces various IFN-stimulated genes (ISGs), including cytokines, through autocrine activation of its receptor composed of IFNAR1 and IFNAR2 subunits [26–29]. Because the signalling cascade of IFNAR1/2 basically involves the JAK1/STAT1 pathway [30] and because LPS-mediated induction of some cytokines has already been shown to require STAT1 activity [31], we hypothesised that ruxolitinib may alter LPS-mediated regulation of cytokines through impairing the autocrine effects of IFN β . To investigate this hypothesis, we beforehand determined whether ruxolitinib efficiently counteracts LPS-triggered IFN β signalling pathway in human macrophages. As shown in Fig. 4, LPS up-regulated IFN β at both mRNA and protein secretion levels in primary human macrophages. Induction of IFN β mRNA levels was however transient and peaked after a 2 h exposure to LPS (Fig. 4A), whereas IFN β secretion appeared in a delayed manner after a 4 h LPS-exposure and persisted after a 6 h LPS-exposure (Fig. 4B). This LPS-mediated secretion of IFN β appeared to be functional, because mRNA expressions of reference ISGs such as MX1, ISG15, protein kinase R (PKR) and IRF7 were markedly induced in response to exposure to LPS (Fig. 5A). The kinetic of these inductions, i.e., up-regulations in response to 4 h and 6 h exposure to LPS, but not for shorter exposures (1 h and 2 h) (Fig. S5), was moreover fully consistent with that of IFN β secretion (Fig. 4B). Such LPS-mediated inductions of these ISGs were fully inhibited by ruxolitinib (Fig. 5A), thus suggesting that they required activation of the JAK/STAT signalling. In agreement with this hypothesis, LPS was found to induce phosphorylation of STAT1 and its subsequent translocation into the nucleus, which were fully blocked by ruxolitinib (Fig. 5B). Taken together, these data demonstrate that ruxolitinib was able to fully repress the LPS-mediated activation of IFN β signalling pathway in primary human macrophages. Ruxolitinib was additionally found to significantly, but partly, counteract LPS-mediated up-regulation of IFN β mRNAs (Fig. 6A) and IFN β secretion (Fig. 6B) in primary cultures of human macrophages. By contrast, ruxolitinib did not alter LPS-triggered nuclear translocation of NF- κ B in macrophages (Fig. S6A) nor LPS-mediated phosphorylation of TBK1 (Fig. S6B).

3.3. IFN β -mediated inducibility of ruxolitinib-repressed cytokines

The putative inducibility by type I IFN, like IFN β , of LPS-regulated cytokines was first analysed using the online interferome database and is indicated in Table S2 for each cytokine. When globally analysed (Table 3), the majority (66.7%) of LPS-induced genes repressed by ruxolitinib was found to be inducible by type I IFN by our *in silico* approach. By contrast, LPS-induced cytokines not sensitive to ruxolitinib were, for most of them (94.1%), not responsive to type I IFN (Table 3 and Table S2), thus underlining the link between sensitivity to ruxolitinib and response to IFN. To confirm this relationship, we next investigated the direct regulation of various ruxolitinib-sensitive cytokines by IFN β in primary human macrophages. As indicated in Fig. 7, CCL2, CXCL9, CXCL10, TRAIL, IL6 and TNF α mRNA expressions were found to be up-regulated by a 4 h exposure to 50 ng/mL IFN β , in a JAK/STAT-dependent manner as demonstrated by the suppressive effects of

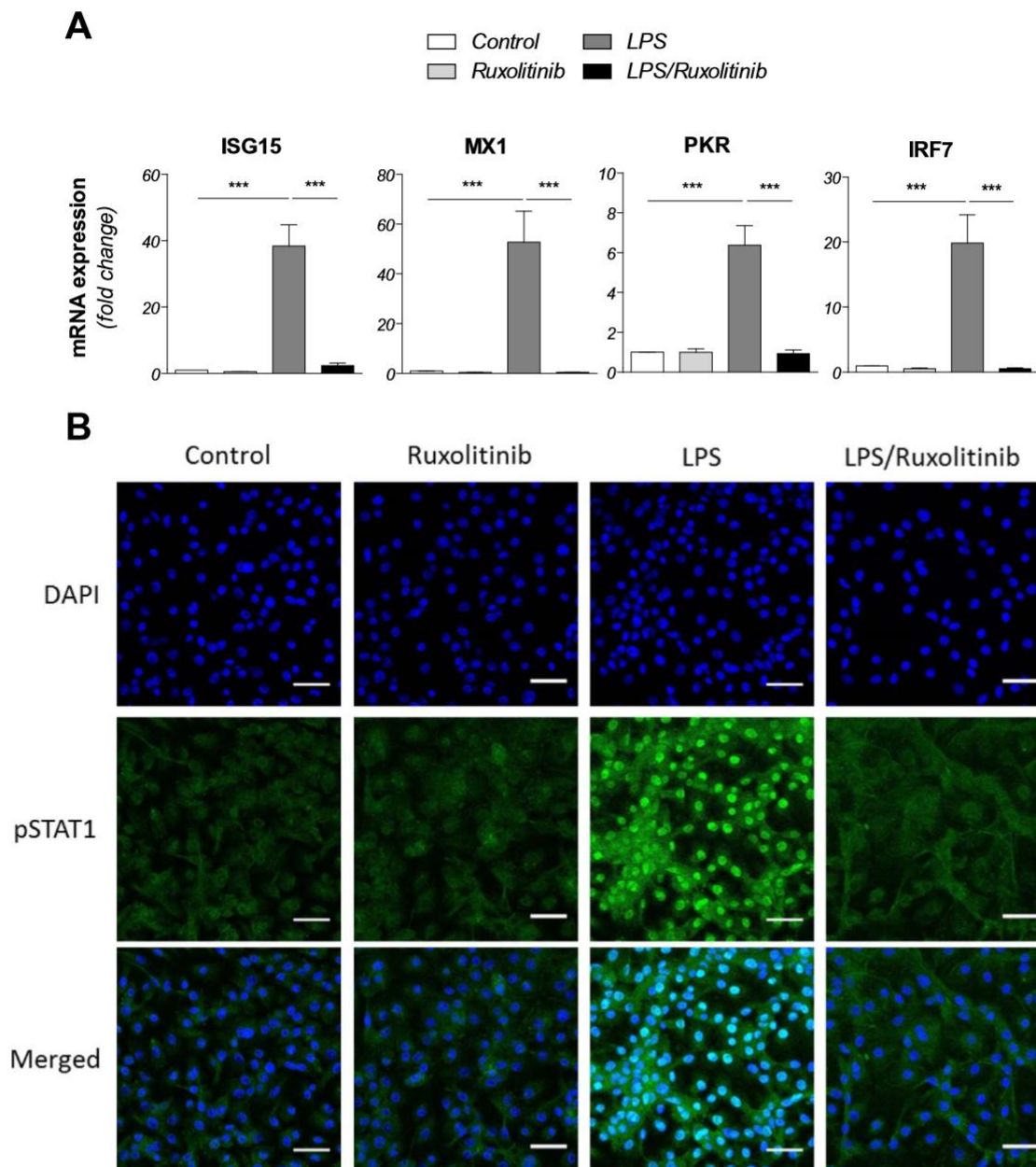


Fig. 5. Effects of ruxolitinib on LPS-induced IFN β signalling pathway in human macrophages.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 6 h. (A) mRNA expression of interferon-stimulated genes (ISGs) was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA expression fold change compared to untreated macrophages, i.e., the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells; they are the means \pm SEM of at least 6 independent experiments. ***, $p < 0.001$. (B) Phosphorylated STAT1 (pSTAT1) was analysed by immunofluorescence; pSTAT1-related fluorescence is green, whereas blue fluorescence corresponds to DAPI-stained nuclei. Bar = 50 μ m. Data shown are representative of 5 independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

5 μ M ruxolitinib. By contrast, IL1 β , which is not sensitive to ruxolitinib (Fig. 1), was not up-regulated by IFN β in macrophages (Fig. 7). IL-27, although inhibited by ruxolitinib in LPS-exposed macrophages (Fig. 1), was also not induced by IFN β in primary human macrophages (Fig. 7).

To finally determine whether abrogation of the IFN β signalling cascade may mimic the activity of ruxolitinib towards cytokine expression, we analysed the effects of a blocking antibody directed against IFNAR2 in LPS-exposed macrophages. As shown in Fig. S7, the use of this blocking anti-IFNAR2 antibody fully reproduced the inhibitory effects of ruxolitinib towards LPS-mediated induction of reference ISGs such as MX1, ISG15, PKR and IRF7, which demonstrates its efficiency for counteracting IFN β signalling in macrophages. The anti-IFNAR2 antibody was next shown to block LPS-mediated up-regulation of various cytokines, including CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL15, IL27,

TNF α and TRAIL (Fig. 8). Such effects of this anti-IFNAR2 antibody were similar to those caused by ruxolitinib, which fully supports ruxolitinib efficiency for counteracting IFN β signalling in human macrophages (Fig. 7). By contrast, the anti-IFNAR2 antibody failed to inhibit IFN β mRNA induction caused by LPS in human macrophages, whereas it concomitantly fully suppressed that of ISG15 (Fig. S8).

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib markedly counteracts the LPS-mediated induction of various cytokines in human macrophages. Such data fully confirm the fact that inflammatory cytokines constitute key-targets for ruxolitinib and support its now well-established, but possibly complex, interactions with

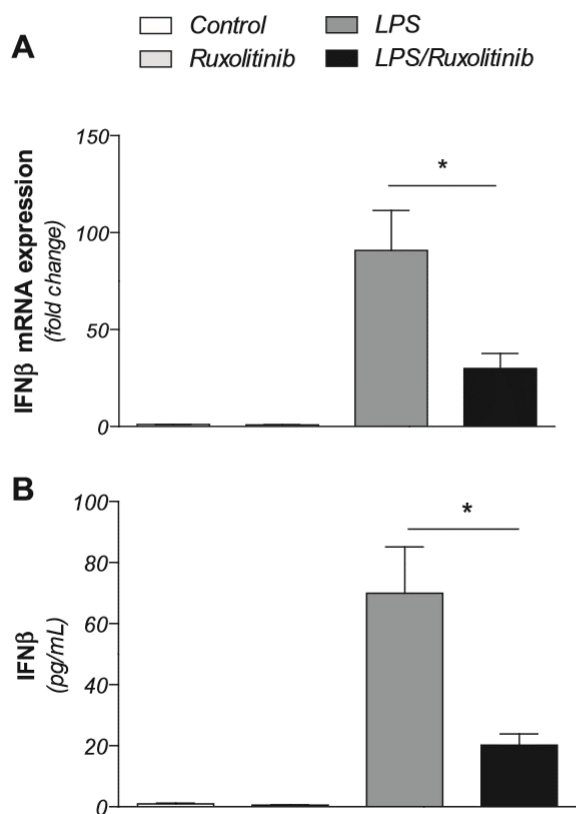


Fig. 6. Effects of ruxolitinib on LPS-induced mRNA expression and secretion of IFN β . Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for (A) 2 h or (B) 4 h. (A) IFN β mRNA expression was determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated macrophages, i.e., the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in control untreated cells. (B) IFN β secretion in culture medium was determined by ELISA. Data are expressed as pg/mL. (A, B) Data are the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. *, $p < 0.05$.

Table 3
Association between repression by ruxolitinib and inducibility by type I IFN for LPS-induced cytokines.

Ruxolitinib effect ^a	Type I IFN inducibility ^b		p value ^c
	Yes	No	
Repression	$n = 18$ (66.7%) ^d	$n = 9$ (33.3%) ^d	< 0.0001
No repression	$n = 1$ (5.9%) ^e	$n = 16$ (94.1%) ^e	

^a According to PCR array data.

^b Evaluated using the online interferome database [19].

^c Determined by chi-square test.

^d Numbers in parentheses correspond to the percentage of the total number of LPS-induced cytokines repressed by ruxolitinib ($n = 27$).

^e Numbers in parentheses correspond to the percentage of the total number of LPS-induced cytokines not repressed by ruxolitinib ($n = 17$).

inflammatory/immune processes [32,33]. Expression of major inflammatory cytokines such as TNF α and IL6 was notably reduced in inflammatory human macrophages exposed to ruxolitinib, which may agree with clinical beneficial anti-inflammatory properties of the JAK1/2 inhibitor in various human diseases, notably in myeloproliferative neoplasms [5], graft-versus-host disease [34] and cutaneous diseases [35]. In contrast to our data, ruxolitinib has however been reported to stimulate secretion of TNF α and IL6 in mouse bone-marrow macrophages [10]. Such a discrepancy may reflect species-specific response of macrophages to ruxolitinib. The fact that such divergences in response to inflammatory effectors, including LPS, have already been reported

between human and mouse macrophages [12], likely supports this hypothesis. Moreover, despite its putative pro-inflammatory activity in mouse macrophages, ruxolitinib has been reported to exert rather potent anti-inflammatory effects in various murine models of inflammation, including those related to macrophage activation hemophagocytic lymphohistiocytosis [6], age-related inflammation [7], experimental candida sepsis [36], chronic pancreatitis [37] and pancreatic cancer [38]. Such data overall support a dominant anti-inflammatory effect of ruxolitinib in mouse species.

The molecular mechanism by which ruxolitinib down-regulates expression of various cytokines in human macrophages most likely involves inhibition of the JAK-STAT pathway. Indeed, the IC₅₀ values of ruxolitinib towards LPS-mediated up-regulation of various cytokines are in the 10–100 nM range, which corresponds to concentrations previously shown to inhibit the JAK-STAT pathway in cultured cells [4]. Also, structurally-divergent JAK inhibitors such as AT9283 and TG101209 prevented LPS-mediated up-regulation of cytokines. Moreover, ruxolitinib efficiently blocked JAK-mediated phosphorylation and subsequent nuclear translocation of STAT1, known to be required for induction of some LPS-regulated genes [39]. Ruxolitinib also counteracted LPS-mediated induction of references ISGs such as MX1, which are well-known to be induced via IFN β -mediated activation of the JAK1/STAT1 pathway in inflammatory macrophages [27]. Lastly, ruxolitinib failed to inhibit JAK-independent IL8 mRNA up-regulation in IL1 β - or TNF α -treated hepatoma HepaRG cells and it did not impair LPS/TLR4-triggered activation of JAK-unrelated molecular signalling actors, like NF- κ B (MyD88-dependent pathway) and TBK1 (MyD88-independent pathway), in macrophages. In fact, the inhibition of the JAK-dependent IFN β signalling cascade probably contributes in a major way to the nature of the cytokines targeted by ruxolitinib in human macrophages. Indeed, most of the cytokines down-regulated by the JAK inhibitor, including notably CCL2, CXCL9, CXCL10 and TRAIL, were found to be inducible by IFN β and abrogation of IFN β signalling using a blocking antibody directed against the IFN receptor IFNAR2 fully mimicked the effects of ruxolitinib. The JAK inhibitor appears therefore to counteract IFN β -dependent effects triggered by TLR4/TRIF/IRF3-dependent signalling cascade, through inhibition of the JAK1/STAT1 signalling pathway activated by TRIF-induced IFN β (Fig. 9). Autocrine effects of IFN β in human inflammatory macrophages are consequently abrogated by ruxolitinib-mediated inhibition of JAK1/2 activity. The partial, but significant, reduction of LPS-induced IFN β secretion due to ruxolitinib may additionally contribute to its inhibitory activity towards the TRIF/IFN β signalling cascade activated by LPS. The way by which ruxolitinib diminishes, but not abolishes, IFN β up-regulation in LPS-exposed human macrophages remains to be determined. Impairment of a putative autocrine amplification of IFN β secretion by the cytokine itself can however be discarded, as the use of an anti-IFNAR2 antibody failed to alter IFN β induction in response to LPS. Similarly, an inhibition of the first steps of the MyD88-independent TLR4/TRIF/TBK1/IRF3 pathway, leading to activation of TBK1, is very unlikely, as ruxolitinib did not inhibit phosphorylation of TBK1 in LPS-treated human macrophages. The JAK inhibitor may therefore be hypothesised to partially decrease activity of IRF3 or to partially inhibit other unidentified molecular ways required for proper IFN β expression. Further studies are likely required to investigate these points.

In contrast to the MyD88-independent TRIF/IFN β pathway, the MyD88/NF- κ B cascade activated by LPS is unlikely to be impaired by ruxolitinib (Fig. 9). Indeed, induction by LPS of IL1 β , a prototypical cytokine regulated by NF- κ B [40], is not altered by the JAK inhibitor, as well as LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B. In this context, it may be hypothesized that ruxolitinib probably failed to block the well-established NF- κ B-mediated induction of IL6 and TNF α in response to TLR4 activation. Partial reduction of the expression of these cytokines by ruxolitinib thus likely results from blockage of IFN β signalling, knowing that TNF α and IL6 were demonstrated to be inducible by IFN β in the present study. In addition, inhibition of other JAK/STAT

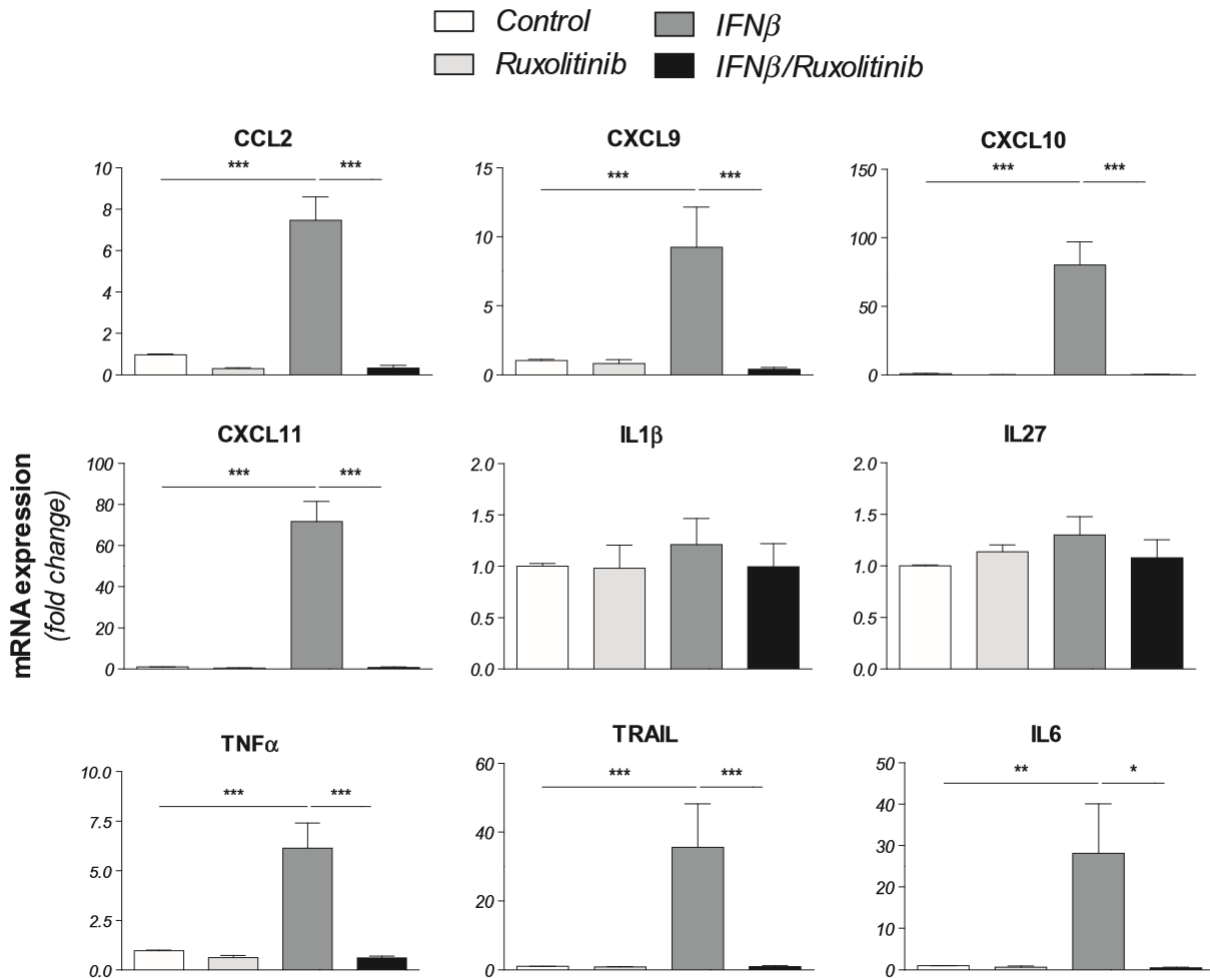


Fig. 7. Effects of ruxolitinib on IFN β -induced mRNA expression of cytokines in human macrophages.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 50 ng/mL IFN β or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 50 ng/mL IFN β for 4 h. mRNA expression of cytokines was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated macrophages, i.e., the ratio mRNA expression in IFN β -treated macrophages versus that found in untreated cells; they are the means \pm SEM of at least 5 independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

signalling cascades, activated by LPS-induced cytokines distinct from IFN β , may be implicated. With respect to IL27, its LPS-induced expression is markedly inhibited by ruxolitinib and also by the blocking antibody directed against IFNAR2, thus demonstrating that IFN β signalling is required for its induction by LPS. IL27 was however not found to be directly inducible by IFN β itself in human macrophages; this suggests that its up-regulation by LPS may in fact initially involve an unknown IFN β -dependent factor, which secondary stimulates IL27 expression.

The exact contribution of the ruxolitinib-mediated repressions of distinct cytokines to its *in vivo* anti-inflammatory effects remains to be precisely determined. As already discussed above, the partial repression of IL6 and TNF α expression by ruxolitinib is likely to contribute, owing to the major inflammatory role of these cytokines. Decreased expression of the chemokines CCL2, CCL7, CXCL9, CXCL10, CXCL11, which act as pro-inflammatory chemoattractants for immune cells like monocytes, macrophages or T lymphocytes [41,42], may also support the anti-inflammatory activity of the JAK inhibitor. The same hypothesis may be drawn for ruxolitinib-mediated repression of IL15 and IL27, owing to the pro-inflammatory role of these cytokines [43,44]. Interestingly, macrophagic cytokines are repressed by ruxolitinib concentrations in the 10–100 nM range, which is easily reached in plasma of patients treated by ruxolitinib [45]. These cytokines may therefore be postulated to be efficiently *in vivo* targeted by administration of the JAK inhibitor. This hypothesis is supported by the fact that plasma levels of

IL6 and TNF α have been reported to decrease in patients suffering from myelofibrosis and receiving ruxolitinib [1]. Further studies are required to determine whether other cytokines targeted by the JAK1/2 inhibitor in macrophages and up-regulated in myeloproliferative neoplasms, such as IL7, IL15, CCL2, CXCL9 and CXCL10 [46,47], may be also repressed in plasma of ruxolitinib-treated patients.

Besides pro-inflammatory cytokines, IL10, a cytokine known to limit and ultimately terminate inflammatory responses [48] and to be inducible by type 1 IFN in response to LPS [49], is also repressed by ruxolitinib. This JAK1/2 inhibitor may therefore be considered as exerting some opposite effects, i.e., it represses expression of both inflammatory and anti-inflammatory cytokines in macrophages. The net balance, which has to integrate the effects of ruxolitinib towards other immune cells, such as T lymphocytes [50], dendritic cells [21] and NK cells [20], tilts nevertheless likely in favour of an anti-inflammatory role, as exemplified by the improvement of inflammatory symptoms observed in patients treated by ruxolitinib [5] and the known dominant IFN activities stimulating macrophages for enhanced effector function [51]. In addition, IFN β has been demonstrated to significantly contribute to LPS-induced lethality [28]. Ruxolitinib, through counteracting IFN β signalling, may consequently protect against mortality due to bacterial infections.

Apart from its potential beneficial anti-inflammatory activity, ruxolitinib may exert deleterious effects on health, through the repression of the TLR4/TRIF/IFN β signalling cascade. Indeed, IFN β , like other IFN

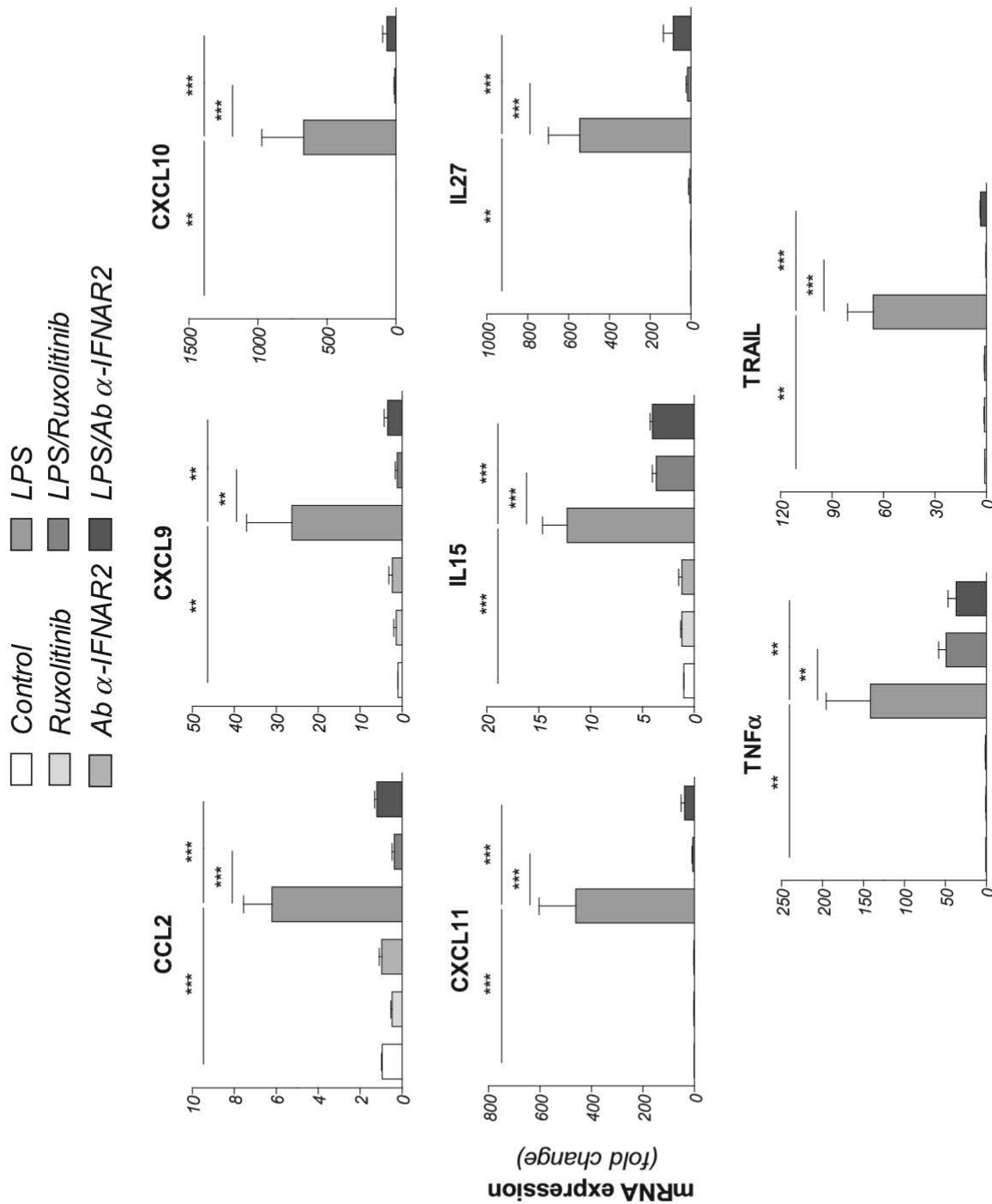


Fig. 8. Effects of a blocking anti-IFNAR2 antibody on LPS-induced mRNA expression of cytokines in human macrophages. Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib, 5 μ g/mL anti-IFNAR antibody (Ab α -IFNAR2) or 10 ng/mL LPS, or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS or to 5 μ g/mL anti-IFNAR2 antibody and 10 ng/mL LPS for 6 h. mRNA expression of cytokines was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated macrophages, i.e., the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells; they are the means \pm SEM of at least 4 independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

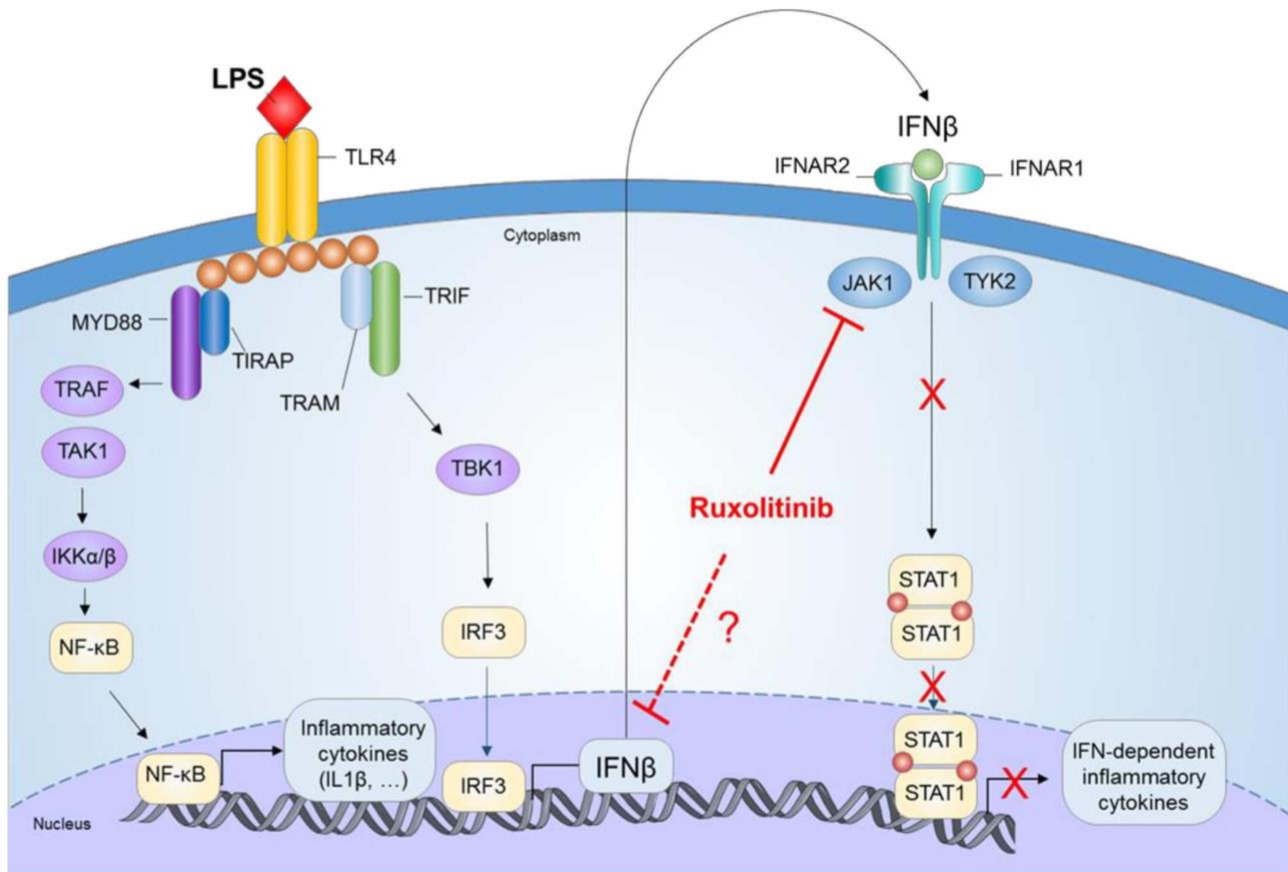


Fig. 9. Schematic representation of putative interaction of ruxolitinib with LPS/TLR4 signalling pathways.

Stimulation of TLR4 by LPS leads to the recruitment of MYD88 and TRIF, via Toll-interleukin 1 receptor adaptor protein (TIRAP) and TRIF-related adaptor molecule (TRAM), respectively. MYD88 activates the NF- κ B pathway and subsequent production of inflammatory cytokines through mobilisation of the IL1 receptor-associated kinases (IRAKs)/TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)/transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1)/inhibitor of kappa B kinase (IKK) α/β signalling cascade. The TRIF signalling pathway leads to the transcription of IFN β via TBK1-mediated phosphorylation of IRF3 and subsequent translocation of phosphorylated IRF3 into the nucleus. Once secreted, IFN β interacts with the IFN α/β receptor (IFNAR, composed of the IFNAR1 and IFNAR2 subunits) in an autocrine manner, which then activates JAK1 and TYK2. Phosphorylation of the receptor by these kinases results in the recruitment, phosphorylation, dimerization and nuclear translocation of STATs, notably STAT1. In the nucleus, STATs will induce the transcription of IFN-dependent inflammatory cytokines. Ruxolitinib, through primarily antagonizing JAK1 activity, likely abrogates autocrine IFN β signalling pathway triggered by LPS. Partial repression of LPS-mediated induction of IFN β by ruxolitinib, through unknown mechanisms, may additionally also contribute to its effects towards IFN-responsive cytokines in LPS-stimulated human macrophages.

subtypes, plays a major role in antiviral response [52,53]. Abrogation of IFN β effects by ruxolitinib, which is moreover associated with down-regulation of LPS-mediated type II IFN γ expression, may consequently favour viral infection. The fact that administration of ruxolitinib to patients resulted in the development or reactivation of viral infections [54–56], supports this hypothesis.

In summary, ruxolitinib was shown to prevent the up-regulation of various pro-inflammatory cytokines in human inflammatory macrophages, mainly through abolishing LPS-induced activation of the TLR4/TRIF/IFN β signalling pathway. Such effects indirectly confirm that IFN β plays a major role in the response to LPS in human macrophages, as previously established in mouse counterparts [28]. They also fully supports the promising and already well-established anti-inflammatory effects of ruxolitinib.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

This study was supported by Cancéropole Grand Ouest (Project HII-GO) and the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité d'Ille-et-Vilaine and Comité de Vendée). The authors thank Dr. Sylvie Hermouet for her constant and helpful encouragement to their work and the platform

MRic (Microscopy Rennes Imaging Center, Biosit, Rennes) for confocal microscopy facilities.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.032>.

References

- [1] S. Verstovsek, H. Kantarjian, R.A. Mesa, A.D. Pardanani, J. Cortes-Franco, D.A. Thomas, Z. Estrov, J.S. Fridman, E.C. Bradley, S. Erickson-Viitanen, K. Vaddi, R. Levy, A. Tefferi, Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis, *N. Engl. J. Med.* 363 (12) (2010) 1117–1127.
- [2] A.M. Vannucchi, C.N. Harrison, Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms, *Blood* 129 (6) (2017) 693–703.
- [3] R.A. Mesa, Ruxolitinib, a selective JAK1 and JAK2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative neoplasms and psoriasis, *IDrugs* 13 (6) (2010) 394–403.
- [4] A. Quintas-Cardama, K. Vaddi, P. Liu, T. Manshouri, J. Li, P.A. Scherle, E. Caulder, X. Wen, Y. Li, P. Waeltz, M. Rupal, T. Burn, Y. Lo, J. Kelley, M. Covington, S. Shepard, J.D. Rodgers, P. Haley, H. Kantarjian, J.S. Fridman, S. Verstovsek, Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms, *Blood* 115 (15) (2010) 3109–3117.
- [5] M.E. Bjorn, H.C. Hasselbalch, The impact of ruxolitinib treatment on inflammation-mediated comorbidities in myelofibrosis and related neoplasms, *Clin. Case Rep.* 3 (6) (2015) 499–503.
- [6] S. Maschalidi, F.E. Sepulveda, A. Garrigue, A. Fischer, G. de Saint Basile, Therapeutic effect of JAK1/2 blockade on the manifestations of hemophagocytic

Supplementary data

Repression of interferon β -regulated cytokines by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib
in inflammatory human macrophages

Marie FEBVRE-JAMES, Valérie LECUREUR, Yu AUGAGNEUR, Abdullah MAYATI and
Olivier FARDEL

Table S1. List of genes included in the PCR array “Human cytokines and chemokines”

Gene family	Nature of gene
Chemokines	CCL1 (I-309), CCL11 (eotaxin), CCL13 (MCP-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL22 (MDC), CCL24 (MPIF-2 , Eotaxin-2), CCL3 (MIP-1A), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CX3CL1, CXCL1 (GRO1, GRO α , SCYB1), CXCL10 (INP10), CXCL11 (I-TAC, IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL16, CXCL2 (GRO2, GRO β , SCYB2), CXCL5 (ENA-78, LIX), CXCL9 (MIG), PPBP, XCL1
Interleukins	IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL15, IL16, IL17A, IL17F, IL18, IL1A, IL1B, IL1RN, IL2, IL21, IL22, IL23A, IL24, IL27, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, CXCL8, IL9
Interferons	IFNA2, IFNG
Growth factors	MP2, BMP4, BMP6, BMP7, CNTF, CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), GPI, LIF, MSTN (GDF8), NODAL, OSM, THPO, VEGFA
TNF receptor superfamily members	CD40LG (TNFSF5), FASLG (TNFSF6), LTA (TNFB), LTB, TNF, TNFRSF11B (OPG), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (RANKL), TNFSF13B
Other cytokines	ADIPOQ (ACRP30), C5, MIF, SPP1, TGFB2
Anti-inflammatory cytokines	CCL18 (PARC), CCL19, CCL21 (MIP-2), IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL18, IL2, IL22, IL23A, IL24, IL4, IL6, TGFB2.
House-keeping genes	ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, RPLP0

Table S2. List of genes whose mRNA expression is induced in LPS-treated macrophages

Gene	LPS-mediated induction factor^a	Effect of ruxolitinib^b	Type I IFN-inducibility^c
IL12B	12944.0	No effect	No
CXCL11	4544.8	Repression	Yes
GM-CSF	1128.4	No effect	No
IL27	891.4	Repression	Yes
CXCL10	885.3	Repression	Yes
CCL20	809.0	No effect	No
IL1B	648.1	No effect	No
G-CSF	630.3	No effect	No
IFNG	613.1	Repression	No
CCL1	390.7	No effect	No
IL6	152.2	Repression	Yes
IL1A	135.3	No effect	No
CCL19	123.6	Repression	Yes
CXCL8	120.3	No effect	No
IL23A	92.4	No effect	No
CCL5	77.2	No effect	Yes
TRAIL	76.6	Repression	Yes
TNF	59.3	Repression	Yes
CCL3	50.2	No effect	No
LTA	39.4	Repression	No
FASLG	35.5	Repression	Yes
CXCL1	32.2	No effect	No
IL7	30.7	Repression	Yes
CXCL9	28.1	Repression	Yes
CXCL2	22.8	No effect	No
CCL8	19.3	Repression	Yes
IL15	14.6	Repression	Yes
CXCL13	13.5	Repression	Yes
BMP2	10.9	Repression	No
IL2	10.7	No effect	No
TNFRSF11B	10.5	Repression	No
IL12A	8.7	Repression	No
LIF	6.5	Induction	No
BMP6	6.1	No effect	No
OSM	5.3	No effect	No
CCL2	5.2	Repression	Yes
CCL7	5.2	Repression	Yes
IL1RN	3.9	Repression	Yes
TNFSF13B	3.7	Repression	Yes
CD40LG	3.7	Repression	No
C5	3.6	Repression	No
XCL1	3.4	Repression	No
IL10	3.2	Repression	No
CXCL16	2.2	Repression	Yes

^aRatio of mRNA expression in LPS-treated macrophages versus that in untreated primary macrophages according to PCR array data.

