

Université de Montréal

**Développement de nouvelles immunothérapies pour le  
traitement de la lymphohistiocytose hémophagocytaire  
(HLH) à l'aide d'un modèle murin**

par

Josée-Anne Joly

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)  
en Microbiologie et Immunologie

Août 2019

© Josée-Anne Joly, 2019

Université de Montréal  
Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Développement de nouvelles immunothérapies pour le traitement de la lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH) à l'aide d'un modèle murin**

Présenté par  
Josée-Anne Joly

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Sébastien Delisle  
*Président-rapporteur*

Dre Hélène Decaluwe  
*Directrice de recherche*

Dre Nathalie Labrecque  
*Membre du jury*

# Résumé

La lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH) est une maladie hyper-inflammatoire rare, mais potentiellement mortelle affectant surtout les jeunes enfants. Il existe deux formes de HLH : primaire et secondaire. La HLH primaire est causée par une mutation des gènes impliqués dans la voie cytotoxique médiée par les granules, alors que la HLH secondaire se développe en raison d'une condition préexistante, telle qu'un cancer, une infection chronique ou une transplantation. La HLH est caractérisée par le développement d'inflammation extrême, une production excessive de cytokines inflammatoires ainsi qu'une infiltration tissulaire massive par des lymphocytes T et des macrophages activés. À ce jour, le traitement de la HLH consiste d'abord à réduire l'inflammation à l'aide d'agents de chimiothérapie hautement toxiques et de corticostéroïdes, puis à procéder à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) chez les patients atteints de HLH primaire, le seul traitement disponible permettant la rémission de ces patients. Toutefois, les thérapies actuelles ne parviennent pas toujours à réduire l'inflammation extrême chez plusieurs patients atteints de HLH, si bien que le taux de mortalité avant la transplantation de CSH est toujours d'environ 20% à 25%. C'est pourquoi le développement de nouveaux traitements anti-inflammatoires, plus efficaces, représenterait une avancée majeure dans le traitement de la HLH.

Des études dans des modèles murins avaient déjà démontré que l'utilisation d'anticorps bloquants ciblant l'IFN $\gamma$  (anti-IFN $\gamma$ ) ou de ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2 (« *janus activated kinases 1/2* »), pouvait améliorer efficacement, quoique partiellement, les manifestations de la HLH. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'utilisation d'une thérapie combinée ciblant des cytokines JAK-dépendantes et indépendantes serait plus efficace qu'une monothérapie pour diminuer les symptômes de la HLH. À l'aide d'un modèle murin déficient pour le gène de la perforine (PKO), nous avons comparé les effets de l'inhibition de l'IL-6 et de l'IL-18, deux cytokines fortement sécrétées dans la HLH, en combinaison avec soit de l'anti-IFN $\gamma$  ou du ruxolitinib. Nous avons aussi vérifié l'efficacité d'une thérapie combinée d'anti-IFN $\gamma$  et de ruxolitinib sur les manifestations de la HLH. Nos travaux ont montré que l'anti-IL-6R et l'anti-IL-18, lorsque combinés avec de l'anti-IFN $\gamma$  ou du ruxolitinib, amélioraient légèrement, mais pas de manière significative, les symptômes de la HLH. Par contre,

l'utilisation d'une thérapie combinant du ruxolitinib avec de l'anti-IFN $\gamma$  génèrait un important effet de synergie sur la résolution des symptômes. Notre étude démontre que l'anti-IFN $\gamma$  et le ruxolitinib, même s'ils sont efficaces par eux-mêmes, devraient être utilisés en combinaison afin de prévenir la progression de la HLH. Cette étude est particulièrement pertinente puisque l'anti-IFN $\gamma$  a récemment été approuvé par la FDA pour le traitement de la HLH tandis que le ruxolitinib est présentement à l'étude chez l'humain.

**Mots-clés :** Lymphohistiocytose hémophagocytaire, immunothérapie, hématologie, IFN $\gamma$ , ruxolitinib, thérapie combinée

# Abstract

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare, life-threatening hyper-inflammatory disease affecting mainly young children. There are two types of HLH : primary and secondary. Primary HLH is caused by defects in genes of the perforin-granzyme cytotoxic pathway, whereas secondary HLH develops following a pre-existing underlying condition, such as a cancer, a chronic infection or a transplantation. HLH is characterized by extreme inflammation, a very high secretion of inflammatory cytokines and a massive tissue infiltration by activated T cells and macrophages. Currently, treatment for HLH consists of reducing the inflammation with a course of highly toxic chemotherapy agents and corticosteroids, followed by hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for patients with primary HLH, which is the only available curative treatment for these patients. However, current therapies often fail to properly manage the extreme inflammation of HLH in many patients, so that the pre-HSCT fatality still stands around 20% to 25%. Thus, the development of new, more potent anti-inflammatory treatments would be a major advance in the treatment of HLH.

It had already been shown in relevant mouse models that blocking antibodies targeting  $\text{IFN}\gamma$  (anti- $\text{IFN}\gamma$ ) or ruxolitinib, a Janus activated kinase 1/2 (JAK1/2) inhibitor, could efficiently, but partially, improve the pathological manifestations of HLH. Thus, we hypothesized that combined therapies targeting both JAK-dependent and independent cytokines would be more effective than either one alone to reduce the symptoms of this pathology. Using a perforin knock-out (PKO) mouse model, we compared the effects of targeting IL-6 and IL-18, which are highly expressed cytokines during HLH, in combination with either anti- $\text{IFN}\gamma$  or ruxolitinib. We also tested the efficacy of a therapy combining anti- $\text{IFN}\gamma$  with ruxolitinib on the manifestations of HLH. We found that anti-IL-6R and anti-IL-18, when used in combination with either anti- $\text{IFN}\gamma$  or ruxolitinib, showed small, but not significant improvements on the pathological manifestations of HLH. However, combination therapy using ruxolitinib and anti- $\text{IFN}\gamma$  showed a major synergistic effect on the resolution of the symptoms of HLH. Our findings support that anti- $\text{IFN}\gamma$  and ruxolitinib, although effective independently, should be used in combination to suppress HLH progression. This is particularly relevant since the former was recently approved for treating HLH while the latter is in clinical trials.

**Keywords :** Hemophagocytic lymphohistiocytosis, immunotherapy, hematology, IFN $\gamma$ , ruxolitinib, combination therapy

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations et sigles.....	x
Remerciements.....	xiv
CHAPITRE 1: INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système immunitaire.....	1
1.1.1 Système immunitaire inné.....	1
1.1.1.1 Les cellules phagocytaires.....	2
1.1.1.2 Les cellules NK.....	2
1.1.2 Système immunitaire adaptatif.....	2
1.1.2.1 Les lymphocytes T.....	3
1.1.2.2 Les lymphocytes B.....	4
1.1.2.3 Les lymphocytes T auxiliaires.....	4
1.2 L'inflammation.....	5
1.2.1 La réponse inflammatoire.....	5
1.2.2 Les cytokines pro-inflammatoires.....	6
1.3 La réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	11
1.3.1 Mécanismes de la réponse cellulaire.....	11
1.3.1.1 La cytotoxicité.....	13

1.3.2 Régulation négative de la réponse à médiation cellulaire.....	16
1.3.3 Activation chronique : infections chroniques et cancers .....	17
1.4 La lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH).....	18
1.4.1 HLH primaire.....	19
1.4.1.1 Exocytose des granules cytotoxiques.....	21
1.4.2 HLH secondaire .....	22
1.4.3 Présentation clinique et diagnostic.....	23
1.4.4 Physiopathologie, cytokines et signalisation .....	24
1.4.5 Traitements actuels et pronostic.....	28
1.4.5.1 Historique.....	28
1.4.5.2 HLH-94.....	29
1.4.5.3 HLH-2004 .....	30
1.4.5.4 Emapalumab (GAMIFANT).....	31
1.4.6 Traitements expérimentaux.....	31
1.5 Modèles murins de HLH.....	32
1.5.1 Souris perforine « <i>knock-out</i> » (PKO).....	32
1.5.2 Autres modèles de HLH primaire .....	33
1.5.3 Modèles murins de HLH secondaire.....	34
1.6 Problématique, hypothèse et objectifs .....	34
CHAPITRE 2: RÉSULTATS .....	36
Article: JAK-dependent and independent cytokines drive the pathogenicity of HLH in a murine model: targets for combination therapy .....	36
CHAPITRE 3: DISCUSSION .....	70

3.1 Le ciblage de l'IFN $\gamma$ dans le traitement de la HLH .....	70
3.1.1 Thérapie combinée d'anti-IFN $\gamma$ et d'anti-IL-6R.....	71
3.1.2 Thérapie combinée d'anti-IFN $\gamma$ et d'anti-IL-18 .....	73
3.2 Le ruxolitinib pour le traitement de la HLH .....	74
3.2.1 Thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IL-18 .....	76
3.3 Ruxolitinib <i>versus</i> anti-IFN $\gamma$ : quel est plus efficace? .....	77
3.4 L'inhibition de l'IFN $\gamma$ à l'aide d'une thérapie combinée .....	78
CHAPITRE 4 : CONCLUSION .....	80
Bibliographie.....	81

# Liste des tableaux

<b>Table I</b> : Sécrétion, signalisation et impact biologique de quelques cytokines d'importance dans la réponse inflammatoire.....	8
<b>Table II</b> : Sécrétion, signalisation et interaction de quelques cytokines clés de la réponse à médiation cellulaire.....	12
<b>Table III</b> : Classification des sous-types de HLH primaire .....	20
<b>Table IV</b> : Critères de diagnostic de la HLH établis pour l'étude HLH-2004.....	24
<b>Table V</b> : Critères de diagnostic de la HLH établis pour l'étude HLH-94 .....	29

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Voie de signalisation NF- $\kappa$ B .....	7
<b>Figure 2</b> : Voies de signalisation JAK-STAT .....	9
<b>Figure 3</b> : Mécanismes d'induction de l'apoptose par les cellules cytotoxiques.....	15
<b>Figure 4</b> : Régulation négative de la présentation antigénique.....	17
<b>Figure 5</b> : Impact des mutations génétiques associées à la HLH primaire sur le processus d'exocytose des granules cytotoxiques.....	22
<b>Figure 6</b> : Dysfonction de la régulation négative de la présentation antigénique chez les patients atteints de HLH.....	25
<b>Figure 7</b> : Boucle de sécrétion cytokinique lors d'une réponse cellulaire telle que celle observée lors d'une HLH .....	27

## Liste des abréviations et sigles

AJIS :	Arthrite juvénile idiopathique systémique
Anti-IFN $\gamma$ :	Anticorps monoclonal contre l'IFN $\gamma$
Anti-IL-6R :	Anticorps monoclonal contre l'IL-6R
Anti-IL-18 :	Anticorps monoclonal contre l'IL-18
ATG :	« <i>Antithymocyte globulins</i> »
BCR :	« <i>B cell receptor</i> » (Récepteur des lymphocytes B)
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMHI :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMHII :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CPA :	Cellules présentatrices d'antigènes
CSH :	Cellules souches hématopoïétiques
CTL :	« <i>Cytotoxic T lymphocytes</i> » (Lymphocytes T cytotoxiques)
DAMP :	« <i>Damage associated molecular patterns</i> »
DC :	« <i>Dendritic cells</i> » (Cellules dendritiques)
EBV :	« <i>Epstein-Barr virus</i> » (Virus Epstein-Barr)
FADD :	« <i>Fas-associated death domain</i> »
FDA :	« <i>Food and Drug Administration</i> »

FHL :	« <i>Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis</i> » (Lymphohistiocytose hémophagocytaire familiale)
GM-CSF :	« <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> »
GVHD :	« <i>Graft versus host disease</i> » (Maladie du greffon contre l'hôte)
HLH :	« <i>Hemophagocytic lymphohistiocytosis</i> » (Lymphohistiocytose hémophagocytaire)
HSCT :	« <i>Hematopoietic stem cell transplantation</i> » (Transplantation de cellules souches hématopoïétiques)
IFN $\alpha$ :	Interféron-alpha
IFN $\beta$ :	Interféron-bêta
IFN $\gamma$ :	Interféron-gamma
IFNGR :	Récepteur de l'IFN $\gamma$
I $\kappa$ B $\alpha$ :	« <i>NF-<math>\kappa</math>B inhibitor alpha</i> »
IKK :	« <i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B kinase</i> »
IL :	Interleukine
IL-1R :	Récepteur à l'IL-1
IL-1RAP :	« <i>IL-1R accessory protein</i> »
IL-6R :	Récepteur à l'IL-6
IL-10R :	Récepteur à l'IL-10
IL-12R $\beta$ :	Récepteur à l'IL-12
IL-18BP :	« <i>IL-18 binding proteins</i> »
IL-18R :	Récepteur à l'IL-18

IRAK4 :	« <i>IL-1R-associated kinase 4</i> »
IRF-1 :	« <i>IFN regulatory factor 1</i> »
JAK :	« <i>Janus activated kinases</i> »
LCMV :	« <i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i> » (Virus de la chorioméningite lymphocytaire murine)
MAPK :	« <i>Mitogen-activated protein kinases</i> »
MAS :	« <i>Macrophage activation syndrome</i> » (Syndrome d'activation macrophagique)
MCMV :	« <i>Murine cytomegalovirus</i> » (Cytomégalovirus murin)
M-CSF :	« <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> »
MyD88 :	« <i>Myeloid differentiation primary primary response protein 88</i> »
NF-κB :	« <i>Nuclear factor kappa-B</i> »
NK :	« <i>Natural killer</i> »
PAMP :	« <i>Pathogen associated molecular patterns</i> »
PI3-kinase :	« <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> »
PKO :	« <i>Perforin knock-out</i> » (Perforine-déficient)
PRR :	« <i>Pattern recognition receptor</i> »
sCD25 :	Chaîne α soluble du récepteur à l'IL-2
SI :	Synapse immunologique
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC :	Système nerveux central

STAT :	« <i>Signal transducers and activators of transcription</i> »
T $\beta$ R :	Récepteur de TGF $\beta$
TCR :	« <i>T cell receptor</i> » (Récepteur des lymphocytes T)
T <sub>FH</sub> :	« <i>T follicular helper</i> » (Lymphocytes T auxiliaires folliculaires)
TGF $\beta$ :	« <i>Transforming growth factor beta</i> »
T <sub>H</sub> :	« <i>T helper</i> » (Lymphocytes T auxiliaires)
TLR :	« <i>Toll-like receptor</i> »
TNF $\alpha$ :	« <i>Tumor necrosis factor alpha</i> »
TNFR :	Récepteur de TNF
TRADD :	« <i>TNFR1-associated death domain protein</i> »
TRAF6 :	« <i>TNFR-associated factor 6</i> »
T <sub>regs</sub> :	Lymphocytes T régulateurs
VHC :	Virus de l'hépatite C
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
WT :	« <i>Wild-type</i> »

# Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche Dre Hélène Decaluwe, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour ma maîtrise, et de m'avoir offert l'opportunité de poursuivre l'aventure avec elle pour la suite. Un gros merci aussi pour son support et sa compréhension dans les périodes un peu plus difficiles, autant pour moi que pour le laboratoire, et pour avoir toujours su prendre mes commentaires parfois un peu trop spontan es avec humour.

J'aimerais également remercier mes (nombreux) collègues de laboratoire qui ont contribu es à rendre ces trois dernières années des plus agréables. Tout d'abord Sara Bourbonnais et Jean-Claude Beltra (Oups pardon! Jean-Christophe Beltra!), qui m'ont accueillie, formée et guidée pendant la première moitié de ma maîtrise, et qui ont su m'intégrer dans leur duo d'enfer. Puis Chloé Berthe, avec qui j'ai form e un super duo de demi-assistantes de recherche lorsqu'on s'est retrouvées toutes seules au laboratoire alors qu'Hélène venait d'accoucher. Je tiens aussi à remercier Alexis Vallée, qui m'a beaucoup aidée dans mes expériences, et aussi juste parce que tu es toi. L'ambiance ne serait pas pareille sans le bruit de fond de légumes croqu es qui te suit partout. J'aimerais aussi remercier tous les autres arriv es plus récemment dans l'équipe, Edward Kwarteng, Mitra Shourian (I'm saying thank you Mitra!), Clémence Ruisseaux et Beno te Bourdin. Ce fût un plaisir de travailler avec vous durant la fin de ma maîtrise, et nous aurons encore beaucoup d'occasions de travailler ensembles pour la suite. Aussi, un merci tout spécial à la « gang du 6 e », qui ont contribué à rendre l'ambiance générale des plus agréables, autant lors des activités et des sorties que des dîners de groupe.

Finalement, j'aimerais remercier toute ma famille et mes amis, pour leur soutien, leurs encouragements et leur intérêt par rapport à ce que je fais. Vous m'avez beaucoup aidée durant ces dernières années.

Merci!

# CHAPITRE 1: INTRODUCTION

## 1.1 Le système immunitaire

L'être humain vit dans un monde où les bactéries, les virus, les parasites et les champignons sont ubiquitaires. Même si la plupart de ces microorganismes sont non-pathogènes pour l'humain, certains, au contraire, sont à l'origine d'infections et de maladies parfois graves. Pour cette raison, le corps possède plusieurs moyens de prévenir ou de combattre une infection induite par des agents pathogènes. La première ligne de défense du système immunitaire est la réponse innée, qui consiste à empêcher les microorganismes de pénétrer à l'intérieur de l'organisme et à les combattre rapidement dès leur entrée, lorsque nécessaire. Celle-ci est plus tard suivie par la réponse immunitaire adaptative, plus spécifique, qui permet de générer une mémoire immunologique à long terme afin d'induire une réponse plus rapide dans le cas d'une future exposition au même pathogène. Les systèmes inné et adaptatif collaborent étroitement à l'élimination des pathogènes, tout en évitant d'agresser les cellules de l'organisme qu'ils protègent. En raison de la complexité des mécanismes impliqués, une infime dérégulation au niveau de ceux-ci peut mener au développement de maladies auto-immunes.

### 1.1.1 Système immunitaire inné

Le système immunitaire inné, entièrement fonctionnel dès la naissance, est la première barrière du système immunitaire à laquelle sont confrontés les microorganismes. Celui-ci comprend les barrières physiques, les phagocytes et les cellules NK (« *natural killer* »). Le premier système de défense, et le plus simple, est une barrière physique englobant toutes les surfaces du corps potentiellement en contact avec l'extérieur, dont la plus importante est la peau, qui isole l'intérieur de notre corps du monde extérieur. Les muqueuses externes et internes ainsi que les sécrétions et le mucus agissent aussi en tant que barrières physiques visant à prévenir l'entrée de microorganismes à l'intérieur du corps. Lorsque l'intégrité de l'une de ces barrières est compromise, ou en cas de défaillance de celles-ci, les phagocytes et les cellules NK prennent le relais en générant une réponse rapide et non-spécifique au pathogène impliqué [1, 2].

### **1.1.1.1 Les cellules phagocytaires**

Lors de la réponse innée, les cellules phagocytaires jouent un rôle très important dans la destruction des agents pathogènes et effectuent la liaison entre le système immunitaire inné et adaptatif. Ces cellules comprennent les macrophages, les cellules dendritiques (DC), les neutrophiles et les monocytes. Les microorganismes qui pénètrent dans l'organisme sont reconnus par certains phagocytes résidants dans les tissus via la liaison des PAMP (« *pathogen associated molecular patterns* ») exprimés par les microorganismes aux PRR (« *pattern recognition receptor* ») à la surface des cellules phagocytaires. Celles-ci absorbent et dégradent ensuite les microorganismes via un processus appelé la phagocytose. Les macrophages ainsi activés produisent aussi des cytokines et des chimiokines, qui induisent un recrutement massif d'autres cellules phagocytaires au site d'intrusion, initiant un processus que l'on appelle la réponse inflammatoire. Cette réaction, en plus de permettre la destruction des pathogènes grâce à la phagocytose, permet aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA), principalement les macrophages et les DC, d'activer la réponse immunitaire adaptative par la présentation de peptides du pathogène dégradé aux lymphocytes T et B [1, 2].

### **1.1.1.2 Les cellules NK**

Les phagocytes reconnaissent les microorganismes principalement à l'aide de récepteurs qui sont exprimés sur ceux-ci, ce qui en font une défense peu efficace contre les agents pathogènes intracellulaires, comme les virus. Les cellules NK, en revanche, sont spécialisées dans la reconnaissance et l'élimination des cellules de l'organisme dont l'expression des éléments membranaires est altérée, comme c'est le cas lors d'une infection virale. Pour la même raison, les NK jouent aussi un rôle important dans l'élimination des cellules tumorales. Les NK éliminent les cellules infectées ou anormales en générant une réponse cytotoxique qui induit l'apoptose des cellules cibles [1, 2].

## **1.1.2 Système immunitaire adaptatif**

Le système immunitaire adaptatif, ou acquis, comprend les lymphocytes T et B. La réponse adaptative est initiée suite à la réponse innée, lorsque les CPA migrent des tissus vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs. La réponse

adaptative permet d'amplifier la réponse innée en générant des cellules effectrices, de produire des anticorps spécifiques au pathogène impliqué et de générer une mémoire immunitaire qui permettra de réagir plus rapidement et efficacement lors d'une réinfection par le même pathogène. Le principe de la vaccination est d'ailleurs d'initier une réponse adaptative spécifique au pathogène contre lequel on veut protéger l'individu afin de générer une mémoire immunitaire à long terme contre celui-ci, qui permettra une réponse efficace du système immunitaire en cas d'infection.

### **1.1.2.1 Les lymphocytes T**

L'activation et la prolifération des lymphocytes T est induite à l'aide de trois signaux indispensables. Le premier signal est fourni par l'interaction du TCR (« *T cell receptor* ») spécifique à l'antigène et des corécepteurs (CD4 ou CD8) avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), exprimé à la surface des CPA, qui contient le peptide antigénique. La liaison des molécules de costimulation CD80 et CD86 à la surface des CPA avec CD28, à la surface du lymphocyte constitue le deuxième signal. L'absence du signal de costimulation induit l'anergie du lymphocyte. Finalement, les cytokines sécrétées par les CPA activées constituent le troisième signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T, et permettent d'orienter le type de réponse immunitaire vers la réponse la mieux adaptée contre le pathogène impliqué. Il existe deux types de lymphocytes T qui sont responsables de l'immunité dite cellulaire, les CD8<sup>+</sup> et les CD4<sup>+</sup>.

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reconnaissent les antigènes intracellulaires présentés par les CPA via le CMH de classe I (CMHI). Lorsqu'activés, ceux-ci prolifèrent et peuvent éliminer les cellules infectées en induisant l'apoptose de ces cellules à l'aide d'une réponse cytotoxique, venant ainsi soutenir l'action des cellules NK. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont appelés lymphocytes T cytotoxiques (CTL) après leur activation. Lorsque le pathogène est éliminé, la plupart de ces cellules, devenues inutiles, meurent par apoptose. Toutefois, une petite proportion de ces cellules survit pour devenir des cellules T mémoires, qui permettront une différenciation plus rapide en CTL et une réponse plus efficace lors d'une éventuelle réinfection.

Pour leur part, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, aussi nommés lymphocytes T auxiliaires (T<sub>H</sub>), reconnaissent les antigènes extracellulaires présentés par le CMH de classe II (CMHII). Les

lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés participent à l'activation des CTL et des lymphocytes B. En fonction des cytokines sécrétées par les cellules du système immunitaire inné et de la réponse requise pour éliminer le pathogène, les cellules T CD4<sup>+</sup> subiront une différenciation en T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub>, T régulateurs (T<sub>regs</sub>) ou T auxiliaires folliculaires (T<sub>FH</sub>). Chacun de ces phénotypes de T<sub>H</sub> modulera la réponse immunitaire de manière à optimiser son efficacité. Une partie de ces cellules, au lieu de se différencier en T<sub>H</sub>, deviendront plutôt des cellules mémoires spécifiques au pathogène impliqué afin de favoriser une réponse plus rapide et efficace en cas de réinfection [1-3].

### 1.1.2.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B participent à l'immunité dite humorale. Ceux-ci peuvent être activés sans l'aide du CMH, par l'interaction de leur BCR (« *B cell receptor* ») avec leur antigène spécifique. Le peptide antigénique est ensuite dégradé par les lymphocytes B et présenté aux T<sub>H</sub> afin qu'ils induisent la différenciation des lymphocytes B en cellules mémoires ou en plasmocytes. Les plasmocytes sécrètent des anticorps spécifiques à différents antigènes, qui peuvent être divisés en plusieurs classes fonctionnelles, soit les IgM, les IgD, les IgG, les IgA et les IgE. Chacune de ces classes d'anticorps est spécifique au contexte inflammatoire et sera produite en réponse aux cytokines sécrétées par les T<sub>H</sub>. Les plasmocytes produisent d'abord des IgM, puis pourront par la suite produire les autres classes d'anticorps suite au processus de la commutation de classe [1, 2].

### 1.1.2.3 Les lymphocytes T auxiliaires

Tel que mentionné précédemment, les cytokines sécrétées par les CPA et le contexte de l'infection induisent le développement de différents phénotypes de T<sub>H</sub>, notamment les phénotypes T<sub>H1</sub> et T<sub>H2</sub>. Selon leur phénotype, les T<sub>H</sub> produiront diverses cytokines permettant d'activer les cellules appropriées et d'engendrer une réponse immunitaire adaptée au type de pathogène.