^bAccording to PCR array data.

^cEvaluated using the online interferome database [18].

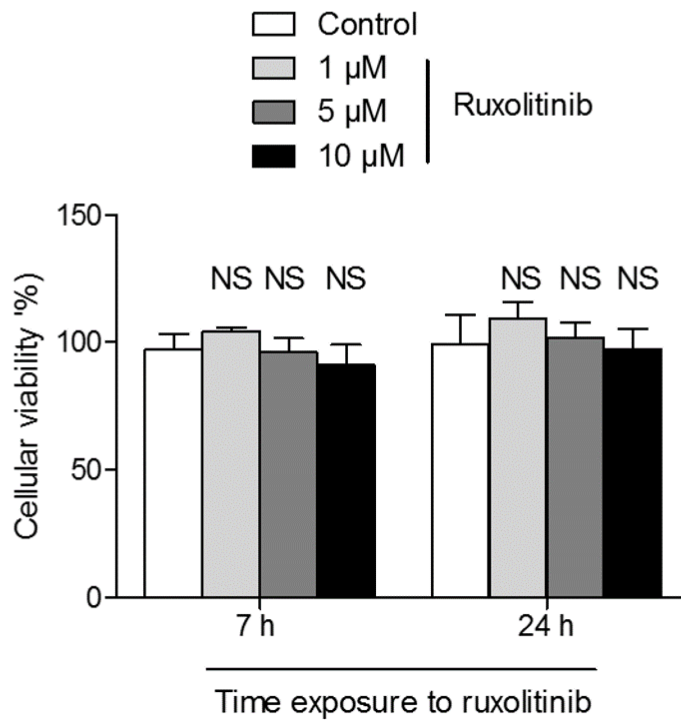


Fig. S1: Viability of human macrophages exposed to ruxolitinib.

Human macrophages were untreated (control) or treated by 1, 5 or 10 μM ruxolitinib for 7 h or 24 h. Cell viability was then assessed using the WST-1 assay, as described in Materials and Methods. Data are expressed as percentage of cell viability of untreated control cells, arbitrarily set at 100 % and are the means \pm SEM of six independent assays. NS, not statistically different when compared to control untreated cells.

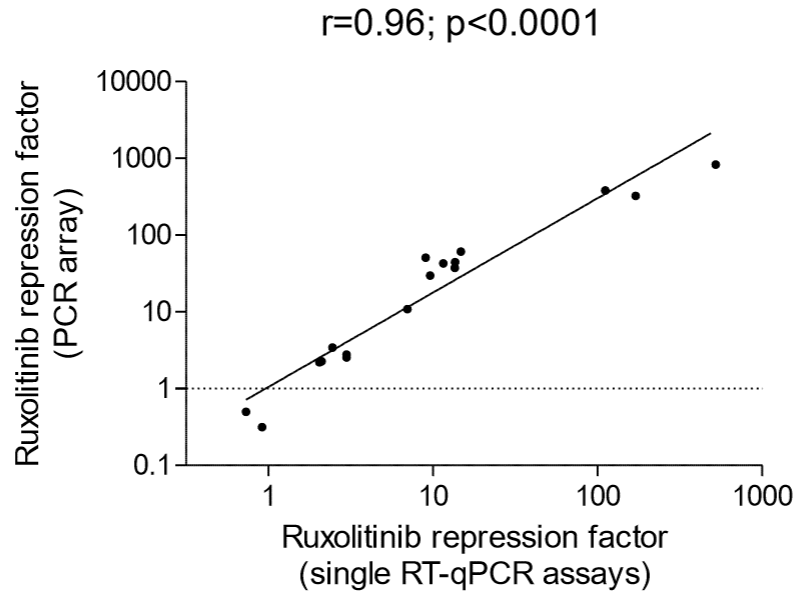


Fig. S2: Linear correlation between ruxolitinib repression factors determined from single RT-qPCR assay versus those from PCR array.

Ruxolitinib repression factors, *i.e.*, the ratio mRNA expression in untreated macrophages versus that in ruxolitinib-treated counterparts, were determined for 15 cytokines through PCR array (data from Table 2) and single RT-qPCR assays (data from Fig. 1). Pearson r correlation coefficient and p value are indicated at the top of the graph.

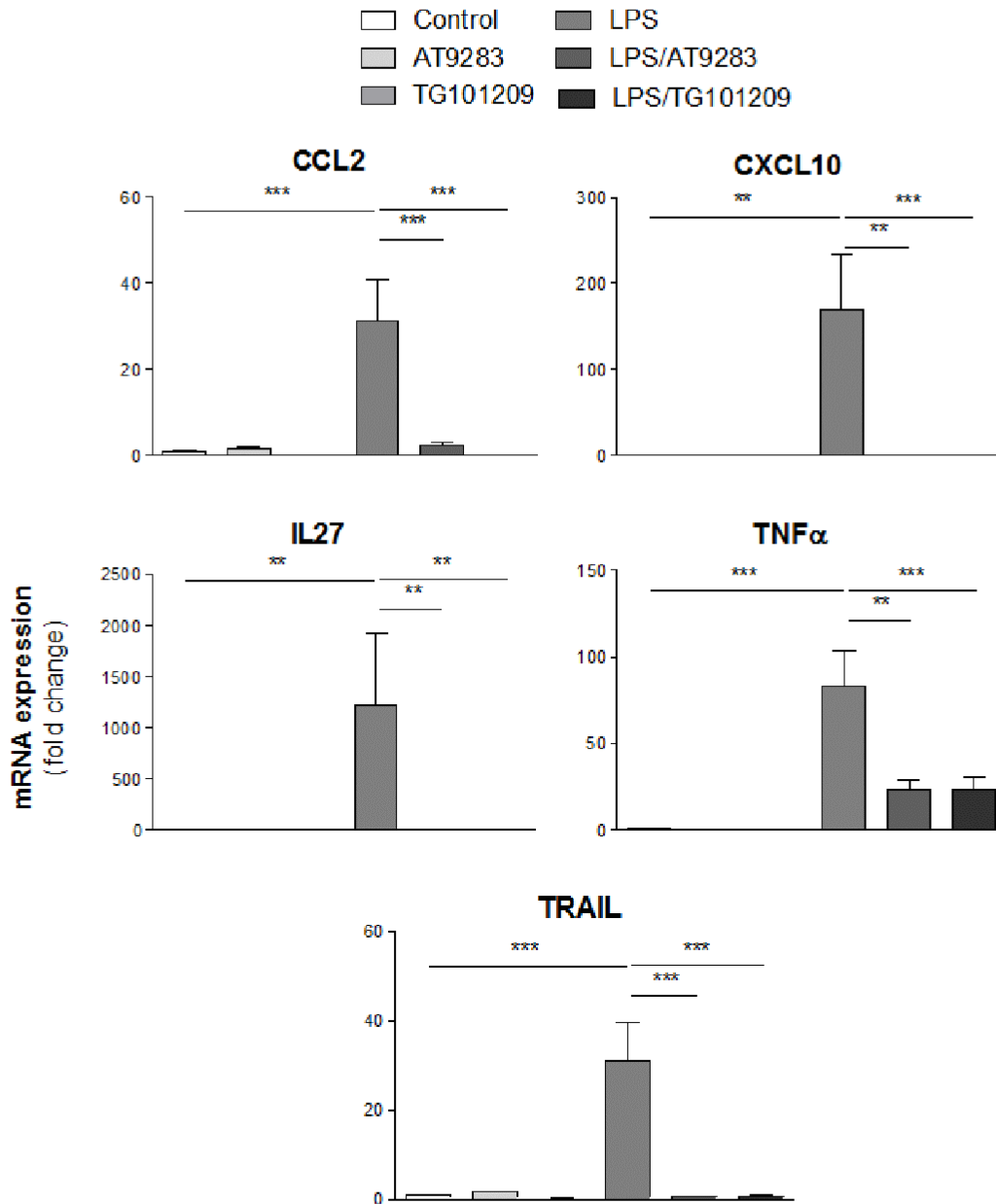


Fig. S3. Effects of the JAK inhibitors AT9283 and TG101209 on LPS-induced mRNA expression of cytokines in human macrophages.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M AT9283, 5 μ M TG101209 or 10 ng/mL LPS, or co-exposed to 5 μ M AT9283 and 10 ng/mL LPS or to 5 μ M TG101209 and 10 ng/mL LPS for 6 h. mRNA expression of cytokines was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated macrophages, *i.e.*, the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells; they are the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

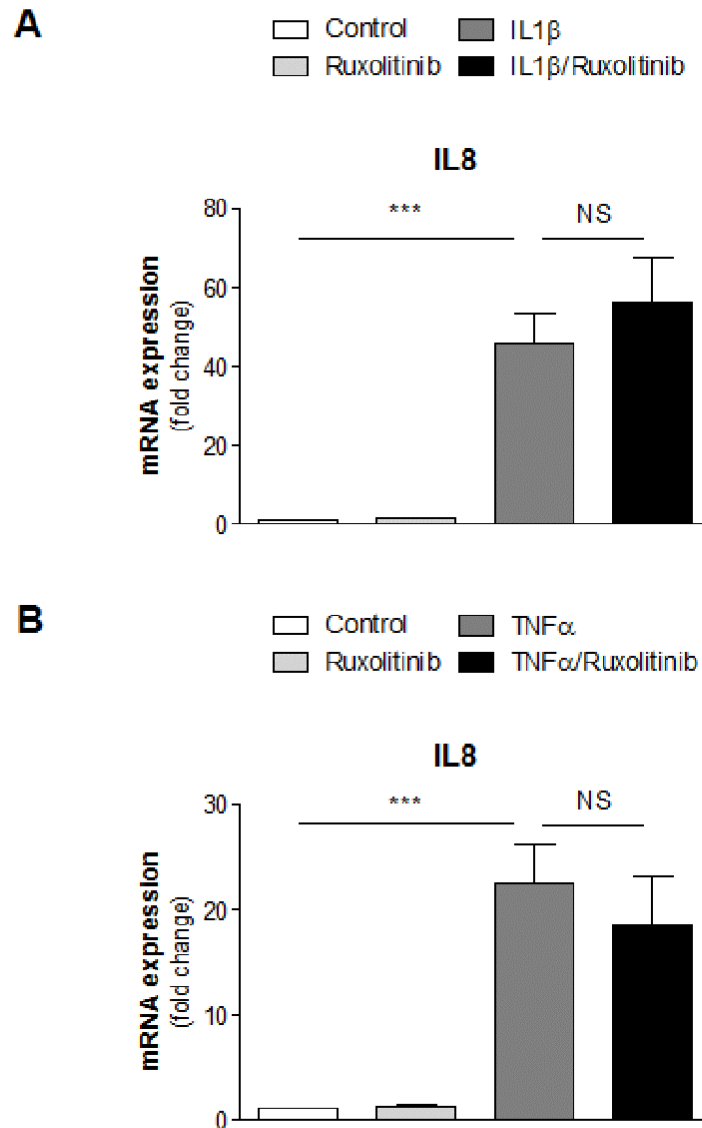


Fig. S4. Lack of effects of ruxolitinib towards IL1 β - and TNF α -mediated induction of IL8 mRNA expression in human hepatoma HepaRG cells.

HepaRG cells were exposed were untreated (control), treated by 5 μ M ruxolitinib or exposed to (A) 1 ng/mL IL-1 β or (B) 10 ng/mL TNF α (B), in the absence or presence of 5 μ M ruxolitinib for 24 h. IL8 mRNA expression was determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated HepaRG cells, *i.e.*, the ratio mRNA expression in treated-HepaRG cells versus that found in untreated cells. Data are the means \pm SEM of at least 4 independent experiments. ***, $p < 0.01$; NS, not statistically significant.

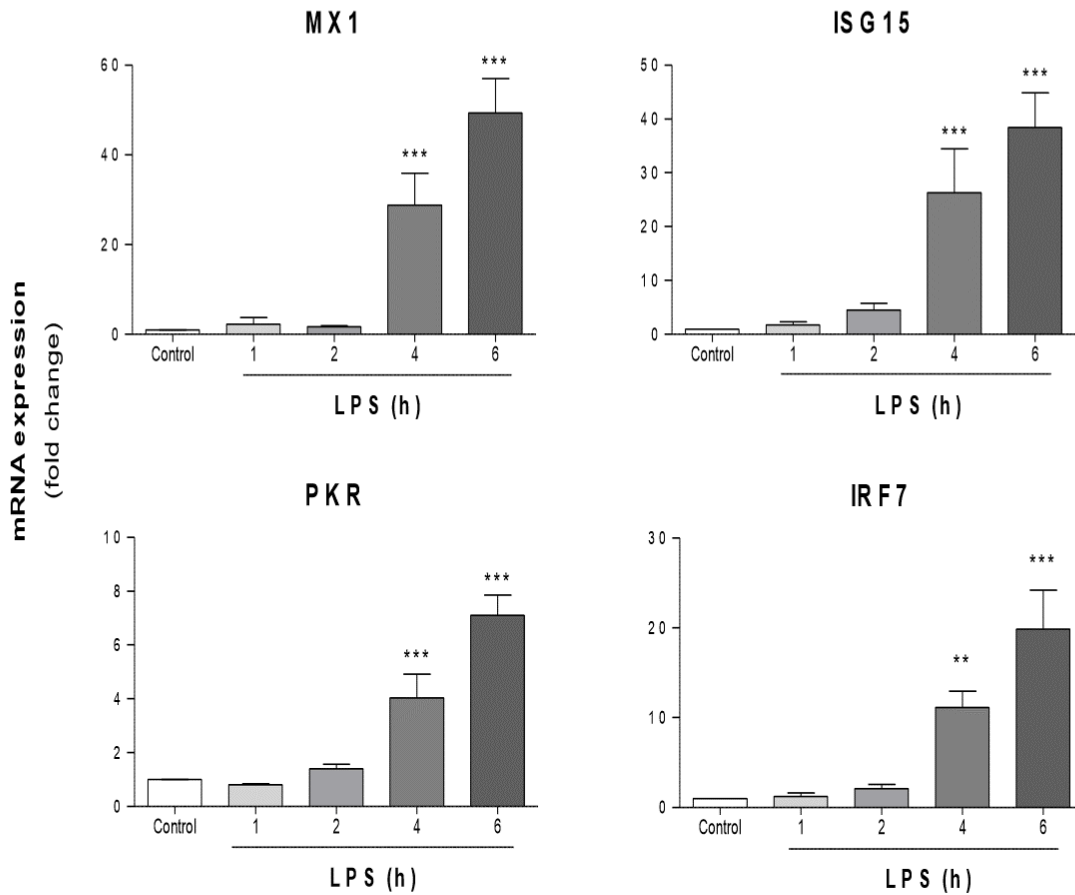


Fig. S5. Kinetics of LPS-induced IFN-stimulated gene (ISG) mRNA expression.

Primary human macrophages were either untreated (control), or exposed to 10 ng/mL for 1, 2, 4 or 6 h. mRNA expression of ISGs was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated macrophages, *i.e.*, the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells; they are the means \pm SEM of at least 4 independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ when compared to control.

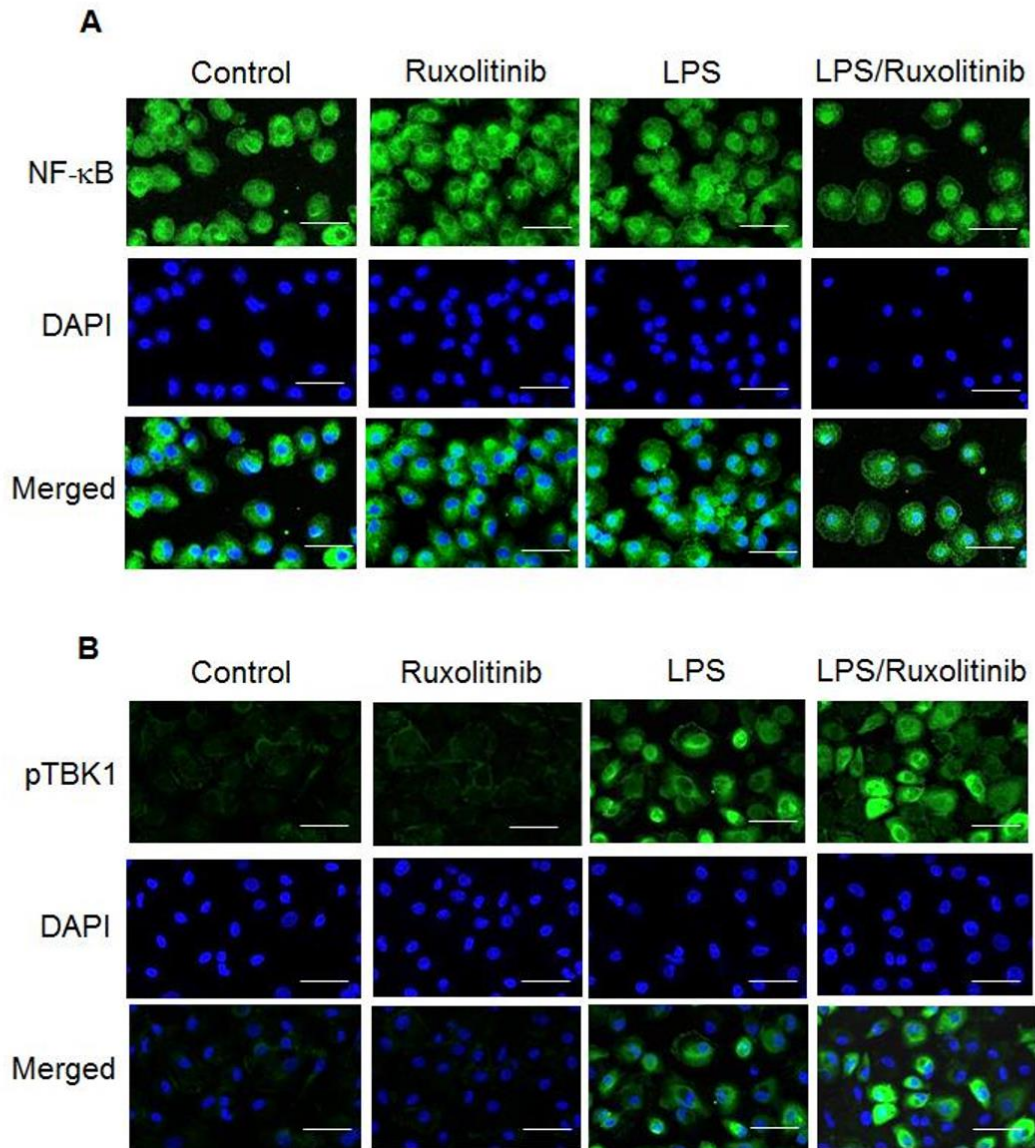


Fig. S6. Lack of effect of ruxolitinib on LPS-induced (A) nuclear translocation of NF- κ B and (B) phosphorylation of TBK1.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 1 h. (A) NF- κ B and (B) phosphorylated TBK1 (pTBK1) were then analysed by immunofluorescence; NF- κ B- and pTBK1-related fluorescence is green, whereas blue fluorescence corresponds to DAPI-stained nuclei. (A) Note that NF- κ B- related fluorescence is mainly located in cytoplasm for control and ruxolitinib-treated cells and in nucleus for LPS- and LPS/ruxolitinib-treated cells. (A, B) Bar = 50 μ m. Data shown are representative of 4 independent experiments.

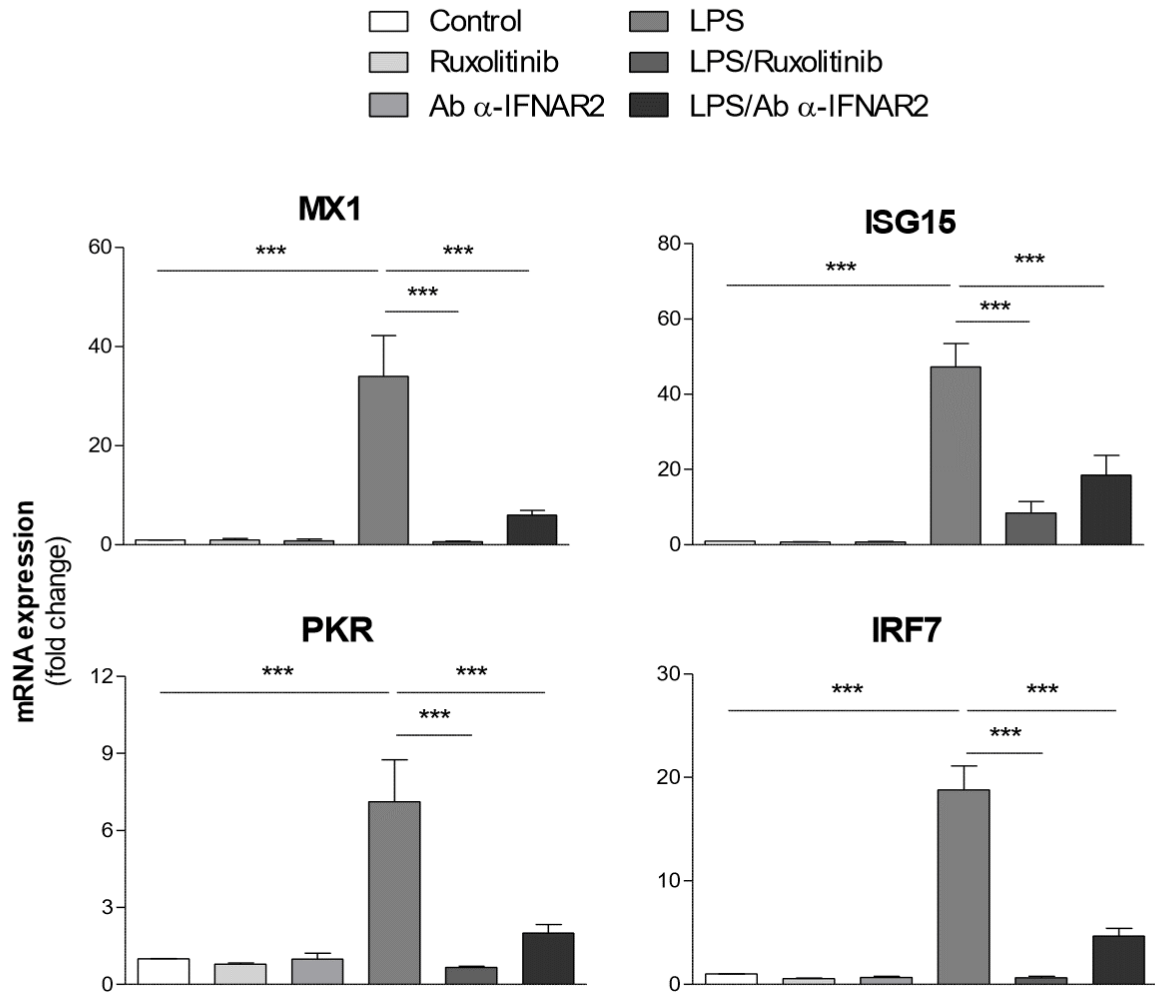


Fig. S7. Effects of a blocking anti-IFNAR2 antibody on LPS-induced mRNA expression of reference IFN-stimulated genes (ISGs) in human macrophages.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib, 5 μ g/mL anti-IFNAR2 antibody (Ab α -IFNAR2) or 10 ng/mL LPS, or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS or to 5 μ g/mL anti-IFNAR2 antibody and 10 ng/mL LPS for 6 h. mRNA expression of ISGs was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as mRNA fold change compared to untreated macrophages, *i.e.*, the ratio mRNA expression in treated-macrophages versus that found in untreated cells; they are the means \pm SEM of at least 4 independent experiments. ***, $p < 0.001$.

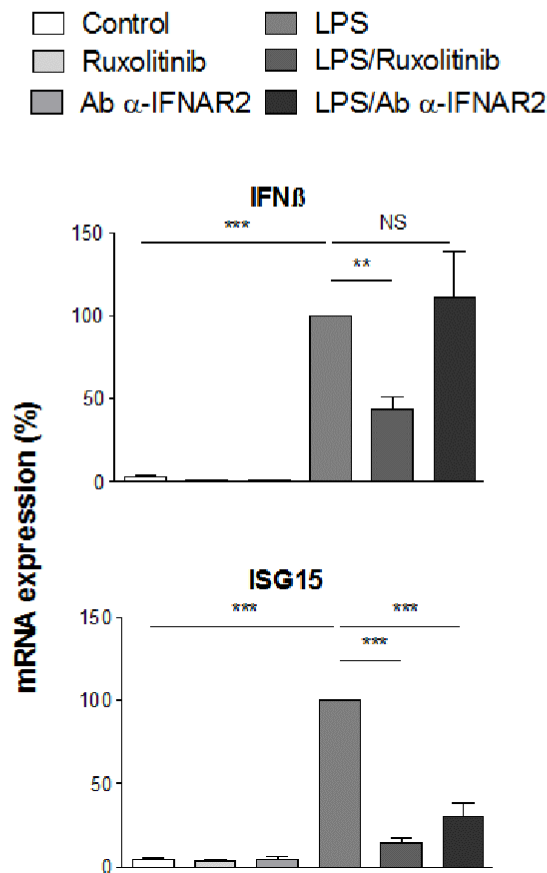


Fig. S8. Effects of a blocking anti-IFNAR2 antibody on LPS-induced mRNA expression of IFN β in human macrophages.

Primary human macrophages were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib, 5 μ g/mL anti-IFNAR2 antibody (Ab α -IFNAR2) or 10 ng/mL LPS, or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS or to 5 μ g/mL anti-IFNAR2 antibody and 10 ng/mL LPS for 2 h. mRNA expression of IFN β and of ISG15 was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as percentage of mRNA expression found in LPS-exposed macrophages, arbitrarily set at 100%; they are the means \pm SEM of 5 independent experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, not statistically significant.

II. Article 2 : Le ruxolitinib restaure l'expression de protéines de détoxication des médicaments réprimées par l'IL-6, dans l'hépatocyte humain

II.1. Résumé

Ici l'intérêt s'est porté sur les potentiels effets modulateurs du ruxolitinib sur les enzymes hépatique de détoxication des médicaments dont l'expression et l'activité sont altérées par l'inflammation.

II.1.1. Matériel et méthodes

Dans cette étude, deux modèles cellulaires sont utilisés. Les hépatocytes humains en culture primaire, qui sont le « gold standard » dans les études portant sur les protéines de détoxication des médicaments, et la lignée de cellules HepaRG. Les cellules HepaRG sont hautement différenciées et reconnues comme très bon substituts pour l'étude de l'inflammation hépatique (Aninat et al., 2006; Guillouzo et al., 2007).

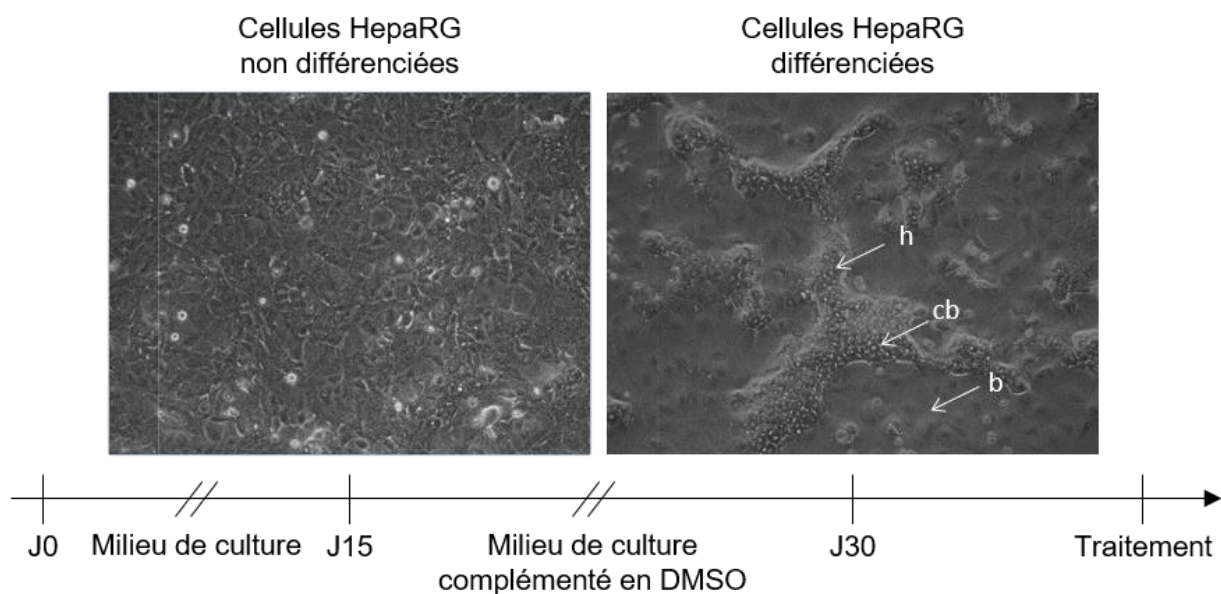


Figure 21 : Protocole de différenciation des cellules HepaRG (Images : A.Mayati)

La culture des cellules HepaRG se fait en deux temps (Figure 21). Une première phase de prolifération pendant 15 jours et suivie d'une phase de différenciation grâce à la

complémentation du milieu de culture par du DMSO, pendant 15 jours supplémentaires. Les cellules HepaRG se différencient alors en deux sous-populations pour donner des cellules biliaires-like (b) et des cellules hépatocytaires-like (h) s'organisant spontanément de façon à former des canalicules biliaires (cb).

II.1.2. Résultats et discussion

L'efficacité du ruxolitinib à contrer l'inflammation induite par une stimulation par l'IL6 dans les hépatocytes humains et les cellules HepaRG est tout d'abord confirmée de par sa capacité à réprimer les taux en ARNm de CRP.

Le ruxolitinib est ensuite montré comme restaurant complètement les niveaux d'expression de CYP hépatiques majeurs ainsi que de transporteurs SLC, fortement réprimés par une stimulation IL6. Cet effet se retrouve sur l'activité de ces différentes enzymes dont les taux sont restaurés au niveau des taux d'activité basaux. De plus, le ruxolitinib est montré comme étant efficaces à des concentrations atteintes dans le plasma des patients.

L'IL1 β , ayant des effets répresseurs similaires à l'IL6 sur l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme des médicaments, mais dont la voie de signalisation ne fait pas intervenir de JAK, est utilisée comme contrôle négatif. Les résultats, montrant une incapacité du ruxolitinib à restaurer l'expression des CYPs et transporteurs réprimés par une stimulation IL1 β , confirment alors que les effets du ruxolitinib sont bien JAK-dépendants. De plus, un traitement par le tofacitinib, un inhibiteur de JAK utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, montre des effets similaires à ceux du ruxolitinib, confirmant la spécificité de la molécule.

L'ensemble de ces résultats apporte des informations supplémentaires quant aux effets du ruxolitinib sur les acteurs hépatiques du métabolisme et du transport des médicaments en conditions inflammatoires.

The JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Reverses Interleukin-6-Mediated Suppression of Drug-Detoxifying Proteins in Cultured Human Hepatocytes [§]

Marie Febvre-James, Arnaud Bruyère, Marc Le Vée, and Olivier Fardel

Institut de Recherches en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1, Rennes, France (M.F.-J., A.B., M.L.V., O.F.) and Pôle Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Rennes, France (O.F.)

Received August 11, 2017; accepted November 17, 2017

ABSTRACT

The inflammatory cytokine interleukin (IL)-6, which basically activates the Janus kinase (JAK)/ signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway, is well known to repress expression of hepatic cytochromes P-450 (P450s) and transporters. Therapeutic proteins, like monoclonal antibodies targeting IL-6 or its receptor, have consequently been demonstrated to restore full hepatic detoxification capacity, which results in inflammatory disease-related drug-drug interactions (idDDIs). In the present study, we investigated whether ruxolitinib, a small drug acting as a JAK1/2 inhibitor and currently used in the treatment of myeloproliferative neoplasms, may also counteract the repressing effects of IL-6 toward hepatic detoxifying systems. Ruxolitinib was found to fully inhibit IL-6-mediated repression of P450 (CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4) and transporter (NTCP, OATP1B1, and OCT1) mRNA levels in primary human hepatocytes and differentiated hepatoma HepaRG cells.

Such effects were dose-dependent, with ruxolitinib EC₅₀ values around 1.0–1.2 μM and thus close to ruxolitinib plasma levels that can be reached in patients. Moreover, they were associated with concomitant restoration of P450 and drug transporter activities in IL-6-exposed HepaRG cells. By contrast, ruxolitinib failed to suppress the repression of drug-detoxifying protein mRNA levels caused by IL-1β. The JAK inhibitor and anti-rheumatoid arthritis compound tofacitinib was additionally found to reverse IL-6-mediated suppression of P450 and transporter mRNA expressions. Taken together, our results demonstrated that small drugs acting as JAK inhibitors, like ruxolitinib, counteract IL-6-mediated repression of drug-metabolizing enzymes and drug transporters in cultured human hepatocytes. These JAK inhibitors may consequently be hypothesized to restore hepatic detoxification capacity for patients suffering from inflammatory diseases, which may in turn cause idDDIs.

Introduction

Drug-mediated alteration of drug detoxification pathways is a major cause of drug-drug interactions (DDIs) (Cascorbi, 2012). Such pharmacokinetics-related DDIs usually involve a small-molecule drug, i.e., the perpetrator, which directly inhibits activity of drug-metabolizing enzymes or drug transporters or regulates their expression. This will then result in decreased or enhanced clearance of a coadministered drug, i.e., the victim, substrate for these detoxifying proteins. These DDIs therefore implicate small-drug perpetrators mostly acting as inhibitors of drug-metabolizing cytochrome P-450 (P450) or drug transporter activity, through competitive or noncompetitive mechanisms, or as inducers of drug-metabolizing enzyme expression. Numerous clinical examples of such DDIs have been reported in the literature (Danton et al., 2013). The possibility that a new

molecular entity may be the perpetrator or the victim of a putative DDI must by regulation be investigated by pharmaceutical companies during preclinical drug development (Prueksaritanont et al., 2013).

The increase in the clinical use of therapeutic proteins (TPs) has recently drawn attention to the potential DDIs between TPs and small-molecule drugs (Evers et al., 2013). Indeed, inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1β, IL-6, and tumor necrosis factor-α are potent repressors of hepatic cytochrome P-450 and drug transporter expression (Morgan et al., 2008; Fardel and Le Vée, 2009), which is known to commonly lead to reduced clearance of drugs in patients suffering from infectious and/or inflammatory diseases (Morgan, 2009). The use of TPs acting as anticytokine drugs, like monoclonal antibodies (mAbs) directed against circulating inflammatory cytokines or cytokine receptors, has consequently been hypothesized to neutralize the repressing effects of inflammatory cytokines toward drug-detoxifying protein expression; in this way, it probably restores full hepatic drug-detoxification capacity for patients suffering from inflammatory or infectious diseases. This may be the source of DDIs (Harvey and Morgan, 2014), which may in fact be considered as inflammatory disease-related DDIs (idDDIs). This hypothesis has been validated for

This work was supported by Cancéropole Grand Ouest (Project HII-GO) and the Ligue contre le Cancer (Comité d'Ille et Vilaine et Comité de Vendée).

<https://doi.org/10.1124/dmd.117.078048>.

[§]This article has supplemental material available at dmd.aspetjournals.org.

ABBREVIATIONS: BSP, bromosulfophthalein; CRP, C-reactive protein; P450, cytochrome P-450; DDI, drug-drug interaction; DMSO, dimethyl sulfoxide; EC₅₀, half-maximal effective concentration; E3S, estrone-3-sulfate; FBS, fetal bovine serum; idDDI, inflammatory disease-related drug-drug interaction; IL, interleukin; JAK, Janus kinase; LC-MS/MS, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; mAb, monoclonal antibody; NTCP, sodium-taurocholate cotransporting polypeptide; OATP, organic anion-transporting polypeptide; OCT, organic cation transporter; PBS, phosphate-buffered saline; STAT, signal transducer and activator of transcription; TEA, tetra-ethylammonium; TP, therapeutic protein.

TPs targeting the IL-6 pathway in patients with rheumatoid arthritis. Indeed, the mAbs tocilizumab and sarilumab, directed against the IL-6 receptor α , as well as the IL-6-neutralizing mAb sirukumab, reduce exposure of coadministered drugs like simvastatin, midazolam, or omeprazole (Schmitt et al., 2011; Zhuang et al., 2015; Lee et al., 2017), most probably through reversal of IL-6-mediated suppression of P450 expression (Jiang et al., 2016).

Ruxolitinib (also known as INCB018424) is a small drug belonging to the emerging class of Janus kinase (JAK) inhibitors and currently used clinically in the treatment of JAK2 *V617F*-positive myeloproliferative neoplasms, including intermediate or high-risk myelofibrosis and polycythemia vera (Bose and Verstovsek, 2017). Besides the JAK2 isoform, primarily associated with receptors for the hematopoietic growth factors erythropoietin and thrombopoietin, the JAK1 isoform, which plays a major role in the signaling pathway of inflammatory cytokines, is also potentially inhibited by ruxolitinib. With respect to the two other members of the JAK family, tyrosine kinase 2 (TYK2) is additionally targeted by ruxolitinib, whereas JAK3 is less sensitive (Quintas-Cardama et al., 2010). Ruxolitinib is nevertheless considered as belonging to the class of first generation pan-JAK inhibitors (Baker and Isaacs, 2017).