Le phénotype T<sub>H1</sub> est favorisé en présence d'interleukine-12 (IL-12), d'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ) et d'IL-18, comme c'est le cas lors d'une infection virale ou bactérienne par un pathogène intracellulaire. Les T<sub>H1</sub> sécrètent principalement de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF $\alpha$  (« *tumor necrosis factor alpha* »), et favorisent l'immunité cellulaire en induisant l'activation

des CTL, des macrophages et des cellules NK. La réponse  $T_H1$  sera décrite de manière plus approfondie dans la section 1.3 [1, 2, 4].

En présence d'IL-4, c'est le phénotype  $T_H2$  qui est plutôt favorisé, typiquement lors d'une infection par un pathogène extracellulaire (helminthes, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, nématodes). En sécrétant de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10 et de l'IL-13, les  $T_H2$  favorisent l'immunité humorale en médiant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes.

Finalement, il existe aussi trois autres phénotypes de  $T_H$  importants à la réponse immunitaire, les  $T_H17$ , les  $T_{regs}$  et les  $T_{FH}$ . Le phénotype  $T_H17$  est induit en présence de TGF $\beta$  (« *transforming growth factor beta* ») et d'IL-6. Ces cellules, surtout associées à la réaction d'inflammation, sécrètent de l'IL-17. Elles seraient d'ailleurs associées à plusieurs maladies auto-immunes. Le phénotype  $T_{regs}$ , quant à lui, est induit lorsqu'une régulation, ou une atténuation de la réponse immunitaire, est nécessaire. Les  $T_{regs}$ , par la sécrétion de TGF $\beta$  et d'IL-10, permettent l'atténuation de la réponse immunitaire face à des cellules auto réactives ou suite à la résolution d'une infection. Les  $T_{regs}$  ont donc un rôle protecteur contre l'auto-immunité et les réponses immunitaires exagérées. Finalement, les  $T_{FH}$  sont favorisées en présence d'IL-6 et d'IL-21. Ces cellules, situées dans les centres germinatifs, jouent un rôle similaire à celui des  $T_H2$  en favorisant l'immunité humorale. Les  $T_{FH}$  sécrètent plusieurs cytokines, dont l'IL-4, l'IL-21 et l'IFN $\gamma$  [1, 2].

## 1.2 L'inflammation

### 1.2.1 La réponse inflammatoire

Lorsque les barrières immunitaires innées sont franchies par un pathogène ou à la suite d'une blessure au niveau de la peau ou des muqueuses, la réponse inflammatoire est le premier processus impliqué au niveau local pour éliminer les pathogènes ou les cellules endommagées au site d'intrusion. Normalement, l'inflammation est résolue lorsque la menace est éliminée. Toutefois, celle-ci peut dans certains cas devenir chronique ou systémique et provoquer de graves dommages à l'hôte ou des maladies inflammatoires.

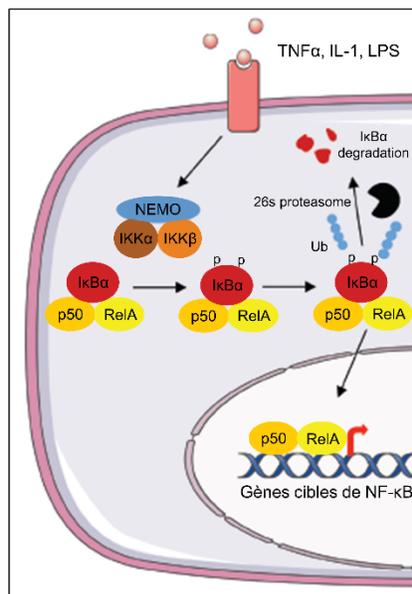
D'abord, suite à l'activation de leurs PRR par les PAMP ou les DAMP (« *damage associated molecular patterns* »), les cellules phagocytaires résidentes dans les tissus phagocytent les pathogènes, les débris et les cellules endommagées au site d'intrusion, puis sécrètent des cytokines, des chimiokines et d'autres molécules médiatrices qui induiront, entre autres, une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins dans la région affectée. Cet afflux de sang et de fluide se produit très rapidement après la défaillance des barrières innées et cause une rougeur, une sensation de chaleur ainsi qu'un œdème des tissus, souvent accompagnés de douleur. L'importance des symptômes de la réponse inflammatoire est corrélée avec la sévérité de l'insulte, et ceux-ci peuvent parfois prendre une ampleur impressionnante et devenir très inconfortables pour l'hôte.

Peu après, de nombreuses cellules phagocytaires activées et recrutées par les médiateurs sécrétés par les phagocytes des tissus s'infiltreront au site infecté ou endommagé via la circulation sanguine. Celles-ci participent à l'élimination des pathogènes ou des cellules endommagées par phagocytose, puis sécrètent à leur tour des cytokines et des chimiokines afin d'amplifier la réponse inflammatoire. Ce processus permet aussi l'activation de la réponse immunitaire adaptative grâce aux CPA [2].

### **1.2.2 Les cytokines pro-inflammatoires**

Les cytokines jouent un rôle clé dans de nombreux processus de l'immunité. Elles sont sécrétées par une variété de cellules du système immunitaire et peuvent recruter des cellules effectrices, induire l'inflammation, moduler la différenciation des différents effecteurs de la réponse innée et adaptative, aider au développement des précurseurs des cellules immunitaires, jouer un rôle protecteur au niveau de l'organisme ou même induire des effets systémiques nocifs pour l'hôte lorsque leur sécrétion est dérégulée. Même si elles peuvent avoir plusieurs rôles, certaines d'entre elles, les cytokines pro-inflammatoires, sont particulièrement spécifiques à la réponse inflammatoire. L'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF $\alpha$  sont les trois cytokines les plus couramment associées à la réponse inflammatoire. Toutefois, l'IL-17, l'IL-18, l'IL-23 et l'IL-33, entre autres, sont aussi connues pour leurs effets pro-inflammatoires [2, 5, 6]. Chacune de ces cytokines induit une série d'événements qui leur est propre.

L'IL-1 $\beta$  est principalement sécrétée par les monocytes et les macrophages en réponse à des dommages cellulaires ou une infection. Une fois sécrétée, elle se lie à une première sous-unité de son récepteur, l'IL-1R1, dont l'expression est ubiquitaire dans les cellules du système immunitaire, induisant le recrutement d'une seconde unité, l'IL-1RAP (« *IL-1R accessory protein* »). La dimérisation de ces deux sous-unités induit le recrutement à la membrane de plusieurs protéines, telles que MyD88 (« *myeloid differentiation primary response protein 88* »), IRAK4 (« *IL-1R-associated kinase 4* ») et TRAF6 (« *TNFR-associated factor 6* »), qui activeront le complexe IKK (« *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase* »), qui induira à son tour une cascade d'événements aboutissant à la translocation de NF- $\kappa$ B (« *nuclear factor kappa-B* ») au noyau de la cellule, puis à la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation (Figure 1) [7, 8]. Au niveau de l'organisme, l'impact de l'IL-1 $\beta$  se traduit par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et du recrutement de cellules phagocytaires au site inflammé. L'IL-1 $\beta$  est aussi responsable de l'induction de la réponse aiguë face à un pathogène et de la fièvre, un phénomène favorisant la destruction de certains microorganismes pathogènes sensibles à la chaleur, mais pouvant aussi être nocif pour les cellules de l'hôte. L'IL-1 $\beta$  est aussi impliquée dans l'activation des lymphocytes T et des lymphocytes B (Table I) [9, 10].



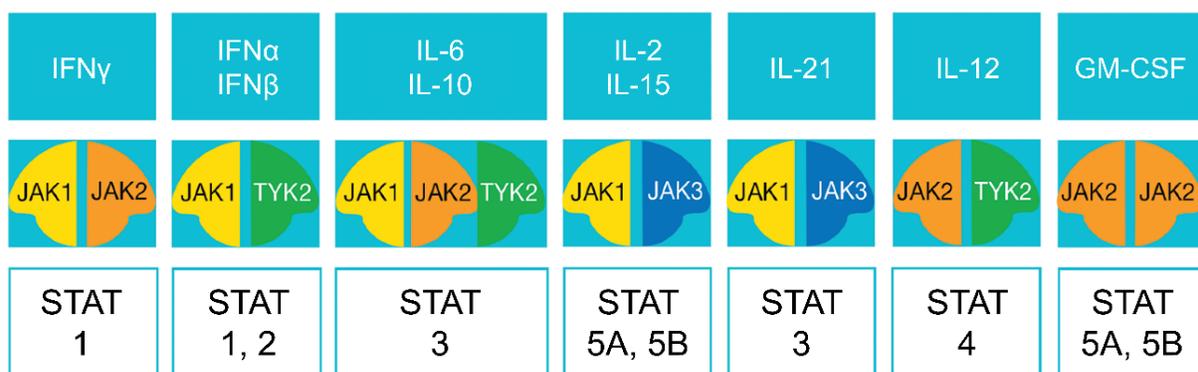
**Figure 1 : Voie de signalisation NF- $\kappa$ B.** Activation du complexe IKK, constitué des protéines NEMO, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  (« *NF- $\kappa$ B inhibitor alpha* ») puis translocation de NF- $\kappa$ B au noyau suite à la signalisation de cytokines telles qu'IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IL-18. Figure adaptée de E. Viennois *et al.* (2013) [11].

**Table I : Sécrétion, signalisation et impact biologique de quelques cytokines d'importance dans la réponse inflammatoire**

Cytokine	Type	Provenance	Récepteurs	Voies de signalisation	Impact biologique
IL-1 $\beta$	Pro	Monocytes Macrophages	IL-1R1 IL-1RAP	NF- $\kappa$ B	- Fièvre - Activation cellules T et B - Recrutement de phagocytes
IL-6	Pro	Lymphocytes T Lymphocytes B Monocytes	IL-6R gp130	JAK1/2, Tyk2 → STAT3	- Différenciation vers T <sub>H</sub> 17 - Différenciation vers CTL - Production d'anticorps
TNF $\alpha$	Pro	Macrophages NK Lymphocytes T	TNFR1	TRADD → NF- $\kappa$ B et MAPK	- Vasodilatation - Activation macrophages - Induction apoptose
IL-10	Anti	Macrophages DC T <sub>regs</sub>	IL-10R1 IL-10R2	JAK1, Tyk2 → STAT3	- Suppression des cellules T <sub>H</sub> 1 - Différenciation des T <sub>regs</sub>
TGF $\beta$	Anti Pro	Toutes les cellules immunitaires	T $\beta$ R1 T $\beta$ R2	SMAD PI3-kinase p38 GTPase	- Différenciation vers T <sub>H</sub> 17 ou T <sub>regs</sub> - Suppression présentation antigénique - Stimulation/inhibition de l'activation des CPA
IL-17A	Pro	T <sub>H</sub> 17	IL-17RA IL-17RC	NF- $\kappa$ B MAPK	- Stimulation de la sécrétion d'IL-6 et IL-8 - Stabilisation de la transcription des gènes cibles d'IL-17

L'IL-6, quant à elle, induit la différenciation des T<sub>H</sub> vers le phénotype T<sub>H</sub>17, qui soutiendront la réponse inflammatoire en sécrétant de l'IL-17 [6, 12]. L'IL-6 favorise aussi la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en CTL, ainsi que la production d'anticorps par les cellules B. De plus, l'IL-6 est impliqué dans de nombreux processus causant des déséquilibres de la production de certaines protéines ou molécules sanguines, tels qu'une augmentation de la synthèse de fibrinogène et de plaquettes ainsi qu'une réduction des niveaux d'albumine et de fer. La mesure des niveaux sanguins de ces molécules est d'ailleurs souvent utilisée en clinique afin de détecter ou d'évaluer la sévérité de diverses maladies inflammatoires [13]. L'IL-6 est sécrétée par plusieurs types de cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B et les monocytes lors de la réponse inflammatoire. Notamment, l'IL-1 $\beta$  et le

TNF $\alpha$  active des facteurs de transcription stimulant la sécrétion de l'IL-6. L'IL-6 peut signaler de deux façons. Dans la signalisation traditionnelle, elle se lie à son récepteur (IL-6R), exprimé principalement sur les lymphocytes T, les lymphocytes B activés, les neutrophiles et les monocytes, qui se dimérise alors avec une molécule appelée gp130. Dans la méthode alternative, appelée transsignalisation, une forme soluble de l'IL-6R peut se lier à l'IL-6 en circulation avant de venir se lier avec le gp130 à la membrane. La particularité de la transsignalisation est qu'elle peut être inactivée si le dimère IL-6-IL-6R soluble forme un complexe avec une forme soluble de gp130 avant de pouvoir se lier à la membrane [14]. Dans les deux cas, la dimérisation de l'IL-6R et de gp130 à la membrane entraîne l'activation des voies de signalisation JAK-STAT [15]. Il existe actuellement quatre protéines JAK (« *janus activated kinases* ») : JAK1 à JAK3 et Tyk2; ainsi que sept protéines STAT (« *signal transducers and activators of transcription* ») connues : STAT1 à STAT6, avec deux sous-types de STAT5 (5A et 5B). Les sous-unités des récepteurs cytokiniques sont associées à des tyrosines kinases JAK dans leur région cytoplasmique et leur dimérisation entraîne l'activation des molécules JAK. Les JAK activés induisent la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription STAT. À leur tour, les STAT activés se dimérisent et sont transloqués dans le noyau de la cellule, où ils induiront la transcription génique (Figure 2) [16, 17]. Dans le cas de l'IL-6, les molécules gp130 sont associées aux protéines JAK1, JAK2 et Tyk2 et induisent la phosphorylation de STAT3 (Table I) [13, 15].