JAK1, JAK2, and TYK2 are thought to play a key role in IL-6 signaling pathway. Indeed, these JAK isoforms are activated/phosphorylated upon IL-6 binding to its receptor and downstream they phosphorylate signal transducer and activators of transcription (STAT) 1 and 3, which triggers molecular genomic response to IL-6 (Hunter and Jones, 2015). It is then probable that ruxolitinib may antagonize most IL-6 effects, which probably contributes to its well reported anti-inflammatory properties. In this context, it may be hypothesized that ruxolitinib may counteract the suppressing effects of IL-6 toward drug-detoxifying proteins, as reported above for TPs targeting the IL-6 pathway. The present study was therefore designed to investigate this hypothesis, using primary human hepatocytes and highly differentiated hepatoma HepaRG cells, which are recognized as convenient cell systems to study cytokine effects toward hepatic detoxifying enzymes and transporters (Aitken and Morgan, 2007; Le Vee et al., 2009; Klein et al., 2015; Rubin et al., 2015). Our data demonstrate that ruxolitinib can effectively reverse the repressing effects of IL-6 toward P450s and drug transporters *in vitro*, suggesting that putative idDDIs with drugs handled by IL-6-targeted-detoxifying proteins and coadministered with ruxolitinib may have to be considered.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents. Ruxolitinib and tofacitinib were provided by Selleckchem (Houston, TX). Verapamil, midazolam and bromosulphthalein (BSP) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Phenacetine, acetaminophen, bupropion, and hydroxybupropion were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX), whereas 1'-hydroxy-midazolam was provided by Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). [³H(G)] taurocholic acid (specific activity 5 Ci/mmol), [6,7-³H(N)] estrone-3-sulfate (E3S) (specific activity 51.8 Ci/mmol) and [1-¹⁴C] tetra-ethylammonium (TEA) (specific activity 3.5 Ci/mmol) were purchased by Perkin-Elmer (Courtabouef, France). Recombinant human IL-6 and IL-1 β were supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN). All other chemicals and reagents were commercial products of the highest purity available. Stock solutions of ruxolitinib were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), whereas those of IL-6 were done in sterile distilled water containing 0.1% bovine serum albumin. Control cultures received the same dose of solvents as treated counterparts.

Cell Culture. Primary human hepatocytes were obtained from adult donors undergoing hepatic resection for secondary tumors, via the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes BB-0033-0005 (University Hospital, Rennes, France), which has obtained the authorization no. DC-2008-630 from the French Ministry of Health to collect hepatic resections from the digestive

surgery department and then to isolate and deliver the hepatocytes used in this study. Human hepatocytes, initially prepared by enzymatic dissociation of histologically normal liver fragments (Fardel et al., 1993), were seeded in 24-well or 48-well plastic plates at a density of 2×10^5 cells/cm² in Williams' E medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS) (Perbio Sciences, Brébieres, France), 5 μ g/ml bovine insulin (Sigma-Aldrich), 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM glutamine (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After 24 hours, this seeding medium was discarded, and primary hepatocytes were routinely cultured in Williams' E medium defined above and supplemented with 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate (Upjohn, Paris La Défense, France) and 2% (vol/vol) DMSO, as reported previously (Le Vee et al., 2009). All experimental procedures complied with French laws and regulations and were approved by the National Ethics Committee. Characteristics of hepatocyte donors are indicated in Supplemental Table 1.

Highly differentiated human hepatoma HepaRG cells were cultured as previously described (Le Vee et al., 2013). Briefly, cells plated in 24-well plates were first grown in Williams' E medium supplemented with 10% (vol/vol) FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 5 μ g/ml insulin, 2 mM glutamine, and 5×10^{-5} M hydrocortisone hemisuccinate for 2 weeks. Cells were next cultured for an additional 2 weeks in the same medium supplemented with 2% (vol/vol) DMSO to get a full differentiation of the cells (Gripon et al., 2002). HepaRG cells were used for experiments as surrogates for human hepatocytes, notably for P450 activities and drug transport assays, owing to the cost of human hepatocytes and the well established convenience of using a cell line like HepaRG.

Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction Experiments. Total RNAs were extracted using the TRI Reagent (Sigma-Aldrich). RNAs were then reverse transcribed using the Applied Biosystems cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). PCR were next performed using the fluorescent dye SYBR Green methodology and a CFX384 real-time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA), as described already (Le Vee et al., 2009). Gene-specific primers for drug transporters, CYP2B6 and CYP3A4, C-reactive protein (CRP), IL-8, and 18S rRNA were exactly as previously reported (Jigorel et al., 2006; Le Vee et al., 2008). Other primers were CYP1A2 sense, CACTATCAGGACTTTGACAAG, and CYP1A2 antisense, AGGTTGACAATCTTCTCTCTG. The specificity of each gene amplification was verified at the end of quantitative PCR reactions through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were analyzed with CFX Manager software (Bio-Rad), using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to the 18S rRNA endogenous reference, using the $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ method. Data were finally commonly expressed comparatively to mRNA expression found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U for each analyzed gene.

Cytochrome P450 Activities. CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2 activities were measured by analyzing oxidation of specific substrates, i.e., midazolam, bupropion, and phenacetine for CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2, respectively, using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Briefly, hepatocytes were exposed to 50 μ M midazolam, 100 μ M bupropion, or 200 μ M phenacetine for 4 hours in minimum essential medium, in the absence of FBS. Production of P450 activity-related metabolites, i.e., 1'-hydroxy-midazolam, hydroxybupropion, and acetaminophen, was then analyzed in culture supernatants through LC-MS/MS, using a high-performance liquid chromatography Aria system (Agilent, Les Ulis, France), equipped with a Kromasyl C18 (4.6 \times 150 mm) column (Interchim, Montluçon, France) and coupled to a tandem mass spectrometry TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) fitted with an electrospray ionization source (ESI+). Monitored ion transitions were at 342.0 > 168.0 *m/z* for 1'-hydroxymidazolam, 152.0 > 110.0 *m/z* for acetaminophen, and 256.1 > 237.9 *m/z* for hydroxybupropion. Amounts of produced metabolites were finally normalized to total protein cell content, determined by Bradford's method (Bradford, 1976).

Drug Transport Assays. Activities of the sinusoidal transporters sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/*SLC10A1*), organic anion-transporting polypeptides (OATPs/*SLCOs*), and organic cation transporter 1 (OCT1/*SLC22A1*) were determined by measuring inhibitor-sensitive

accumulation of reference substrates, as previously described (Jigorel et al., 2005). In brief, HepaRG cells were incubated for 5 minutes at 37°C with radiolabeled substrates, i.e., 30 μM TEA (substrate for OCT1), 4 nM E3S (substrate for OATPs), or 40 nM taurocholate (substrate for NTCP), in the absence or presence of reference transporter inhibitors, i.e., 50 μM verapamil (OCT1 inhibitor) or 100 μM BSP (OATP inhibitor), or in the presence or absence of sodium (for NTCP activity) (Le Vee et al., 2013). The transport buffer used for assays consisted of 5.3 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4 , 0.8 mM MgSO_4 , 1.8 mM CaCl_2 , 11 mM D-glucose, 10 mM HEPES, and 136 mM NaCl, adjusted to pH 7.4; NaCl was replaced by *N*-methylglucamine for transport assays in the absence of sodium. Cells were then washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and subjected to lysis in distilled water. Accumulation of radiolabeled substrates was next determined through scintillation counting of cell lysates and normalized to protein content, determined by Bradford's method. TEA uptake in the absence of verapamil minus uptake in the presence of verapamil, E3S uptake in the absence of BSP minus uptake in the presence of BSP, and taurocholate accumulation in the presence of sodium minus accumulation in the absence of sodium are thought to correspond to OCT1, OATP, and NTCP activities, respectively (Jigorel et al., 2005).

Immunocytochemistry. HepaRG cells were fixed with a cold solution of acetone for 10 minutes on ice. Cells were then washed with PBS and further incubated in PBS containing 4% bovine serum albumin for 1 hour at room temperature. Cells were next incubated overnight with primary antibody against phosphorylated-STAT1 (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). After two washes with PBS, the primary antibody was detected with anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands), whereas nuclei were stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole for 1 hour at room temperature. Finally, immunofluorescence images were acquired with a confocal fluorescence microscope LEICA DMI 6000 CS (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France).

Calculation and Statistical Analysis. Quantitative data were routinely expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent assays, each being performed in duplicate or triplicate. They were statistically analyzed using analysis of variance followed by the Newman-Keuls post-hoc test. The criterion of significance was $P < 0.05$. Half-maximal effective concentration (EC_{50}) values of ruxolitinib toward cytokine mRNA expression were determined using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA), through nonlinear regression on the basis of the four-parameter logistic function. Percentages of reduction in mRNA expression or activity of detoxifying proteins in response to IL-6 or IL-1 β treatment were calculated using the eq. (1):

$$\% \text{ Reduction (mRNA expression or activity)} = 100 - \left(\frac{\text{Value Cytokine}}{\text{Value Control}} \times 100 \right) \quad (1)$$

where Value Cytokine corresponds to mRNA level or P450 or transporter activity in cells exposed to cytokine (IL-6 or IL-1 β) and Value Control corresponds to mRNA level or P450 or transporter activity found in control untreated cells.

Results

Inhibition of IL-6-Induced CRP mRNA by Ruxolitinib in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells. The responsiveness of primary human hepatocytes and HepaRG cells to IL-6 and ruxolitinib were determined first. To do so, cells were exposed for 24 hours to 10 ng/ml IL-6, a concentration previously used successfully to analyze IL-6-mediated regulation of hepatic detoxifying pathways in vitro (Le Vee et al., 2009; Klein et al., 2015). As shown in Table 1, this treatment was found to increase mRNA expression of CRP, a reference target of the signaling cascade IL-6/JAK1/STAT3 in human hepatocytes (Zhang et al., 1996). IL-6 concomitantly failed to exert cytotoxic effects, as shown by phase-contrast microscopic examination of the cultures (data not shown), which agrees with previous measurement of cellular viability in IL-6-treated human hepatocytes (Le Vee et al., 2009). In the presence of 5 μM ruxolitinib, IL-6-induced CRP mRNA expression was

TABLE 1
Effects of ruxolitinib on IL-6 mediated induction of CRP mRNA levels in primary human hepatocytes and HepaRG cells^a

Treatment	CRP mRNA Levels ^b	
	Primary Human Hepatocytes	HepaRG Cells
None (control)	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
Ruxolitinib	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.2
IL-6	6223 \pm 2667*	1258 \pm 125.7*
Ruxolitinib/IL-6	0.2 \pm 0.0 [§]	0.3 \pm 0.1 [§]

* $P < 0.05$ when compared with control cells; [§] $P < 0.05$ when compared with IL-6-treated cells.

^aCells were either untreated (control), exposed to 5 μM ruxolitinib or 10 ng/ml IL-6, or coexposed to 5 μM ruxolitinib and 10 ng/ml IL-6 for 24 hours. CRP mRNA expression was then determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction.

^bCRP mRNA levels are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U; they are the means \pm S.E.M. of values from six independent human hepatocyte populations or five HepaRG cell cultures.

fully abolished in both primary human hepatocytes and HepaRG cells (Table 1), thus suggesting that ruxolitinib efficiently inhibited the IL-6/JAK/STAT pathway in these cultured hepatic cells. This hypothesis was fully confirmed by the fact that ruxolitinib fully antagonized IL-6-induced phosphorylation of STAT1 and its subsequent nuclear translocation in HepaRG cells (Supplemental Fig. 1).

Attenuation of IL-6-Mediated Repression of P450 Expression by Ruxolitinib in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells. In agreement with previous studies (Abdel-Razzak et al., 1993; Aitken and Morgan, 2007) and in comparison with untreated cells, treatment of human hepatocytes by 10 ng/ml IL-6 for 24 hours was found to markedly repress mRNA expression of CYP1A2 (by 95.6% \pm 2.9%), CYP2B6 (by 87.9% \pm 3.7%), and CYP3A4 (by 97.1% \pm 2.1%) in primary human hepatocytes (Fig. 1A). Ruxolitinib used at 5 μM was able to fully reverse these IL-6-mediated suppressions of P450 mRNA expression (Fig. 1A). The JAK inhibitor was similarly efficient in abolishing mRNA repression of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 caused by longer exposures to IL-6 (48 and 72 hours) (Supplemental Fig. 2). Inhibitory effects of ruxolitinib toward IL-6-related suppression of P450 mRNAs in primary human hepatocytes were next shown to be dose-dependent, with EC_{50} values around 1.1 μM for CYP3A4 and around 1.2 μM for CYP1A2 and CYP2B6 (Fig. 1B); similar ruxolitinib EC_{50} values were found for CYP1A2, CYP3A4, and CYP2B6 mRNA regulation in HepaRG cells (Supplemental Fig. 3). Hepatocyte population from each donor was fully responsive to IL-6, i.e., IL-6 repressed CYP3A4 mRNA levels by more than 97% for each of the analyzed hepatocyte population, and ruxolitinib EC_{50} values ranged from 1.01 to 1.15 μM according to hepatocyte populations (data not shown), thus precluding any major interindividual difference for the response to the JAK inhibitor.

P450 mRNA and activity levels were next investigated in HepaRG cells exposed to 10 ng/ml IL-6 for 48 hours. This treatment time was chosen owing to the known notable half-life of CYP3A4 protein and activity, estimated at 28.9 hours in IL-6-exposed human hepatocytes (Ramsden et al., 2015). IL-6 markedly reduced CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expression in HepaRG cells (Fig. 2A). These P450 mRNA repressions were associated with a concomitant significant reduction of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 activities (Fig. 2B); CYP1A2-related acetaminophen, CYP2B6-related hydroxybupropion and CYP3A4-related 1'-hydroxymidazolam formations measured by LC-MS/MS were thus reduced by 67.9 \pm 10.9%, 79.4 \pm 8.1%, and 60.8 \pm 4.0%, respectively, in response to exposure to IL-6. Ruxolitinib used at 5 μM was found to counteract IL-6-mediated repression of CYP1A2, CYP26, and CYP3A4 at both mRNA (Fig. 2A) and activity (Fig. 2B) level.

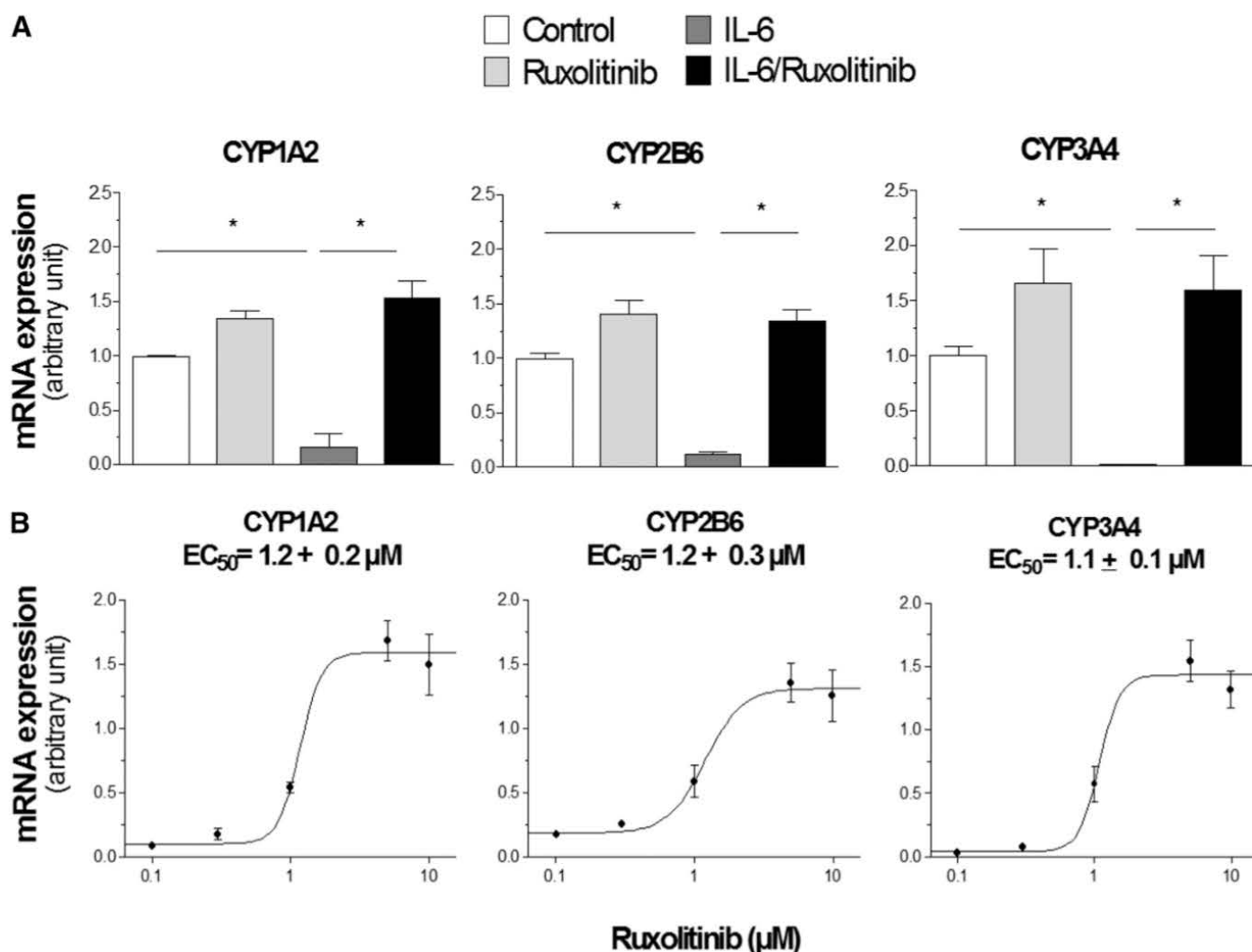


Fig. 1. Effects of ruxolitinib on IL-6-mediated mRNA repression of P450s in primary human hepatocytes. (A) Primary human hepatocytes were either untreated (control), exposed to 5 μM ruxolitinib, or 10 ng/ml IL-6 or coexposed to 5 μM ruxolitinib and 10 ng/ml IL-6 for 24 hours. CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expressions were then determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Data for each transporter are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U; they are the means \pm S.E.M. of values from at least four independent human hepatocyte populations. * $P < 0.05$. (B) Primary human hepatocytes were either untreated or exposed to 10 ng/ml IL-6 in the presence of various concentrations of ruxolitinib (from 0 to 10 μM) for 24 hours. CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expressions were then determined by RT-qPCR. Data for each transporter are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U; they are the means \pm S.E.M. of values from at least four independent human hepatocyte populations. Ruxolitinib EC_{50} values are indicated at the top of each graph.

Attenuation of IL-6-Mediated Repression of Drug Transporter Expression by Ruxolitinib in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells. In agreement with previous studies (Le Vee et al., 2009; Yang et al., 2012) and in comparison with untreated cells, treatment of cultured human hepatocytes by 10 ng/ml IL-6 for 24 hours was found to markedly repress mRNA expression of the drug transporters NTCP (by $98.0 \pm 0.5\%$), OATP1B1 (*SLCO1B1*) (by $82.6 \pm 5.3\%$), and OCT1 (by $75.2 \pm 3.9\%$) (Fig. 3A). Ruxolitinib used at 5 μM was able to reverse these IL-6-mediated suppressions of transporter mRNA expression (Fig. 3A). The JAK inhibitor was also fully efficient to abolish mRNA repression of NTCP, OATP1B1, and OCT1 caused by longer exposure to IL-6 (up to 72 hours) (Supplemental Fig. 4). Inhibitory effects of ruxolitinib toward IL-6-related suppression of transporter mRNAs in primary human hepatocytes were next shown to be dose-dependent, with EC_{50} values around 1.0 μM (for OATP1B1 and OCT1) and 1.1 μM (for NTCP) (Fig. 3B).

Treatment of HepaRG cells by 10 ng/ml IL-6 for 48 hours also markedly suppressed mRNA expression of NTCP, OATP1B1, and

OCT1 (Fig. 4A). It concomitantly reduced NTCP, OATP, and OCT1 transport activities (Fig. 4B), indicating functional repression of transporters by IL-6, in agreement with previous data (Le Vee et al., 2009). Sodium-dependent uptake of taurocholate, BSP-inhibitable uptake of E3S, and verapamil-inhibitable uptake of TEA were thus reduced by $62.4 \pm 18.0\%$, $46.3 \pm 5.8\%$, and $53.0 \pm 18.5\%$. Ruxolitinib used at 5 μM was found to reverse IL-6-mediated repression of NTCP, OATP1B1, and OCT1 mRNA levels (Fig. 4A). It concomitantly inhibited IL-6-triggered decrease of NTCP, OATP, and OCT1 activity (Fig. 4B).

Lack of Ruxolitinib Effects Toward IL-1 β -Mediated Repression of P450 and Transporter mRNA Levels in HepaRG Cells. To evaluate the specificity of ruxolitinib toward cytokines like IL-6 acting via the JAK/STAT pathway, we next analyzed its potential effects toward IL-1 β -mediated alteration of detoxifying pathways in HepaRG cells. Indeed, IL-1 β primarily acts by notably mobilizing myeloid-differentiation primary response gene 88 (MYD88)/IL-1 receptor-activated protein kinases (IRAKs)/I κ B kinases/NF- κ B, in a

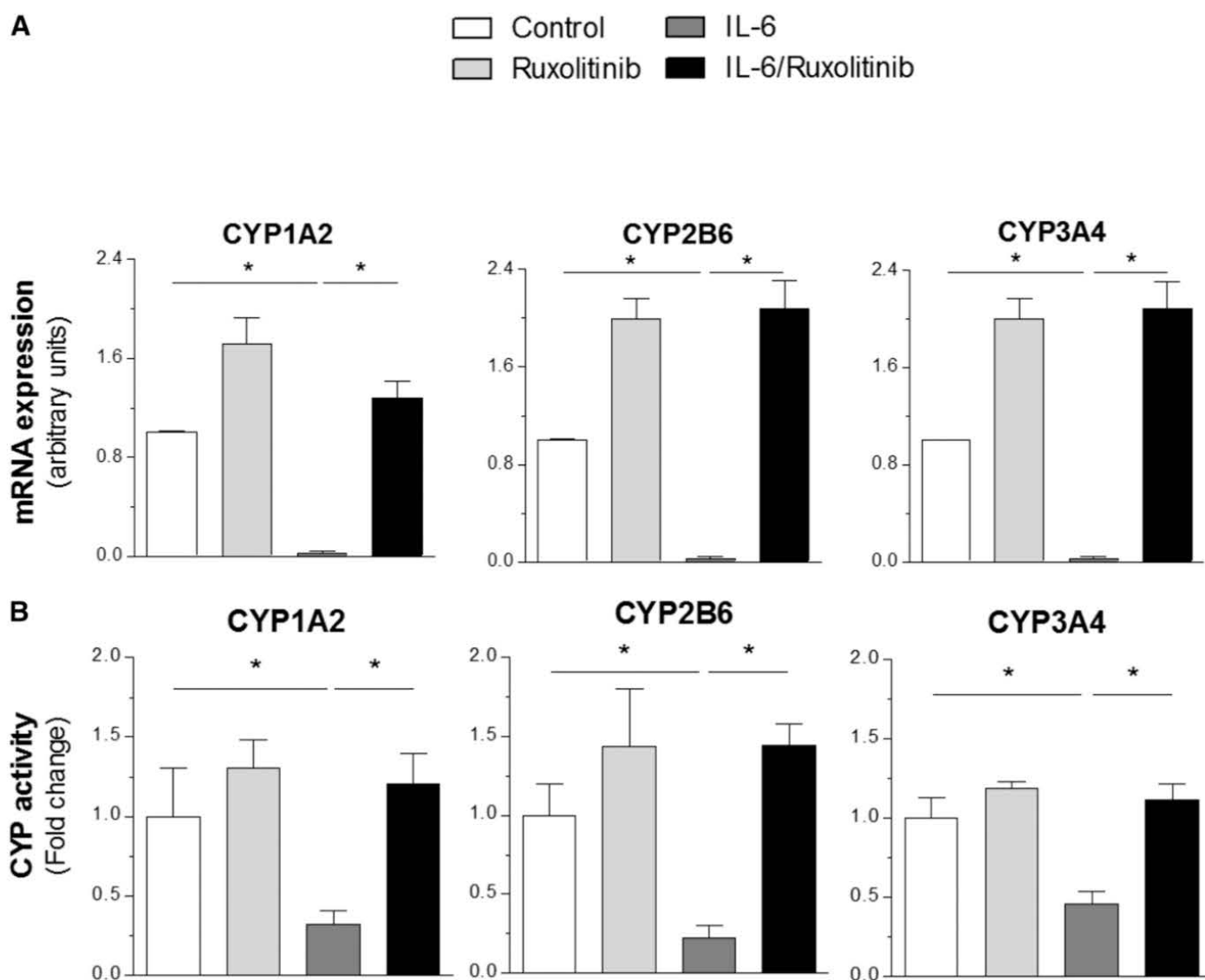


Fig. 2. Effects of ruxolitinib on IL-6-mediated repression of P450 mRNA (A) and activity (B) in human hepatoma HepaRG cells. HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/ml IL-6, or coexposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/ml IL-6 for 48 hours. (A) CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expressions were then determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Data for each P450 are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U. (B) CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 activities were determined by measuring the formation of acetaminophen, hydroxybupropion and 1'-hydroxy-midazolam, as described in *Materials and Methods*. Basal P450 activities in untreated control HepaRG cells were 3.4 ± 1.0 pM acetaminophen/mg protein per minute (CYP1A2 activity), 24.1 ± 4.8 pM hydroxy-bupropion/mg protein per minute (CYP2B6 activity), and 203.7 ± 25.8 pM 1'-hydroxy-midazolam/mg protein per minute (CYP3A4 activity). Data are expressed as fold-change when compared with P450 activities found in untreated control cells, i.e., as the ratio P450 activities in treated cells vs. that found in untreated cells. (A and B) Data are the means \pm S.E.M. of values from at least three independent assays. * $P < 0.05$.

JAK-independent manner (Weber et al., 2010). IL-1 β was used at 1 ng/ml, a concentration previously demonstrated to repress many detoxifying proteins in human hepatocytes (Le Vee et al., 2008; Dickmann et al., 2012; Moreau et al., 2017). This IL-1 β concentration did not trigger cytotoxicity, as shown by phase-contrast microscopic examination of the cultures (data not shown), which agrees with previous measurement of cellular viability in IL-1 β -treated HepaRG cells (Le Vee et al., 2008). IL-1 β was found to highly induce mRNA expression of the inflammatory markers CRP and IL-8, as already reported (Le Vee et al., 2008), and to significantly reduce those of various P450s and transporters (Fig. 5). CYP1A2 and CYP3A4 mRNA levels were thus highly reduced by $99.1 \pm 0.3\%$ and $98.5 \pm 0.4\%$, respectively, and those of NTCP, OATP1B1, and OCT1 were markedly decreased by $91.8 \pm 7.6\%$, $92.8 \pm 2.5\%$, and $67.7 \pm 13.9\%$, respectively. Such potent repressions of drug-detoxifying protein

mRNA levels in response to IL-1 β were not significantly impaired by 5 μ M ruxolitinib (Fig. 5). Similarly, IL-1 β -mediated upregulation of IL-8 was not counteracted by ruxolitinib, which, by contrast, inhibited that of CRP (Fig. 5), suggesting an implication of the JAK/STAT pathway in CRP upregulation by IL-1 β .

Attenuation of IL-6-Mediated Repression of P450 and Drug Transporter mRNA Levels by the JAK1/3 Inhibitor Tofacitinib in HepaRG Cells. To determine whether JAK inhibitors structurally distinct from ruxolitinib can also reverse IL-6-mediated suppression of detoxifying protein, we analyzed the effects of tofacitinib (also known as CP-690,550), a marketed JAK1/3 inhibitor currently used for the treatment of rheumatoid arthritis (Vyas et al., 2013). Here, tofacitinib was used at a 3 μ M concentration, which may be reached in plasma of patients treated by oral administration of this JAK inhibitor (Dowty et al., 2014; Krishnaswami et al., 2015). At this concentration, tofacitinib

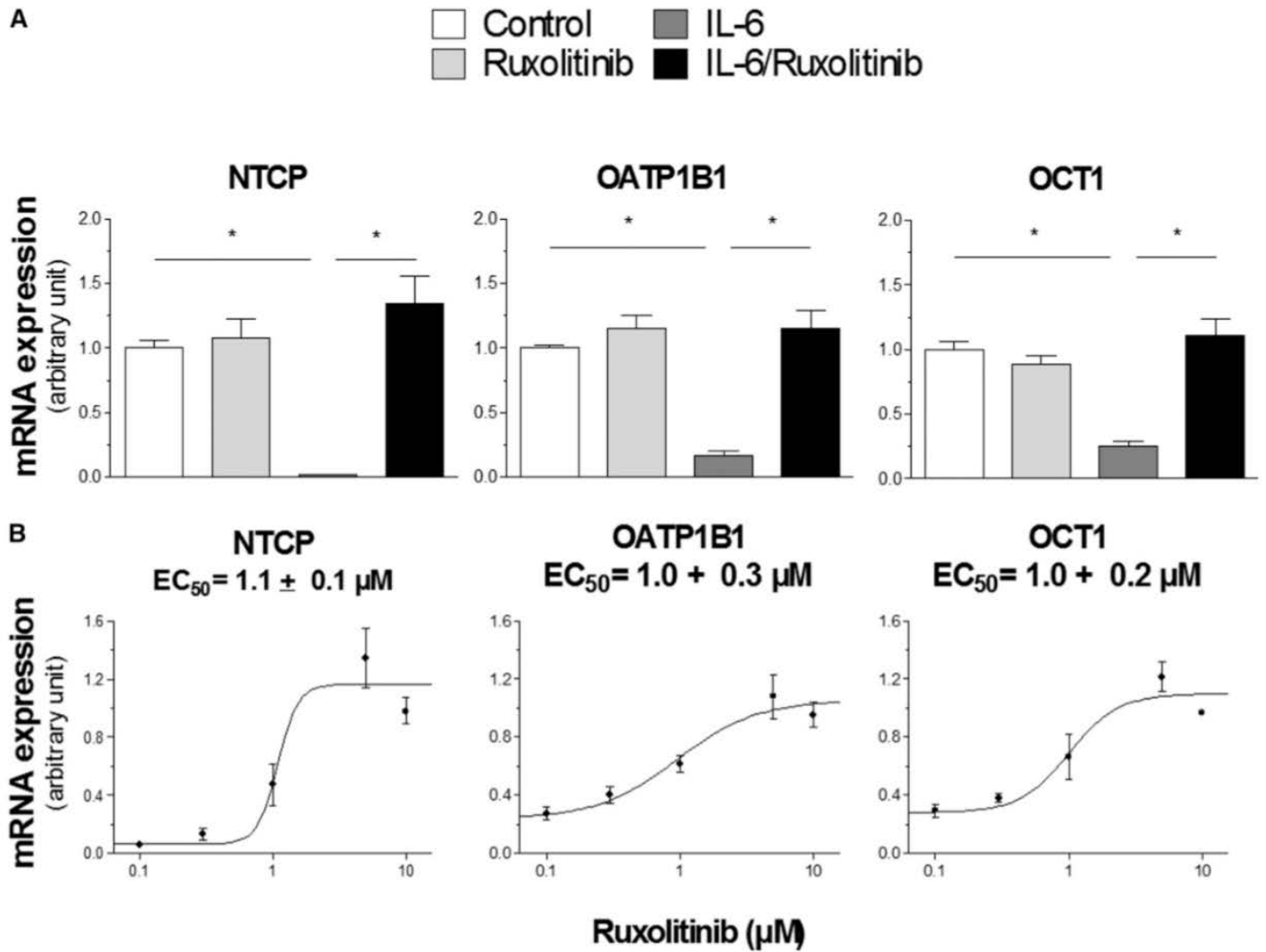


Fig. 3. Effects of ruxolitinib on IL-6-mediated mRNA repression of drug transporters in primary human hepatocytes. (A) Primary human hepatocytes were either untreated (control), exposed to 5 μM ruxolitinib or 10 ng/ml IL-6, or coexposed to 5 μM ruxolitinib and 10 ng/ml IL-6 for 24 hours. CRP, IL-8, NTCP, OATP1B1, and OCT1 mRNA expressions were then determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Data for each transporter are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U; they are the means \pm S.E.M. of values from at least four independent human hepatocyte populations. * $P < 0.05$. (B) Primary human hepatocytes were either untreated or exposed to 10 ng/ml IL-6 in the presence of various concentrations of ruxolitinib (from 0 to 10 μM) for 24 hours. NTCP, OATP1B1, and OCT1 mRNA expressions were then determined by RT-qPCR. Data for each transporter are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U; they are the means \pm S.E.M. of values from at least three independent human hepatocyte populations. Ruxolitinib EC_{50} values are indicated at the top of each graph.

was found to fully reverse IL-6-mediated mRNA induction of the reference target CRP in HepaRG cells (Fig. 6), thus demonstrating that tofacitinib, as ruxolitinib, was efficient to antagonize the JAK/STAT pathway mobilized by IL-6 in such cells. Tofacitinib was next shown to counteract repression of CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4, NTCP, OATP1B1, and OCT1 mRNA levels caused by IL-6 in HepaRG cells (Fig. 6).

Discussion

The data reported in the present study indicate that the marketed JAK1/2 inhibitor ruxolitinib can markedly reverse IL-6-mediated repression of hepatic drug-detoxifying proteins in vitro. Ruxolitinib notably restores mRNA expression of both drug-metabolizing enzymes and sinusoidal drug transporters in primary human hepatocytes and HepaRG cells exposed to IL-6. These ruxolitinib effects are rather specific, as the JAK1/2 inhibitor failed to hinder IL-1 β -mediated mRNA suppression of drug-detoxifying proteins. Also, tofacitinib, another JAK

inhibitor not structurally related to ruxolitinib, counteracted P450 and drug transporter suppression owing to IL-6 as well. Furthermore, ruxolitinib concentrations (in the 1 μM range) required to reverse IL-6-mediated repression of detoxifying pathways in primary human hepatocytes were close to those (in the 0.25–1 μM range) previously demonstrated to be needed to efficiently counteract the JAK/STAT pathway in cultured cells (Schönberg et al., 2015). These ruxolitinib effects toward drug-detoxifying protein expression consequently most probably implicate its basic inhibitory activity against the JAK/STAT pathway. A role for off-target effects of ruxolitinib, which notably concerns various kinases such as tropomyosin receptor kinase B, activated CDC42 kinase 1, anaplastic lymphoma kinase, RET kinase, and Rho-associated protein kinases (Zhou et al., 2014; Rudolph et al., 2016), has thus to be discarded. Importantly, the IL-6 concentration used in the present study (10 ng/ml) has to be considered as supraphysiologic. Indeed, in healthy individuals, serum IL-6 concentrations usually range from 1.3 to 10.3 pg/ml and are increased to 2.6–123 pg/ml in some patient populations suffering from inflammation-based diseases

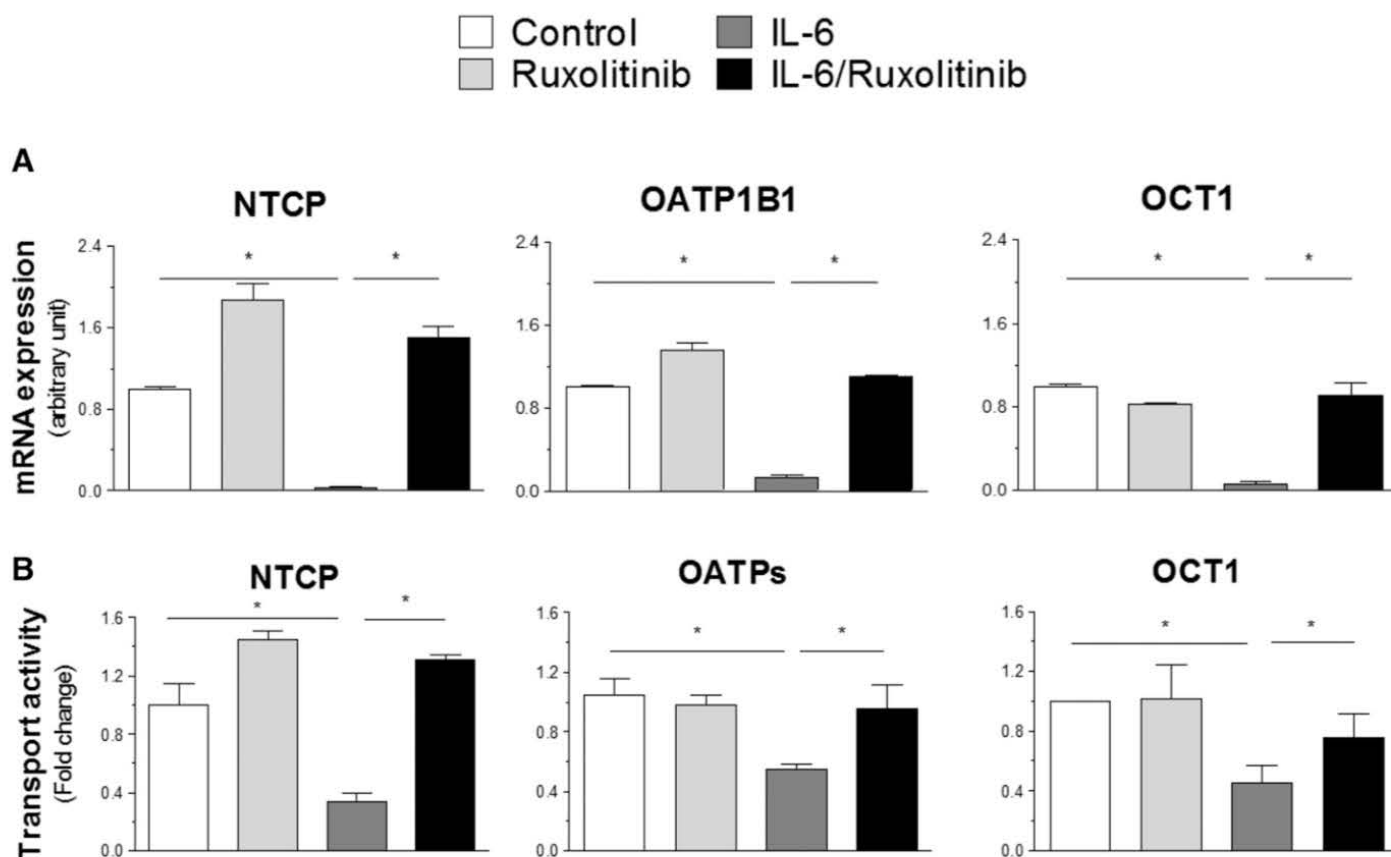


Fig. 4. Effects of ruxolitinib on IL-6-mediated repression of drug transporter mRNA (A) and activity (B) in human hepatoma HepaRG cells. HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/ml IL-6, or coexposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/ml IL-6 for 48 hours. (A) NTCP, OATP1B1, and OCT1 mRNA expressions were then determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Data for each transporter are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U. (B) NTCP, OATP1B1, and OCT1 activities were determined by measuring sodium-dependent uptake of taurocholate, BSP-inhibitable uptake of E3S, and verapamil-inhibitable uptake of TEA, as described in *Materials and Methods*. Data are expressed as fold-change when compared with transporter activities found in untreated control cells, i.e., as the ratio of transporter activity in treated cells vs. that found in untreated cells. Absolute levels of transporter-mediated uptake of substrates in untreated control HepaRG cells were 1.59 ± 0.34 pmol/mg protein (taurocholate), 0.35 ± 0.05 pmol/mg protein (E3S), and 148.5 ± 76.9 pmol/mg protein (TEA). (A and B) Data are the means \pm S.E.M. of values from at least three independent assays. * $P < 0.05$.