**Figure 2 : Voies de signalisation JAK-STAT.** Protéines JAK et facteurs de transcription STAT impliqués dans la signalisation de plusieurs cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire. Figure inspirée de J. A. Hodge *et al.* (2016) [16].

Ayant un effet local similaire à celui de l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  induit aussi une augmentation de la perméabilité et une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Plus globalement, le TNF $\alpha$  favorise l'activation des macrophages, qui sécrètent eux-mêmes cette cytokine, et peut induire l'apoptose de nombreux types de cellules. Dans le contexte de l'inflammation, TNF $\alpha$  se lie à son récepteur, TNFR1, dont l'expression est ubiquitaire. TNFR1, qui porte un domaine de mort cellulaire, induit le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (« *TNFR1-associated death domain protein* »), ce qui permettra l'assemblage de divers complexes de signalisation. L'assemblage du complexe I induit l'activation des voies de signalisation de NF- $\kappa$ B (Figure 1) et des MAPK (« *mitogen-activated protein kinases* »), impliquées dans l'inflammation, la réponse immunitaire face aux pathogènes, la dégénération tissulaire et la prolifération cellulaire. La formation des complexes IIa et IIb est associée à l'activation des caspases et l'induction de l'apoptose alors que la formation du complexe IIc induit la nécrose et l'inflammation [18, 19]. L'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  sont de puissantes cytokines médiatrices de l'inflammation et sont toutes deux sécrétées précocement lors de la réponse innée en réponse à la liaison des PAMP ou des DAMP aux PRR. Ces cytokines sont aussi autorégulées de manière positive, puisque la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  induit une cascade de processus qui mèneront à la sécrétion de plus d'IL-1 $\beta$  et de TNF $\alpha$  (Table I) [2].

Certaines cytokines, contrairement aux cytokines pro-inflammatoires, ont un effet anti-inflammatoire. L'IL-10 et le TGF $\beta$  sont des cytokines sécrétées par les T<sub>regs</sub>, les macrophages et les DC après l'activation des PRR, et permettent d'inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après la résolution de l'infection. Ces mécanismes de régulation sont vitaux, car malgré l'effet initialement protecteur de l'inflammation, un état inflammatoire prolongé ou systémique peut avoir des conséquences parfois fatales [2]. L'IL-10, après dimérisation de ses deux sous-unités de récepteur (IL-10R1 et IL-10R2), induit l'activation des molécules JAK1 et Tyk2 associées aux sous-unités de son récepteur, puis la phosphorylation de STAT3 (Figure 2). Plus spécifiquement, l'IL-10, au niveau de l'organisme, joue un rôle à la fois suppresseur et stimulateur sur la réponse immunitaire. En effet, l'IL-10 procure une suppression de la réponse inflammatoire, mais joue un rôle activateur dans la réponse anti-tumorale [20]. Quant à TGF $\beta$ , elle est sécrétée par tous les types de cellules immunitaires et est impliquée dans la différenciation des T<sub>H</sub> vers le phénotype T<sub>regs</sub> ou T<sub>H</sub>17, l'inhibition de la présentation

antigénique suite à l'activation de la réponse immunitaire, la survie des lymphocytes T naïfs, ainsi qu'une myriade de processus régulateurs de la réponse immunitaire. Toutefois, TGFβ a la particularité de pouvoir agir en tant que cytokine anti-inflammatoire aussi bien qu'en tant que cytokine pro-inflammatoire, en fonction du contexte et des cytokines sécrétées dans l'environnement lors de la réponse inflammatoire. De façon similaire à l'IL-10, la signalisation de TGFβ se fait par la dimérisation des deux sous-unités de son récepteur (TβRI et TβRII). Ce processus entraîne leur activation, puis la phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3, qui formeront un complexe avec SMAD4 avant de transloquer au noyau de la cellule et d'activer la transcription génique. En plus des voies de signalisation SMAD, TGFβ peut aussi activer les voies de signalisation de PI3-kinase (« *phosphoinositide 3-kinase* »), de p38 kinase et des petites GTPase (Table I) [21, 22].

## **1.3 La réponse immunitaire à médiation cellulaire**

Lors d'une infection intracellulaire, par un virus ou certaines bactéries, les cytokines sécrétées par les CPA et la présentation antigénique aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> via le CMHI et aux T<sub>H</sub> via le CMHII induit principalement une réponse cytotoxique par les CTL, de même qu'une différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés en T<sub>H</sub>1. Ce type de réponse immunitaire représente une réponse effectrice à médiation cellulaire, que l'on peut aussi appeler une réponse de type cellulaire.

### **1.3.1 Mécanismes de la réponse cellulaire**

En réponse à un pathogène intracellulaire, les CPA et les cellules NK activés produisent une myriade de cytokines, telles que l'IL-15, l'IFNγ, les interférons de type I (IFNα/β), l'IL-12 et l'IL-18. Les peptides antigéniques sont ensuite présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> via le CMHI, initiant l'activation et la prolifération des CTL. Après l'élimination des cellules infectées, les CTL et les NK sont prêtes à tuer de nouvelles cellules cibles [1, 2].

L'un des facteurs les plus déterminants pour le phénotype de différenciation des T<sub>H</sub> sont les cytokines sécrétées par les CPA et les NK. L'IFNγ, produite par les CPA, les NK et les lymphocytes T, est la cytokine la plus associée à la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en

T<sub>H1</sub>. L'IFN $\gamma$  permet aussi une robuste activation des macrophages, augmente la présentation antigénique par les CPA et l'activité des cellules NK et stimule le recrutement de phagocytes au site infecté. À la surface des cellules cibles, l'IFN $\gamma$  est reconnue par son récepteur, constitué de deux sous-unités IFNGR1 et deux sous-unités IFNGR2, associées aux protéines JAK1 et JAK2. Lors de la liaison de l'IFN $\gamma$  à son récepteur, les molécules JAK s'activent et induisent la phosphorylation de STAT1, qui se dimérise et transloque au noyau pour y induire la transcription génique (Figure 2) (Table II). La production d'IFN $\gamma$  est, entre autres, stimulée par l'IL-12 et l'IL-18 et inhibée par l'IL-4, l'IL-10 et TGF $\beta$  [4, 23, 24].

**Table II : Sécrétion, signalisation et interaction de quelques cytokines clés de la réponse à médiation cellulaire**

Cytokine	Provenance	Récepteurs	Voies de signalisation	Production stimulée par :	Stimule la production de :
IFN $\gamma$	CPA NK Lymphocytes T	IFNGR1 IFNGR2	JAK1/2 $\rightarrow$ STAT1	IL-12 IL-18	TNF $\alpha$ IL-1 $\beta$ IL-6
IL-12	CPA Lymphocytes B	IL-12R $\beta$ 1 IL-12R $\beta$ 2	JAK2, Tyk2 $\rightarrow$ STAT4	IFN $\gamma$ IL-2	IFN $\gamma$ TNF $\alpha$ GM-CSF IL-2
IL-18	CPA	IL-18R $\alpha$ IL-18R $\beta$	NF- $\kappa$ B	IFN $\gamma$ IL-12 IL-15	IFN $\gamma$ TNF $\alpha$ IL-1 $\beta$

L'IL-12, principalement sécrétée par les CPA et les cellules B, est reconnue par les deux sous-unités de son récepteur (IL-12R $\beta$ 1 et IL-12R $\beta$ 2), exprimées surtout à la surface des cellules NK et des lymphocytes T activés. Après liaison de la cytokine, les deux sous-unités se dimérisent et activent les molécules JAK2 et Tyk2 qui y sont associées, induisant la phosphorylation de STAT4 principalement (Figure 2). Tout comme l'IFN $\gamma$ , l'IL-12 est aussi associée à la différenciation des T<sub>H</sub> vers le phénotype T<sub>H1</sub>, mais inhibe en plus leur différenciation vers le phénotype T<sub>H2</sub>, et interfère avec la différenciation des T<sub>regs</sub>. L'IL-12, seule ou en synergie avec IL-18 ou l'IL-2, induit fortement la production d'IFN $\gamma$  par les NK et les lymphocytes T, de même que la sécrétion de TNF $\alpha$ , de GM-CSF (« *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* ») et d'IL-2 (Table II) [25, 26].

Tout comme l'IFN $\gamma$  et l'IL-12, l'IL-18 est elle aussi sécrétée par les CPA et associée à la différenciation vers un phénotype T<sub>H1</sub>. L'IL-18 est reconnue par IL-18R $\alpha$ , l'une des sous-unités de son récepteur, qui se dimérise à l'IL-18R $\beta$  lorsque la cytokine se lie au récepteur. Tout comme pour l'IL-1 $\beta$ , la dimérisation des deux sous-unités de l'IL-18R induit le recrutement de MyD88, IRAK4 et TRAF6, puis l'éventuelle activation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B (Figure 1). Au niveau de l'organisme, l'IL-18, en synergie avec l'IL-12, induit la production d'IFN $\gamma$ . Toutefois, en présence d'IFN $\gamma$ , l'IL-18 induit aussi la production de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  (Table II) [10, 27, 28].

Ainsi, en présence de l'IL-12, l'IFN $\gamma$  et l'IL-18 sécrétés par les CPA et les NK, la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en T<sub>H1</sub> est favorisée. À leur tour, les T<sub>H1</sub> sécrètent, entre autres, de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF $\alpha$ . L'IL-2 ainsi produite permet de stimuler plus robustement l'activation et la prolifération des CTL, alors que le TNF $\alpha$  stimule l'activation des macrophages. De plus, la sécrétion d'IFN $\gamma$  supplémentaire par les cellules effectrices, en plus de celui déjà produit par les CPA et les NK activées, assure le renforcement de la réponse cellulaire par l'augmentation de l'expression génique de molécules associées à la réponse à médiation cellulaire, ainsi que par l'augmentation de la phagocytose, de la présentation antigénique et de la cytotoxicité des cellules NK. Ainsi, les différents mécanismes de la réponse cellulaire agissent de concert pour stimuler et entretenir la réponse cytotoxique qui la caractérise [1, 2, 4, 24].