(Dickmann et al., 2011). Ruxolitinib has therefore to be considered as fully efficient to counteract effects of IL-6, even if the cytokine is used at very high concentrations. By contrast, TPs acting as IL-6- or IL-1 β -neutralizing mAbs attenuate, but not fully abolish, IL-6- or IL-1 β -mediated repression of CYP3A4 by shifting cytokine half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) toward higher values (Dickmann et al., 2011; Moreau et al., 2017).

It is noteworthy that ruxolitinib EC₅₀ values (in the 1 μ M range) needed to abrogate IL-6 effects toward drug-detoxifying proteins in cultured human hepatocytes are much higher than those (in the 5 nM range) required to inhibit JAK1 and JAK2 activities in acellular system assays (Fridman et al., 2010). This may reflect the fact that active free concentrations of ruxolitinib, known to be highly bound to circulating proteins in the human plasma (unbound plasma concentration = 3.3%) (Shi et al., 2015), are probably low in the FBS-supplemented culture medium used for the in vitro treatment of hepatocytes in the present study. Moreover, intracellular hepatic concentrations of unbound ruxolitinib, which remain to be characterized, probably need to be taken into account, because ruxolitinib primarily acts intracellularly, i.e., it blocks JAKs located at the cytoplasmic face of the IL-6 receptor. Finally, metabolic degradation of ruxolitinib by drug-metabolizing enzymes, especially CYP3A4 (Shi et al., 2012), may additionally contribute to the

relatively high EC₅₀ values of ruxolitinib observed in metabolically competent human hepatocytes.

The marked upregulation of functional drug-detoxifying protein expression by ruxolitinib in IL-6-treated human hepatocyte cultures suggests that the JAK1/2 inhibitor may cause idDDIs in patients suffering from inflammatory or infectious diseases by enhancing detoxification capacities. This hypothesis is fully supported by the fact that other drugs targeting the IL-6 pathway, such as the mAbs tocilizumab, sarilumab, and sirukumab, have been shown to reduce exposure of coadministered drugs like simvastatin, midazolam, or omeprazole (Schmitt et al., 2011; Zhuang et al., 2015; Lee et al., 2017). Moreover, ruxolitinib concentrations required to counteract IL-6-mediated suppression of P450s and drug transporters in vitro are in the 1.0–1.2 μ M range, which is close to the range of ruxolitinib maximum plasma concentrations (C_{max}; 0.59–1.29 μ M) reached in patients treated with the JAK inhibitor (Ogama et al., 2013). In addition, ruxolitinib in vitro effects toward IL-6-related P450 and transporter repression seem to be not transient, i.e., they lasted at least 72 hours in cultured human hepatocytes. The clinical use of ruxolitinib may therefore be theoretically efficient to counteract the repressing effect of IL-6 toward drug-detoxifying pathways in vivo. However, such an effect, and the potential consequences in terms of idDDIs, have not

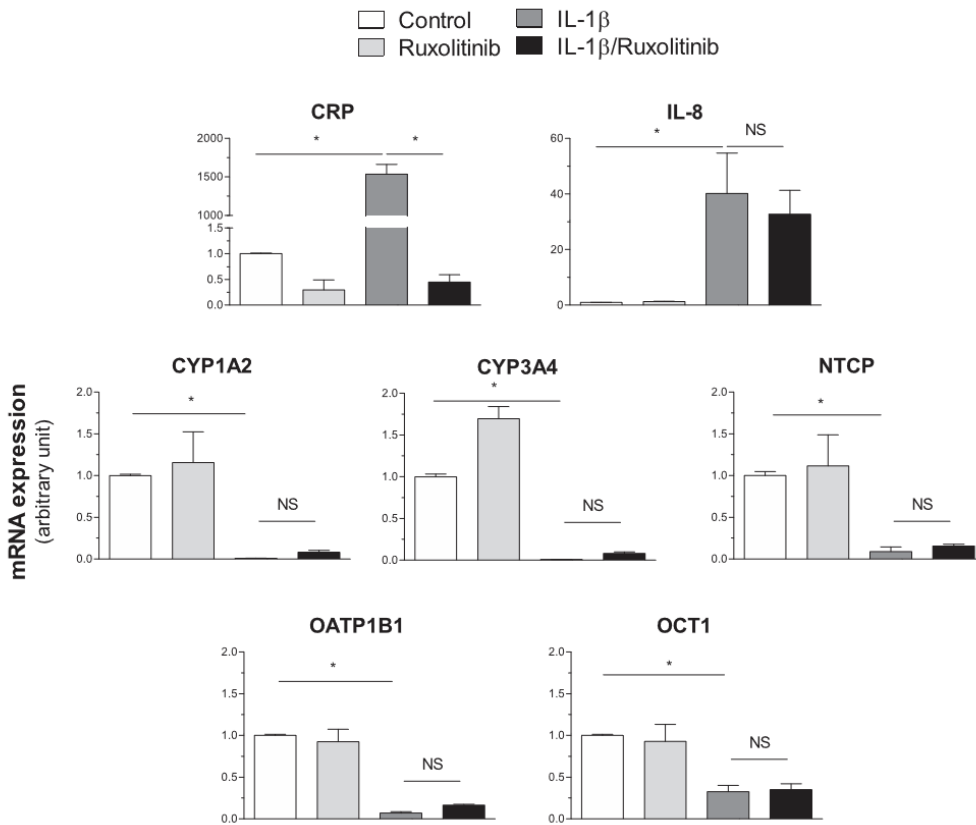


Fig. 5. Effects of ruxolitinib on IL-1 β -mediated repression of P450 and transporter mRNA levels in human hepatoma HepaRG cells. HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 1 ng/ml IL-1 β , or coexposed to 5 μ M ruxolitinib and 1 ng/ml IL-1 β for 24 hours. (A) CRP, IL-8, CYP1A2, CYP3A4, NTCP, OATP1B1, and OCT1 mRNA expressions were then determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Data for each drug-detoxifying protein are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U. Data are the means \pm S.E.M. of values from at least five independent assays. * P < 0.05; NS, not statistically significant (P > 0.05).

presently been reported in the literature, according to the best of our knowledge. Similarly, tofacitinib, although efficiently counteracting P450 and transporter repression caused by IL-6 in hepatic HepaRG cells, has not been shown to cause clinical idDDIs through enhancing drug metabolism and/or transport. Notably, tofacitinib did not alter the pharmacokinetics of the reference CYP3A4 substrate midazolam in healthy volunteers (Gupta et al., 2012). It similarly failed to impair pharmacokinetics of oral contraceptive steroids in healthy female volunteers (Menon et al., 2016). Nevertheless, it is noteworthy that these pharmacokinetics studies were performed in healthy subjects, who probably would not have exhibited inflammation-related altered physiological functions, such as IL-6-mediated repression of hepatic detoxifying pathways. By contrast, patients suffering from myeloproliferative neoplasms or rheumatoid arthritis, which correspond to present clinical indications for ruxolitinib and tofacitinib, respectively, commonly exhibit increased plasma levels of IL-6 (Čokić et al., 2015; do Prado et al., 2016; Sollazzo et al., 2016). Pharmacokinetic studies centered on such patients are probably required therefore to verify the hypothesis that marketed JAK inhibitors, including not only ruxolitinib and tofacitinib, but also baricitinib, very recently approved in European Union for rheumatoid arthritis treatment (Richez et al., 2017), may cause idDDIs through antagonizing the IL-6/JAK/STAT pathway.

It is noteworthy that both ruxolitinib and tofacitinib are primarily metabolized by CYP3A4, which thus appears as a key factor for their detoxification (Shi et al., 2012; Dowty et al., 2014). Inhibition of CYP3A4 activity by ketoconazole notably has been shown to increase total ruxolitinib plasma exposure, whereas induction of CYP3A4 expression by rifampicin decreased it in healthy volunteers (Shi et al., 2012). Through restoring functional expression of hepatic CYP3A4 in patients displaying elevated levels of IL-6, ruxolitinib and tofacitinib may therefore induce their own metabolism. Finally, it is noteworthy that ruxolitinib and tofacitinib reduce plasma levels of IL-6 and other

inflammatory cytokines in patients to whom they are administered (Migita et al., 2014; Tabaroki et al., 2014). Such a downregulation of inflammatory cytokines may also contribute to putative *in vivo* inhibition of inflammation-related repression of hepatic detoxifying pathway by the JAK inhibitors.

Both primary human hepatocytes and HepaRG cells were found to be well responsive to IL-6 and ruxolitinib, thus demonstrating that these cellular models are probably relevant for studying the interactions of small drugs with inflammatory cytokines *in vitro*. Cultured human hepatocytes have similarly been used to investigate the effects of TPs toward cytokine-driven regulation of P450s and transporters (Dickmann et al., 2011; Moreau et al., 2017). Their relevance for the prediction of TP-idDDIs may however be compromised because of the high interlaboratory variability in P450 suppression by cytokines (Evers et al., 2013). In this context, it is noteworthy that the rather elevated concentration of IL-6 used in the study (10 ng/ml) allowed for high repression of CYP3A4 mRNA in the human hepatocyte population analyzed from each donor; other drug-detoxifying proteins, including CYP1A2, CYP2B6, NTCP, OATP1B1, and OCT1, were also markedly repressed, regardless of the hepatocyte population (data not shown). In addition, ruxolitinib was likewise efficient in counteracting IL-6-related repression of CYP3A4 mRNAs in the human hepatocyte population of each donor. Taken together, these data suggest that interindividual variations in ruxolitinib response may be rather negligible in our experimental conditions. Besides, it should be kept in mind that inflammatory diseases display complex biology, with frequent implication of multiple cytokines, which may interact with one another. The hepatocyte monoculture has consequently been considered as an oversimplified system, which cannot reproduce the complex biology of *in vivo* inflammatory disease states (Girish et al., 2011; Evers et al., 2013). The analysis of JAK inhibitor effects toward cytokine-regulated detoxifying proteins in a more relevant *in vitro* model, such as the

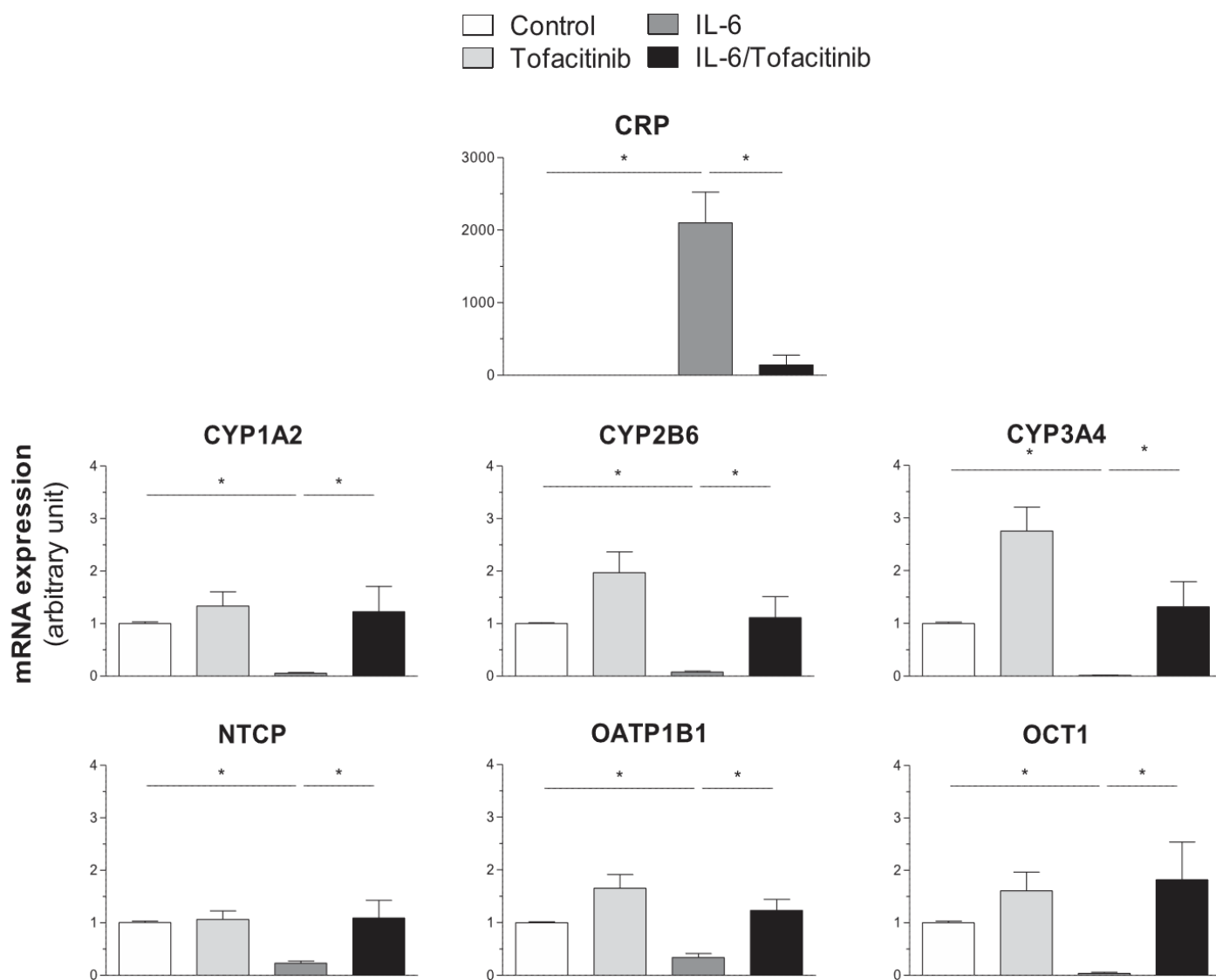


Fig. 6. Effects of tofacitinib on IL-6-mediated repression of P450 and drug transporter mRNA levels in human hepatoma HepaRG cells. HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 3 μ M tofacitinib or 10 ng/ml IL-6, or coexposed to 3 μ M tofacitinib and 10 ng/ml IL-6 for 24 hours. CRP, P450, and drug transporter mRNA expressions were then determined by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Data are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 U; they are the means \pm S.E.M. of values from four independent assays. * $P < 0.05$.

hepatocyte-Kupffer cell coculture system (Nguyen et al., 2015), would be welcome.

In summary, the JAK inhibitor ruxolitinib was shown to potently counteract the repressing effects of IL-6 toward hepatic P450s and drug transporters. This may be the source of potential idDDIs, through a new mechanism, i.e., a small drug (ruxolitinib) acting as a perpetrator by restoring full hepatic detoxification capacities for patients suffering from inflammation-based diseases. This point probably deserves attention, owing to the growing interest in clinical use of ruxolitinib, tofacitinib, baricitinib, and other JAK inhibitors currently in development for the treatment of various inflammatory and autoimmune diseases (Banerjee et al., 2017).

Acknowledgments

The authors thank Dr. Valérie Lecœur for critical reading of the manuscript, Dr. Sylvie Hermouet for her helpful encouragement to their work, Dr. Abdullah Mayati for his help with immunocytochemistry, Dr. Bruno Turlin and the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé de Rennes BB-0033-00056 for managing patient samples, and Technologie Servier (Orléans, France) for the gift of the LC-MS/MS system.

Authorship Contributions

Participated in research design: Febvre-James, Fardel.
Conducted experiments: Febvre-James, Bruyère.
Contributed new reagents or analytic tools: Bruyère, Le Vée.
Performed data analysis: Febvre-James, Fardel.
Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Febvre-James, Bruyère, Fardel.

References

- Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, and Guillouzo A (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* **44**:707–715.
- Aitken AE and Morgan ET (2007) Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **35**:1687–1693.
- Baker KF and Isaacs JD (2017) Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: what can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? *Ann Rheum Dis* [published ahead of print].
- Banerjee S, Biehl A, Gadina M, Hasni S, and Schwartz DM (2017) JAK-STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects. *Drugs* **77**:521–546.
- Bose P and Verstovsek S (2017) JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms: what is next? *Blood* **130**:115–125.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254.
- Cascorbi I (2012) Drug interactions—principles, examples and clinical consequences. *Dtsch Arztebl Int* **109**:546–555, quiz 556.

- Čokić VP, Mitrović-Ajtić O, Beleslin-Čokić BB, Marković D, Buač M, Diklić M, Kraguljac-Kurtović N, Damjanović S, Milenković P, Gotić M, et al. (2015) Proinflammatory cytokine IL-6 and JAK-STAT signaling pathway in myeloproliferative neoplasms. *Mediators Inflamm* **2015**: 453020.
- Danton AC, Montastruc F, Sommet A, Durrieu G, Bagheri H, Bondon-Guillon E, Lapeyre-Mestre M, and Montastruc JL (2013) Importance of cytochrome P450 (CYP450) in adverse drug reactions due to drug-drug interactions: a Pharmacovigilance study in France. *Eur J Clin Pharmacol* **69**:885–888.
- Dickmann LJ, Patel SK, Rock DA, Wienkers LC, and Slatter JG (2011) Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos* **39**:1415–1422.
- Dickmann LJ, Patel SK, Wienkers LC, and Slatter JG (2012) Effects of interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-1 β /interleukin 6 (IL-6) combinations on drug metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Curr Drug Metab* **13**:930–937.
- do Prado AD, Bisi MC, Piovesan DM, Bredemeier M, Batista TS, Petersen L, Bauer ME, da Silveira IG, Mendonça JA, and Staub HL (2016) Ultrasound power Doppler synovitis is associated with plasma IL-6 in established rheumatoid arthritis. *Cytokine* **83**:27–32.
- Dowdy ME, Lin J, Ryder TF, Wang W, Walker GS, Vaz A, Chan GL, Krishnaswami S, and Prakash C (2014) The pharmacokinetics, metabolism, and clearance mechanisms of tofacitinib, a janus kinase inhibitor, in humans. *Drug Metab Dispos* **42**:759–773.
- Evers R, Dallas S, Dickmann LJ, Fahmi OA, Kenny JR, Kraynov E, Nguyen T, Patel AH, Slatter JG, and Zhang L (2013) Critical review of preclinical approaches to investigate cytochrome p450-mediated therapeutic protein drug-drug interactions and recommendations for best practices: a white paper. *Drug Metab Dispos* **41**:1598–1609.
- Fardel O and Le Vée M (2009) Regulation of human hepatic drug transporter expression by pro-inflammatory cytokines. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**:1469–1481.
- Fardel O, Morel F, and Guillouzo A (1993) P-glycoprotein expression in human, mouse, hamster and rat hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis* **14**:781–783.
- Fridman JS, Scherle PA, Collins R, Burn TC, Li Y, Li J, Covington MB, Thomas B, Collier P, Favata MF, et al. (2010) Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050. *J Immunol* **184**:5298–5307.
- Girish S, Martin SW, Peterson MC, Zhang LK, Zhao H, Balthasar J, Evers R, Zhou H, Zhu M, Klunk L, et al. (2011) AAPS workshop report: strategies to address therapeutic protein-drug interactions during clinical development. *AAPS J* **13**:405–416.
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaize D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, and Guguen-Guillouzo C (2002) Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:15655–15660.
- Gupta P, Alvey C, Wang R, Dowdy ME, Fahmi OA, Walsky RL, Riese RJ, and Krishnaswami S (2012) Lack of effect of tofacitinib (CP-690,550) on the pharmacokinetics of the CYP3A4 substrate midazolam in healthy volunteers: confirmation of in vitro data. *Br J Clin Pharmacol* **74**:109–115.
- Harvey RD and Morgan ET (2014) Cancer, inflammation, and therapy: effects on cytochrome p450-mediated drug metabolism and implications for novel immunotherapeutic agents. *Clin Pharmacol Ther* **96**:449–457.
- Hunter CA and Jones SA (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* **16**:448–457.
- Jiang X, Zhuang Y, Xu Z, Wang W, and Zhou H (2016) Development of a physiologically based pharmacokinetic model to predict disease-mediated therapeutic protein-drug interactions: modulation of multiple cytochrome P450 enzymes by interleukin-6. *AAPS J* **18**:767–776.
- Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Bertrand M, and Fardel O (2005) Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **33**:1418–1422.
- Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, and Fardel O (2006) Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **34**:1756–1763.
- Klein M, Thomas M, Hofmann U, Seehofer D, Damm G, and Zanger UM (2015) A systematic comparison of the impact of inflammatory signaling on absorption, distribution, metabolism, and excretion gene expression and activity in primary human hepatocytes and HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* **43**:273–283.
- Krishnaswami S, Boy M, Chow V, and Chan G (2015) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of single oral doses of tofacitinib, a Janus kinase inhibitor, in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev* **4**:83–88.
- Le Vee M, Gripon P, Stieger B, and Fardel O (2008) Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1 β . *Drug Metab Dispos* **36**:217–222.
- Le Vee M, Lecœur V, Stieger B, and Fardel O (2009) Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α or interleukin-6. *Drug Metab Dispos* **37**:685–693.
- Le Vee M, Noel G, Jouan E, Stieger B, and Fardel O (2013) Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol In Vitro* **27**:1979–1986.
- Lee EB, Daskalakis N, Xu C, Paccaly A, Miller B, Fleischmann R, Bodrug I, and Kivitz A (2017) Disease-drug interaction of sarilumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokinet* **56**:607–615.
- Menon S, Riese R, Wang R, Alvey CW, Shi H, Petit W, and Krishnaswami S (2016) Evaluation of the effect of tofacitinib on the pharmacokinetics of oral contraceptive steroids in healthy female volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev* **5**:336–342.
- Migita K, Izumi Y, Jiuchi Y, Kozuru H, Kawahara C, Izumi M, Sakai T, Nakamura M, Motokawa S, Nakamura T, et al. (2014) Effects of Janus kinase inhibitor tofacitinib on circulating serum amyloid A and interleukin-6 during treatment for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **175**:208–214.
- Moreau A, Le Vée M, Jouan E, Denizot C, Parmentier Y, and Fardel O (2017) Effect of gevo-kizumab on interleukin-1 β -mediated cytochrome P450 3A4 and drug transporter repression in cultured human hepatocytes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **42**:871–878.
- Morgan ET (2009) Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* **85**:434–438.
- Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, et al. (2008) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab Dispos* **36**:205–216.
- Nguyen TV, Ukairo O, Khetani SR, McVay M, Kanchagar C, Seghezzi W, Ayanoglu G, Irrechukwu O, and Evers R (2015) Establishment of a hepatocyte-kupffer cell coculture model for assessment of proinflammatory cytokine effects on metabolizing enzymes and drug transporters. *Drug Metab Dispos* **43**:774–785.
- Ogama Y, Mineyama T, Yamamoto A, Woo M, Shimada N, Amagasaki T, and Natsume K (2013) A randomized dose-escalation study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ruxolitinib (INC424) in healthy Japanese volunteers. *Int J Hematol* **97**:351–359.
- Pruksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, Cabalu T, and Hochman J (2013) Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J* **15**:629–645.
- Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshour T, Li J, Scherle PA, Caulder E, Wen X, Li Y, Waelz P, et al. (2010) Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* **115**:3109–3117.
- Ramsden D, Zhou J, and Tweedie DJ (2015) Determination of a degradation constant for CYP3A4 by direct suppression of mRNA in a novel human hepatocyte model, hepatoPac. *Drug Metab Dispos* **43**:1307–1315.
- Richez C, Truchetet ME, Kostine M, Schaevebeke T, and Bannwarth B (2017) Efficacy of baricitinib in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother* **18**:1399–1407.
- Rubin K, Janefeldt A, Andersson L, Berke Z, Grime K, and Andersson TB (2015) HepaRG cells as human-relevant in vitro model to study the effects of inflammatory stimuli on cytochrome P450 isoenzymes. *Drug Metab Dispos* **43**:119–125.
- Rudolph J, Heine A, Quast T, Kolanus W, Trebicka J, Brossart P, and Wolf D (2016) The JAK inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell migration via off-target inhibition of ROCK. *Leukemia* **30**:2119–2123.
- Schmitt C, Kuhn B, Zhang X, Kivitz AJ, and Grange S (2011) Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther* **89**:735–740.
- Schönberg K, Rudolph J, Vonnahme M, Paramalli Jayanarayana S, Cornez I, Hejazi M, Manser AR, Uhrberg M, Verbeck W, Koschmieder S, et al. (2015) JAK inhibition impairs NK cell function in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res* **75**:2187–2199.
- Shi JG, Chen X, Emm T, Scherle PA, McGee RF, Lo Y, Landman RR, McKeeve EG, Jr, Punwani NG, Williams WV, et al. (2012) The effect of CYP3A4 inhibition or induction on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of orally administered ruxolitinib (INCB018424 phosphate) in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* **52**:809–818.
- Shi JG, Fraczekiewicz G, Williams WV, and Yelawaram S (2015) Predicting drug-drug interactions involving multiple mechanisms using physiologically based pharmacokinetic modeling: a case study with ruxolitinib. *Clin Pharmacol Ther* **97**:177–185.
- Sollazzo D, Forte D, Polverelli N, Perricone M, Romano M, Luatti S, Vianelli N, Cavo M, Palandri F, and Catani L (2016) Circulating calreticulin is increased in myelofibrosis: correlation with interleukin-6 plasma levels, bone marrow fibrosis, and splenomegaly. *Mediators Inflamm* **2016**: 5860657.
- Tabarrokí A, Lindner DJ, Visconte V, Zhang L, Rogers HJ, Parker Y, Duong HK, Lichtin A, Kalaycio ME, Sekeres MA, et al. (2014) Ruxolitinib leads to improvement of pulmonary hypertension in patients with myelofibrosis. *Leukemia* **28**:1486–1493.
- Vyas D, O'Dell KM, Bandy JL, and Boyce EG (2013) Tofacitinib: the First Janus Kinase (JAK) inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Pharmacother* **47**:1524–1531.
- Weber A, Wasiliew P, and Kracht M (2010) Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* **3**:cm1.
- Yang Q, Doshi U, Li N, and Li AP (2012) Effects of culture duration on gene expression of P450 isoforms, uptake and efflux transporters in primary hepatocytes cultured in the absence and presence of interleukin-6: implications for experimental design for the evaluation of down-regulatory effects of biotherapeutics. *Curr Drug Metab* **13**:938–946.
- Zhang D, Sun M, Samols D, and Kushner I (1996) STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem* **271**:9503–9509.
- Zhou T, Georgeon S, Moser R, Moore DJ, Cafilisch A, and Hantschel O (2014) Specificity and mechanism-of-action of the JAK2 tyrosine kinase inhibitors ruxolitinib and SAR302503 (TG101348). *Leukemia* **28**:404–407.
- Zhuang Y, de Vries DE, Xu Z, Marciniak SJ, Jr, Chen D, Leon F, Davis HM, and Zhou H (2015) Evaluation of disease-mediated therapeutic protein-drug interactions between an anti-interleukin-6 monoclonal antibody (sirukumab) and cytochrome P450 activities in a phase I study in patients with rheumatoid arthritis using a cocktail approach. *J Clin Pharmacol* **55**:1386–1394.

Address correspondence to: Dr. Olivier Fardel, Institut de Recherches en Santé, Environnement et Travail (IRSET), UMR INSERM U1085, Faculté de Pharmacie, Université de Rennes 1, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 34043 Rennes, France.
E-mail: olivier.fardel@univ-rennes1.fr

Supplemental data

Manuscript Title: The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib reverses interleukin-6-mediated suppression of drug detoxifying proteins in primary human hepatocytes

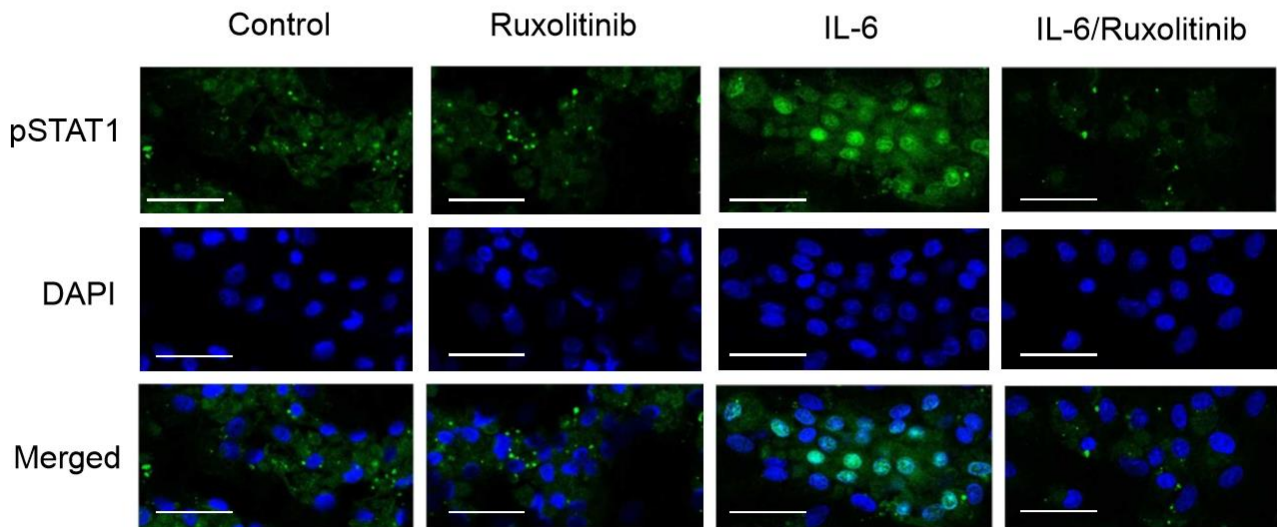
Authors: Marie Febvre-James, Arnaud Bruyère, Marc Le Vée, Olivier Fardel

Journal title: Drug Metabolism and Disposition

SUPPLEMENTAL TABLE 1

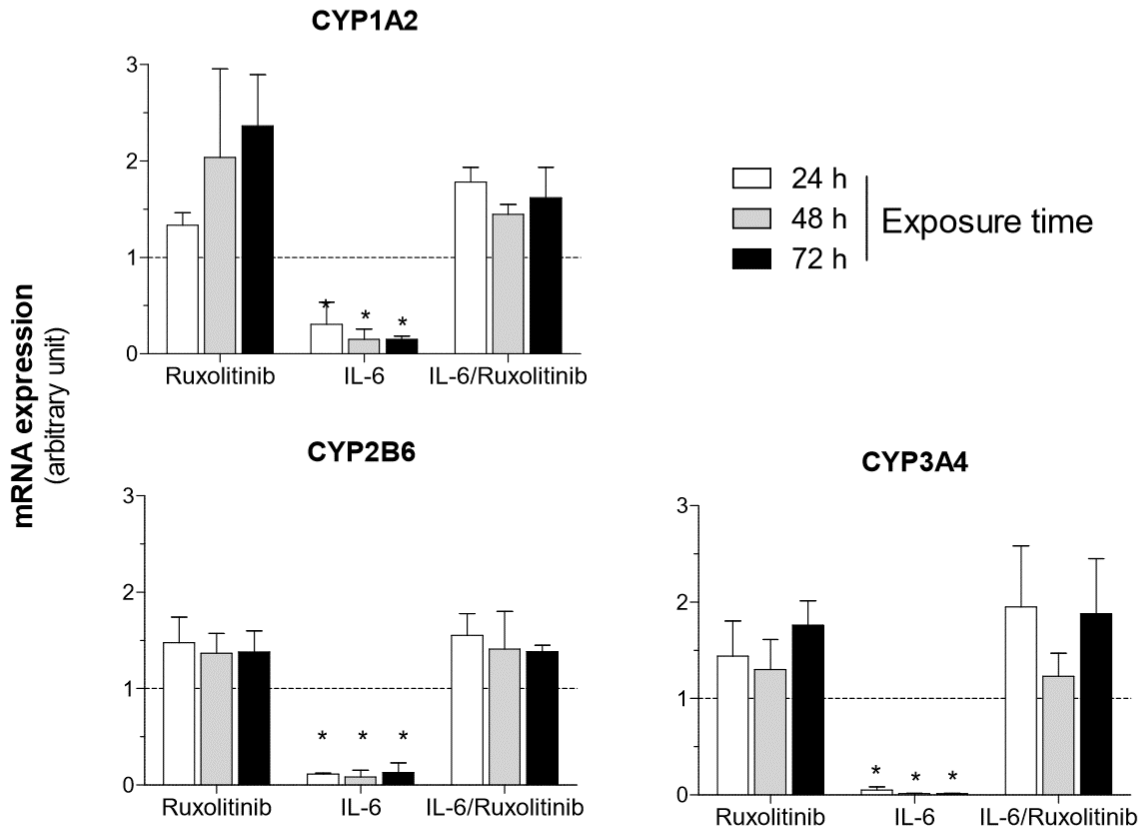
Hepatocyte donor characteristics

Donor	Sex	Age (years)	Disease	Smoking	Alcoholism
HH1	Female	64	Cholangiocarcinoma	No	No
HH2	Female	50	Metastasis	No	Unknown
HH3	Male	70	Cholangiocarcinoma	No	Unknown
HH4	Male	55	Cholangiocarcinoma	No	Unknown
HH5	Male	69	Cholangiocarcinoma	No	Unknown
HH6	Male	59	Metastasis	No	Unknown
HH7	Female	60	Metastasis	No	Unknown
HH8	male	79	Metastasis	No	Unknown



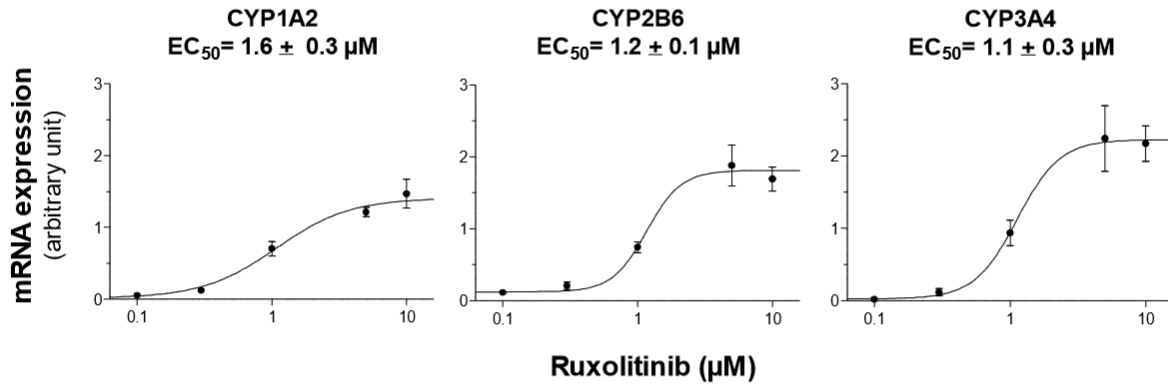
Supplemental Fig. 1. Effects of ruxolitinib on IL-6-induced expression and nuclear translocation of pSTAT1 in HepaRG cells.

HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL IL-6 or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL IL-6 for 30 min. Expression of pSTAT1 was analysed by immunofluorescence; pSTAT1-related fluorescence is green, whereas blue fluorescence corresponds to DAPI-stained nuclei. Bar = 50 μ m. Data shown are representative of 3 independent experiments.



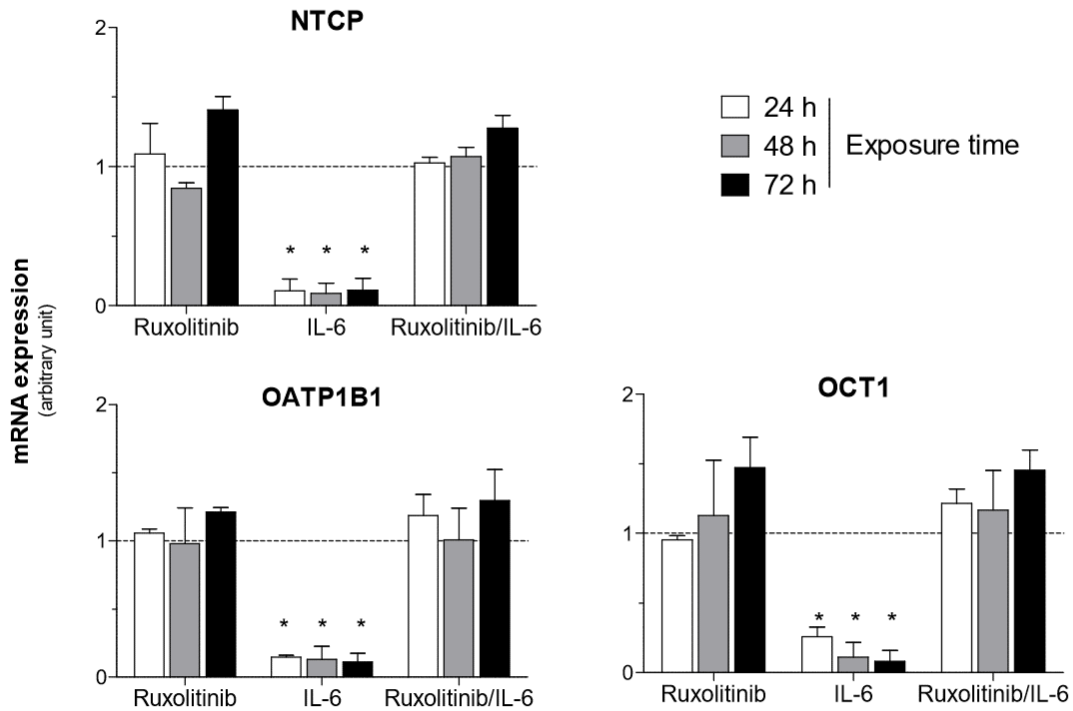
Supplemental Fig. 2. Time-dependence of ruxolitinib effects on IL-6-mediated mRNA repression of CYPs in human hepatocytes.

Primary human hepatocytes were either untreated, exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL IL-6 or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL IL-6 for 24 h, 48 h or 72 h. CYP mRNA expression was next determined by RT-qPCR. Data for each CYP are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit and indicated by a dashed line on the graphs; they are the means \pm SEM of values from 3 independent human hepatocyte populations. *, $p < 0.05$ when compared to control untreated hepatocytes.