### **1.3.1.1 La cytotoxicité**

Les CTL et les cellules NK peuvent induire l'apoptose des cellules cibles par différents mécanismes qui sont assez similaires entre les deux types de cellules, soit la voie dépendante de perforine et granzyme et la voie de Fas. Dans les deux cas, une liaison entre la cellule cytotoxique et la cellule cible et l'établissement d'une zone de contact cellule-cellule est nécessaire pour initier l'apoptose. Dans le cas des CTL, elles reconnaissent l'antigène associé au CMHI sur la cellule cible, alors que les cellules NK détectent plutôt l'absence de CMHI sur les cellules. Après la reconnaissance de la cellule cible, une synapse immunologique (SI) se forme à la surface de contact entre les cellules [1, 2, 29-31]. Alternativement, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$

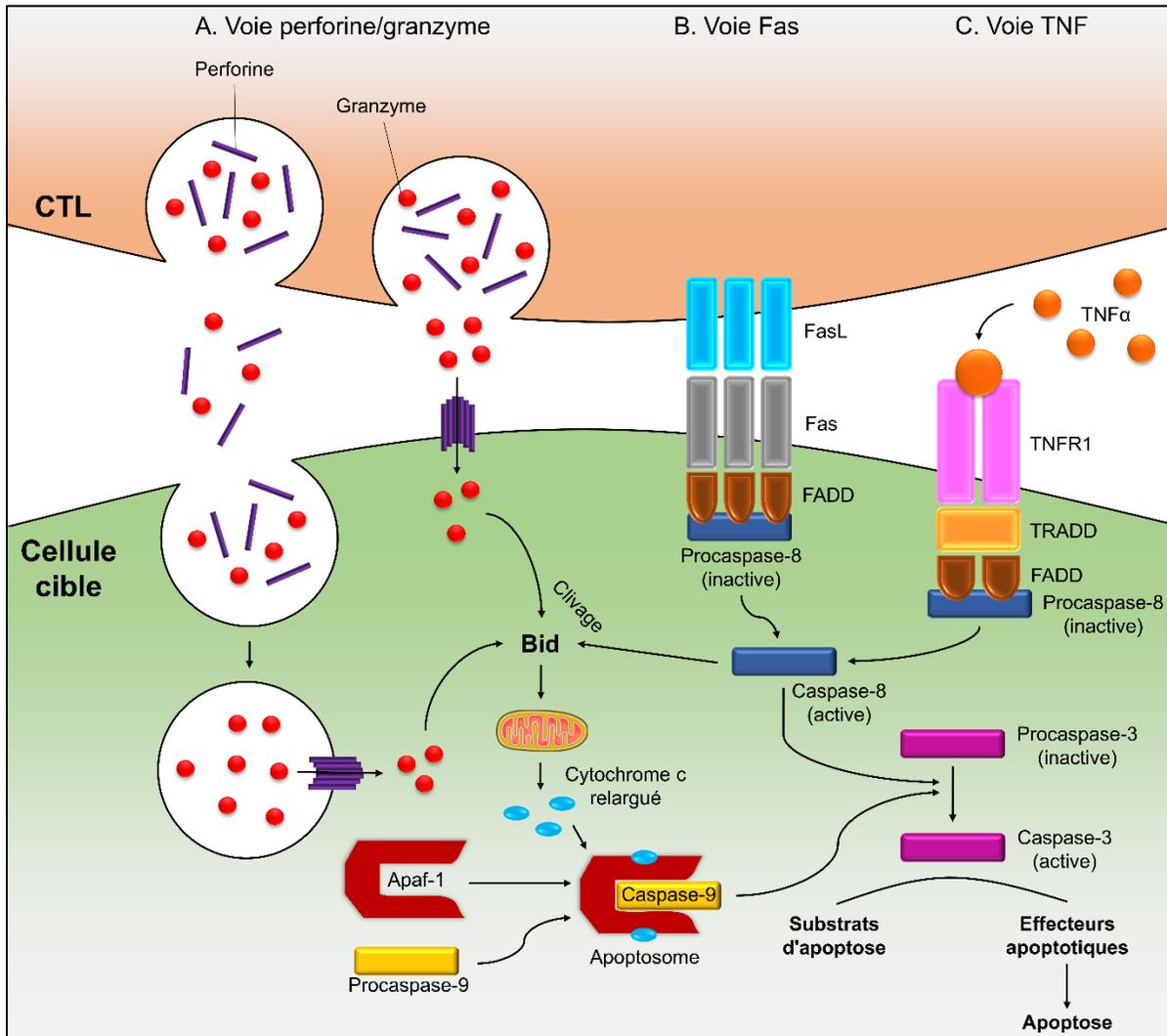
produits par les CTL et les cellules NK peuvent aussi induire l'apoptose d'une cellule cible par la voie TNF, indépendante de la voie perforine-granzyme et Fas [32, 33].

Dans la voie perforine-granzyme, les granules contenant les molécules pro-apoptotiques perforine et granzyme s'accumulent à la surface de contact dans les cellules cytotoxiques, puis les molécules de perforine et granzyme sont libérées dans la SI par exocytose. Deux mécanismes sont présentement admis quant à la manière dont ces molécules pénètrent ensuite dans la cellule cible. Dans le premier, les molécules de perforine libérées dans la SI forment un pore à la surface de la cellule cible, permettant l'entrée des molécules de granzyme. Dans le second, les molécules de perforine et de granzyme sont internalisées dans la cellule cible par endocytose, puis les granzymes sont libérées dans le cytoplasme des cellules cibles par la formation d'un pore dans la membrane des vésicules par les molécules de perforine [2, 29, 34]. Dans les deux cas, les granzymes, une fois libérées dans le cytoplasme, stimulent le relargage de cytochrome c par les mitochondries et l'activation de la caspase-3. Cela induit ensuite une cascade de caspases qui activera les voies de mort cellulaire et ultimement l'apoptose (Figure 3A) [1, 2, 31].

Lorsque les cellules cytotoxiques rencontrent une cellule cible exprimant Fas, elles peuvent aussi induire l'apoptose par la voie Fas. Cette voie est activée lors de la liaison de Fas, exprimé à la surface des cellules cibles, avec son récepteur FasL, exprimé à la surface des cellules cytotoxiques. Lors de la liaison Fas-FasL, la protéine FADD (« *Fas-associated death domain* »), associée à la procaspase-8, initie les mêmes cascades de signalisation que les granzymes dans la voie perforine-granzyme (Figure 3B). Fas est exprimé, entre autres, par les lymphocytes T activés. Ainsi, la voie apoptotique de Fas participe à la modulation de l'amplitude de la réponse immunitaire en induisant l'apoptose des lymphocytes T activés. Les CTL peuvent aussi utiliser la voie Fas afin de lyser des cellules cibles lors de la réponse antivirale, au lieu de la voie perforine-granzyme. Les NK, par contre, utilisent plutôt la voie perforine-granzyme [2, 31, 35].

Finalement, les CTL et les cellules NK peuvent aussi induire l'apoptose d'une cellule cible par l'action directe de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$  qu'elles sécrètent, sans passer par les voies décrites précédemment. En effet, l'IFN $\gamma$  sécrété se lie à son récepteur sur la cellule cible et induit la phosphorylation de STAT1 et l'expression d'IRF-1 (« *IFN regulatory factor 1* »), ayant pour

effet d'augmenter l'expression de TNFR1 à la surface de la cellule cible et de sensibiliser celle-ci à l'apoptose induite par TNF $\alpha$ . Ensuite, la liaison du TNF $\alpha$  sécrété par les CTL et les NK à son récepteur induit le recrutement de TRADD, puis de FADD, associé à des molécules de procaspases, résultant en une activation d'une cascade de caspases puis à l'induction de l'apoptose de la cellule cible, de manière très similaire à la voie Fas (Figure 3C). Ainsi, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  sécrétés par les CTL et les cellules NK peuvent, en synergie, induire l'apoptose d'une cellule cible indépendamment des voies perforine-granzyme et Fas [32, 33].

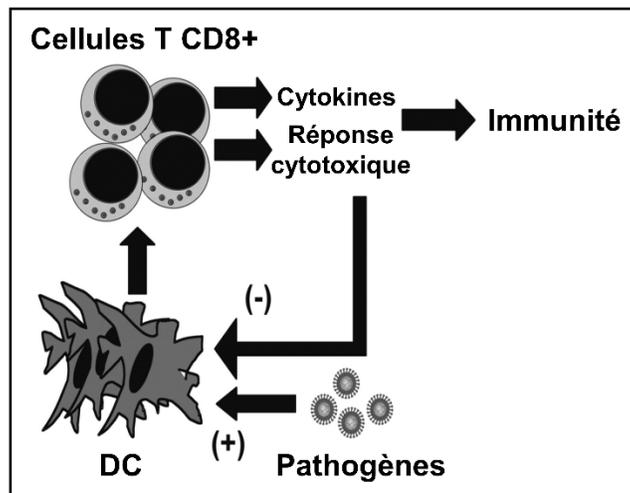


**Figure 3 : Mécanismes d'induction de l'apoptose par les cellules cytotoxiques.** (A) Mécanismes d'entrée des molécules de granzyme dans le cytoplasme de la cellule cible, (B) Mécanisme d'induction de l'apoptose par la voie Fas et (C) Mécanisme d'induction de l'apoptose par la voie TNF. Figure inspirée de J. A. Owen (2014) [2], I. Voskoboinik *et al.* (2006) [34] et K. Suk *et al.* (2001) [32, 33].

### 1.3.2 Régulation négative de la réponse à médiation cellulaire

Après la résolution de l'infection ayant initié le développement de la réponse cellulaire, celle-ci doit être inhibée afin d'éviter l'établissement d'un état d'activation chronique et d'endommager les cellules de l'hôte. Tel que détaillé précédemment, chez un individu normal, les CPA présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8+, qui s'activent, prolifèrent et induisent l'apoptose des cellules infectées en initiant une réponse cytotoxique. Lorsque les cellules infectées sont éliminées, les CTL éliminent aussi les CPA présentant le peptide antigénique ayant induit leur activation afin de réguler négativement l'activation des CTL. En l'absence de signaux d'activation, la majorité des CTL meurent aussi, la fraction restante constituant une population de cellules mémoire [36].

Dans les dernières années, des études ont suggéré que les DC auraient un rôle majeur dans la régulation de l'activation des CTL. En effet, les DC commenceraient à être éliminés par les CTL dès le développement de celles-ci par une voie cytotoxique dépendante de perforine-granzyme, et la régulation négative de l'activation des CTL serait dépendante de l'élimination des DC (Figure 4) [37, 38]. D'autres études ont aussi suggéré un rôle régulateur pour les cellules NK, qui pourraient restreindre la présentation antigénique, et donc l'activation des CTL, par la sécrétion d'IL-10 [39, 40]. De plus, les T<sub>regs</sub> auraient aussi un rôle dans la suppression de la réponse immunitaire. Les T<sub>regs</sub> pourraient, entre autres, réduire la présentation antigénique des CPA en inhibant l'expression à leur surface des molécules co-stimulatrices nécessaires à leur fonction ou par l'induction de l'apoptose des CTL activés et des DC par cytotoxicité médiée par les granules de perforine-granzyme [41, 42].



**Figure 4 : Régulation négative de la présentation antigénique.** En réponse à un agent pathogène, les CPA activent les lymphocytes T CD8+, qui produiront des cytokines pro-inflammatoires et élimineront le pathogène ainsi que les CPA afin de restreindre l’activation des lymphocytes T CD8+. La régulation négative de la présentation antigénique par les CTL est médiée par la réponse cytotoxique dépendante de perforine-granzyme. Figure adaptée de C. Terrell et M.B. Jordan (2013) [37].

Ainsi, puisque l’activité des CPA et des cellules cytotoxiques sont liées à l’activation de la réponse immunitaire par une boucle d’auto-régulation négative dépendante de la cytotoxicité médiée par les granules, il semble évident que le bon fonctionnement de tous ces éléments régulateurs est d’une importance cruciale pour prévenir l’auto-immunité et les maladies inflammatoires. Toutefois, certaines situations particulières, comme les infections chroniques et les cancers, peuvent causer une dérégulation de ces mécanismes, forçant le système immunitaire à mettre en place des mesures visant à protéger l’hôte des conséquences de cette dérégulation.

### 1.3.3 Activation chronique : infections chroniques et cancers

Les infections chroniques et les cancers, par leur persistance, induisent un état d’activation chronique du système immunitaire inné et adaptatif, augmentant considérablement le risque de développer des maladies inflammatoires, des co-infections et des cancers chez les individus atteints. Une infection est dite chronique lorsque la réponse immunitaire ne suffit pas à éliminer un pathogène et que celui-ci s’installe et persiste dans l’organisme. C’est le cas notamment d’une infection par le virus de l’immunodéficience humaine (VIH), le virus de l’hépatite C (VHC), *Plasmodium* (malaria), ainsi que de nombreux autres virus, bactéries,

champignons et parasites. Les cancers, quant à eux, sont provoqués par des cellules anormales qui parviennent à échapper à la détection ou à l'action des cellules du système immunitaire, s'établissent dans l'organisme et prolifèrent de manière incontrôlée. Dans ces deux situations, l'activation persistante du système immunitaire induit des changements fonctionnels au niveau des cellules effectrices afin de prévenir une hyperactivation du système immunitaire et les dommages qui en découleraient.

Par exemple, lorsqu'une infection virale devient chronique, les CPA perdent leur capacité à sécréter des interférons de type I, qui sont essentiels à l'établissement d'une réponse antivirale efficace. Aussi, la prolifération, les fonctions cytotoxiques et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes T activés est graduellement inhibée en raison d'un état dit d'épuisement immunitaire, causé par la surexpression de récepteurs inhibiteurs à leur surface. De plus, une augmentation de l'activité des  $T_{\text{regs}}$  est un phénomène souvent observé dans les contextes d'infections chroniques et de cancers. Celles-ci contribuent à réduire les réponses effectrices des cellules activées, diminuant ainsi la capacité de l'organisme à combattre les infections et les cancers, mais protégeant aussi l'hôte des dommages induits par une activation persistante du système immunitaire [43, 44].

Une telle dérégulation du système immunitaire, même si elle est principalement observée lors d'infections chroniques et de cancers, peut aussi être observée dans le contexte de certaines maladies ou syndromes affectant la capacité du système immunitaire de réguler la spécificité, l'amplitude ou la durée de la réponse immunitaire. C'est le cas, entre autres, de l'arthrite rhumatoïde, du diabète de type I et des syndromes hémophagocytaires.

## **1.4 La lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH)**

La lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH) est un syndrome hyper-inflammatoire potentiellement mortel caractérisé par une hypercytokinémie, une prolifération excessive et anormale de macrophages activés, une altération des fonctions cytotoxiques des cellules T et NK ainsi qu'une hémophagocytose. La HLH est parfois aussi appelée syndrome d'activation macrophagique (MAS).

### 1.4.1 HLH primaire

Il existe deux types de HLH, soit la HLH primaire et la HLH secondaire, dont la cause est le principal facteur permettant de les distinguer. La HLH primaire, aussi dite familiale (FHL), est une maladie génétique rare, mais potentiellement mortelle, dont l'incidence est d'environ 1 sur 50 000 naissances [45]. Elle est causée par une mutation génétique, héritée de manière autosomique récessive, affectant des gènes essentiels à la réponse cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK médiée par les granules [46, 47]. Plus rarement, la HLH primaire peut aussi être associée à certains syndromes de déficiences immunitaires [48, 49]. En raison de son origine génétique, elle est généralement observée chez les jeunes enfants et les bébés [49]. Toutefois, plusieurs cas de HLH primaire ont plus récemment été observés chez des adolescents et des adultes qui présentaient des mutations génétiques incomplètes [50].

La HLH primaire a été catégorisée en cinq sous-types, nommés FHL-1 à FHL-5, en fonction du gène muté. Dans le cas de la FHL-1, le gène muté et la protéine affectée sont toujours inconnus, mais la mutation a été localisée au niveau du chromosome 9q21.3-22 [51]. La FHL-2, quant à elle, présente une mutation au niveau de PRF1, le gène codant pour la perforine [52], une molécule contenue dans les granules cytotoxiques permettant l'induction de la mort cellulaire en facilitant l'entrée des granzymes dans les cellules cibles [34]. Cette mutation est la plus communément observée parmi les cas de HLH primaire, avec une prévalence de 13% à 58%, selon les origines ethniques [48]. Dans le cas de la FHL-3, FHL-4 et FHL-5, les gènes mutés sont, respectivement, UNC13D [53], STX11 [54] et STXBP2 [55] (Table III). En fonction du sous-type impliqué, la sévérité et l'âge d'apparition des symptômes peut varier de manière importante chez les patients [56]. Par exemple, la FHL-4 est caractérisée par une apparition plus tardive ainsi qu'une intensité des symptômes plus modérée que les autres sous-types de HLH primaire, alors que la FHL-2 est habituellement caractérisée par une apparition très précoce des symptômes, avec un âge médian de seulement 3 mois [48, 57, 58].

**Table III : Classification des sous-types de HLH primaire**

Sous-type de HLH	Gène muté	Protéine associée
FHL-1	Inconnu	Inconnu
FHL-2	PRF1	Perforine 1
FHL-3	UNC13D	Munc13-4
FHL-4	STX11	Syntaxin 11
FHL-5	STXBP2	Munc18-2
Syndrome Griscelli de type II	RAB27A	Rab27a
Syndrome Chediak-Higashi	LYST	Lyst
Syndrome Hermansky-Pudlak de type II	AP3B1	AP3B1
Syndrome lymphoprolifératif associé au chromosome X de type I	SH2D1A	SAP
Syndrome lymphoprolifératif associé au chromosome X de type II	BIRC4	XIAP

Table inspirée de M. Madkaikar *et al.* (2016) [59]

Certaines mutations génétiques peuvent aussi causer une HLH primaire en association avec un syndrome de déficience immunitaire. C'est le cas du syndrome Griscelli de type II, causé par une mutation de RAB27A [60], du syndrome Chediak-Higashi (LYST) [61] et du syndrome Hermansky-Pudlak de type II (AP3B1) [62]. Les patients atteints de l'un de ces trois syndromes présentent des caractéristiques similaires, telles qu'une hypopigmentation de la peau et des cheveux, une fonction déficiente des neutrophiles et sont donc atteints d'infections récurrentes [60-62]. D'autres mutations, dont SH2D1A et BIRC4, causent des syndromes lymphoprolifératifs associés au chromosome X pouvant aussi mener au développement d'une HLH primaire en réponse aux infections par le virus Epstein-Barr (EBV) qui les caractérisent (Table III) [63, 64]. L'infection par EBV provoque une importante prolifération de lymphocytes activés, qui sont éventuellement éliminés par apoptose chez les individus sains. La protéine pro-apoptotique SAP, codée par le gène SH2D1A, est impliquée dans la régulation négative de la réponse immunitaire. Une mutation de ce gène serait donc en cause dans le développement d'une HLH suivant une infection à EBV [64, 65]. Quant à la protéine anti-apoptotique XIAP, codée par le gène BIRC4, elle est au contraire impliquée dans la survie des cellules activées. Une mutation de ce gène préviendrait donc une réponse immunitaire efficace face à une infection par EBV, pouvant mener à des complications telles que la HLH [63]. À l'exception des mutations SH2D1A et BIRC4, les gènes affectés dans toutes les autres formes de HLH

primaire sont tous impliqués à différents niveaux du processus d'exocytose des granules cytotoxiques (Figure 5).

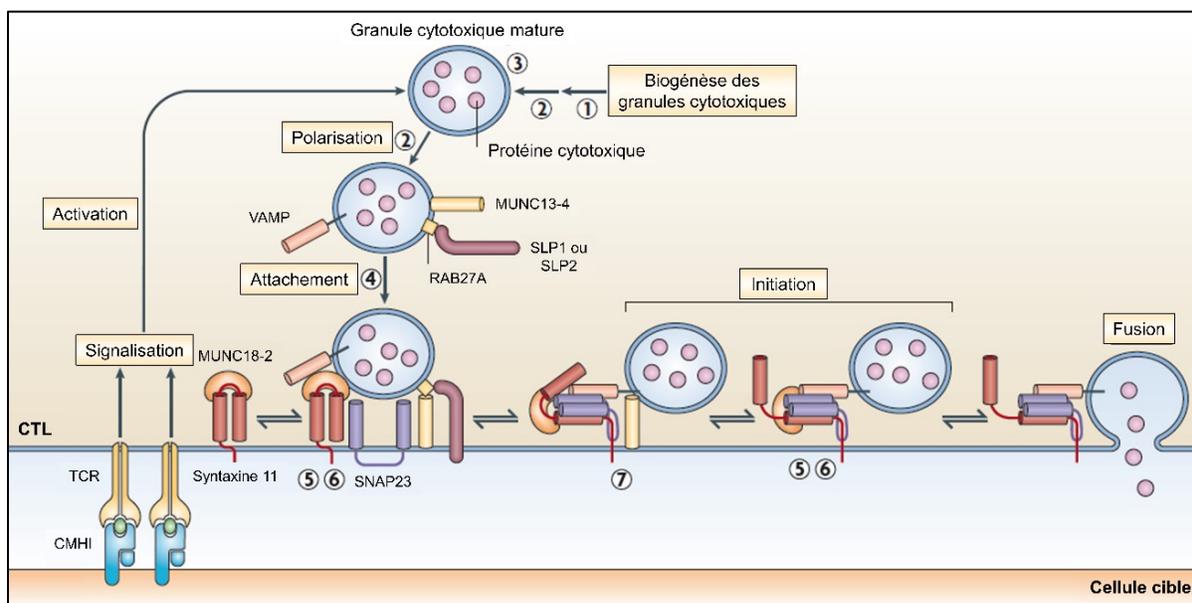
#### **1.4.1.1 Exocytose des granules cytotoxiques**

Les granules cytotoxiques, qui contiennent des molécules de perforine et de granzyme, se retrouvent dans toutes les cellules NK et sont synthétisées dans les lymphocytes T CD8+ après leur différenciation en CTL. Chez les patients HLH dont les gènes *LYST* ou *AP3B1* sont mutés, le processus de formation des granules cytotoxiques est directement affecté au niveau du lysosome et du transport des protéines dans l'endosome. Les cellules de ces patients sont donc incapables de produire des granules cytotoxiques fonctionnelles. Chez les patients présentant la mutation *PRF1*, ce sont plutôt les molécules de perforine contenues dans les granules cytotoxiques qui ne sont pas synthétisées correctement, les rendant incapables de tuer les cellules cibles (Figure 5).

Lorsque les NK et les CTL reconnaissent une cellule cible, il y a formation d'une SI. Dans les CTL et les NK, les granules cytotoxiques sont attirées à l'interface de la SI dans un processus appelé la polarisation. Avant d'être sécrétées, les granules doivent ensuite passer par plusieurs étapes. D'abord, celles-ci doivent s'attacher à la membrane cellulaire dans un processus dépendant de la protéine Rab27a, un processus déficient chez les patients présentant une mutation de *RAB27A*. Après l'attachement des granules à la membrane, celles-ci doivent subir une étape d'initiation permettant leur éventuelle fusion à la membrane. Ce processus, dépendant de la protéine Munc13-4, est le processus affecté chez les patients présentant une mutation du gène *UNC13D* (Figure 5).

Finalement, les protéines syntaxin 11 et Munc18-2, normalement associées dans un complexe, sont impliquées dans le processus d'attachement de la granule à la membrane puis au processus d'initiation menant à la fusion et à l'excrétion du contenu de la granule dans la SI. Ce sont ces deux protéines qui sont affectées chez les patients HLH présentant une mutation des gènes *STX11* et *STXBP2*, respectivement. Il a d'ailleurs été démontré qu'une déficience de syntaxin 11 permettait tout de même une exocytose partielle des granules cytotoxiques, et que la nécessité de cette protéine dans le processus d'exocytose pouvait être en partie contournée par une activation encore plus prononcée des CTL, phénomène sans doute responsable des

symptômes plus modérés observés chez les patients atteints de FHL-4. La déficience de MUNC18-2 ne peut pas être contournée de cette façon (Figure 5) [29, 31, 66].



**Figure 5 : Impact des mutations génétiques associées à la HLH primaire sur le processus d'exocytose des granules cytotoxiques.** Modélisation des mécanismes de biogénèse et d'exocytose des granules cytotoxiques. Les chiffres indiquent les étapes du processus affectées par les différentes mutations génétiques associées à la HLH primaire : mutation de (1) LYST, (2) AP3B1, (3) PRF1, (4) RAB27A, (5) STX11, (6) STXBP2 et (7) UNC13D. Figure adaptée de G. de Saint-Basile, G. Ménasché et A. Fischer (2010) [29].

## 1.4.2 HLH secondaire

Contrairement à la HLH primaire, la HLH secondaire, ou acquise, n'est pas d'origine génétique. Elle peut se développer à la suite d'une infection sévère ou persistante, en particulier par EBV, de certains cancers, de maladies auto-immunes ou dans des cas de déficiences immunitaires induite par des drogues immunosuppressives, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou une transplantation [67-71]. Dans les cas de maladies auto-immunes, le développement d'une HLH secondaire est particulièrement associée à l'arthrite juvénile idiopathique systémique (AJIS), à la maladie de Still chez l'adulte et au lupus érythémateux systémique [48]. À l'instar de la HLH primaire, la HLH secondaire est aussi liée à une altération des fonctions cytotoxiques des cellules T et NK, mais celle-ci est temporaire et n'est pas due à une mutation génétique des gènes liés à ces fonctions [49]. La HLH secondaire est aussi souvent

appelée syndrome d'activation macrophagique (MAS) lorsqu'elle est associée à une maladie auto-immune [72].

En raison des nombreux facteurs pouvant mener à son développement, la HLH secondaire est beaucoup plus fréquente que la HLH primaire. Pour la même raison, elle est observée chez tous les groupes d'âges et la présence et la sévérité des symptômes est très variable [48].

### **1.4.3 Présentation clinique et diagnostic**

Dans de nombreux cas, une infection, même banale ou asymptomatique, peut agir en tant que déclencheur de la HLH primaire ou secondaire. Toutefois, un développement spontané de la HLH, sans élément déclencheur identifiable, est fréquemment observé dans les cas de HLH primaire [73]. Le diagnostic de la HLH peut seulement être établi par l'observation d'un ensemble de symptômes cliniques et physiologiques souvent non-spécifiques lorsqu'observés individuellement [74]. Les patients présentent typiquement des symptômes tels qu'une forte fièvre, une hépato-splénomégalie, une sévère cytopénie, une insuffisance hépatique, une élévation des niveaux sanguins de ferritine [75], triglycérides, transaminases et sCD25 (chaîne  $\alpha$  soluble du récepteur à l'IL-2) [76] ou encore une atteinte du système nerveux central (SNC) [77]. Une altération des fonctions cytotoxiques des cellules NK est aussi observée chez les patients atteints de HLH [46, 47]. Chez plusieurs patients, une étude histologique des tissus révèle une infiltration massive par des macrophages activés, qui phagocytent tout indistinctement, y compris des érythrocytes et des cellules de la moelle osseuse, d'où le nom « hémophagocytaire » (Table IV) [78]. Afin qu'un diagnostic de HLH soit établi, les patients doivent présenter au moins cinq de ces symptômes [77]. Le type de HLH, les maladies associées et l'âge du patient, entre autres, peuvent causer une importante variabilité au niveau de la présentation et de la sévérité des différents symptômes [57].