Supplemental Fig. 3. Dose-dependence of ruxolitinib effects towards IL-6-mediated repression of CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 mRNA levels in hepatoma HepaRG cells.

HepaRG cells were either untreated or exposed to 10 ng/mL IL-6 in the presence of various concentrations of ruxolitinib (from 0 to 10 µM) for 24 h. CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 mRNA expressions were then determined by RT-qPCR. Data for each CYP are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit; they are the means \pm SEM of values from 3 independent assays. Ruxolitinib EC₅₀ values are indicated at the top of each graph.



Supplemental Fig. 4. Time-dependence of ruxolitinib effects on IL-6-mediated mRNA repression of drug transporters in human hepatocytes.

Primary human hepatocytes were either untreated, exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL IL-6 or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL IL-6 for 24 h, 48 h or 72 h. Transporter mRNA expression was next determined by RT-qPCR. Data for each transporter are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit and indicated by a dashed line on the graphs; they are the means \pm SEM of values from 3 independent human hepatocyte populations. *, $p < 0.05$ when compared to control untreated hepatocytes.

III. Article 3 : Effet du ruxolitinib sur l'expression de la CRP

III.1. Résumé

Cette étude a porté sur les effets du ruxolitinib sur l'expression hépatique de la CRP en réponse à une stimulation par le LPS.

III.1.1. Matériel et méthodes

Similairement à ce qui a été précédemment décrit, les modèles cellulaires utilisés sont les hépatocytes humains en culture primaire et les cellules HepaRG. Ici l'inflammation est induite par un traitement au LPS et les cellules HepaRG représentent un bon substitut aux hépatocytes humains en culture primaire puisqu'elles disposent de toute la machinerie nécessaire à la réponse au LPS, de façon similaire aux hépatocytes humains (Luangsay et al., 2015).

III.1.2. Résultats et discussion

En premier lieu, les résultats confirment la capacité du LPS à induire l'expression de la CRP dans notre modèle de cellules HepaRG. Ainsi, un pic d'expression est observé à 24 h d'exposition au LPS et est complètement réprimé par le ruxolitinib. L'effet du ruxolitinib est retrouvé au niveau protéique, de façon dose-dépendante et montre une efficacité à des concentrations atteintes dans le plasma des patients. Les effets du ruxolitinib aux niveaux transcriptomique et protéique sont confirmés dans les hépatocytes humains en culture primaire. De plus, dans les cellules HepaRG, le ruxolitinib montre son efficacité pour contrer l'induction de la CRP en réponse à une large variété de stimulus inflammatoires.

Le blocage de la phosphorylation et de la translocation nucléaire de STAT1 induites en réponse au LPS confirme que les effets du ruxolitinib sont bien dus à une inhibition de la voie JAK-STAT. Cette conclusion est renforcée par l'utilisation de deux autres inhibiteurs de JAK,

le tofacitinib et le pacritinib, dont les effets sont similaires à ceux du ruxolitinib au niveau transcriptomique comme protéique.

L'hypothèse émise est alors que le ruxolitinib bloque l'induction de la CRP en bloquant la réponse IL6 secondaire à la stimulation par le LPS.

L'induction de l'IL6 par l'ensemble des stimulus montrés précédemment comme inducteurs de la CRP appuie cette hypothèse. De plus, l'utilisation du tocilizumab, un anticorps neutralisant anti-récepteur à l'IL6, utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, montre une inhibition de l'expression de la CRP similaire à celle observé avec le ruxolitinib et cela face à une variété de stimulus inflammatoire. Ces résultats sont, de plus, confirmés au niveau protéique par les effets du tocilizumab en réponse au LPS montrant un profil d'inhibition similaire à celui du ruxolitinib.

Pour finir, les effets inhibiteurs du ruxolitinib en réponse au LPS dans les hépatocytes humaines et les cellules HepaRG ne se limitent pas à la CRP, mais touchent un large nombre de protéines de la phase aiguë.

L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que dans l'hépatocyte humain en culture primaire, le ruxolitinib bloque la réponse inflammatoire se traduisant notamment par la production de CRP et induite par une stimulation par le LPS, en inhibant la réponse secondaire orchestrée par l'IL6.

III.2. Manuscrit (soumis)

Potent repression of C-reactive protein (CRP) expression by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human hepatocytes

Marie Febvre-James¹, Valérie Lecureur¹ and Olivier Fardel²

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail)

- UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

² Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé,

environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

Correspondence to: Olivier Fardel, Irset - UMR_S 1085, Campus Santé, 2 Avenue du Pr Léon

Bernard, 35043 Rennes, France. E-mail : olivier.fardel@univ-rennes1.fr

ABSTRACT

Objective and design: In order to determine whether inflammatory hepatocytes may constitute primary targets for ruxolitinib, a Janus kinase (JAK) inhibitor, its effects towards expression of hepatic acute phase proteins, especially C-reactive protein (CRP), were assessed.

Material: Ruxolitinib effects were analysed in primary human hepatocytes and human hepatoma HepaRG cells exposed to various inflammatory stimuli.

Results: Ruxolitinib was found to fully inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced CRP secretion and mRNA expression, at concentrations ($IC_{50} = 12.9$ nM) achievable in human blood. It similarly repressed CRP up-regulation due to several Toll-like receptor agonists or pro-inflammatory cytokines (Interleukin (IL) 1β , IL6 and tumor necrosis factor α) and counteracted LPS-mediated induction of serum amyloid A, fibrinogen, haptoglobin and serpin. Ruxolitinib was additionally found to block the activation of the IL6/JAK/ signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway triggered by LPS and whose inhibition by the neutralizing anti-IL6 receptor antibody tocilizumab prevented CRP induction.

Conclusion: Ruxolitinib can potently repress induction of CRP in inflammatory human hepatocytes, most likely through targeting the IL6/JAK/STAT signalling cascade. Hepatic production of acute phase proteins during liver inflammation may therefore constitute a target for ruxolitinib.

Key-words: C-reactive protein; Hepatic inflammation; Interleukin 6; JAK inhibition; Ruxolitinib

INTRODUCTION

Ruxolitinib is a member of the Janus kinase (JAK) inhibitors and is currently clinically used in the treatment of myeloproliferative neoplasms such as myelofibrosis and polycythaemia vera [1–4]. The principal target of ruxolitinib is the JAK2 isoform, primarily associated with receptors for the hematopoietic growth factors thrombopoietin and erythropoietin. The JAK1 isoform, which plays a major role in the signalling pathway of inflammatory cytokines, is also potently inhibited by ruxolitinib. Although the two other members of the JAK family, JAK3 and tyrosine kinase 2 (TYK2), are less impacted [5], ruxolitinib is considered as a pan-JAK inhibitor.

Ruxolitinib has been shown to exert potent anti-inflammatory effects towards various cell types, including macrophages [6,7], lymphocytes [8], natural killer cells [9] and dendritic cells [10]. Such anti-inflammatory properties likely contribute to the beneficial therapeutic effects of the JAK inhibitor in myeloproliferative neoplasms, but also in other pathologies with systemic inflammation and for which the use of ruxolitinib is currently considered, including graft versus host disease [11–13] or solid tumours, *i.e.*, pancreatic cancer [14], lung cancer [15] and breast cancer [16–18].

One of the main markers of inflammation is the acute-phase C-reactive protein (CRP), whose plasma levels are elevated by inflammation due to infection or tissue damage, to the extent that its expression may increase up to 1000-fold in severe inflammatory states. It is getting more and more acknowledged that CRP is not only a marker of inflammation, but may play an active role in the inflammatory process, which however depends on the nature of the CRP isoform [19–21]. CRP is well known for being primarily synthesised by hepatocytes upon stimulation by pro-inflammatory signals, including cytokines like interleukin (IL) 6 [22] and activators of Toll-like receptors (TLRs), like bacterial lipopolysaccharide (LPS) [23,24].

Pre-treatment with ruxolitinib hinders liver inflammation in mice exposed to carbon

tetrachloride [25] or to thioacetamide [26]. The JAK inhibitor also inhibits IL6-related repression of hepatic detoxification proteins [27]. Such data indicate that the inflammatory liver may be responsive to the JAK inhibitor. Especially, because plasma levels of CRP have been shown to be reduced in patients treated by ruxolitinib [28,29], CRP production by hepatocytes in response to inflammatory signals may be abrogated by the JAK inhibitor. Our study was designed to confirm this hypothesis, using primary human hepatocytes and highly differentiated human hepatoma HepaRG cells. HepaRG cells express a similar pattern of functional LPS-response machinery as compared to primary hepatocytes, display functional TLRs [30] and are recognised as convenient surrogates to study hepatic inflammation [31,32]. Our results display that ruxolitinib can significantly repress induction of CRP triggered by inflammatory signals such as LPS, through targeting the IL6 signalling pathway. Such effects of ruxolitinib likely highlight its anti-inflammatory potential, notably with respect to the liver.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents. Ruxolitinib and tofacitinib were provided by Selleckchem (Houston, TX, USA), tocilizumab by Roche (Bale, Switzerland) and pacritinib by MedChemTronica (Sollentuna, Sweden). Recombinant human IL6, IL1 β and tumor necrosis factor (TNF) α were supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). LPS (*E. coli* O55:B5) was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Pam3CSK4, Poly(I:C), flagellin (*B. subtilis*) and imiquimod (R837) were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Stock solutions of ruxolitinib were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), whereas those of LPS and those of cytokines were done in sterile distilled water containing 0.1 % bovine serum albumin. Control cultures received the same dose of solvents as treated counterparts. The antibody directed against phosphorylated (Tyr701) -signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 was from Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The anti-rabbit

IgG antibody coupled to Alexa Fluor 488 was from Cell Signaling (Leiden, The Netherlands). All other chemicals and reagents were commercial products of the highest purity available.

Cell culture. Primary human hepatocytes were obtained from adult donors undergoing hepatic resection for secondary tumours, via the Biological Resource Center (University Hospital, Rennes, France), which has obtained the authorization N°DC-2008-630 from the French Ministry of Health to collect hepatic resections from the digestive surgery department and then to isolate and deliver the hepatocytes used in this study. Human hepatocytes, initially prepared by enzymatic dissociation of histologically-normal liver fragments [33], were seeded in 24-well plastic plates at a density of 2×10^5 cells/cm² in Williams' E medium (Invitrogen), supplemented with 10 % (vol/vol) fetal bovine serum (FBS) (Perbio Sciences, Brébieres, France), 5 µg/mL bovine insulin (Sigma-Aldrich), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM glutamine (Invitrogen). After 24 h, this seeding medium was discarded, and primary hepatocytes were routinely cultured in Williams' E medium defined above and supplemented with $5 \cdot 10^{-5}$ M hydrocortisone hemisuccinate (Upjohn, Paris La Défense, France) and 2 % (vol/vol) DMSO, as reported previously [34]. All experimental procedures complied with French laws and regulations and were approved by the National Ethics Committee.

Highly-differentiated human hepatoma HepaRG cells were cultured as previously described [35]. Briefly, cells plated in 24-well plates were first grown in Williams' E medium supplemented with 10 % (vol/vol) FBS, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 2 mM glutamine, and $5 \cdot 10^{-5}$ M hydrocortisone hemisuccinate for two weeks. Cells were next cultured for additional two weeks in the same medium supplemented with 2 % (vol/vol) DMSO in order to get a full differentiation of the cells [36].

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) experiments.

Total RNAs were extracted using the TRI reagent (Sigma-Aldrich). RNAs were then reverse

transcribed using the RT kit from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). PCR were next performed using the fluorescent dye SYBR Green methodology and a CFX384 real-time PCR system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), as described already [34]. Primers were specific ready-to-use KiCqStart® gene primers (from Sigma Aldrich) or in-house custom primers for NTCP, CYP3A4, CRP, CYP7A1 and 18S rRNA, as previously reported (Jigorel et al., 2006; Le Vee et al., 2008; Mayati et al., 2018). Other in-house custom primers were: serum amyloid A (SAA) sense TGGTTTTCTGCTCCTTGGTC and SAA antisense CCCGAGCATGGAAGTATTTG, haptoglobin sense AACAGCGAAAGACATTGCC and haptoglobin antisense ACACGCCCTACTTCTGCATA. The specificity of each gene amplification was verified at the end of qPCR reactions through analysis of dissociation curves of the PCR products. Amplification curves were analysed with the CFX Manager software (Bio-Rad), using the comparative cycle threshold method. Relative quantification of the steady-state target mRNA levels was calculated after normalization of the total amount of cDNA tested to the 18S rRNA endogenous reference, using the $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ method. Data were finally commonly expressed comparatively to mRNA expression found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit for each analysed gene, or as percentages of values found in LPS-treated cells.

Quantification of cytokine levels. The levels of cytokines secreted in culture medium of hepatocyte or HepaRG cell cultures were quantified by the enzyme-linked immunoSorbent assay (ELISA) using specific human DuoSet ELISA Kits (R&D Systems), according to the instructions of the manufacturer. Data were finally collected by spectrophotometry using a SPECTROstar Nano microplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France).

Immunocytochemistry. HepaRG cells were fixed with a cold solution of acetone for 10 min on ice. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and further incubated in PBS containing 4 % bovine serum albumin for 1 h at room temperature. Cells were next

incubated overnight with primary antibody against phosphorylated-STAT1 (pSTAT1). Cells were then washed twice with PBS, before adding secondary antibody directed against rabbit IgG and coupled to Alexa Fluor 488 for 45 min. Nuclei were next stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 10 min. Immunofluorescence images were finally acquired with a confocal fluorescence microscope LEICA DMI 6000 CS (Leica Microsystemes SAS, Nanterre, France).

Calculation and statistical analysis. Quantitative data were routinely expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.) of at least three independent assays, each being performed in duplicate or triplicate. They were statistically analysed using the Student's t test or by analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls' post hoc test. The criterion of significance was $p < 0.05$. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of ruxolitinib towards CRP mRNA expression was determined using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), through nonlinear regression based on the four parameters logistic function.

RESULTS

Repression of pro-inflammatory signals-mediated CRP up-regulation by ruxolitinib

The responsiveness of hepatoma HepaRG cells to LPS (used here as a prototypical pro-inflammatory signal) and ruxolitinib were first to be determined. To do so, cells were exposed for 2, 6, 24 or 48 h to 10 ng/mL LPS. At this concentration, LPS did not exert cytotoxic effects, as shown by phase-contrast microscopic examination of the cultures (data not shown). As indicated in Fig. 1A, LPS markedly increased mRNA expression of CRP, with a maximal effect after 24 h of treatment. This LPS-induced CRP mRNA expression was fully abolished in the presence of ruxolitinib at 5 μ M (Fig. 1A), a concentration of ruxolitinib previously

shown to be fully active towards the JAK/STAT pathway in HepaRG cells [27]. The inhibitory effect of ruxolitinib towards LPS-induced CRP mRNA expression was next demonstrated to be concentration-dependent, with an IC_{50} value of 12.9 nM (Fig. 1B). Moreover, it was associated with concomitant significant repression of LPS-induced CRP secretion in supernatants of HepaRG cell cultures (Fig. 1C). These results were finally validated in primary human hepatocytes. Ruxolitinib was thus shown to fully inhibit LPS-induced CRP at both the mRNA (Fig. 2A) and protein secretion level (Fig. 2B) in human hepatocyte cultures.

To determine whether ruxolitinib may also counteract the inducing effects of other inflammatory stimuli towards CRP expression, HepaRG cells were next treated with different TLRs agonists and pro-inflammatory cytokines. Pam3CSK4, Poly(I:C), flagellin and imiquimod were thus used as ligands for TLR1/2, TLR3, TLR5 and TLR7/8, respectively, as previously described [30]. Except imiquimod, all TLR agonists were shown to increase mRNA expression (Fig. 3A) and protein secretion (Fig. 3B) of CRP after 24 h agonist treatment. Likewise, treatment with both IL1 β (Fig. 3C) and TNF α (Fig. 3D) led to an increase of CRP mRNA expression. Co-treatment with 5 μ M ruxolitinib totally inhibited CRP induction, regardless of the inflammatory stimulus (TLR agonists, IL1 β or TNF α) (Fig. 3).

JAK-dependence of ruxolitinib-mediated repression of CRP

We first analysed whether the JAK-STAT pathway, the primary target of ruxolitinib [5], was well inhibited by ruxolitinib in HepaRG cells. LPS activated the JAK/STAT pathway in HepaRG cells, as shown by phosphorylation of STAT1 and its translocation to the nucleus in response to the endotoxin (Fig. 4). Ruxolitinib was able to fully prevent LPS-mediated phosphorylation and translocation of STAT1 (Fig. 4), thus indicating that the JAK inhibitor was fully efficient in HepaRG cells exposed to LPS.

As ruxolitinib may exert JAK-independent effects [37], the effects of JAK inhibitors structurally unrelated to ruxolitinib, such as tofacitinib and pacritinib, towards up-regulation of CRP triggered by LPS were next studied. These JAK inhibitors used at 6 μM (tofacitinib) or 2.5 μM (pacritinib) fully repressed LPS-mediated induction of CRP at mRNA (Fig. 5A) and protein secretion level (Fig. 5B) in HepaRG cells.

Contribution of ruxolitinib-mediated IL6 signalling pathway inhibition to CRP repression

Because (i) IL6 is known to play a major role in CRP expression [22] and (ii) the IL6/JAK/STAT pathway is targeted by ruxolitinib in human hepatocytes [27], we hypothesized that repression of CRP by ruxolitinib in inflammatory hepatocytes may be primarily due to inhibition of the IL6 signalling pathway. To test this hypothesis, we first verified that IL6 treatment induced CRP expression in HepaRG cells at mRNA (Fig. S1A) and protein (Fig. S1B) levels, which was fully inhibited by 5 μM ruxolitinib (Fig. S1). Ruxolitinib also blocked IL6-mediated STAT1 phosphorylation and translocation in HepaRG cells (Fig. S2). We next analysed IL6 protein secretion in HepaRG cells exposed to various inflammatory signals, which all increased CRP expression, except for imiquimod (Fig. 3). As indicated in Fig. 6A, LPS, Pam3CSK4, Poly(I:C) and IL1 β significantly enhanced IL6 secretion. IL6 was also clearly up-regulated by flagellin and TNF α , even if the level of significance was not reached. By contrast, imiquimod failed to increase IL6 secretion (Fig. 6A). To investigate the involvement of this IL6 up-regulation by inflammatory signals in CRP induction, we treated HepaRG cells by the therapeutic neutralising monoclonal antibody, tocilizumab, directed against IL6 receptor [38]. Tocilizumab was found to abolish CRP mRNA induction caused by LPS, Pam3CSK4, Poly(I:C), flagellin, IL1 β and TNF α (Fig. 6B). Tocilizumab also prevented CRP secretion triggered by LPS (Fig. 6C). LPS-mediated

phosphorylation and translocation of STAT1 were additionally inhibited by tocilizumab (Fig. S3).

Repression of additional acute phase protein up-regulation by ruxolitinib

To determine whether ruxolitinib may impair inflammation-mediated up-regulation of acute phase proteins distinct from CRP, we analysed the effects of ruxolitinib on mRNA expression of SAA, haptoglobin, fibrinogen and serpin in LPS-exposed HepaRG cells and in primary human hepatocytes. mRNA levels of these acute phase proteins were induced by LPS in both HepaRG cells (Fig. 7A) and human hepatocytes and ruxolitinib inhibited these up-regulations (Fig. 7B). Tocilizumab was similarly found to repress LPS-mediated induction of SAA, haptoglobin, fibrinogen and serpin in HepaRG cells (Fig. S4A) and primary human hepatocytes (Fig. S4B).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib markedly counteracts induction of acute phase proteins, especially CRP, in cultured inflammatory hepatocytes. This anti-inflammatory property of ruxolitinib occurs in hepatic cells exposed to distinct pro-inflammatory signals up-regulating CRP, such as agonists of various TLRs, including TLR1/2, TLR3, TLR4 and TLR5, and pro-inflammatory cytokines like IL1 β , TNF α and IL6. This suggests that ruxolitinib can counteract acute phase protein secretion triggered by activation of both TLR receptors and inflammatory cytokine receptors expressed at the membrane of hepatocytes. The inhibition of cytokines-mediated CRP induction is likely important to be considered as cytokines like IL1 β , TNF α and IL6, primarily produced by macrophagic Kupffer cells in response to TLR activation, are considered as playing a major

role in hepatic inflammation [39]. By inhibiting both TLR- and cytokine-induced CRP secretion, ruxolitinib exerts therefore an anti-inflammatory effect towards various sources of liver inflammation, thus highlighting the possible *in vivo* relevance of ruxolitinib as a potent and global hepatic anti-inflammatory agent. This conclusion is moreover fully supported by the fact that the ruxolitinib IC_{50} value (12.9 nM) towards CRP expression is much lower than the maximum plasma concentration (C_{max} : 0.9-1.7 μ M) found in patients treated with ruxolitinib [40]. *In vivo* concentrations of ruxolitinib in patients may thus be hypothesized to be fully active against CRP induction. The fact that reduced plasma levels of CRP have been reported in patients treated by ruxolitinib [28,29] fully agrees with this hypothesis. The repressing effects of ruxolitinib towards liver inflammation in mice exposed to carbon tetrachloride [25] or to thioacetamide [26] additionally argue in favour of the *in vivo* relevance of the use of the JAK inhibitor towards hepatic inflammatory processes.

The primary mechanism involved in ruxolitinib-mediated repression of LPS-induced CRP expression is most likely related to JAK inhibition. This conclusion is firstly supported by the fact that ruxolitinib was found to potently hinder STAT1 phosphorylation and translocation caused by LPS in HepaRG cells, indicating that ruxolitinib was fully efficient to inhibit the JAK/STAT pathway. Moreover, ruxolitinib IC_{50} value (12.9 nM) towards CRP expression in HepaRG cells is close to ruxolitinib concentrations (around 3 nM) inhibiting activities of JAK1 and JAK2 in purified kinase assays [5]. Finally, JAK inhibitors structurally unrelated to ruxolitinib, such as tofacitinib and pacritinib, also inhibited CRP induction, thus discarding any JAK-independent effect of ruxolitinib towards CRP expression. Off-target effects of ruxolitinib, which notably effect various kinases such as tropomyosin receptor kinase B, activated CDC42 kinase 1, anaplastic lymphoma kinase, RET kinase, and Rho-associated protein kinases [41,42], should therefore be rejected.

Downstream of JAK1/2, the IL6 signalling pathway is probably the key target of ruxolitinib for inhibiting expression of CRP and other acute phase proteins in inflammatory hepatocytes. Indeed, IL6, which the signalling cascade includes the JAK/STAT pathway as a main effector [43], is well known to play an important role in CRP regulation [22], as confirmed by enhanced levels of CRP in IL6-treated HepaRG cells. Moreover, this pro-inflammatory cytokine is involved in CRP up-regulation by various pro-inflammatory signals, *i.e.*, agonists of TLRs (LPS, Pam3CSK4, Poly(I:C) and flagellin), and inflammatory cytokines (IL1 β and TNF α). Such pro-inflammatory signals thus induced both CRP and IL6 production in HepaRG cells, unlike the TLR agonist imiquimod, which failed to induce CRP expression and did not trigger IL6 secretion either. Furthermore, the anti-IL6 receptor monoclonal antibody tocilizumab blocked CRP induction by TLR agonists, IL1 β and TNF α . Taken together, these data favour the hypothesis of pro-inflammatory signals leading to increased production of IL6 by hepatocytes. IL6 in turn acts in an autocrine manner to induce CRP expression. Ruxolitinib, by inhibiting the IL6/JAK/STAT pathway, prevents production of CRP (Fig. 8). Ruxolitinib may also be hypothesized to repress other acute phase proteins by hepatocytes through inhibiting the IL6 signalling pathway, as LPS-related inductions of these inflammatory markers were prevented by tocilizumab, thus underlining their dependence to IL6. It is noteworthy that ruxolitinib however failed to inhibit all molecular targets regulated by inflammation. We have thus found that LPS-mediated repression of the drug metabolizing enzyme cytochrome P-450 (CYP) 3A4 as well as that of the bile acid synthesis enzyme CYP7A1 was not prevented by ruxolitinib in primary human hepatocytes (data not shown). Tocilizumab also failed to hinder these CYP3A4 and CYP7A1 down-regulation (data not shown), indicating that they occurred independently of the IL6 pathway, which most likely contributes to the lack of effect of ruxolitinib.

Even if the potent repression of the inflammatory marker CRP by ruxolitinib can be basically and intuitively included in the anti-inflammatory property of the JAK inhibitor, as reported above, the exact consequences in terms of inflammation may however be dependent of the nature of the CRP isoform. Indeed, CRP has both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties depending on its conformation [44,45]. *In vivo*, CRP has been shown to display anti-inflammatory properties, as protection against LPS, bacterial infections and other inflammation mediators [46]. *In vitro*, it stimulates secretion of anti-inflammatory actors such as IL10 and IL1ra and may recruit a number of complement inhibitors [47]. It is suggested that these anti-inflammatory effects would be exerted by the pentameric isoform of CRP, *i.e.*, native CRP, which is highly soluble in plasma and shown to be involved in the resolution phase of inflammation and to induce the anti-inflammatory M2 phenotype in macrophages [21]. On the opposite, monomeric CRP isoform, coming from the irreversible dissociation of pentameric CRP at sites of inflammation and infection, is believed to induce the secretion of inflammatory cytokines and to promote the pro-inflammatory M1 phenotype in macrophages [48]. In this context, it is noteworthy that ruxolitinib, through inhibiting basal CRP mRNA expression, is expected to repress levels of both monomeric and pentameric CRP isoforms. Nevertheless, the exact consequences of the down-regulation of CRP, as well as those of other acute phase proteins, by ruxolitinib, in terms of inflammation and its evolution remain to be precisely determined, which likely requires further studies.

CONCLUSION

Ruxolitinib was found to potently repress expression of CRP and other acute phase proteins in cultured human hepatic cells exposed to various kinds of inflammatory signals, including LPS. This effect was due to inhibition by the JAK inhibitor of the IL6/JAK/STAT pathway, activated by inflammation in hepatocytes. It occurred for ruxolitinib concentrations thought to

be achievable in patients. Such data underline the potential interest of considering ruxolitinib for hindering the production of acute phase proteins during liver inflammation, whichever the source of the inflammatory stimulus.

Acknowledgements The authors thank Dr. Alain Lescoat for critical reading of the manuscript, the Centre de Ressources Biologiques (CRB) Santé of Rennes BB-0033-00056 for providing human hepatocytes and the MRic (Microscopy Rennes Imaging Center, Biosit, Rennes) platform for confocal microscopy facilities.

Author contributions MFJ and OF conceived and designed the study, analysed the data and edited and reviewed the manuscript. VL edited and reviewed the manuscript. MFJ carried out the experiments. MFJ, VL and OF gave final approval for publication.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Harrison C, Kiladjian J-J, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366:787–98.
2. Vannucchi AM. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2015;372:1670–1.
3. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366:799–807.
4. Verstovsek S, Vannucchi AM, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus best available therapy in patients with polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. *Haematologica*. 2016;101:821–9.

5. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshour T, Li J, Scherle PA, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115:3109–17.
6. Maschalidi S, Sepulveda FE, Garrigue A, Fischer A, Basile G de S. Therapeutic effect of JAK1/2 blockade on the manifestations of hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice. *Blood*. 2016;128:60–71.
7. Febvre-James M, Lecureur V, Augagneur Y, Mayati A, Fardel O. Repression of interferon β -regulated cytokines by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2018;54:354–65.
8. Parampalli Yajnanarayana S, Stübig T, Cornez I, Alchalby H, Schönberg K, Rudolph J, et al. JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2015;169:824–33.
9. Schönberg K, Rudolph J, Vonnahme M, Yajnanarayana SP, Cornez I, Hejazi M, et al. JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Res*. 2015;75:2187–99.
10. Heine A, Held SAE, Daecke SN, Wallner S, Yajnanarayana SP, Kurts C, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood*. 2013;122:1192–202.
11. von Bubnoff N, Ihorst G, Grishina O, Röthling N, Bertz H, Duyster J, et al. Ruxolitinib in GvHD (RIG) study: a multicenter, randomized phase 2 trial to determine the response rate of Ruxolitinib and best available treatment (BAT) versus BAT in steroid-refractory acute graft-versus-host disease (aGvHD) (NCT02396628). *BMC Cancer* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 9];18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6245867/>
12. Neumann T, Schneidewind L, Weigel M, Plis A, Vaizian R, Schmidt CA, et al. Ruxolitinib for Therapy of Graft-versus-Host Disease [Internet]. *BioMed Res. Int*. 2019 [cited 2019 Apr 9]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2019/8163780/>
13. Vicent MG, Molina B, Pablo JG de, Castillo A, Díaz MÁ. Ruxolitinib treatment for steroid refractory acute and chronic graft vs host disease in children: Clinical and immunological results. *Am J Hematol*. 2019;94:319–26.

14. Hurwitz H, Van Cutsem E, Bendell J, Hidalgo M, Li C-P, Salvo MG, et al. Ruxolitinib + capecitabine in advanced/metastatic pancreatic cancer after disease progression/intolerance to first-line therapy: JANUS 1 and 2 randomized phase III studies. *Invest New Drugs*. 2018;36:683–95.
15. Patel MR, Dash A, Jacobson BA, Ji Y, Baumann D, Ismail K, et al. JAK/STAT inhibition with ruxolitinib enhances oncolytic virotherapy in non-small cell lung cancer models. *Cancer Gene Ther*. 2019;
16. Escher TE, Lui AJ, Geanes ES, Walter KR, Tawfik O, Hagan CR, et al. Interaction between MUC1 and STAT1 drives IFITM1 overexpression in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells and mediates estrogen-induced apoptosis. *Mol Cancer Res*. 2019;molcanres.0916.2018.
17. Kim JW, Gautam J, Kim JE, Kim J-A, Kang KW. Inhibition of tumor growth and angiogenesis of tamoxifen-resistant breast cancer cells by ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor. *Oncol Lett*. 2019;17:3981–9.
18. O’Shaughnessy J, DeMichele A, Ma CX, Richards P, Yardley DA, Wright GS, et al. A randomized, double-blind, phase 2 study of ruxolitinib or placebo in combination with capecitabine in patients with advanced HER2-negative breast cancer and elevated C-reactive protein, a marker of systemic inflammation. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;170:547–57.
19. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol*. 2005;117:104–11.
20. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111:1805–12.
21. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 9];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5908901/>
22. Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I. STAT3 Participates in Transcriptional Activation of the C-reactive Protein Gene by Interleukin-6. *J Biol Chem*. 1996;271:9503–9.

23. Aninat C, Seguin P, Descheemaeker P-N, Morel F, Malledant Y, Guillouzo A. Catecholamines induce an inflammatory response in human hepatocytes. *Crit Care Med.* 2008;36:848–54.
24. Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, Piccigallo E, Amati L, Lembo A, et al. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res.* 2002;8:319–27.
25. Hazem SH, Shaker ME, Ashamalla SA, Ibrahim TM. The novel Janus kinase inhibitor ruxolitinib confers protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via multiple mechanisms. *Chem Biol Interact.* 2014;220:116–27.
26. Shaker ME, Hazem SH, Ashamalla SA. Inhibition of the JAK/STAT pathway by ruxolitinib ameliorates thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2016;96:290–301.
27. Febvre-James M, Bruyère A, Vée ML, Fardel O. The JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Reverses Interleukin-6-Mediated Suppression of Drug-Detoxifying Proteins in Cultured Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2018;46:131–40.
28. Mascarenhas J, Mughal T, Verstovsek S. Biology and Clinical Management of Myeloproliferative Neoplasms and Development of the JAK Inhibitor Ruxolitinib. *Curr Med Chem.* 2012;19:4399–413.
29. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Rosen PJ, Rumi E, et al. A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer.* 2014;120:513–20.
30. Luangsay S, Ait-Goughoulte M, Michelet M, Floriot O, Bonnin M, Gruffaz M, et al. Expression and functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG cells. *J Hepatol.* 2015;63:1077–85.
31. Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, et al. Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2006;34:75–83.

32. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 2007;168:66–73.
33. Fardel O, Morel F, Guillouzo A. P-glycoprotein expression in human, mouse, hamster and rat hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis.* 1993;14:781–3.
34. Vee ML, Lecureur V, Stieger B, Fardel O. Regulation of Drug Transporter Expression in Human Hepatocytes Exposed to the Proinflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor- α or Interleukin-6. *Drug Metab Dispos.* 2009;37:685–93.
35. Le Vee M, Noel G, Jouan E, Stieger B, Fardel O. Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* 2013;27:1979–86.
36. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15655–60.
37. Green MR, Newton MD, Fancher KM. Off-Target Effects of BCR-ABL and JAK2 Inhibitors. *Am J Clin Oncol.* 2016;39:76–84.
38. Nishimoto N, Kishimoto T. Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab. *Handb Exp Pharmacol.* 2008;151–60.
39. Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis and liver injury. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2009;36:4–12.
40. Shi JG, Chen X, McGee RF, Landman RR, Emm T, Lo Y, et al. The Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of Orally Dosed INCB018424 Phosphate in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2011;51:1644–54.
41. Rudolph J, Heine A, Quast T, Kolanus W, Trebicka J, Brossart P, et al. The JAK inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell migration via off-target inhibition of ROCK. *Leukemia.* 2016;30:2119–23.
42. Zhou T, Georgeon S, Moser R, Moore DJ, Caflisch A, Hantschel O. Specificity and mechanism-of-action of the JAK2 tyrosine kinase inhibitors ruxolitinib and SAR302503 (TG101348). *Leukemia.* 2014;28:404–7.

43. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374:1–20.
44. Eisenhardt SU, Thiele JR, Bannasch H, Stark GB, Peter K. C-reactive protein: How conformational changes influence inflammatory properties. *Cell Cycle.* 2009;8:3885–92.
45. Thiele Jan R., Habersberger Jonathon, Braig David, Schmidt Yvonne, Goerendt Kurt, Maurer Valentin, et al. Dissociation of Pentameric to Monomeric C-Reactive Protein Localizes and Aggravates Inflammation. *Circulation.* 2014;130:35–50.
46. Mold C, Rodriguez W, Rodic-Polic B, Clos TWD. C-Reactive Protein Mediates Protection from Lipopolysaccharide Through Interactions With FcγR. *J Immunol.* 2002;169:7019–25.
47. Mihlan M, Blom AM, Kupreishvili K, Lauer N, Stelzner K, Bergström F, et al. Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells. *FASEB J.* 2011;25:4198–210.
48. Del Giudice M, Gangestad SW. Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain Behav Immun.* 2018;70:61–75.

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. *Effects of ruxolitinib on LPS-induced mRNA expression and secretion of CRP in HepaRG cells.* (A) Human hepatoma HepaRG cells were either untreated, exposed to 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 2, 6, 24 or 48 h. CRP mRNA expression was next determined by RT-qPCR. Data are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit; they are the means \pm SEM of values from 8 independent assays; *, $p < 0.05$. (B) HepaRG cells were either untreated or exposed to 10 ng/mL LPS in the presence of various concentrations of ruxolitinib (from 0 to 10 μ M) for 24 h. CRP mRNA expression was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as % of CRP mRNA levels found in cells exposed only to LPS, arbitrarily set at 100%; they are the means \pm SEM of values from 6 independent assays. Ruxolitinib IC₅₀ value is indicated at the top of the graph. (C) HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 24 h. CRP secretion in culture medium was next determined by ELISA. Data are expressed in ng/mL and are the means \pm SEM of 6 independent assays. *, $p < 0.05$.

Fig. 2. *Effects of ruxolitinib on LPS-induced mRNA expression and secretion of CRP in primary human hepatocytes.* Primary human hepatocytes were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 24 h. (A) CRP mRNA expression was determined by RT-qPCR and (B) CRP secretion in culture medium was assessed by ELISA. Data are expressed comparatively to mRNA or protein levels found in cells treated with LPS, arbitrarily set at 100%; they are the means \pm SEM of values from (A) 5 and (B) 4 independent human hepatocyte populations. *, $p < 0.05$.

Fig. 3. *Effects of ruxolitinib on mRNA expression and secretion of CRP induced by different inflammatory stimuli in HepaRG cells.* (A, B) HepaRG cells were either untreated (control), or treated to either 50 ng/mL Pam3CSK4 (TLR1/2/6 agonist), 10 µg/mL Poly(I:C) (TLR3 agonist), 1 µg/mL flagellin (TLR5 agonist) or 5 µg/mL imiquimod (TLR7/8 agonist) in the absence or presence of 5 µM ruxolitinib. (A) CRP mRNA expression was determined by RT-qPCR. Data are expressed comparatively to CRP mRNA level found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit; they are the means ± SEM of values from at least 4 independent assays. (B) CRP secretion in culture medium was assessed by ELISA. Data are expressed in ng/mL and are the means ± SEM of 4 independent assays. (C, D) HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 µM ruxolitinib, to (C) 1 ng/mL IL1β in the absence or presence of 5 µM ruxolitinib or to (D) 100 ng/mL TNFα in the absence or presence of 5 µM ruxolitinib. CRP mRNA expression was next determined by RT-qPCR. Data are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit; they are the means ± SEM of values from at least 3 independent assays. (A-D) *, $p < 0.05$.

Fig. 4. *Effects of ruxolitinib on LPS-induced phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 in HepaRG cells.* HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 µM ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 µM ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 2 h. Expression of pSTAT1 was analysed by immunofluorescence; pSTAT1-related fluorescence is green, whereas blue fluorescence corresponds to DAPI-stained nuclei. Bar = 50 µm. Data shown are representative of 3 independent experiments.

Fig. 5. *Effects of tofacitinib and pacritinib on LPS-induced mRNA expression and secretion of CRP in HepaRG cells.* (A, B) HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 6 µM

tofacitinib, 2.5 μ M pacritinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 6 μ M tofacitinib and 10 ng/mL LPS or to 2.5 μ M pacritinib and 10 ng/mL LPS for 24 h. (A) CRP mRNA expression was determined by RT-qPCR. Data are expressed comparatively to CRP mRNA level found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit; they are the means \pm SEM of values from at least 6 independent assays. (B) CRP secretion in culture medium was assessed by ELISA. Data, expressed in ng/mL, are the means \pm SEM of 3 independent assays. (A, B) *, $p < 0.05$.