**Table IV : Critères de diagnostic de la HLH établis pour l'étude HLH-2004**

<b>Le diagnostic de la HLH peut être établi si l'une des deux conditions ci-dessous est remplie :</b>
1. Présence d'une mutation génétique associée à la HLH
OU
2. Le patient présente au moins cinq des huit critères de diagnostic ci-dessous :
A. Fièvre
B. Splénomégalie
C. Cytopénie (affectant au moins deux des trois lignées cellulaires du sang périphérique) : Hémoglobine < 90 g/L (< 100 g/L pour les bébés de moins de quatre semaines) Plaquettes < $100 \times 10^9/L$ Neutrophiles < $1,0 \times 10^9/L$
D. Hypertriglycéridémie et/ou hypofibrinogénémie : Triglycérides (à jeûn) $\geq 265$ mg/dL Fibrinogènes $\leq 1,5$ g/L
E. Hémophagocytose dans la moelle osseuse, la rate ou les ganglions lymphatiques
F. Activité déficiente ou altérée des cellules NK
G. Ferritine $\geq 500$ $\mu\text{g/L}$
H. sCD25 $\geq 2$ 400U/mL

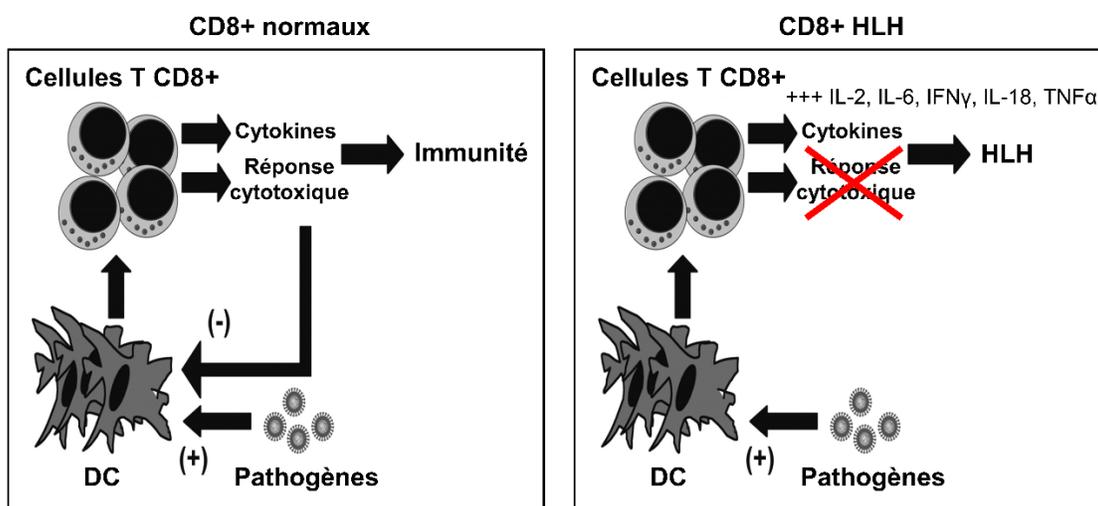
Table adaptée de Henter *et al.* (2007) [77]

Étant donné que ces symptômes sont non-spécifiques à la HLH, sont similaires à ceux provoqués par d'autres maladies plus fréquentes et peuvent varier d'un patient à l'autre, la HLH peut aisément être confondue pour un choc septique ou une méningo-encéphalite, par exemple. C'est particulièrement le cas pour les nouveau-nés et les adultes, qui présentent souvent certains symptômes de manière atypique. Dans tous les cas, les symptômes de la HLH sont sévères et très souvent fatals en l'absence d'une prise en charge rapide et de traitements appropriés [48, 73, 79].

#### **1.4.4 Physiopathologie, cytokines et signalisation**

L'une des caractéristiques les plus frappantes de la HLH est une production extrême de cytokines inflammatoires, un phénomène appelé « hypercytokinémie », ou aussi souvent désigné « *cytokine storm* » [79, 80]. La forte altération ou l'absence complète de la fonction cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK est la cause principale de cette hypercytokinémie. En effet, suite à la présentation antigénique par les CPA, la réponse

cytotoxique des cellules T et NK permet non seulement l'élimination des cellules infectées, mais aussi l'arrêt de la présentation antigénique et de la réponse immunitaire [38]. Une étude a aussi montré que les cellules cytotoxiques incapables d'induire l'apoptose de leur cellule cible ne peuvent désengager la liaison de leur récepteur efficacement et produisent une forte quantité de cytokines pro-inflammatoires [81]. En conséquence, une réponse cytotoxique déficiente empêche la régulation négative de la réponse immunitaire, menant à une activation persistante du système immunitaire, une sécrétion incontrôlée de cytokines inflammatoires, puis éventuellement au développement des symptômes cliniques associés à la HLH (Figure 6) [37].



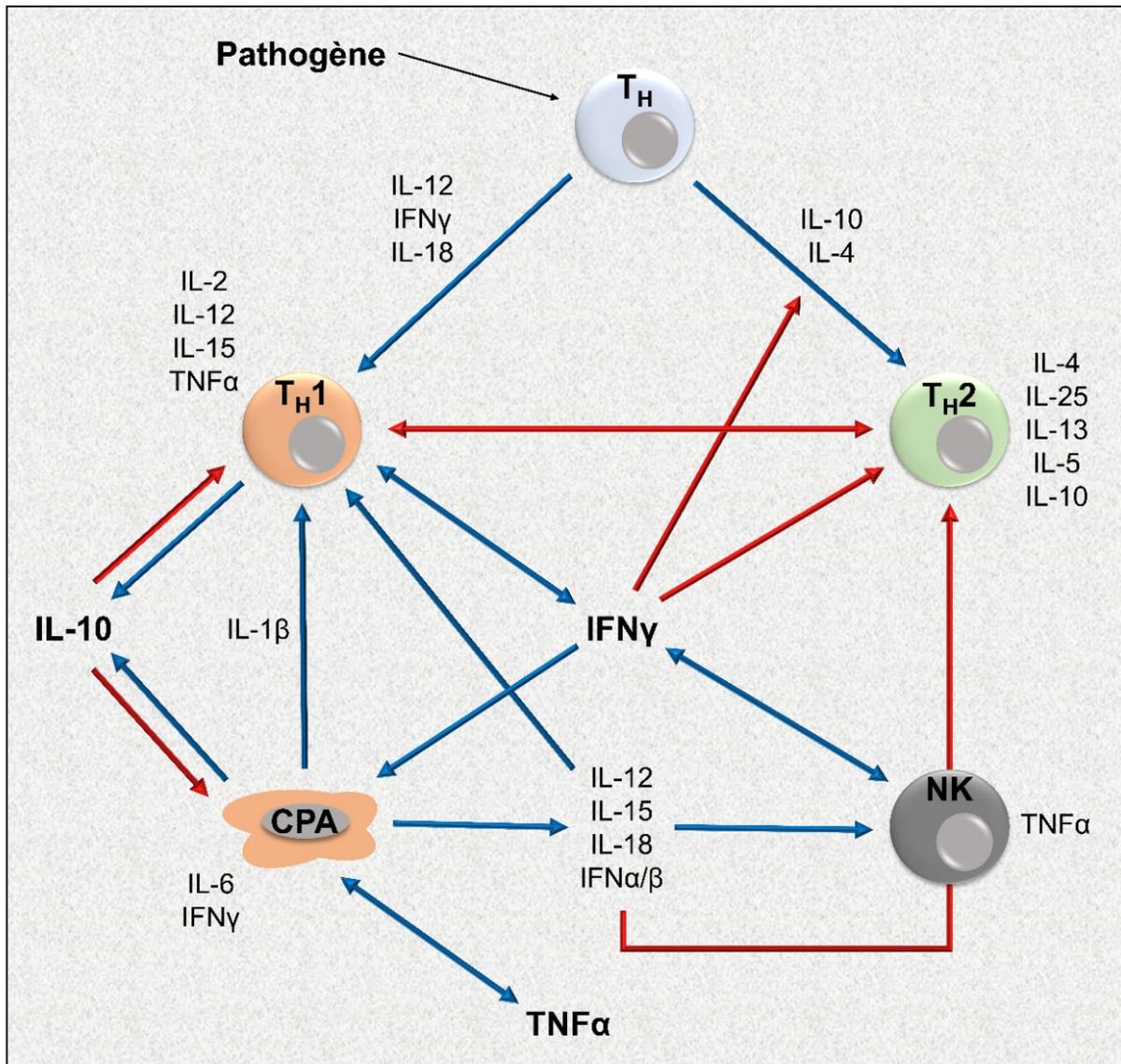
**Figure 6 : Dysfonction de la régulation négative de la présentation antigénique chez les patients atteints de HLH.** En l'absence d'une réponse cytotoxique fonctionnelle, la régulation négative de la présentation antigénique par les cellules cytotoxiques n'a pas lieu, entraînant une production exagérée de cytokines inflammatoires, puis éventuellement le développement de la HLH. Figure inspirée de C. Terrell et M.B. Jordan (2013) [37].

Dans la HLH primaire, l'altération de la réponse cytotoxique des cellules T et NK est évidemment due à la mutation d'un des gènes essentiels à ces fonctions. Pour la HLH secondaire, les causes de cette altération sont moins bien comprises, mais peuvent être diverses. Certaines études ont suggéré que certaines infections virales, une forte concentration de cytokines déjà présentes ou encore une susceptibilité génétique chez certaines populations pourraient induire l'inhibition des fonctions cytotoxiques qui déclencherait la HLH [48, 49]. Lorsque la HLH secondaire est associée à un cancer, les cytokines sécrétées par les cellules tumorales pourraient aussi jouer un rôle dans ce processus [49, 82]. Dans les dernières années,

un modèle murin de HLH secondaire a été produit par une stimulation répétée du « *Toll-like receptor 9* » (TLR9) [83], suggérant que l'activation persistante du système immunitaire inné chez les patients atteints de maladies auto-immunes pourrait être le mécanisme impliqué dans le développement de la HLH secondaire chez ces patients [84].

Les patients atteints de HLH présentent une très forte concentration de cytokines de type  $T_H1$  en circulation, telles que  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, GM-CSF et M-CSF (« *macrophage colony-stimulating factor* ») [59, 80]. En particulier, l' $IFN\gamma$  est une cytokine présente à un niveau exceptionnellement élevé dans le sérum des patients. Cette hypercytokinémie est d'ailleurs à l'origine de la plupart des symptômes décrits précédemment. Par exemple, la fièvre est provoquée par IL-1 et IL-6, la cytopénie par  $IFN\gamma$  et  $TNF\alpha$ , et l'élévation du niveau de triglycérides par  $TNF\alpha$  [49, 78]. Les hauts niveaux d' $IFN\gamma$  et de  $TNF\alpha$  induisent aussi l'activation chronique des macrophages, provoquant le phénomène d'hémophagocytose observé dans les tissus infiltrés. Toutefois, l'hémophagocytose ne serait que partiellement responsable de la cytopénie, celle-ci étant surtout provoquée par l'effet direct d' $IFN\gamma$  et de  $TNF\alpha$  [78]. L'IL-18, une cytokine principalement sécrétée par les macrophages activés, induit la production d' $IFN\gamma$  par les cellules T et NK et la production de  $TNF\alpha$  par les cellules NK [28, 85, 86]. Donc, l' $IFN\gamma$  active les macrophages, qui à leur tour sécrètent de l'IL-18, qui induit elle aussi la production d' $IFN\gamma$ , qui maintiendra l'activation des macrophages, créant ainsi une boucle d'auto-régulation positive de la production d' $IFN\gamma$  (Figure 7). Dans un contexte immunitaire normal, l' $IFN\gamma$  peut aussi jouer un rôle anti-inflammatoire, notamment en induisant, entre autres, l'apoptose des lymphocytes T activés, l'inhibition de la sécrétion de chimiokines, l'inhibition des dommages tissulaires et la production d'IL-18BP (« *IL-18 binding proteins* »), qui permet d'inhiber l'IL-18. Toutefois, des études ont suggéré que le rôle de l' $IFN\gamma$  dans divers contextes de maladies inflammatoire pouvait être altéré, et donc difficile à prédire en fonction du contexte. Dans le cas de la HLH, le rôle de l' $IFN\gamma$  semble être principalement activateur [87, 88]. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que l' $IFN\gamma$  est une cytokine dont le rôle est essentiel dans le développement de la HLH. Ces études ont montré, dans des modèles murins de HLH primaire et secondaire, que l'administration d'anticorps bloquants contre l' $IFN\gamma$  permettait d'améliorer considérablement la survie, de même que la plupart des symptômes

cliniques et hématologiques associés à la HLH, soutenant l'hypothèse que l'IFN $\gamma$  serait la principale cytokine impliquée dans le développement de la HLH [89-91].