Fig. 6. *Implication of IL6 in CRP up-regulation by inflammatory stimuli in HepaRG cells.* (A) HepaRG cells were either untreated (control), or treated to either 10 ng/mL LPS (TLR4 agonist), 50 ng/mL Pam3CSK4 (TLR1/2 agonist), 10 μ g/mL Poly(I:C) (TLR3 agonist), 1 μ g/mL flagellin (TLR5 agonist), 5 μ g/mL imiquimod (TLR7/8 agonist), 1 ng/mL IL1 β or 100 ng/mL TNF α for 24 h. IL6 secretion in culture medium was assessed by ELISA. Data are expressed in ng/mL and are the means \pm SEM of at least 3 independent assays. (B) HepaRG cells were either untreated (control), or treated to either 10 ng/mL LPS, 50 ng/mL Pam3CSK4, 10 μ g/mL Poly(I:C), 1 μ g/mL flagellin, 1 ng/mL IL1 β or 100 ng/mL TNF α , in the absence or presence of 5 μ g/mL tocilizumab for 24 h. CRP mRNA expression was next determined by RT-qPCR. Data are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit; they are the means \pm SEM of values from 5 independent assays. (C) HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ g/mL tocilizumab or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ g/mL tocilizumab and 10 ng/mL LPS for 24 h. CRP secretion in culture medium was assessed by ELISA. Data are expressed in ng/mL and are the means \pm SEM of 5 independent assays. (A, B) *, $p < 0.05$.

Fig. 7. *Effects of ruxolitinib on LPS-induced mRNA expression of various acute phase proteins in HepaRG cells and primary human hepatocytes.* (A) HepaRG cells and (B) primary human hepatocytes were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL LPS for 24 h. mRNA expression of SAA, haptoglobin, fibrinogen and serpin was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as % of mRNA levels found in LPS-treated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means \pm SEM of values from (A) at least 6 independent assays or (B) 5 independent human hepatocyte populations. *, $p < 0.05$.

Fig. 8. *Schematic representation of ruxolitinib-mediated CRP repression in inflammatory hepatocytes.* Inflammatory signals (TLR agonists as well as pro-inflammatory cytokines) enhance IL6 expression. Produced IL6 next acts in an autocrine manner for inducing CRP expression in human hepatocytes, via its JAK/STAT-related signaling pathway. Ruxolitinib, through inhibiting JAK1/2, hinders CRP up-regulation.

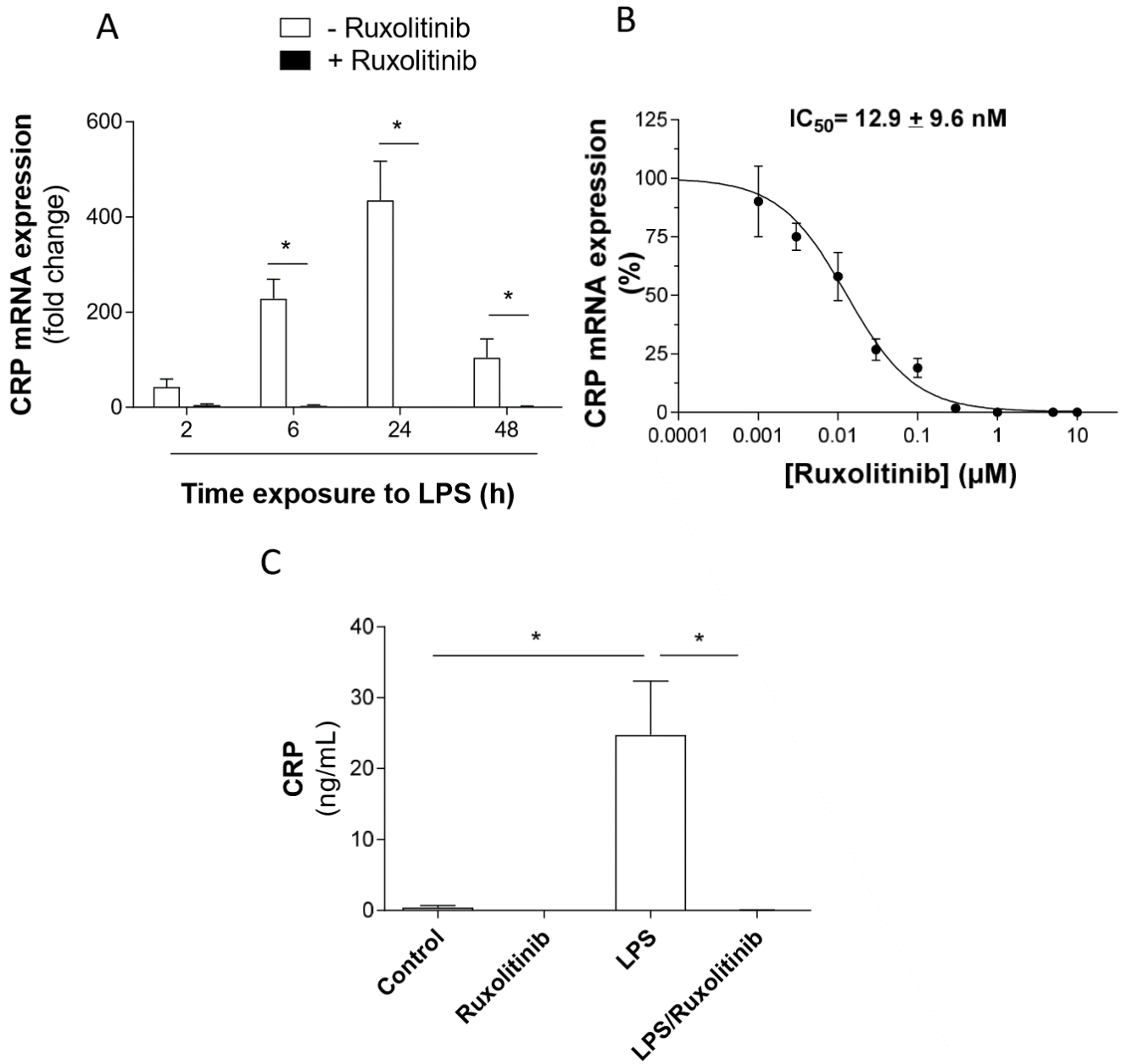
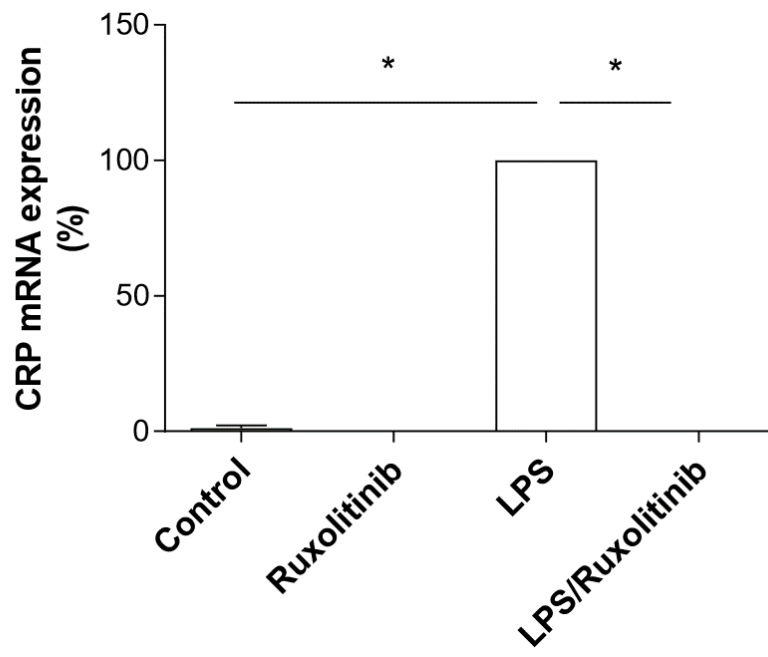


Figure 1

A



B

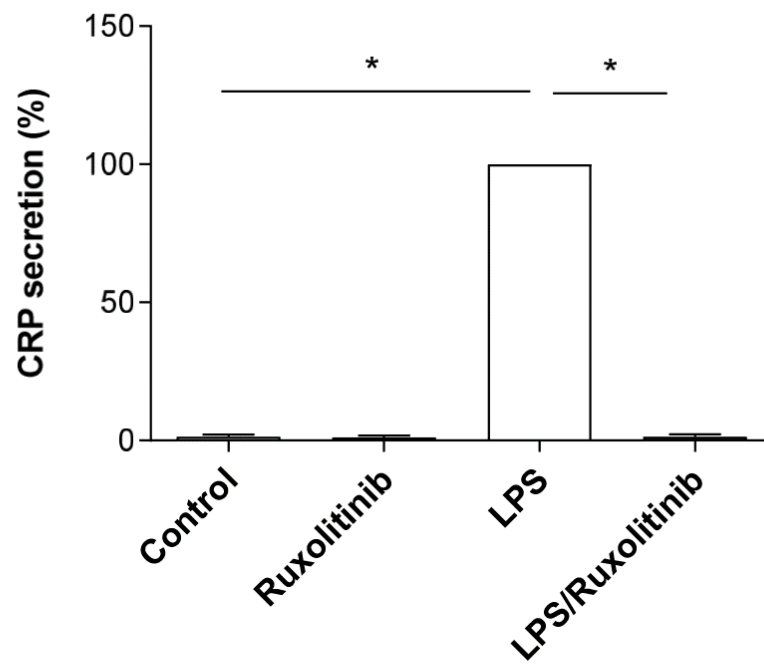


Figure 2

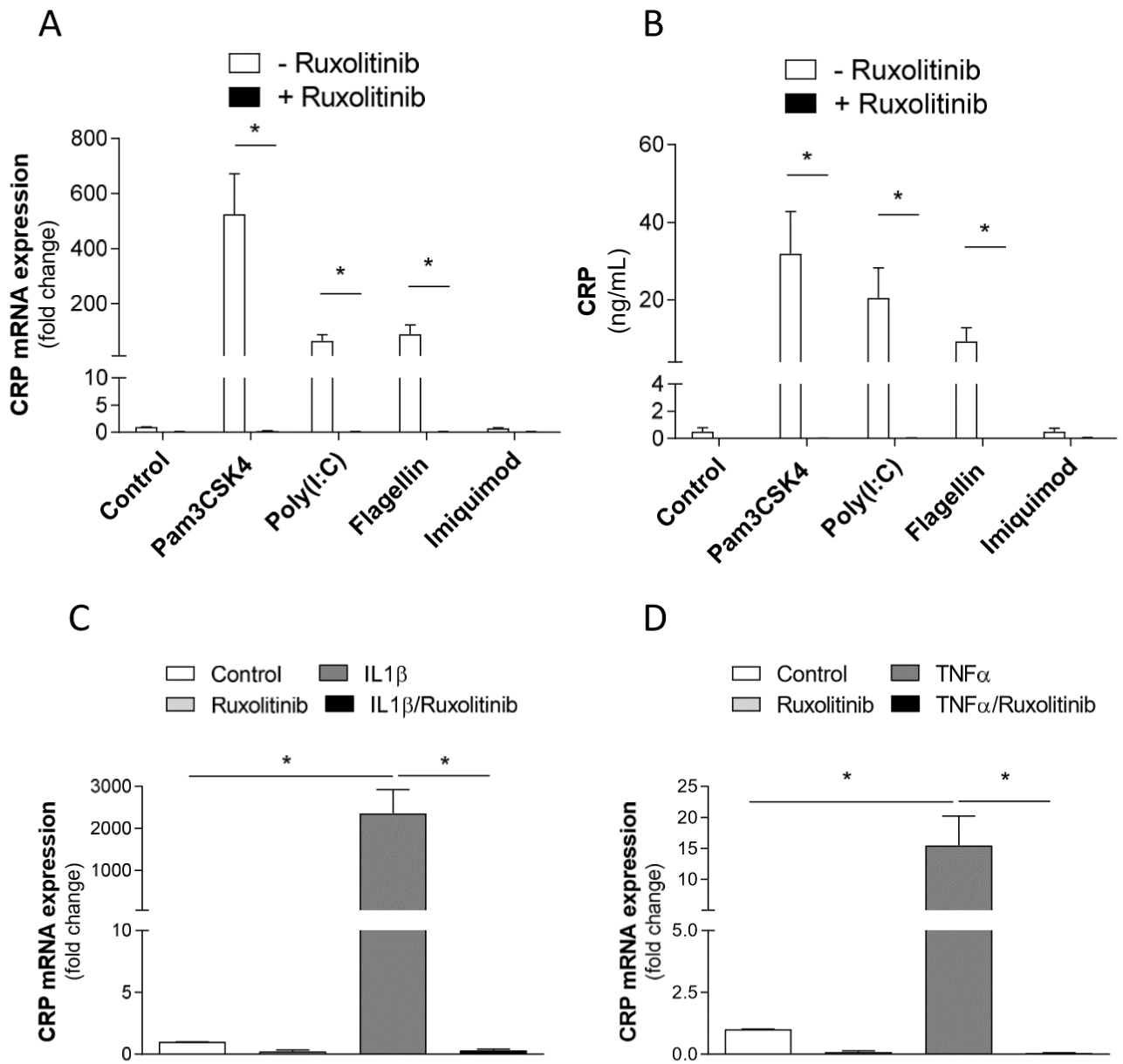


Figure 3

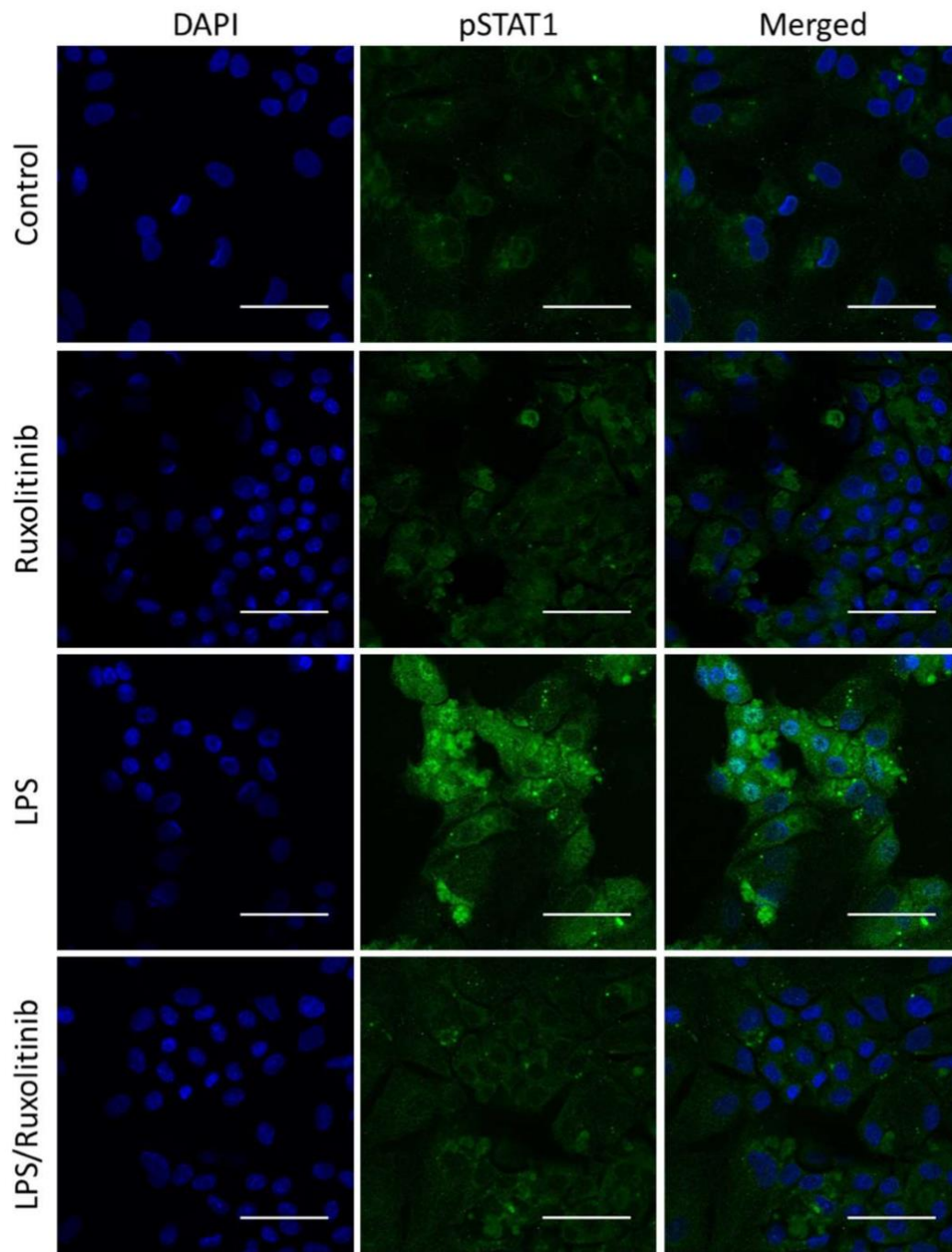
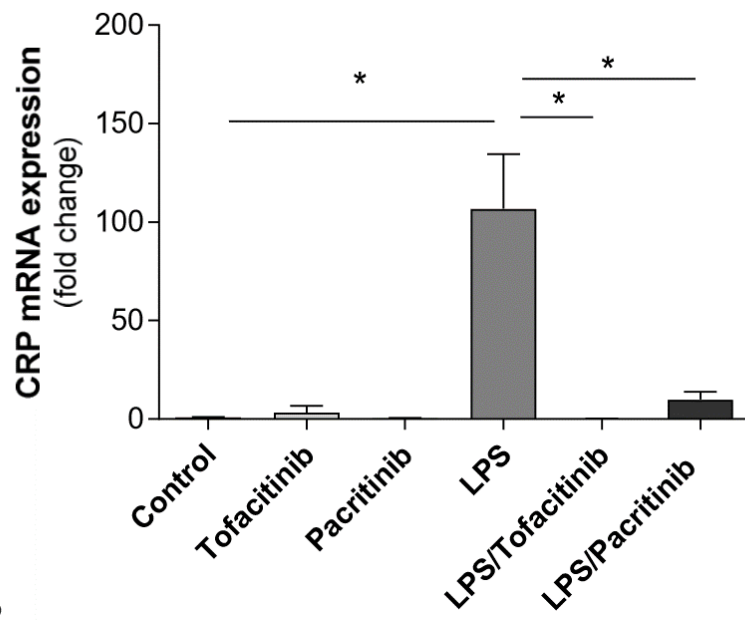


Figure 4

A



B

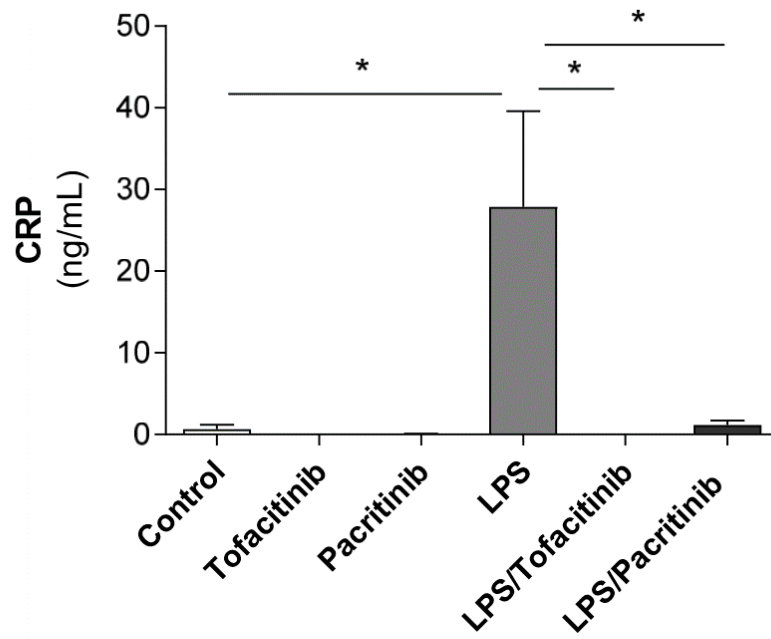


Figure 5

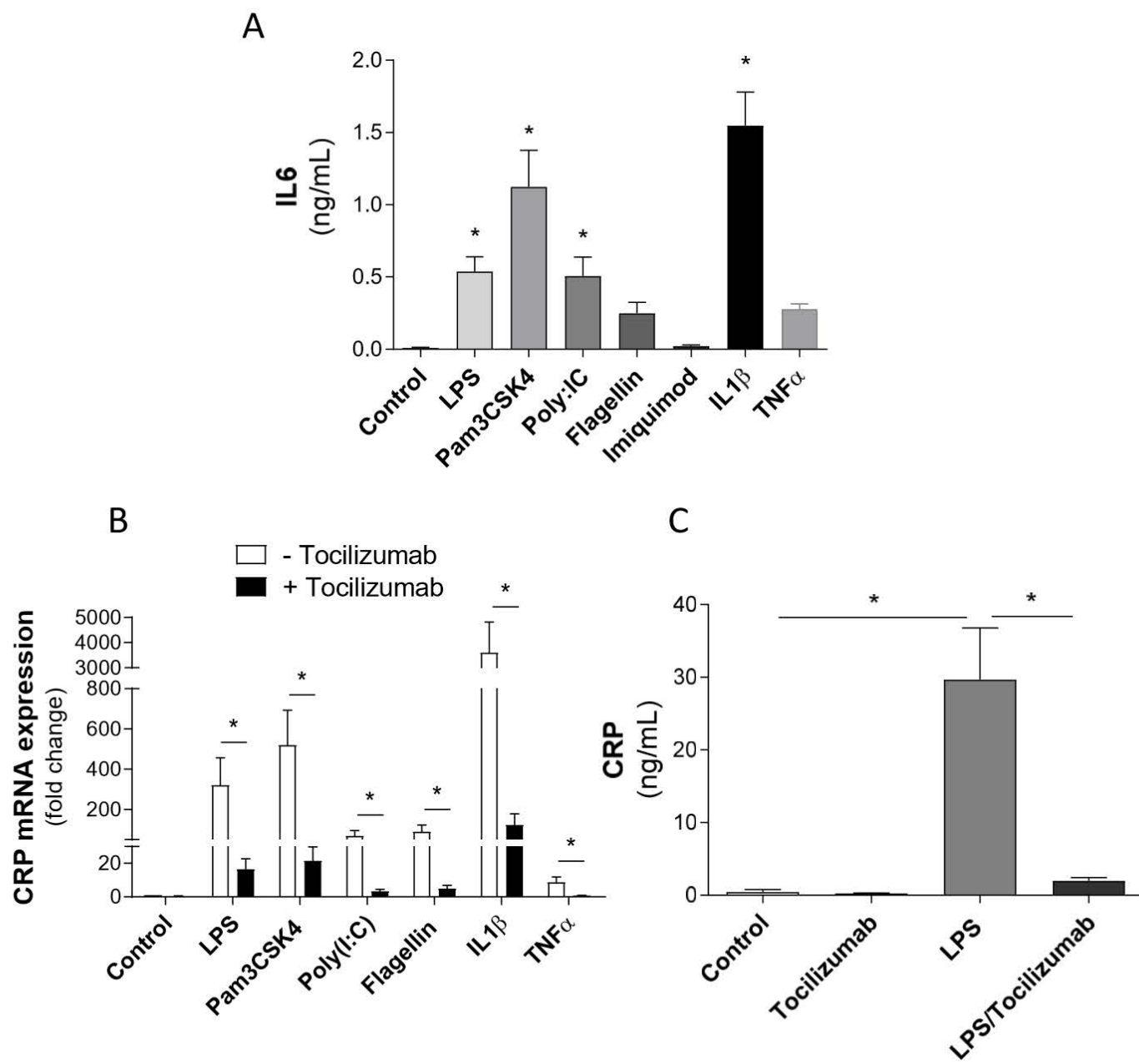


Figure 6

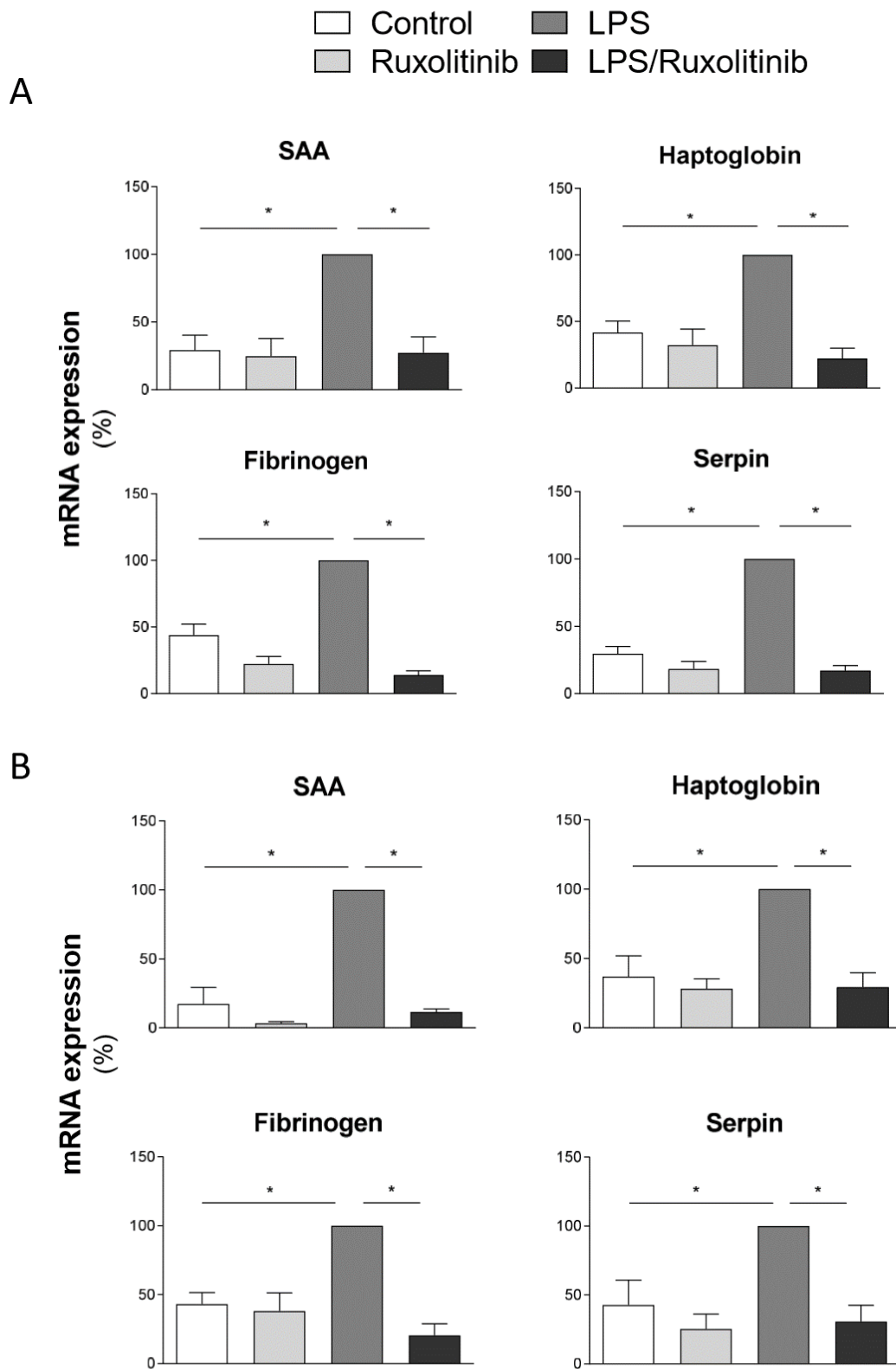
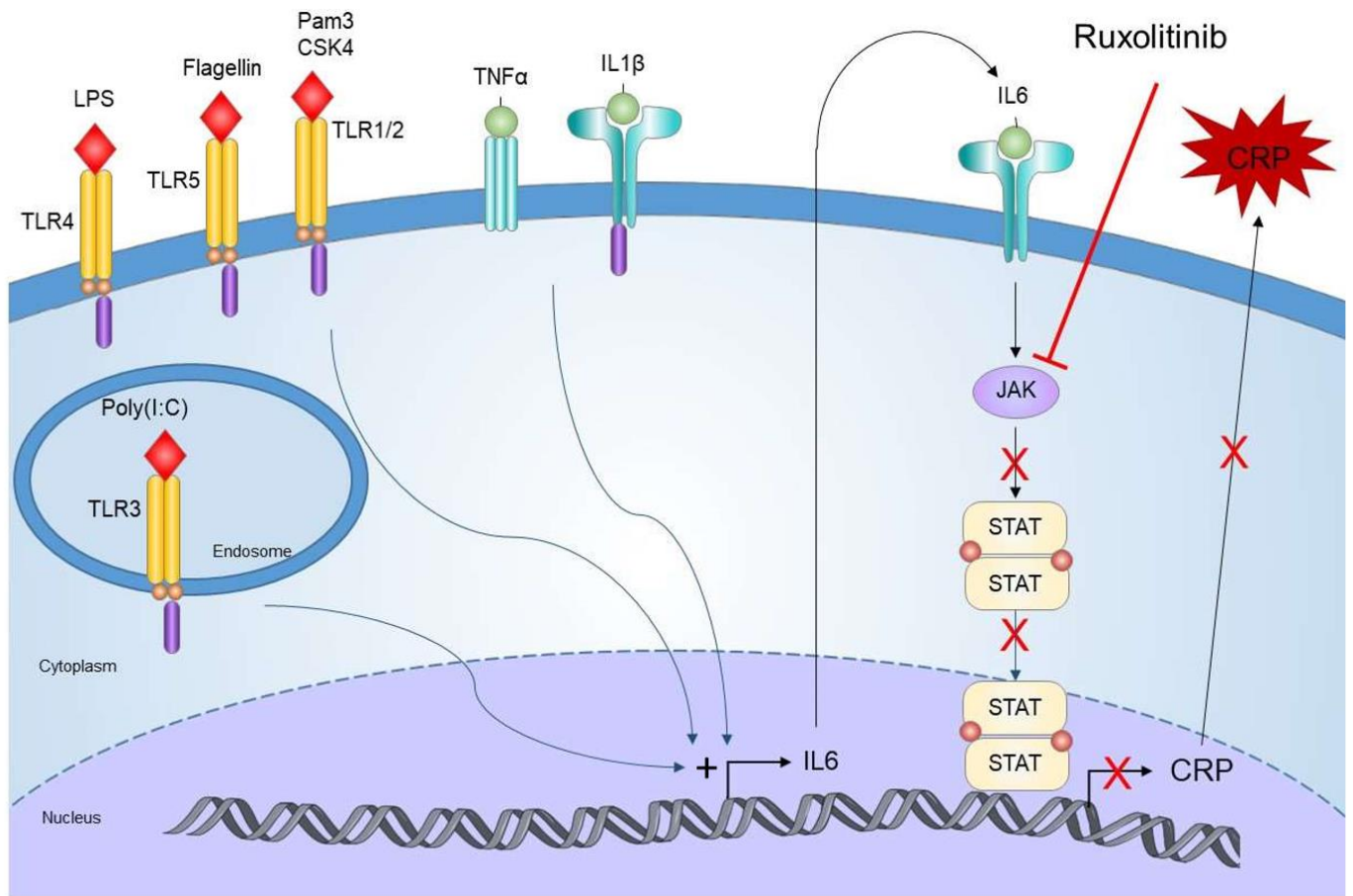


Figure 7



Human hepatocytes

Figure 8

Supplementary Materials

Inflammation Research

Potent repression of C-reactive protein (CRP) expression by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human hepatocytes

Marie Febvre-James¹, Valérie Lecureur¹ and Olivier Fardel²

¹ Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail)
- UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

² Univ Rennes, CHU Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) - UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

Correspondence to: Olivier Fardel, Irset - UMR_S 1085, Campus Santé, 2 Avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France. E-mail : olivier.fardel@univ-rennes1.fr

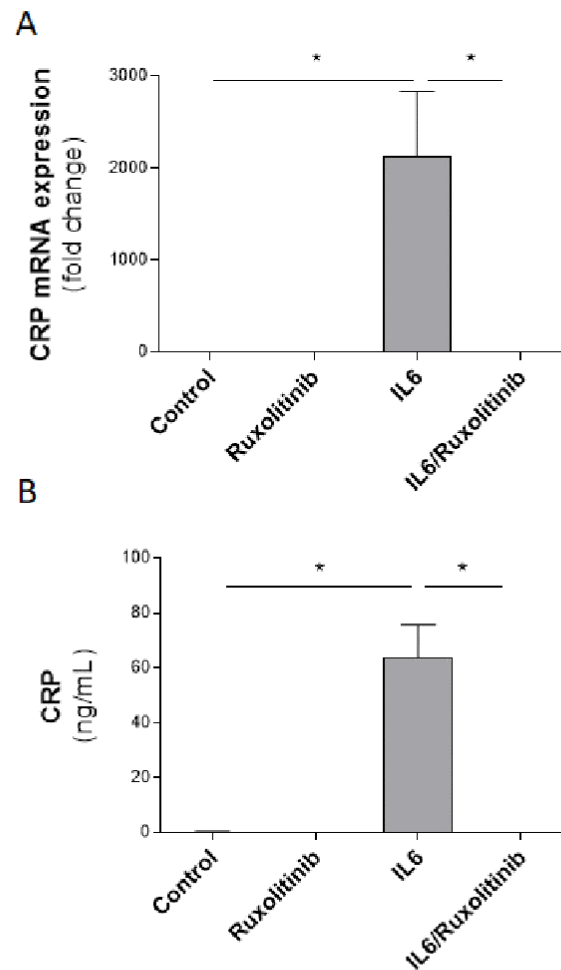


Fig. S1. Effects of ruxolitinib on mRNA expression and secretion of CRP induced by IL6. (A, B) Human hepatoma HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib or 10 ng/mL IL6 or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL IL6 for 24 h. (A) CRP mRNA expression was determined by RT-qPCR. Data are expressed comparatively to mRNA levels found in untreated control cells, arbitrarily set at 1 unit; they are the means \pm SEM of values from 5 independent assays. (B) CRP secretion in culture medium was assessed by ELISA. Data are expressed in ng/mL and are the means \pm SEM of 3 independent assays. (A, B) *, $p < 0.05$.

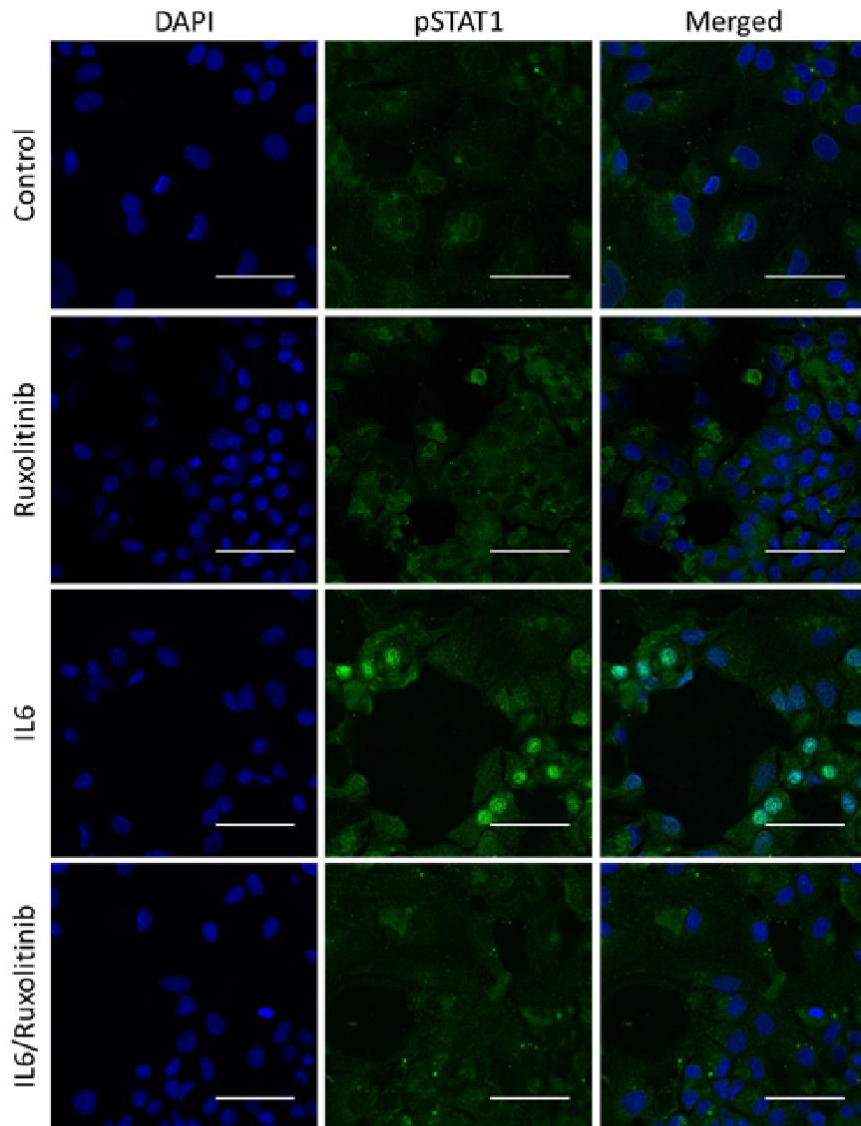


Fig. S2. Effects of ruxolitinib on IL6-induced phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 in HepaRG cells. HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 μ M ruxolitinib, or 10 ng/mL IL6 or co-exposed to 5 μ M ruxolitinib and 10 ng/mL IL6 for 30 min. Expression of pSTAT1 was analysed by immunofluorescence; pSTAT1-related fluorescence is green, whereas blue fluorescence corresponds to DAPI-stained nuclei. Bar = 50 μ m. Data shown are representative of 3 independent experiments.

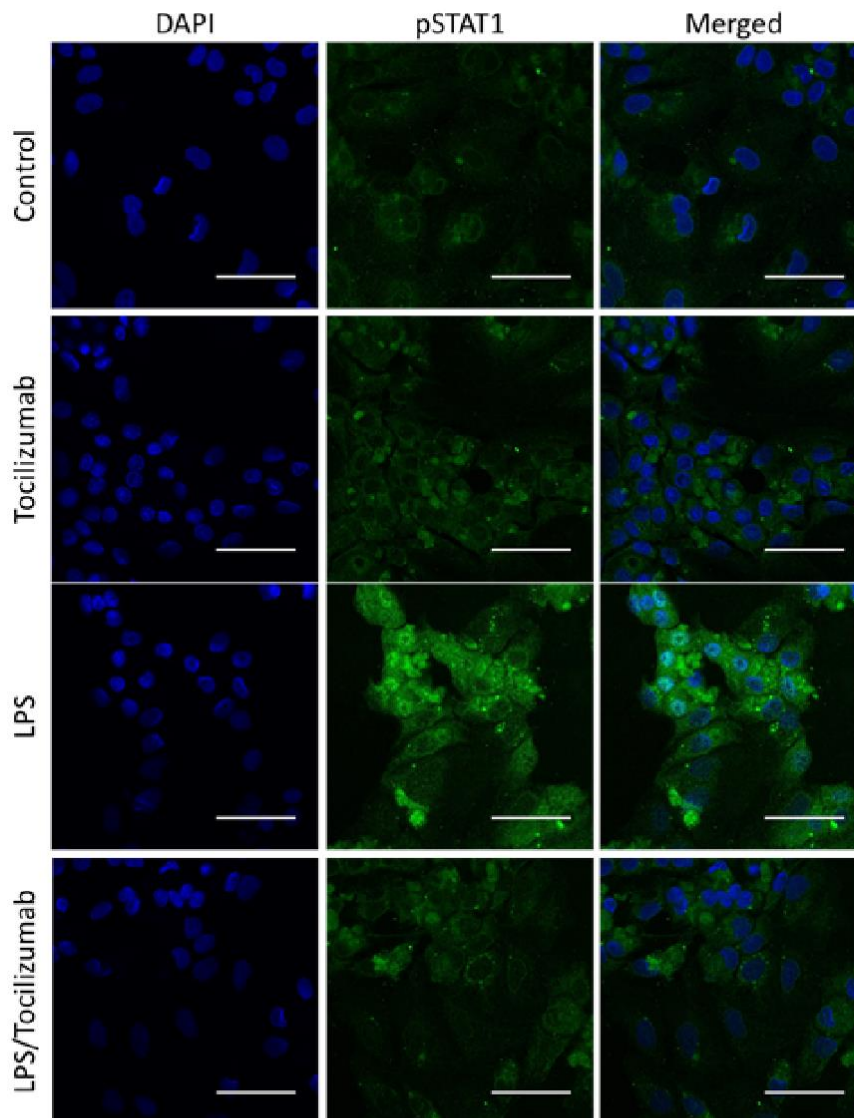


Fig. S3. Effects of tocilizumab on LPS-induced phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 in HepaRG cells. HepaRG cells were either untreated (control), exposed to 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tocilizumab or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tocilizumab and 10 ng/mL LPS for 2 h. Expression of pSTAT1 was analysed by immunofluorescence; pSTAT1-related fluorescence is green, whereas blue fluorescence corresponds to DAPI-stained nuclei. Bar = 50 μm . Data shown are representative of 3 independent experiments.

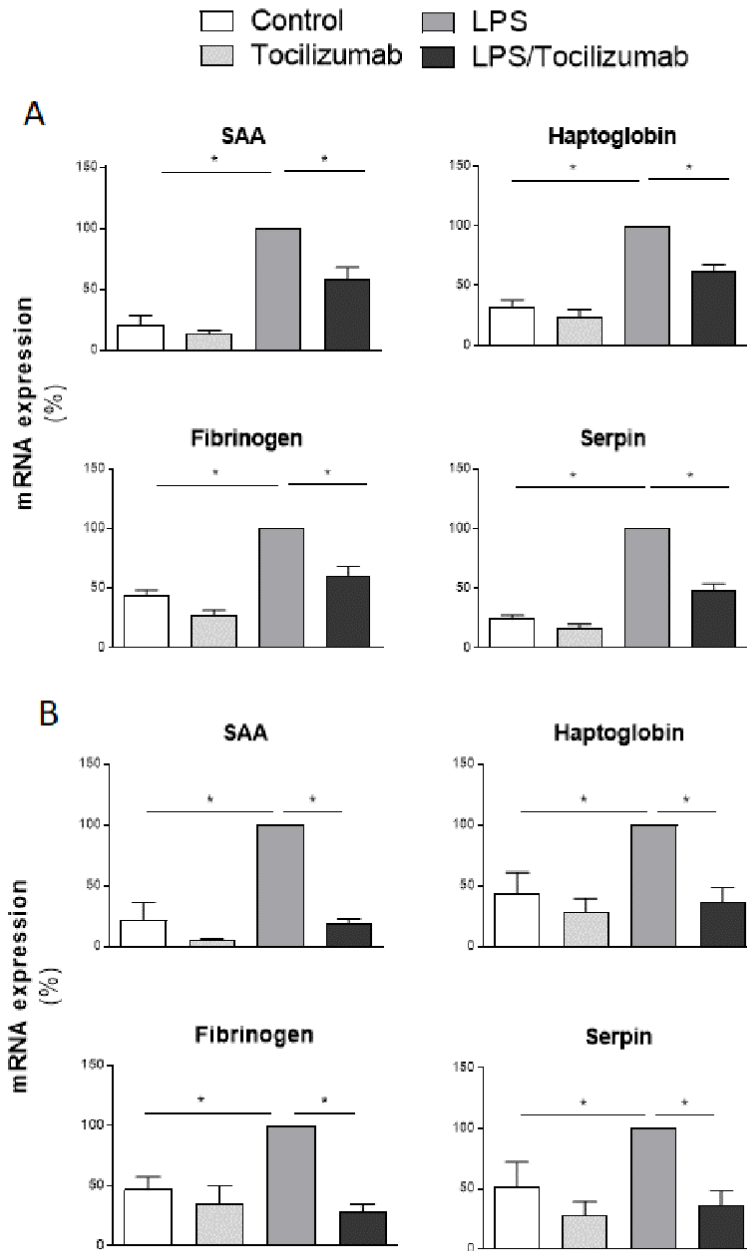


Fig. S4. Effects of tocilizumab on LPS-induced mRNA expression of various acute phase proteins in HepaRG cells and primary human hepatocytes. (A) Human hepatoma HepaRG cells and (B) primary human hepatocytes were either untreated (control), exposed to 5 μ g/mL tocilizumab or 10 ng/mL LPS or co-exposed to 5 μ g/mL tocilizumab and 10 ng/mL LPS for 24 h. SAA, haptoglobin, fibrinogen and serpin mRNA expression was next determined by RT-qPCR. Data are expressed as % of mRNA levels found in LPS-treated cells, arbitrarily set at 100%; they are the means \pm SEM of values from (A) at least 6 independent assays or (B) 4 independent human hepatocyte populations. *, $p < 0.05$.

Conclusion générale et perspectives

I.1. Les apports des études effectuées

L'ensemble de ces travaux a permis d'apporter un certain nombre de données supplémentaires quant aux mécanismes d'action du ruxolitinib et ses effets phénotypiques dans différents modèles cellulaires.

Ainsi, bien que certaines cytokines aient déjà été montrées comme diminuées chez les patients traités au ruxolitinib, notre étude des macrophages humains placés en conditions inflammatoires offre une vision globale des cibles dont l'expression pourrait être réprimée *in vivo*. De plus, l'approche mécanistique employée dans cette étude permet de mieux comprendre comment le ruxolitinib agit pour cibler un large nombre de cytokines.

Au travers de la deuxième étude, il est montré pour la première fois que le ruxolitinib rétablit l'expression et l'activité de protéines impliquées dans le métabolisme et l'élimination des médicaments, et réprimées en conditions inflammatoires. Ces nouvelles données suggèrent de potentielles conséquences d'un traitement par le ruxolitinib pour la pharmacocinétique des médicaments auxquels il peut être associé dans des pathologies inflammatoires.

L'ensemble de ces études permet de mettre en perspective l'importance des effets du ruxolitinib au niveau systémique. Tout d'abord, la variété des types cellulaires sur lesquels il peut agir, montre ainsi que ses effets peuvent cibler différents organes. D'autre part, les données en faveur des effets systémiques du ruxolitinib sont renforcées de par les résultats obtenus dans la dernière étude montrant un rôle régulateur sur l'expression de la CRP, dont les effets touchent l'ensemble de l'organisme.

De façon plus accessoire, ces études ont permis de montrer l'intérêt du ruxolitinib comme outil pour l'étude de la signalisation intracellulaire.

I.2. Limites de ces études

I.2.1. Etude exposée dans l'article 1

Idéalement, cette étude aurait dû être menée sur des macrophages portant la mutation *JAK2V617F*, afin de se rapprocher au mieux de ce qui est retrouvé chez les patients. Initialement, ce travail comportait une partie basée sur l'utilisation de la lignée cellulaire HEL (human erythroleukemia), portant la mutation *JAK2V617F*. Cependant, nous avons pris le parti de ne pas publier les résultats obtenus avec ce modèle du fait de la difficulté à induire l'expression de cytokine de façon notable et significative et de l'effet limité du ruxolitinib dans celui-ci. Ce choix s'est basé sur plusieurs arguments. Tout d'abord, la lignée cellulaire tumorale HEL non traitée se présente sous la forme de cellules immatures myéloïdes à différenciation érythroïde. Ensuite, bien que le traitement au PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), choisi d'après la littérature pour mimer la stimulation inflammatoire, permette l'induction de certains marqueurs macrophagiques (Papayannopoulou et al., 1983), ce traitement est aussi largement décrit comme pouvant induire une différenciation des cellules HEL en mégacaryocytes (Long et al., 1990). Le fait que les cellules HEL traitées ou non au PMA présentent plusieurs types de marqueurs associés à différents types cellulaires pourrait contribuer au fait que l'expression de cytokines soit plus faible dans la lignée HEL que dans les macrophages humains. De plus, le traitement au PMA active les PKC qui agissent sur un très grand nombre de voies de signalisation (Zauli et al., 1996), induisant ainsi une réponse pseudo-inflammatoire peu spécifique et très éloignée de ce qui est observé "physiologiquement" en cas de réponse inflammatoire dans les macrophages. De ce fait, les cellules HEL utilisées en conditions basale ou inflammatoire ne semblent pas être le meilleur modèle de macrophages *JAK2V617F*. Afin d'obtenir des résultats plus pertinents quant au rôle de cette mutation dans l'inflammation et au rôle du ruxolitinib chez les patients présentant cette mutation, il serait par conséquent plus pertinent de réaliser ces études sur des macrophages en culture primaire issus de patients porteurs de la mutation *JAKV617F*.

Cependant, plusieurs obstacles rendent difficiles de telles analyses. Tout d'abord, l'approvisionnement en échantillons de sang de patients porteurs de la mutation *JAK2V617F*, d'une part nécessite de travailler avec une équipe hospitalière en charge de tels patients et d'autre part, les échantillons obtenus sont généralement difficilement utilisables aussi bien d'un point de vue quantitatif que qualitatif. De plus, il faut tenir compte du fait que pour une majorité de ces échantillons, devant la sévérité des syndromes myéloprolifératifs, les patients sont exposés à de nombreux traitements associés, ce qui rend difficile l'étude des effets propres et isolés du ruxolitinib.

Ainsi, dans l'idéal, il faudrait pour cette étude, une lignée cellulaire qui soit stable, présentant la mutation *JAK2V617F*, exprimant des marqueurs cellulaires propres aux macrophages et répondant à une stimulation cytokinique.

Aussi, il est important de garder en tête que bien que dans notre étude, les effets du ruxolitinib aient été attribué à une inhibition de la voie $IFN\beta$ dans le modèle de macrophage humain en culture primaire, ses cibles sont multiples. De ce fait, il est possible qu'une étude dont les auteurs se seraient focalisés sur l'IL6 ait conduit à des résultats similaires. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le ruxolitinib montre un effet inhibiteur plus important que l'anticorps neutralisant de la voie $IFN\beta$, laissant ainsi supposer que la différence observée est due à l'inhibition d'une autre voie (Article 1, Figure 8).

Une autre limite de ce travail est l'effet potentiel du ruxolitinib sur la polarisation macrophagique. En effet, le GM-CSF, utilisé dans notre modèle pour la différenciation des monocytes en macrophages pré-M1 utilise la voie de signalisation JAK-STAT. Il est donc attendu que ses effets soient bloqués par le ruxolitinib. Des résultats préliminaires, non publiés, ont montré que le ruxolitinib empêche complètement la différenciation des macrophages lorsqu'il est utilisé en prétraitement du GM-CSF, conduisant à une perte d'adhésion des cellules.

1.2.2. Etude exposée dans l'article 2

Cette étude étant principalement axée sur une analyse fonctionnelle, il aurait été avantageux de pouvoir mener l'ensemble des expérimentations sur des hépatocytes humains en culture primaire.

Aussi, il aurait été intéressant de compléter cette étude avec une partie portant sur certains médicaments pouvant être fréquemment associés, ou qui sont envisagés comme risquant d'être associés, au ruxolitinib. Il aurait alors été possible d'évaluer directement les effets du ruxolitinib sur le transport et le métabolisme de ces médicaments. Par exemple, l'utilisation de corticoïdes ou d'inhibiteurs des voies Pi3K ou mTOR aurait permis de mimer les combinaisons de traitements à l'étude pour le traitement de la GvHD et les syndromes myéloprolifératifs *JAK2V617F*-positifs, respectivement.

1.2.3. Etude exposée dans l'article 3

Tout d'abord, il est important de noter qu'en clinique, une suppression de la CRP ne se traduit pas forcément par une baisse de l'ensemble des manifestations inflammatoires systémiques. De ce fait, la perte brutale de l'expression de la CRP peut être perçue comme la perte d'un marqueur inflammatoire fiable et facile d'accès, rendant ainsi difficile le suivi de l'amélioration ou non de l'inflammation, ou bien nuisant au diagnostic de pathologies associées, telle que la survenue d'infections bactériennes dont la CRP constitue l'un des marqueurs. Ainsi, la baisse spécifique de la CRP par le ruxolitinib pourrait présenter un frein au diagnostic ou au suivi des patients, à l'image tocilizumab qui, chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, induit une diminution de la CRP qui n'est pas toujours synonyme d'une amélioration ni de l'inflammation globale ni des symptômes cliniques (Smolen et al., 2013).

Du point de vue du modèle cellulaire utilisé, ce travail aurait pu être complété par une analyse de co-culture d'hépatocytes et cellules de Kupffer afin de mieux mimer l'inflammation hépatique. Dans cet optique, une étude préliminaire a été réalisée, utilisant des surnageants

de macrophages humains en culture primaire stimulés par le LPS, pour le traitement de cellules HepaRG. De façon simple, seules les cellules HepaRG étaient traitées au ruxolitinib avant d'être exposées au surnageant de macrophages. Ces résultats montrent que le traitement par le surnageant de macrophages placés en conditions d'inflammation (Figure 22, milieu LPS) permet d'induire l'expression de protéines de la phase aiguë et d'inhiber l'expression du CYP3A4. Le prétraitement des cellules HepaRG par le ruxolitinib restaure les taux de protéines de la phase aiguë mais n'a pas d'effet sur l'expression du CYP3A4.

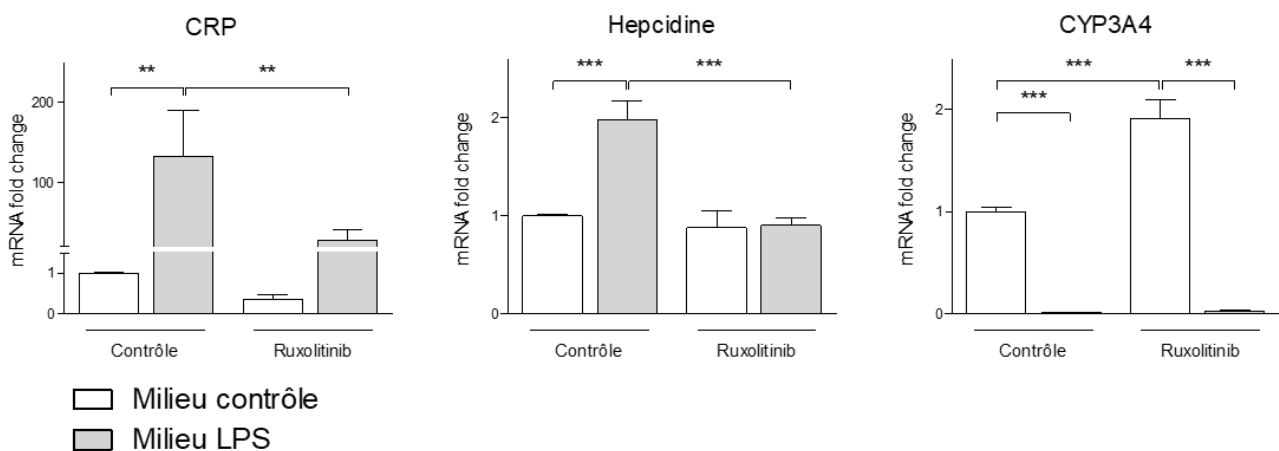


Figure 22 : Résultats de pseudo-coculture

Le problème que présente ce modèle est qu'il n'est pas possible de distinguer les effets dus aux cytokines inflammatoires sécrétées dans le surnageant, des effets dus au LPS résiduel présent dans le surnageant. Idéalement, l'utilisation d'un inhibiteur de TLR4 aurait permis de s'affranchir de l'effet du LPS.

I.3. Les perspectives à approfondir

I.3.1. Le ruxolitinib et ses effets secondaires

I.3.1.1. Les effets secondaires du ruxolitinib

Le ruxolitinib reste globalement un traitement relativement bien toléré. Les principaux effets secondaires sont des thrombocytopénies et des anémies, pouvant atteindre des niveaux importants de sévérité. De plus, par effets immunomodulateurs, le ruxolitinib est responsable d'une augmentation du risque d'infections, notamment virales (herpes zoster) ou bactériennes (pneumonie, tuberculose, infections du tractus urinaire), dont le diagnostic peut être rendu plus complexe du fait de la perte de certains marqueurs inflammatoires tels que la CRP.

Du fait des effets secondaires hématologiques parfois sévères chez certains patients, le ruxolitinib montre un important taux d'abandon du traitement. Ces patients peuvent alors subir d'importants « symptômes de sevrage » caractérisés par une rechute aiguë des symptômes de la maladie, une accélération de la splénomégalie et une dégradation des cytopénies. De plus, les patients devant abandonner leur traitement, présentant des « symptômes de sevrage » ou non, finissent par voir réapparaître leurs symptômes, faisant du ruxolitinib un traitement non curatif et seulement suspensif.

Cependant, il est important de noter que le ruxolitinib reste avantageux, par rapport à d'autres traitements, de par son mode d'administration par voie orale ainsi que par le fait qu'il n'induit pas d'immunogénicité contrairement, notamment, aux anticorps monoclonaux anti-cytokines. De plus, en comparaison à d'autres traitements, les Jakinibs dans leur ensemble ne présentent pas plus de risques d'infections que les DMARDs (pour disease modifying anti-rheumatic drugs) (T. Virtanen et al., 2019), entraînent moins de toxicité gastro-intestinale que les corticoïdes ou les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens et ne semblent pas provoquer plus d'accidents thrombotiques que les anti-TNF α utilisés dans le traitement des pathologies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde (Muller, 2019).

Aussi, les effets secondaires hématologiques retrouvés globalement lors de l'administration orale du ruxolitinib, ne sont pas observés avec les préparations en crème pour application locale utilisée en dermatologie. Cela s'explique certainement du fait de l'utilisation locale et en surface des formulations en crème. Ces effets ne sont pas non plus retrouvés lors de la prise orale pour le traitement de la pelade ; il est ainsi possible que les patients dont la moelle osseuse n'est pas compromise soient moins sensibles aux cytopénies.

1.3.1.2. Le ruxolitinib et les idDDIs

A ce jour, aucune donnée décrite dans la littérature ne met en évidence les effets potentiels du ruxolitinib en tant qu'acteurs (« perpetrators ») dans des idDDIs.

Le tocilizumab, indiqué dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et utilisé comme référence pour l'importance des idDDIs, est montré comme restaurant l'activité de la P-gp ce qui se traduit par un meilleur métabolisme de médicaments anticoagulants. Ainsi, l'attention est portée sur le fait qu'en réduisant l'inflammation, le tocilizumab favorise les accidents thrombotiques (Clarivet et al., 2016; Kim et al., 2012). Bien que ces incidents soient retrouvés chez les patients traités au ruxolitinib (Barabanshikova et al., 2019; Harrison et al., 2017), il n'existe pour le moment pas de preuve que celui-ci, en diminuant l'inflammation, provoque une augmentation de la clairance de ces médicaments. Il faut cependant garder en tête que, bien que les patients souffrant de syndromes myéloprolifératifs présentent de fréquents incidents thrombotiques, ils sont classiquement traités par des antiagrégants plaquettaires, différents des anticoagulants. Les effets premiers du ruxolitinib étant cytopéniques, les patients présentent une réduction du risque de thrombose et d'incidents thromboemboliques par rapport aux agents cytoréducteurs (Griesshammer et al., 2019; Keohane et al., 2015; Samuelson et al., 2016; Vannucchi, 2015; Verstovsek et al., 2016). De plus, le ruxolitinib est considéré comme étant sûr au regard d'évènements thrombotiques (Finazzi et al., 2018; Pieri et al., 2017). Ainsi, il est possible que le ruxolitinib soit à l'origine d'idDDIs compromettant les effets d'anticoagulants et d'antiagrégants mais que cela soit couvert par la diminution importante du nombre de plaquettes au cours des syndromes myéloprolifératifs.

Il faut cependant noter qu'en France au cours de traitements par le tocilizumab, bien que connus pour être à l'origine d'idDDIs, les doses de médicaments associés ne sont pas adaptées en clinique.

1.3.2. Le ruxolitinib en comparaison aux autres Jakinibs

Actuellement, trois inhibiteurs de JAK, le ruxolitinib, le tofacitinib et le baricitinib, sont autorisés pour une utilisation en clinique, et de très nombreux autres sont en développement.

Parmi les inhibiteurs de JAK2 de seconde génération, le pacritinib est en cours d'évaluation pour le traitement des syndromes myéloprolifératifs. Cet inhibiteur de JAK2 semble relativement intéressant car il montre moins d'effets immunosuppresseurs que le ruxolitinib et n'induit pas de cytopénies (Mascarenhas et al., 2018).

Le tofacitinib, un inhibiteur JAK1/2, est utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et est à l'essai pour le psoriasis, les maladies inflammatoires chroniques intestinales, ainsi que d'autres pathologies inflammatoires. Le tofacitinib, et les autres inhibiteurs de JAK1 ont l'avantage de présenter moins d'effets secondaires hématologiques sévères. En effet, les effets cytopéniques exercés par le ruxolitinib et les autres inhibiteurs de JAK2, sont dus à l'inhibition de JAK2, qui est, parmi les JAKs, l'isoforme principale jouant un rôle dans l'hématopoïèse (Banerjee et al., 2017). Cependant, en plus de l'immunosuppression secondaire à l'inhibition de JAK1 orchestrée par les inhibiteurs de JAK1, il semblerait que ces derniers puissent affecter les cellules souches hématopoïétiques sur le long terme (Kleppe et al., 2017).

Des inhibiteurs de JAK3 comme le peficitinib et decernotinib sont à l'étude dans des pathologies dermatologiques (Papp et al., 2015) et la polyarthrite rhumatoïde (Fleischmann et al., 2015), respectivement. Du fait de l'utilisation de l'isoforme JAK3 plus restreinte que celle de JAK1 dans la signalisation des cytokines, ces inhibiteurs présentent moins d'effets off-target, mais sont montrés comme induisant des anémies, probablement par un manque de spécificité se traduisant par une inhibition de JAK2.

La limite majeure des inhibiteurs de JAK1 et JAK3 est leur potentiel à induire des pathologies auto-immunes et à favoriser le développement d'infections.

Les futurs Jakinibs, actuellement en phases d'essais cliniques et en développement, ont pour but d'être plus spécifiques d'une isoforme de JAK, voire même d'une forme mutée comme *JAK2V617F* pour le LS104 (Lipka et al., 2008), et pourraient ainsi présenter moins d'effets secondaires que les Jakinibs de première génération. De ce fait, ils permettraient potentiellement une utilisation à des doses plus importantes sans pour autant induire d'effets secondaires majeurs. Cependant une même isoforme de JAK pouvant servir à la signalisation de nombreuses cytokines et une seule cytokine pouvant réguler l'expression de nombreuses autres, les effets de ces nouveaux inhibiteurs, bien que plus spécifiques, resteraient tout de même à très large spectre.

1.3.3. Le ruxolitinib en combinaison d'autres traitements

Aux vues des effets bénéfiques non négligeables du ruxolitinib, son utilisation en combinaison d'autres traitements pourrait offrir de nouvelles perspectives pour des effets synergiques avec un autre inhibiteur ou pour réduire ses effets cytopéniques.

Notamment, plusieurs études actuellement en cours combinent l'utilisation du ruxolitinib à des inhibiteurs des voies Pi3K et mTOR (Identifiant ClinicalTrials : NCT02718300 et NCT02779283). Des résultats montrent déjà leurs effets synergiques sur l'inhibition de la prolifération induite par *JAK2V617F* (Bartalucci et al., 2013; Choong et al., 2013). Aussi, l'inhibition combinée de JAK2 et de la voie MEK/ERK inhibe l'activation des cellules impliquées dans le développement de la fibrose dans un modèle de myélofibrose (Stivala et al., 2019).

1.3.4. Le ruxolitinib comme anti-fibrosant

De plus en plus d'études s'intéressent ainsi aux interactions qui peuvent exister entre macrophages et cellules cibles, dans des pathologies qui allient inflammation et fibrose, et ce notamment au niveau hépatique.

En effet, il est connu que dans la fibrose hépatique congénitale (CHF), la fibrose serait le résultat d'une inflammation chronique à bas bruit générée par les cholangiocytes qui sécrètent des cytokines recrutant des macrophages induisant eux même l'expression d'un activateur du TGF β . Dans un modèle murin de CHF, le dépôt de collagène augmente avec la proportion de macrophages M2 (Locatelli et al., 2016). De plus, en traitant ces souris CHF avec un inhibiteur du récepteur à CXCL10, une diminution du recrutement de macrophages M2, de l'inflammation ainsi de la fibrose hépatique est observée. Il est aussi constaté que dans les cholangiocytes de ces souris CHF, CXCL10 est produite *via* JAK/STAT3 en réponse à l'IL1 β et la β -catenin (Kaffe et al., 2018). Ces deux études montrent que dans cette pathologie, la fibrose pourrait être directement liée une inflammation JAK/STAT-dépendante.

Aussi, dans des pathologies hépatiques plus répandues comme la NAFLD, les macrophages pourraient induire la fibrose *via* l'activation de l'inflammasome par IL1 β ou le LPS dans des modèles murins (Mridha et al., 2017). Le pacritinib, un inhibiteur de JAK2, montre des effets bénéfiques dans un modèle de souris présentant une fibrose hépatique (Al-Fayoumi et al., 2018). Il a aussi été montré que la production d'OSM est suffisante pour induire une fibrose hépatique, sans nécrose, *in vivo* notamment en induisant directement l'expression du collagène de type 1. En culture, le surnageant des macrophages traités à l'OSM induit l'expression de collagène de type 1 par les cellules étoilées, actrices principales de la fibrose (Matsuda et al., 2017). L'activation des cellules étoilées peut se faire par un traitement à IL6, qui induit l'expression au niveau transcriptomique et protéique de α -SMA et du col1a, notamment *via* la phosphorylation de STAT3. En utilisant des inhibiteurs de STAT, les taux basaux de α -SMA et Col1a sont restaurés (Kagan et al., 2017). Aussi, un traitement des cellules étoilées au LPS les sensibilise à la signalisation TGF β et favorise la progression de la fibrose induite *in vivo* par CCl4 (Chen et al., 2017). Par ailleurs, il est montré que l'utilisation d'inhibiteurs de JAK permettrait d'inhiber l'expression de α -SMA, la prolifération des cellules étoilées, leur capacité de migration en réponse au TGF β et de diminuer l'expression des collagène 1 et 3 et d'induire leur apoptose (Gu et al., 2016).

Les effets anti-fibrosants des inhibiteurs de JAK sont aussi montrés dans d'autres types de fibroses. Ainsi, le ruxolitinib exerce des effets anti-fibrosants non seulement dans la pancréatite chronique (Komar et al., 2017) mais aussi dans la sclérodémie systémique où l'effet bénéfique se retrouve au niveau de la fibrose pulmonaire comme cutanée (Zhang et al., 2017). De plus, dans le traitement de la myélofibrose, le ruxolitinib montre une stabilisation de la fibrose de la moelle osseuse chez les patients. D'autres inhibiteurs ont pu montrer leur efficacité au niveau de la fibrose rénale (Nakamura et al., 2017) et pulmonaire (Dong et al., 2016).

Ainsi, aux vues des effets anti-inflammatoires du ruxolitinib, de ses possibles effets sur la polarisation macrophagique et de la littérature qui tend à montrer de nouvelles propriétés pour cette classe de médicaments, il semblerait intéressant d'évaluer les effets anti-fibrosants du ruxolitinib notamment au niveau hépatique. Ainsi, l'idéal serait de pouvoir caractériser le phénotype de Kupffer en culture primaire, obtenues à partir du surnageant d'hépatectomies, si nécessaire, les pré-polariser en M2 (Sica et al., 2014) et évaluer les effets du ruxolitinib sur ce type cellulaire, notamment *via* par la production de TGF β au niveau transcriptomique et protéique. Dans un deuxième temps, il pourrait être intéressant d'évaluer ces effets anti-fibrosants directement sur des cellules étoilées en culture primaire issues du surnageant d'hépatectomies, activées par un traitement au TGF β , par une évaluation des niveaux transcriptomiques et protéiques de marqueurs de fibrose tels que α -SMA et le collagène de type 1.

1.3.5. Conclusion générale

Le ruxolitinib, et plus globalement les Jakinibs, offrent une alternative pour le traitement des pathologies inflammatoires et auto-immunes, voire plus largement, des pathologies dans lesquelles l'inflammation joue un rôle majeur. L'ensemble de ce travail s'inscrit ainsi au sein d'un nombre notable d'études visant à montrer les nombreuses utilisations possibles du ruxolitinib et des Jakinibs pour le traitement de pathologies variées.

Références

- Abdel-Razzak, Z., Loyer, P., Fautrel, A., Gautier, J.C., Corcos, L., Turlin, B., Beaune, P., and Guillouzo, A. (1993). Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* *44*, 707–715.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745.
- Aitken, A.E., and Morgan, E.T. (2007). Gene-Specific Effects of Inflammatory Cytokines on Cytochrome P4502C, 2B6 and 3A4 mRNA Levels in Human Hepatocytes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *35*, 1687–1693.
- Aitken, A.E., Richardson, T.A., and Morgan, E.T. (2006). Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *46*, 123–149.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* *124*, 783–801.
- Al-Ali, H.K., Griesshammer, M., le Coutre, P., Waller, C.F., Liberati, A.M., Schafhausen, P., Tavares, R., Giraldo, P., Foltz, L., Raanani, P., et al. (2016). Safety and efficacy of ruxolitinib in an open-label, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial. *Haematologica* *101*, 1065–1073.
- Al-Fayoumi, S., Hashiguchi, T., Shirakata, Y., Mascarenhas, J., and Singer, J.W. (2018). Pilot study of the antifibrotic effects of the multikinase inhibitor pacritinib in a mouse model of liver fibrosis. *J. Exp. Pharmacol.* *10*, 9–17.
- Aninat, C., Seguin, P., Descheemaeker, P.-N., Morel, F., Malledant, Y., and Guillouzo, A. (2008). Catecholamines induce an inflammatory response in human hepatocytes. *Crit. Care Med.* *36*, 848–854.
- Anwer, M.S., and Stieger, B. (2014). Sodium-dependent bile salt transporters of the SCL10A Transporter Family: More than solute transporters. *Pflugers Arch.* *466*.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Beau, M.M.L., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* *127*, 2389–2403. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- Banerjee, S., Biehl, A., Gadina, M., Hasni, S., and Schwartz, D.M. (2017). JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs* *77*, 521–546.
- Barabanshikova, M.V., Zubarovsky, I.N., Savrasov, V.M., Korolkov, A.J., Baykov, V.V., Botina, A.V., Vlasova, J.J., Moiseev, I.S., Darskaya, E.I., Morozova, E.V., et al. (2019). Splenectomy following JAK1/JAK2 inhibitor therapy in patients with myelofibrosis undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*
- Bartalucci, N., Tozzi, L., Bogani, C., Martinelli, S., Rotunno, G., Villeval, J.-L., and Vannucchi, A.M. (2013). Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signalling pathways produces synergistic activity against myeloproliferative neoplasms. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 1385–1396.

- Biswas, S.K., Chittezhath, M., Shalova, I.N., and Lim, J.-Y. (2012). Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunol. Res.* *53*, 11–24.
- Black, S., Kushner, I., and Samols, D. (2004). C-reactive Protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 48487–48490.
- Braig, D., Nero, T.L., Koch, H.-G., Kaiser, B., Wang, X., Thiele, J.R., Morton, C.J., Zeller, J., Kiefer, J., Potempa, L.A., et al. (2017). Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites. *Nat. Commun.* *8*.
- Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T.W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 362–374.
- von Bubnoff, N., Ihorst, G., Grishina, O., Röthling, N., Bertz, H., Duyster, J., Finke, J., and Zeiser, R. (2018). Ruxolitinib in GvHD (RIG) study: a multicenter, randomized phase 2 trial to determine the response rate of Ruxolitinib and best available treatment (BAT) versus BAT in steroid-refractory acute graft-versus-host disease (aGvHD) (NCT02396628). *BMC Cancer* *18*.
- Campbell, P.J., and Green, A.R. (2006). The Myeloproliferative Disorders. *N. Engl. J. Med.* *355*, 2452–2466.
- Chen, M., Liu, J., Yang, W., and Ling, W. (2017). Lipopolysaccharide mediates hepatic stellate cell activation by regulating autophagy and retinoic acid signaling. *Autophagy* *1–15*.
- Chen, M., Pockaj, B., Andreozzi, M., Barrett, M.T., Krishna, S., Eaton, S., Niu, R., and Anderson, K.S. (2018). JAK2 and PD-L1 Amplification Enhance the Dynamic Expression of PD-L1 in Triple-negative Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* *18*, e1205–e1215.
- Choong, M.L., Pecquet, C., Pendharkar, V., Diaconu, C.C., Yong, J.W.Y., Tai, S.J., Wang, S.F., Defour, J.-P., Sangthongpitag, K., Villeval, J.-L., et al. (2013). Combination treatment for myeloproliferative neoplasms using JAK and pan-class I PI3K inhibitors. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 1397–1409.
- Clarivet, B., Robin, P., Pers, Y.M., Ferreira, R., Lebrun, J., Jorgensen, C., Hillaire-Buys, D., Brés, V., and Faillie, J.L. (2016). Tocilizumab and mesenteric arterial thrombosis: drug-drug interaction with anticoagulants metabolized by CYP 450 and/or by P-glycoprotein. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *72*, 1413–1414.
- Cohen, P., and Strickson, S. (2017). The role of hybrid ubiquitin chains in the MyD88 and other innate immune signalling pathways. *Cell Death Differ.* *24*, 1153–1159.
- Coutant, D.E., and Hall, S.D. (2018). Disease–Drug Interactions in Inflammatory States via Effects on CYP-Mediated Drug Clearance. *J. Clin. Pharmacol.* *58*, 849–863.
- Croft, M., and Siegel, R.M. (2017). Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as targets for the treatment of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* *13*, 217–233.
- Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T.H., Fitzgerald, K.A., and Kelliher, M.A. (2005). Rip1 Mediates the Trif-dependent Toll-like Receptor 3- and 4-induced NF- κ B Activation but Does Not Contribute to Interferon Regulatory Factor 3 Activation. *J. Biol. Chem.* *280*, 36560–36566.
- Daly, A.K., Rettie, A.E., Fowler, D.M., and Miners, J.O. (2017). Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations†. *J. Pers. Med.* *8*.
- Del Giudice, M., and Gangestad, S.W. (2018). Rethinking IL-6 and CRP: Why they are more than inflammatory biomarkers, and why it matters. *Brain. Behav. Immun.* *70*, 61–75.

- Deng, M., Scott, M.J., Loughran, P., Gibson, G., Sodhi, C., Watkins, S., Hackam, D., and Billiar, T.R. (2013). Lipopolysaccharide Clearance, Bacterial Clearance, and Systemic Inflammatory Responses Are Regulated by Cell Type-Specific Functions of TLR4 during Sepsis. *J. Immunol. Author Choice* 190, 5152–5160.
- Domoszlai, T., Martincuks, A., Fahrenkamp, D., Schmitz-Van de Leur, H., Kuster, A., and Muller-Newen, G. (2014). Consequences of the disease-related L78R mutation for dimerization and activity of STAT3. *J. Cell Sci.* 127, 1899–1910.
- Dong, Z., Tai, W., Lei, W., Wang, Y., Li, Z., and Zhang, T. (2016). IL-27 inhibits the TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *BMC Cell Biol.* 17.
- Döring, B., and Petzinger, E. (2014). Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. *Drug Metab. Rev.* 46, 261–282.
- Dunne, A., Ejdebäck, M., Ludidi, P.L., O'Neill, L.A.J., and Gay, N.J. (2003). Structural Complementarity of Toll/Interleukin-1 Receptor Domains in Toll-like Receptors and the Adaptors Mal and MyD88. *J. Biol. Chem.* 278, 41443–41451.
- Escher, T.E., Lui, A.J., Geanes, E.S., Walter, K.R., Tawfik, O., Hagan, C.R., and Lewis-Wambi, J. (2019). Interaction between MUC1 and STAT1 drives IFITM1 overexpression in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells and mediates estrogen-induced apoptosis. *Mol. Cancer Res. molcanres.0916.2018*.
- Ferrao, R., Zhou, H., Shan, Y., Li, Q., Shaw, D.E., Li, X., and Wu, H. (2014). IRAK4 Dimerization and Trans-autophosphorylation are Induced by Myddosome Assembly. *Mol. Cell* 55, 891–903.
- Finazzi, G., De Stefano, V., and Barbui, T. (2018). Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 8.
- Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., et al. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.-M., and Maniatis, T. (2003). IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491.
- Fleischmann, R.M., Damjanov, N.S., Kivitz, A.J., Legedza, A., Hoock, T., and Kinnman, N. (2015). A randomized, double-blind, placebo-controlled, twelve-week, dose-ranging study of decernotinib, an oral selective JAK-3 inhibitor, as monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* 67, 334–343.
- Gabay, C., and Kushner, I. (1999). Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448–454.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 39, 1003–1018.
- Giaccone, G., Sanborn, R.E., Waqar, S.N., Martinez-Marti, A., Ponce, S., Zhen, H., Kennealey, G., Erickson-Viitanen, S., and Schaefer, E. (2018). A Placebo-Controlled Phase II Study of Ruxolitinib in Combination With Pemetrexed and Cisplatin for First-Line Treatment of Patients With Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer and Systemic Inflammation. *Clin. Lung Cancer* 19, e567–e574.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845.

Green, M.R., Newton, M.D., and Fancher, K.M. (2016). Off-Target Effects of BCR-ABL and JAK2 Inhibitors. *Am. J. Clin. Oncol.* 39, 76–84.

Griesshammer, M., Saydam, G., Palandri, F., Benevolo, G., Egyed, M., Callum, J., Devos, T., Sivgin, S., Guglielmelli, P., Bensasson, C., et al. (2018). Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythemia vera without splenomegaly: 80-week follow-up from the RESPONSE-2 trial. *Ann. Hematol.* 97, 1591–1600.

Griesshammer, M., Kiladjian, J.-J., and Besses, C. (2019). Thromboembolic events in polycythemia vera. *Ann. Hematol.* 98, 1071–1082.

Gu, Y.-J., Gu, Y.-J., Sun, W.-Y., Sun, W.-Y., Zhang, S., Zhang, S., Li, X.-R., Li, X.-R., Wei, W., and Wei, W. (2016). Targeted blockade of JAK/STAT3 signaling inhibits proliferation, migration and collagen production as well as inducing the apoptosis of hepatic stellate cells. *Int. J. Mol. Med.* 38, 903–911.

Hagenbuch, B., and Stieger, B. (2013). THE SLCO (FORMER SLC21) SUPERFAMILY OF TRANSPORTERS. *Mol. Aspects Med.* 34, 396–412.

Haji Abdolvahab, M., Mofrad, M.R.K., and Schellekens, H. (2016). Chapter Eight - Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, and L. Galluzzi, eds. (Academic Press), pp. 343–372.

Harris, J.E., Rashighi, M., Nguyen, N., Jabbari, A., Ulerio, G., Clynes, R., Christiano, A.M., and Mackay-Wiggan, J. (2016). Rapid Skin Repigmentation on Oral Ruxolitinib in a Patient with Coexistent Vitiligo and Alopecia Areata. *J. Am. Acad. Dermatol.* 74, 370–371.

Harrison, C., Kiladjian, J.-J., Al-Ali, H.K., Gisslinger, H., Waltzman, R., Stalbovskaya, V., McQuitty, M., Hunter, D.S., Levy, R., Knoops, L., et al. (2012). JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 366, 787–798.

Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., Kiladjian, J.-J., Al-Ali, H.K., Gisslinger, H., Knoops, L., Cervantes, F., Jones, M.M., Sun, K., McQuitty, M., et al. (2016). Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia* 30, 1701–1707.

Harrison, C.N., Mead, A.J., Panchal, A., Fox, S., Yap, C., Gbandi, E., Houlton, A., Alimam, S., Ewing, J., Wood, M., et al. (2017). Ruxolitinib versus best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide in a randomized trial. *Blood* blood-2017-05-785790.

Hartmann, G., Kim, H., and Piquette-Miller, M. (2001). Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. *Int. Immunopharmacol.* 1, 189–199.

Hazem, S.H., Shaker, M.E., Ashamallah, S.A., and Ibrahim, T.M. (2014). The novel Janus kinase inhibitor ruxolitinib confers protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via multiple mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 220, 116–127.

Heine, A., Held, S.A.E., Daecke, S.N., Wallner, S., Yajnanarayana, S.P., Kurts, C., Wolf, D., and Brossart, P. (2013). The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood* 122, 1192–1202.

- Hermouet, S., Godard, A., Pineau, D., Corre, I., Raheer, S., Lippert, E., and Jacques, Y. (2002). ABNORMAL PRODUCTION OF INTERLEUKIN (IL)-11 AND IL-8 IN POLYCYTHAEMIA VERA. *Cytokine* 20, 178–183.
- Hermouet, S., Bigot-Corbel, E., and Gardie, B. (2015). Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2015.
- Hijmans, B.S., Greffhorst, A., Oosterveer, M.H., and Groen, A.K. (2014). Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* 96, 121–129.
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209, 1167–1181.
- Hornig, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2, 835.
- Hu, Y., Hong, Y., Xu, Y., Liu, P., Guo, D.-H., and Chen, Y. (2014). Inhibition of the JAK/STAT pathway with ruxolitinib overcomes cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer NSCLC. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 1627–1636.
- Hunter, C.A., and Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 16, 448–457.
- Hurwitz, H., Van Cutsem, E., Bendell, J., Hidalgo, M., Li, C.-P., Salvo, M.G., Macarulla, T., Sahai, V., Sama, A., Greeno, E., et al. (2018). Ruxolitinib + capecitabine in advanced/metastatic pancreatic cancer after disease progression/intolerance to first-line therapy: JANUS 1 and 2 randomized phase III studies. *Invest. New Drugs* 36, 683–695.
- Hurwitz, H.I., Uppal, N., Wagner, S.A., Bendell, J.C., Beck, J.T., Wade, S.M., Nemunaitis, J.J., Stella, P.J., Pipas, J.M., Wainberg, Z.A., et al. (2015). Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Ruxolitinib or Placebo in Combination With Capecitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer for Whom Therapy With Gemcitabine Has Failed. *J. Clin. Oncol.* 33, 4039–4047.
- Hussaarts, K.G.A.M., Veerman, G.D.M., Jansman, F.G.A., van Gelder, T., Mathijssen, R.H.J., and van Leeuwen, R.W.F. (2019). Clinically relevant drug interactions with multikinase inhibitors: a review. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 11.
- Jagasia, M., Zeiser, R., Arbushites, M., Delaite, P., Gadbow, B., and Bubnoff, N. von (2018). Ruxolitinib for the treatment of patients with steroid-refractory GVHD: an introduction to the REACH trials. *Immunotherapy* 10, 391–402.
- Janeway, C.A. (2013). Pillars Article: Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989. 54: 1–13. *J. Immunol.* 191, 4475–4487.
- Jetter, A., and Kullak-Ublick, G.A. (2019). Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol. Res.*
- Jiang, X., Zhuang, Y., Xu, Z., Wang, W., and Zhou, H. (2016). Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Predict Disease-Mediated Therapeutic Protein–Drug Interactions: Modulation of Multiple Cytochrome P450 Enzymes by Interleukin-6. *AAPS J.* 18, 767–776.

Jirillo, E., Caccavo, D., Magrone, T., Piccigallo, E., Amati, L., Lembo, A., Kalis, C., and Gumenscheimer, M. (2002). The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J. Endotoxin Res.* 8, 319–327.

Johnson, D.E., O’Keefe, R.A., and Grandis, J.R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 234–248.

Joshi, D., Alomran, A., Zancanaro, P., and Rosmarin, D. (2018). Treatment of vitiligo with the topical Janus kinase inhibitor ruxolitinib: A 32-week open-label extension study with optional narrow-band ultraviolet B. *J. Am. Acad. Dermatol.* 78, 1205-1207.e1.

Jover, R., Bort, R., Gómez-Lechón, M.J., and Castell, J.V. (2002). Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J.* 16, 1799–1801.

Kaffe, E., Fiorotto, R., Pellegrino, F., Mariotti, V., Amenduni, M., Cadamuro, M., Fabris, L., Strazzabosco, M., and Spirli, C. (2018). β -catenin and IL-1 β dependent CXCL10 production drives progression of disease in a mouse model of Congenital Hepatic Fibrosis. *Hepatology*. Baltim. Md 67, 1903–1919.

Kagan, J.C., and Medzhitov, R. (2006). Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell* 125, 943–955.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., and Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nat. Immunol.* 9, 361–368.

Kagan, P., Sultan, M., Tachlytski, I., Safran, M., and Ben-Ari, Z. (2017). Both MAPK and STAT3 signal transduction pathways are necessary for IL-6-dependent hepatic stellate cells activation. *PLoS ONE* 12.

Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.-K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.-H., Deng, L., and Chen, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 Activate the NF- κ B Pathway through Binding to Polyubiquitin Chains. *Mol. Cell* 15, 535–548.

Kaur, S., Sassano, A., Dolniak, B., Joshi, S., Majchrzak-Kita, B., Baker, D.P., Hay, N., Fish, E.N., and Plataniias, L.C. (2008). Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4808–4813.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.

Keohane, C., McLornan, D.P., Sanchez, K., Connor, C., Radia, D., and Harrison, C.N. (2015). The effects of JAK inhibitor therapy upon novel markers of thrombosis In myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 100, e348–e350.

Kim, J.W., Gautam, J., Kim, J.E., Kim, J.-A., and Kang, K.W. (2019). Inhibition of tumor growth and angiogenesis of tamoxifen-resistant breast cancer cells by ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor. *Oncol. Lett.* 17, 3981–3989.

Kim, S., Östör, A.J.K., and Nisar, M.K. (2012). Interleukin-6 and cytochrome-P450, reason for concern? *Rheumatol. Int.* 32, 2601–2604.

Kleppe, M., Spitzer, M.H., Li, S., Hill, C.E., Dong, L., Papalex, E., De Groote, S., Bowman, R.L., Keller, M., Koppikar, P., et al. (2017). Jak1 Integrates Cytokine Sensing to Regulate Hematopoietic Stem Cell Function and Stress Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 21, 489-501.e7.

- Koepsell, H. (2013). The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol. Aspects Med.* *34*, 413–435.
- Komar, H.M., Serpa, G., Kerscher, C., Schwoegl, E., Mace, T.A., Jin, M., Yang, M.-C., Chen, C.-S., Bloomston, M., Ostrowski, M.C., et al. (2017). Inhibition of Jak/STAT signaling reduces the activation of pancreatic stellate cells in vitro and limits caerulein-induced chronic pancreatitis in vivo. *Sci. Rep.* *7*.
- Koonrungsesomboon, N., Khatsri, R., Wongchompoo, P., and Teekachunhatean, S. (2018). The impact of genetic polymorphisms on CYP1A2 activity in humans: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* *18*, 760.
- Kramer, F., Torzewski, J., Kamenz, J., Veit, K., Hombach, V., Dedio, J., and Ivashchenko, Y. (2008). Interleukin-1 β stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NF κ B- and C/EBP β -dependent autocrine interleukin-6 loop. *Mol. Immunol.* *45*, 2678–2689.
- Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G., and Thummel, K.E. (2002). Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *54*, 1271–1294.
- Lee, E.B., Daskalakis, N., Xu, C., Paccaly, A., Miller, B., Fleischmann, R., Bodrug, I., and Kivitz, A. (2017a). Disease–Drug Interaction of Sarilumab and Simvastatin in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin. Pharmacokinet.* *56*, 607–615.
- Lee, Y.-S., Kim, Y.-H., Jung, Y.S., Kim, K.-S., Kim, D.-K., Na, S.-Y., Lee, J.-M., Lee, C.-H., and Choi, H.-S. (2017b). Hepatocyte toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced hepcidin expression. *Exp. Mol. Med.* *49*, e408.
- Levy, D.E., and Darnell, J.E. (2002). STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 651.
- Li, Q., and Shu, Y. (2014). Role of solute carriers in response to anticancer drugs. *Mol. Cell. Ther.* *2*.
- Li, W., Yang, H., Li, X., Han, L., Xu, N., and Shi, A. (2019). Signaling pathway inhibitors target breast cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Oncol. Rep.* *41*, 437–446.
- Lim, S.T., Jeon, Y.W., Gwak, H., Kim, S.Y., and Suh, Y.J. (2018). Synergistic anticancer effects of ruxolitinib and calcitriol in estrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells. *Mol. Med. Rep.* *17*, 5581–5588.
- Lin, S.-C., Lo, Y.-C., and Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88:IRAK4:IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling. *Nature* *465*, 885–890.
- Lipka, D.B., Hoffmann, L.S., Heidel, F., Markova, B., Blum, M.-C., Breitenbuecher, F., Kasper, S., Kindler, T., Levine, R.L., Huber, C., et al. (2008). LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 1176–1184.
- Liu, S., Gallo, D.J., Green, A.M., Williams, D.L., Gong, X., Shapiro, R.A., Gambotto, A.A., Humphris, E.L., Vodovotz, Y., and Billiar, T.R. (2002). Role of Toll-Like Receptors in Changes in Gene Expression and NF- κ B Activation in Mouse Hepatocytes Stimulated with Lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* *70*, 3433–3442.
- Locatelli, L., Cadamuro, M., Spirli, C., Fiorotto, R., Lecchi, S., Morell, C.M., Popov, Y., Scirpo, R., De Matteis, M., Amenduni, M., et al. (2016). MACROPHAGE RECRUITMENT BY

FIBROCYSTIN-DEFECTIVE BILIARY EPITHELIAL CELLS PROMOTES PORTAL FIBROSIS IN CONGENITAL HEPATIC FIBROSIS. *Hepatology*. Baltimore, Md 63, 965–982.

Lussana, F., and Rambaldi, A. (2017). Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J. Autoimmun.* 85, 58–63.

Mackay-Wiggan, J., Jabbari, A., Nguyen, N., Cerise, J.E., Clark, C., Ulerio, G., Furniss, M., Vaughan, R., Christiano, A.M., and Clynes, R. (2016). Oral ruxolitinib induces hair regrowth in patients with moderate-to-severe alopecia areata. *JCI Insight* 1.

Mallick, P., Taneja, G., Moorthy, B., and Ghose, R. (2017). Regulation of drug-metabolizing enzymes in infectious and inflammatory disease: Implications for biologics–small molecule drug interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13, 605–616.

Mannina, D., and Kröger, N. (2019). Janus Kinase Inhibition for Graft-Versus-Host Disease: Current Status and Future Prospects. *Drugs*.

Marnell, L., Mold, C., and Du Clos, T.W. (2005). C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clin. Immunol.* 117, 104–111.

Mascarenhas, J., Hoffman, R., Talpaz, M., Gerds, A.T., Stein, B., Gupta, V., Szoke, A., Drummond, M., Pristupa, A., Granston, T., et al. (2018). Pacritinib vs Best Available Therapy, Including Ruxolitinib, in Patients With Myelofibrosis. *JAMA Oncol.*

Maschalidi, S., Sepulveda, F.E., Garrigue, A., Fischer, A., and Basile, G. de S. (2016). Therapeutic effect of JAK1/2 blockade on the manifestations of hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice. *Blood* 128, 60–71.

Matsuda, M., Tsurusaki, S., Miyata, N., Saijou, E., Okochi, H., Miyajima, A., and Tanaka, M. (2017). Oncostatin M causes liver fibrosis by regulating cooperation between hepatic stellate cells and macrophages in mice. *Hepatology* n/a-n/a.

McFadyen, J.D., Kiefer, J., Braig, D., Loseff-Silver, J., Potempa, L.A., Eisenhardt, S.U., and Peter, K. (2018). Dissociation of C-Reactive Protein Localizes and Amplifies Inflammation: Evidence for a Direct Biological Role of C-Reactive Protein and Its Conformational Changes. *Front. Immunol.* 9.

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

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394.

Mertens, C., Zhong, M., Krishnaraj, R., Zou, W., Chen, X., and Darnell, J.E. (2006). Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* 20, 3372–3381.

Mesa, R., Vannucchi, A.M., Yacoub, A., Zachee, P., Garg, M., Lyons, R., Koschmieder, S., Rinaldi, C., Byrne, J., Hasan, Y., et al. (2017). The efficacy and safety of continued hydroxycarbamide therapy versus switching to ruxolitinib in patients with polycythaemia vera: a randomized, double-blind, double-dummy, symptom study (RELIEF). *Br. J. Haematol.* 176, 76–85.

Miele, L., Valenza, V., Torre, G.L., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Mascianà, R., Forgione, A., Gabrieli, M.L., Perotti, G., et al. (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1877–1887.

Mihlan, M., Blom, A.M., Kupreishvili, K., Lauer, N., Stelzner, K., Bergström, F., Niessen, H.W.M., and Zipfel, P.F. (2011). Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells. *FASEB J.* 25, 4198–4210.

Mohrherr, J., Haber, M., Breitenecker, K., Aigner, P., Moritsch, S., Voronin, V., Eferl, R., Moriggl, R., Stoiber, D., Györfy, B., et al. (2019). JAK-STAT inhibition impairs K-RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *Int. J. Cancer.*

Mold, C., Rodriguez, W., Rodic-Polic, B., and Clos, T.W.D. (2002). C-Reactive Protein Mediates Protection from Lipopolysaccharide Through Interactions With FcγR. *J. Immunol.* 169, 7019–7025.

Morgan, E.T. (2001). Regulation of Cytochrome P450 by Inflammatory Mediators: Why and How? *Drug Metab. Dispos.* 29, 207–212.

Morgan, E.T., Goralski, K.B., Piquette-Miller, M., Renton, K.W., Robertson, G.R., Chaluvadi, M.R., Charles, K.A., Clarke, S.J., Kacevska, M., Liddle, C., et al. (2008). Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Infection, Inflammation, and Cancer. *Drug Metab. Dispos.* 36, 205–216.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.

Mridha, A.R., Wree, A., Robertson, A.A.B., Yeh, M.M., Johnson, C.D., Van Rooyen, D.M., Haczeyni, F., Teoh, N.C.-H., Savard, C., Ioannou, G.N., et al. (2017). NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J. Hepatol.* 66, 1037–1046.

Muller, R. (2019). JAK inhibitors in 2019, synthetic review in 10 points. *Eur. J. Intern. Med.*

Murray, P.J. (2017). Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 541–566.

Nakamura, K., Kawato, Y., Kaneko, Y., Hanaoka, K., Kubo, K., Nakanishi, T., Maeda, M., Fukahori, H., Ito, M., Noto, T., et al. (2017). Prevention of chronic renal allograft rejection by AS2553627, a novel JAK inhibitor, in a rat transplantation model. *Transpl. Immunol.*

Neculai, D., Neculai, A.M., Verrier, S., Straub, K., Klumpp, K., Pfitzner, E., and Becker, S. (2005). Structure of the Unphosphorylated STAT5a Dimer. *J. Biol. Chem.* 280, 40782–40787.

Neumann, T., Schneidewind, L., Weigel, M., Plis, A., Vaizian, R., Schmidt, C.A., and Krüger, W. (2019). Ruxolitinib for Therapy of Graft-versus-Host Disease.

Ofengeim, D., and Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 727–736.

Oliveira, A.B. de, Alpalhão, M., Filipe, P., and Maia-Silva, J. (2019). The role of Janus kinase inhibitors in the treatment of alopecia areata: A systematic review. *Dermatol. Ther.* 0, e13053.

O'Shaughnessy, J., DeMichele, A., Ma, C.X., Richards, P., Yardley, D.A., Wright, G.S., Kalinsky, K., Steis, R., Diab, S., Kennealey, G., et al. (2018). A randomized, double-blind, phase 2 study of ruxolitinib or placebo in combination with capecitabine in patients with

advanced HER2-negative breast cancer and elevated C-reactive protein, a marker of systemic inflammation. *Breast Cancer Res. Treat.* 170, 547–557.

Panteli, K.E., Hatzimichael, E.C., Bouranta, P.K., Katsaraki, A., Seferiadis, K., Stebbing, J., and Bourantas, K.L. (2005). Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Br. J. Haematol.* 130, 709–715.

Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Yokochi, T., Chait, A., and Kannagi, R. (1983). Human erythroleukemia cell line (HEL) undergoes a drastic macrophage-like shift with TPA. *Blood* 62, 832–845.

Papp, K., Pariser, D., Catlin, M., Wierz, G., Ball, G., Akinlade, B., Zeiher, B., and Krueger, J.G. (2015). A phase 2a randomized, double-blind, placebo-controlled, sequential dose-escalation study to evaluate the efficacy and safety of ASP015K, a novel Janus kinase inhibitor, in patients with moderate-to-severe psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 173, 767–776.

Parampalli Yajnanarayana, S., Stübiger, T., Cornez, I., Alchalby, H., Schönberg, K., Rudolph, J., Triviai, I., Wolschke, C., Heine, A., Brossart, P., et al. (2015). JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms. *Br. J. Haematol.* 169, 824–833.

Park, J.S., Hong, M.H., Chun, Y.J., Kim, H.R., and Cho, B.C. (2019). A phase Ib study of the combination of afatinib and ruxolitinib in EGFR mutant NSCLC with progression on EGFR-TKIs. *Lung Cancer Amst. Neth.* 134, 46–51.

Passamonti, F., Griesshammer, M., Palandri, F., Egyed, M., Benevolo, G., Devos, T., Callum, J., Vannucchi, A.M., Sivgin, S., Bensasson, C., et al. (2017). Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet Oncol.* 18, 88–99.

Patel, M.R., Dash, A., Jacobson, B.A., Ji, Y., Baumann, D., Ismail, K., and Kratzke, R.A. (2019). JAK/STAT inhibition with ruxolitinib enhances oncolytic virotherapy in non-small cell lung cancer models. *Cancer Gene Ther.*

Pepys, M.B., and Hirschfield, G.M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* 111, 1805–1812.

Phan, K., and Sebaratnam, D.F. (2019). JAK inhibitors for alopecia areata: a systematic review and meta-analysis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV.*

Pieri, L., Paoli, C., Arena, U., Marra, F., Mori, F., Zucchini, M., Colagrande, S., Castellani, A., Masciulli, A., Rosti, V., et al. (2017). Safety and efficacy of ruxolitinib in splanchnic vein thrombosis associated with myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol.* 92, 187–195.

Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 375.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282, 2085–2088.

Pranada, A.L., Metz, S., Herrmann, A., Heinrich, P.C., and Müller-Newen, G. (2004). Real Time Analysis of STAT3 Nucleocytoplasmic Shuttling. *J. Biol. Chem.* 279, 15114–15123.

Punwani, N., Burn, T., Scherle, P., Flores, R., Shi, J., Collier, P., Hertel, D., Haley, P., Lo, Y., Waeltz, P., et al. (2015). Downmodulation of key inflammatory cell markers with a topical Janus kinase 1/2 inhibitor. *Br. J. Dermatol.* *173*, 989–997.

Quintás-Cardama, A., Vaddi, K., Liu, P., Manshour, T., Li, J., Scherle, P.A., Calder, E., Wen, X., Li, Y., Waeltz, P., et al. (2010). Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* *115*, 3109–3117.

Reich, N.C. (2013). STATs get their move on. *JAK-STAT* *2*.

Ren, K., and Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res. Rev.* *60*, 57–64.

Ridker Paul M (2003). Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation* *107*, 363–369.

Rose-John, S. (2017). The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced Therapeutic Options in Inflammation. *Clin. Pharmacol. Ther.* *102*, 591–598.

Rothstein, B., Joshipura, D., Saraiya, A., Abdat, R., Ashkar, H., Turkowski, Y., Sheth, V., Huang, V., Au, S.C., Kachuk, C., et al. (2017). Treatment of vitiligo with the topical Janus kinase inhibitor ruxolitinib. *J. Am. Acad. Dermatol.* *76*, 1054-1060.e1.

Rowe, D.C., McGettrick, A.F., Latz, E., Monks, B.G., Gay, N.J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A., and Golenbock, D.T. (2006). The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6299–6304.

Rubin, K., Janefeldt, A., Andersson, L., Berke, Z., Grime, K., and Andersson, T.B. (2015). HepaRG Cells as Human-Relevant In Vitro Model to Study the Effects of Inflammatory Stimuli on Cytochrome P450 Isoenzymes. *Drug Metab. Dispos.* *43*, 119–125.

Rudolph, J., Heine, A., Quast, T., Kolanus, W., Trebicka, J., Brossart, P., and Wolf, D. (2016). The JAK inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell migration via off-target inhibition of ROCK. *Leukemia* *30*, 2119–2123.

Samuelson, B., Vesely, S., Chai-Adisaksopha, C., Scott, B., Crowther, M., and Garcia, D. (2016). The impact of ruxolitinib on thrombosis in patients with polycythemia vera and myelofibrosis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* *27*, 648–652.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1813*, 878–888.

Schett, G. (2018). Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology* *57*, ii43–ii50.

Schmitt, C., Kuhn, B., Zhang, X., Kivitz, A.J., and Grange, S. (2011). Disease–Drug–Drug Interaction Involving Tocilizumab and Simvastatin in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Clin. Pharmacol. Ther.* *89*, 735–740.

Schönberg, K., Rudolph, J., Vonnahme, M., Yajnanarayana, S.P., Cornez, I., Hejazi, M., Manser, A.R., Uhrberg, M., Verbeek, W., Koschmieder, S., et al. (2015). JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Res.* *75*, 2187–2199.

Seo, J., Kim, M.W., Bae, K.-H., Lee, S.C., Song, J., and Lee, E.-W. (2019). The roles of ubiquitination in extrinsic cell death pathways and its implications for therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* *162*, 21–40.

Shaker, M.E., Hazem, S.H., and Ashamalla, S.A. (2016). Inhibition of the JAK/STAT pathway by ruxolitinib ameliorates thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* *96*, 290–301.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6425–6440.

Sharifnia, T., Antoun, J., Verriere, T.G.C., Suarez, G., Wattacheril, J., Wilson, K.T., Peek, R.M., Abumrad, N.N., and Flynn, C.R. (2015). Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* *309*, G270–G278.

Shi, J.-H., and Sun, S.-C. (2018). Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Front. Immunol.* *9*.

Shi, J.G., Chen, X., McGee, R.F., Landman, R.R., Emm, T., Lo, Y., Scherle, P.A., Punwani, N.G., Williams, W.V., and Yeleswaram, S. (2011). The Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of Orally Dosed INCB018424 Phosphate in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* *51*, 1644–1654.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* *189*, 1777–1782.

Shuai, K., and Liu, B. (2003). Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 900–911.

Sims, J.E., and Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 89–102.

Smolen, J.S., Schoels, M.M., Nishimoto, N., Breedveld, F.C., Burmester, G.R., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Gabay, C., Gibofsky, A., et al. (2013). Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann. Rheum. Dis.* *72*, 482–492.

Sproston, N.R., and Ashworth, J.J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front. Immunol.* *9*.

Sridhar, J., Goyal, N., Liu, J., and Foroozesh, M. (2017). Review of Ligand Specificity Factors for CYP1A Subfamily Enzymes from Molecular Modeling Studies Reported to-Date. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* *22*.

Stivala, S., Codilupi, T., Brkic, S., Baerenwaldt, A., Ghosh, N., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Dettmer, M.S., Simillion, C., Kaufmann, B.A., et al. (2019). Targeting compensatory MEK/ERK activation increases JAK inhibitor efficacy in myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Invest.* *130*, 1596–1611.

Stover, D.G., Gil Del Alcazar, C.R., Brock, J., Guo, H., Overmoyer, B., Balko, J., Xu, Q., Bardia, A., Tolaney, S.M., Gelman, R., et al. (2018). Phase II study of ruxolitinib, a selective JAK1/2 inhibitor, in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer* *4*.

- Szabo, G., Bala, S., Petrasek, J., and Gattu, A. (2011). Gut-Liver Axis and Sensing Microbes. *Dig. Dis. Basel Switz.* 28, 737–744.
- Tanaka, T., and Kishimoto, T. (2014). The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol. Res.* 2, 288–294.
- Tang, P., Hung, M.-C., and Klostergaard, J. (1996). Human pro-Tumor Necrosis Factor Is a Homotrimer. *Biochemistry* 35, 8216–8225.
- Tefferi, A., Vaidya, R., Caramazza, D., Finke, C., Lasho, T., and Pardanani, A. (2011). Circulating Interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 Levels Are Independently Prognostic in Primary Myelofibrosis: A Comprehensive Cytokine Profiling Study. *J. Clin. Oncol.* 29, 1356–1363.
- Telliez, J.-B. (2016). Janus Kinase Inhibitors. In *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*, M. Parnham, ed. (Basel: Springer Basel), pp. 1–5.
- The International Transporter Consortium (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 215–236.
- Tobias, P.S., Soldau, K., and Ulevitch, R.J. (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164, 777–793.
- Trial, J., Potempa, L.A., and Entman, M.L. (2016). The role of C-reactive protein in innate and acquired inflammation: new perspectives. *Inflamm. Cell Signal.* 3.
- Vaidya, R., Gangat, N., Jimma, T., Finke, C.M., Lasho, T.L., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2012). Plasma cytokines in polycythemia vera: Phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *Am. J. Hematol.* 87, 1003–1005.
- Vannucchi, A.M. (2015). Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 372, 1670–1671.
- Vee, M.L., Lecureur, V., Stieger, B., and Fardel, O. (2009). Regulation of Drug Transporter Expression in Human Hepatocytes Exposed to the Proinflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor- α or Interleukin-6. *Drug Metab. Dispos.* 37, 685–693.
- Verma, S., and Yeh, E.T.H. (2003). C-reactive protein and atherothrombosis--beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R1253-1256; discussion R1257-1258.
- Verstovsek, S., Kantarjian, H., Mesa, R.A., Pardanani, A.D., Cortes-Franco, J., Thomas, D.A., Estrov, Z., Fridman, J.S., Bradley, E.C., Erickson-Viitanen, S., et al. (2010). Safety and Efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 Inhibitor, in Myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 363, 1117–1127.
- Verstovsek, S., Mesa, R.A., Gotlib, J., Levy, R.S., Gupta, V., DiPersio, J.F., Catalano, J.V., Deininger, M., Miller, C., Silver, R.T., et al. (2012). A Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 366, 799–807.
- Verstovsek, S., Vannucchi, A.M., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C.N., Pane, F., Zachee, P., Kirito, K., et al. (2016). Ruxolitinib versus best available therapy in patients with polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. *Haematologica* 101, 821–829.
- Verstovsek, S., Mesa, R.A., Gotlib, J., Gupta, V., DiPersio, J.F., Catalano, J.V., Deininger, M.W.N., Miller, C.B., Silver, R.T., Talpaz, M., et al. (2017). Long-term treatment with ruxolitinib

for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *10*.

Vicent, M.G., Molina, B., Pablo, J.G. de, Castillo, A., and Díaz, M.Á. (2019). Ruxolitinib treatment for steroid refractory acute and chronic graft vs host disease in children: Clinical and immunological results. *Am. J. Hematol.* *94*, 319–326.

Visintin, A., Mazzone, A., Spitzer, J.A., and Segal, D.M. (2001). Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12156.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J., and Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* *412*, 346.

Weerd, N.A. de, Samarajiwa, S.A., and Hertzog, P.J. (2007). Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. *J. Biol. Chem.* *282*, 20053–20057.

Wright, S.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Ramos, R.A. (1989). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* *170*, 1231–1241.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* *249*, 1431–1433.

Yu, L., Wang, L., and Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 2592–2603.

Zanger, U.M., and Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* *138*, 103–141.

Zeiser, R., Burchert, A., Lengerke, C., Verbeek, M., Maas-Bauer, K., Metzelder, S.K., Spoerl, S., Ditschkowski, M., Ecsedi, M., Sockel, K., et al. (2015). Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multi-center survey. *Leukemia* *29*, 2062–2068.

Zhang, D., Sun, M., Samols, D., and Kushner, I. (1996). STAT3 Participates in Transcriptional Activation of the C-reactive Protein Gene by Interleukin-6. *J. Biol. Chem.* *271*, 9503–9509.

Zhang, Y., Liang, R., Chen, C.-W., Mallano, T., Dees, C., Distler, A., Reich, A., Bergmann, C., Ramming, A., Gelse, K., et al. (2017). JAK1-dependent transphosphorylation of JAK2 limits the antifibrotic effects of selective JAK2 inhibitors on long-term treatment. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 1467–1475.

Zhou, T., Georgeon, S., Moser, R., Moore, D.J., Caflich, A., and Hantschel, O. (2014). Specificity and mechanism-of-action of the JAK2 tyrosine kinase inhibitors ruxolitinib and SAR302503 (TG101348). *Leukemia* *28*, 404–407.

Zhuang, Y., de Vries, D.E., Xu, Z., Marciniak, S.J., Chen, D., Leon, F., Davis, H.M., and Zhou, H. (2015). Evaluation of disease-mediated therapeutic protein-drug interactions between an anti-interleukin-6 monoclonal antibody (sirukumab) and cytochrome P450 activities in a phase 1 study in patients with rheumatoid arthritis using a cocktail approach. *J. Clin. Pharmacol.* *55*, 1386–1394.

Activités scientifiques et enseignement

Publications

- 1 – **Febvre-James M**, Lecureur V, Fardel O; 2019; *The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib represses LPS-mediated expression of acute phase proteins in cultured human hepatocytes*; Inflammation Research
- 2 – **Febvre-James M**, Bruyère A, Le Vée M, Fardel O; 2018; *The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib reverses interleukin-6-mediated suppression of drug detoxifying proteins in cultured human hepatocytes*; Drug, Metabolism and Disposition
- 3 – Mayati A, Moreau A, Jouan E, **Febvre-James M**, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O; 2018; *Functional expression and regulation of nucleoside transporters in human hepatoma HepaRG cells*; Toxicology in Vitro
- 4 – **Febvre-James M**, Lecureur V, Augagneur Y, Mayati A, Fardel O; 2017; *Repression of interferon β -regulated cytokines by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human macrophages*; International Immunopharmacology

Communications :

- 1 – *The JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Reverses Interleukin-6 Mediated Suppression of Drug-Detoxifying Proteins in Cultured Human Hepatocytes* – **Poster** - 9^{ème} Journée Recherche - 16 Janvier 2019 et Journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé 2018 – 12 et 13 Décembre 2018 – Rennes
- 2 – *Modulation of inflammation-related repression of drug detoxifying proteins by drugs and therapeutic proteins: towards inflammatory disease-related drug-drug interactions (id-DDI)* – **Oral** – Conférence interne GSK - Rennes - 6 Mars 2018
- 3 – *Repression of interferon β -regulated cytokines by the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory human macrophages* – **Poster** – 8^{ème} Journée Recherche - 17 Janvier 2018 – Rennes
- 4 – *Le médicament anticancéreux ruxolitinib, inhibiteur de la voie de signalisation JAK, bloque la production de cytokines inflammatoires interféron-dépendantes dans le macrophage humain* – **Oral** - 11^{èmes} Journées du Cancéropôle Grand-Ouest - Vannes - 30 Juin 2017

Formations

- 1 – « Microscopie confocale SP8 » - 12 Février 2019 – Rennes
- 2 – « Communication Scientifique Orale et Visuelle » - 03 Octobre 2018 – Rennes
- 3 – « Ethique et intégrité de la recherche » - 01 Mars 2017 – Rennes

3 – « Prévention, Risque incendie, biologique et chimique » - 09 Novembre 2016 – Rennes

4 – « Manipulation des sources radioactives non scellées » - 09 Novembre 2016 – Rennes

Enseignement :

Missions d'enseignement (total de 105h) :

1 – *UE Histologie* – IUT 1ere année – Université Clermont Auvergne - **27h TP** - Semestre 2 2018

2 – *UE Microenvironnement Cellulaire Normal et Pathologique* – Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire – Université de Rennes 1 - **1h30 CM** (en anglais) - Semestre 1 2018, **1h CM** (en anglais) - Semestre 1 2017

3 – *UE Cycle cellulaire, apoptose et vieillissement* – Licence 3 Biologie Cellulaire, Génétique, Microbiologie, Physiologie animale – Université de Rennes 1 - **28h TP** (dont 22h en anglais) - Semestre 1 2017, **24h TP** - Semestre 1 2016

4 – *UE Organisation fonctionnelle de la cellule* – Licence 2 Sciences Moléculaires et Cellulaires – Université de Rennes 1 - **12h TP** - Semestre 1 2017, **12h TP** - Semestre 1 2016

Encadrement stagiaires :

2 stagiaires de 2 mois chacune (encadrement pratique, ainsi que pour la rédaction des rapports et préparation de oraux)

Autres activités

1 - Présentation des résultats au cours de réunions de travail dans le cadre du projet HII-GO - Cancéropôle Grand-Ouest – Nantes – 31 Mars 2016 et 8 Juin 2017 + 2 Visioconférences (28 Juin 2016 et 19 Janvier 2017)

2 - Participation aux Journées Portes Ouvertes de l'Université de Rennes 1 en 2016 et 2017 - Organisation des visites des salles de TP

Titre : Effets régulateurs du ruxolitinib sur l'expression de marqueurs de l'inflammation et de protéines de détoxication des médicaments.

Mots clés : ruxolitinib – inflammation – macrophage – cytokine – hépatocyte – CRP - détoxication

Résumé : Le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2, est actuellement utilisé pour le traitement des syndromes myéloprolifératifs et montre des propriétés anti-inflammatoires. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de ses effets restent peu élucidés. Au travers de ces travaux, les effets régulateurs du ruxolitinib sur l'expression de marqueurs de l'inflammation et de protéines de détoxication des médicaments ont été évalués *in vitro* dans différents types cellulaires. Dans les macrophages humains en culture primaire, le ruxolitinib réprime l'expression de cytokines inflammatoires secondairement induites par la signalisation de l'IFN β , en réponse au LPS. Similairement, le ruxolitinib inhibe l'expression de protéines de la phase aiguë induites dans les hépatocytes humains en culture primaire et la lignée cellulaire HepaRG.

Cet inhibiteur réprime notamment l'expression de la CRP secondairement induite par la signalisation IL6, en réponse au LPS. Aussi, il permet de restaurer l'expression et l'activité de protéines hépatique de détoxication des médicaments réprimées par un stimulus inflammatoire. Dans l'ensemble de ces études, le ruxolitinib montre une efficacité à des concentrations atteintes chez les patients. Ces travaux montrent tout d'abord que par ses propriétés anti-inflammatoires retrouvées dans différents modèles, le ruxolitinib pourrait se montrer intéressant pour le traitement d'un large panel de pathologies inflammatoires. De plus, son utilisation en clinique pourrait nécessiter d'adapter les doses de médicaments associés dont le métabolisme est susceptible d'être modulé par une diminution de l'inflammation par cet inhibiteur de JAK.

Title : Regulatory effects of ruxolitinib on the expression of inflammatory markers and drug-detoxifying proteins.

Keywords : ruxolitinib – inflammation – macrophage – cytokine – hepatocyte – CRP – detoxication

Abstract : Ruxolitinib is a Janus kinase (JAK) 1/2 inhibitor currently used for the treatment of myeloproliferative neoplasms. It shows anti-inflammatory properties, but the involved molecular and cellular mechanisms remain poorly understood. The regulatory effects of ruxolitinib on the expression of inflammatory markers and drug-detoxifying proteins were investigated in different cellular models through these studies. In human macrophages, ruxolitinib represses the expression of inflammatory cytokines secondarily induced by the IFN β signalling pathway, in response to LPS. Similarly, ruxolitinib inhibits the expression of acute phase proteins induced in human hepatocytes and in the HepaRG cell line. It also notably represses the expression of CRP secondarily induced by

the IL6 signalling pathway, in response to LPS. Moreover, ruxolitinib restores the expression and activity of hepatic drug-detoxifying proteins inhibited in inflammatory conditions. In these studies, ruxolitinib is shown to be efficient at concentrations which can be reached in patients. Altogether, these results show that, firstly, as its anti-inflammatory properties are shown throughout different cellular models, ruxolitinib could be interesting for the treatment of various inflammatory pathologies. Also, clinical use could restore hepatic detoxification capacity for patients suffering from inflammatory diseases and therefor require dose adjustments for associated drugs which metabolism could be regulated by inflammation.