**Figure 7 : Boucle de sécrétion cytokinique lors d'une réponse cellulaire telle que celle observée lors d'une HLH.** Sécrétion de cytokines par plusieurs cellules impliquées dans la réponse à médiation cellulaire, illustrant la boucle d'auto-régulation positive de la production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  par les CPA, les NK et les T<sub>H</sub>1. Les flèches indiquent une stimulation ou une sécrétion (bleue) ou une inhibition (rouge), et les flèches à double sens indiquent une stimulation ou une inhibition mutuelle. Figure inspirée de Y. Osugi *et al.* (1997) [80].

Étant donné le rôle prépondérant de plusieurs de ces cytokines dans la progression de la HLH, plusieurs études, dans des modèles murins et chez l'humain, ont testé l'impact de

l'inhibition de certaines d'entre elles sur la résolution des symptômes de la HLH. Afin d'inhiber la signalisation de ces cytokines, il est possible, à l'aide d'anticorps bloquants, de protéines de liaison ou de molécules inhibitrices compétitives, de les cibler directement, de bloquer leur récepteur à la surface des cellules, ou encore de cibler une molécule essentielle à l'une des étapes de la cascade de signalisation en amont de la transcription génique (Table I et II). Étant donné l'efficacité limitée des traitements à plus large spectre présentement utilisés pour le traitement de la HLH, le développement d'immunothérapies plus ciblées et moins nocives est actuellement un sujet de premier intérêt.

## **1.4.5 Traitements actuels et pronostic**

### **1.4.5.1 Historique**

La sévérité des symptômes associés à la HLH a longtemps été synonyme d'un très mauvais pronostic pour les patients. En 1983, le taux de survie à long terme était de seulement 4% [92]. Au cours des dernières décennies, grâce à une collaboration internationale, le diagnostic, le traitement et le taux de survie de la HLH ont été grandement améliorés. En 1991, la « *Histiocyte Society* » a établi pour la première fois une liste de critères diagnostics de la HLH, qui furent ensuite utilisés pour l'établissement d'un premier protocole de traitement international dans le cadre de l'étude HLH-94 (Table V) [92]. En 2004, les résultats de cette étude majeure ainsi que l'avancement de la recherche sur la HLH ont mené au lancement d'une nouvelle étude clinique, HLH-2004, qui comprenait une mise à jour des critères de diagnostic ainsi qu'une amélioration du protocole de traitement international (Table IV) [77]. Les lignes directrices de l'étude HLH-2004 sont toujours en vigueur aujourd'hui.

**Table V : Critères de diagnostic de la HLH établis pour l'étude HLH-94**

Critères :
A. Fièvre
B. Splénomégalie
C. Cytopénie (affectant au moins deux des trois lignées cellulaires du sang périphérique) : Hémoglobine < 90 g/L (< 100 g/L pour les bébés de moins de quatre semaines) Plaquettes < $100 \times 10^9/L$ Neutrophiles < $1,0 \times 10^9/L$
D. Hypertriglycémie et/ou hypofibrinogénémie : Triglycérides (à jeûn) $\geq 2$ mM Fibrinogènes $\leq 1,5$ g/L
E. Hémophagocytose dans la moelle osseuse, la rate ou les ganglions lymphatiques

Table adaptée de Trottestam *et al.* (2011) [92]

#### 1.4.5.2 HLH-94

Ce premier protocole thérapeutique consistait d'abord à réduire et contrôler les symptômes de la HLH, puis de procéder à une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) afin de prévenir la récurrence de la HLH dans les cas de HLH primaire ou de symptômes persistants ou récurrents. Afin de réduire les symptômes, une thérapie intensive d'etoposide, un agent de chimiothérapie, combiné à de la dexaméthasone, un agent immunosuppresseur, était suggérée pendant huit semaines. Les patients atteints de HLH secondaire pouvaient cesser les traitements après ce délai et les recommencer en cas de réapparition des symptômes. Dans les cas d'atteinte du SNC, ou pour un traitement à plus long terme en l'attente d'un donneur de CSH compatible, du méthotrexate et de la cyclosporine A pouvaient être ajoutées au traitement. Les patients nécessitant une transplantation de CSH devaient en outre recevoir une chimiothérapie de conditionnement avant la transplantation [92].

Grâce au protocole de HLH-94, le taux de survie après cinq ans, tous types de HLH confondus, a grimpé à 54%, une amélioration majeure par rapport au taux de survie de 1983. Toutefois, dans les cas de HLH primaire, le taux de survie était plus bas, à 50% après cinq ans. Ceci était principalement dû à une mortalité assez élevée avant la transplantation de CSH ou suite à des complications liées à celle-ci. De plus, aucun patient atteint de HLH primaire dans cette étude n'a survécu sans transplantation [92].

### 1.4.5.3 HLH-2004

Afin de remédier à certaines lacunes des critères de diagnostic et du protocole de traitement établis en 1994, une mise à jour de ceux-ci a été suggérée en 2004, dont les lignes directrices sont toujours utilisées de nos jours.

En effet, les critères de diagnostic de HLH-94, basés sur cinq symptômes courants de la HLH, ne permettaient pas d'identifier les manifestations plus atypiques ou plus tardive de la maladie, ni les patients qui ne présentent pas tous ces symptômes. Dans l'étude HLH-2004, on retrouve encore les cinq critères de HLH-94, toujours pertinents, mais trois nouveaux y ont été ajoutés. Afin de mieux diagnostiquer les patients plus atypiques, la présence de seulement cinq de ces symptômes suffit pour confirmer un diagnostic de HLH. De plus, un patient qui ne présente pas un tableau clinique suffisant pour établir un diagnostic de HLH peut quand même être diagnostiqué s'il présente une anomalie génétique pouvant être associée à la HLH (Table IV) [77].

Dans l'étude HLH-2004, le protocole de traitement suggéré est très similaire à celui de HLH-94, avec quelques améliorations. Étant donné le taux de mortalité assez important avant la transplantation, l'intensité de la thérapie initiale, durant les huit premières semaines, a été augmentée, avec une augmentation des dosages de chimiothérapie ainsi que l'ajout de la cyclosporine A dès le début de la thérapie, plutôt que pour la thérapie de maintenance à long terme seulement. De plus, une surveillance régulière, par analyse du liquide cérébro-spinal, de l'apparition de symptômes au niveau du SNC, fortement corrélés à une importante mortalité, a été suggérée chez les patients sous thérapie à plus long terme, afin d'accélérer la prise en charge de ces complications. Pour les patients atteints de complications au niveau du SNC, des corticostéroïdes ont été ajoutés au traitement de methotrexate déjà proposé. Finalement, le régime de conditionnement suggéré avant la transplantation de CSH a été légèrement modifié pour tenir compte des progrès scientifiques survenus durant cette période [77].

Grâce aux améliorations apportées au protocole de traitement par l'étude HLH-2004, le taux de survie après cinq ans est maintenant de 61%. Chez les patients atteints de HLH primaire, le taux de survie est de 59%. Chez ces patients, la mortalité pré-transplantation a aussi été diminuée avec ce protocole, passant de 27% dans l'étude HLH-94 à 19% dans l'étude HLH-

2004. À ce jour, les critères diagnostics ainsi que le protocole de traitement établis dans l'étude HLH-2004 restent les meilleurs disponibles pour le traitement de la HLH, avec la transplantation de CSH étant le seul traitement curatif à long terme pour les patients atteints de HLH primaire [93].

#### **1.4.5.4 Emapalumab (GAMIFANT)**

Très récemment, en novembre 2018, la « *Food and Drug Administration* » (FDA) a approuvé l'utilisation d'emapalumab, commercialisé sous le nom de GAMIFANT, pour le traitement de la HLH primaire chez les patients de tous âges. Actuellement, l'administration d'emapalumab doit être concomitante à l'administration de dexaméthasone. Ce traitement est recommandé jusqu'à la transplantation de CSH en remplacement des thérapies conventionnelles pour les patients intolérants à celles-ci ou chez qui les symptômes sont récurrents, ne s'améliorent pas ou s'aggravent malgré celles-ci [94].

L'emapalumab est un anticorps monoclonal neutralisant l'IFN $\gamma$  (anti-IFN $\gamma$ ), une cytokine dont le rôle clé dans le développement de la HLH a été démontré par plusieurs études (voir chapitre 1.4.4) [89-91, 95]. Cette étude a été effectuée chez 27 enfants atteints de HLH primaire dont les symptômes ne s'étaient pas améliorés à la suite d'un traitement conventionnel, ou qui étaient intolérants à ces traitements. Après huit semaines de traitement, une amélioration des symptômes de la HLH a pu être observée chez 63% des patients. Seulement 22 patients sont présentement enrôlés dans le suivi de cette étude jusqu'à un an après la transplantation de CSH ou après la dernière infusion d'emapalumab [94, 96]. En raison de sa très récente approbation par la FDA et du très petit nombre de patients ayant participé à l'étude clinique, peu de données sont disponibles sur la survie à long terme de ces patients. Comme pour le traitement conventionnel, celui-ci ne vise qu'à mener à une résolution des symptômes, afin de permettre une éventuelle transplantation de CSH.

#### **1.4.6 Traitements expérimentaux**

Malgré les meilleures thérapies actuellement disponibles, le taux de mortalité de la HLH reste élevé. Pour cette raison, les chercheurs explorent constamment des nouvelles pistes visant à améliorer l'efficacité et à réduire la toxicité des traitements afin de réduire la mortalité pré- et

post-transplantation, et d'améliorer la survie à long terme des patients. De fait, de nombreuses études cliniques sont actuellement en cours, testant de nouveaux agents de chimiothérapie ou immunosuppresseurs ainsi que des immunothérapies ciblées contre des cytokines ou des voies de signalisation dont l'importance dans le développement de la HLH a été démontrée. Mon travail de maîtrise s'inscrit dans cette volonté de découvrir de nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces pour le traitement de la HLH.

## 1.5 Modèles murins de HLH

Afin de faciliter la recherche de traitements plus efficaces et de mieux étudier la HLH, plusieurs modèles murins ont été développés afin de refléter les différents sous-types de HLH primaire et secondaire pouvant être observés chez l'humain. Ces modèles ont permis, entre autres, d'étudier les variations au niveau des manifestations cliniques entre les différents types de HLH primaire, d'identifier des mécanismes déclencheurs possibles pour la HLH secondaire et de tester de nombreux traitements potentiels, favorisant grandement l'avancée de la recherche chez l'humain.

### 1.5.1 Souris perforine « *knock-out* » (PKO)

En 2004, le groupe de Jordan *et al.* a rapporté que des souris PKO infectées avec le virus de la chorioméningite lymphocytaire murine (LCMV) développaient le tableau clinique complet de la FHL-2 tel qu'observé chez l'humain, établissant ainsi un important modèle murin de HLH primaire [89]. À ce jour, ce modèle est l'un des plus fréquemment utilisés pour l'étude de la HLH primaire. C'est d'ailleurs celui que nous avons utilisé dans notre laboratoire.

Les souris PKO, lorsqu'elles sont hébergées dans un environnement exempt de pathogène, ont une qualité de vie, une longévité et un phénotype équivalents à ceux d'une souris B6 normale, ou « *wild-type* » (WT), et ne développent pas spontanément de HLH [89]. Chez une souris WT, l'infection avec la souche Armstrong de LCMV provoque une infection aiguë non-mortelle résolue en sept à huit jours [97]. Chez les souris PKO, en revanche, l'infection avec LCMV Armstrong agit en tant que déclencheur d'une HLH primaire sévère en activant la réponse immunitaire innée. Environ une semaine après l'infection, les souris PKO deviennent

léthargiques, ont une posture voûtée et le poil ébouriffé, perdent la capacité de réguler leur température corporelle, ont une importante perte de poids, une forte hépato-splénomégalie, une cytopénie sévère ainsi que des niveaux élevés de triglycérides, de ferritine et de cytokines inflammatoires dans la circulation sanguine. De plus, un taux de mortalité d'environ 50% est observé après 15 jours, et peut être plus élevé au-delà de 15 jours [89]. Ce tableau clinique correspond en tous points à celui observé chez les patients atteints de FHL-2.

### **1.5.2 Autres modèles de HLH primaire**

Par la suite, d'autres modèles murins furent développés afin de refléter les divers sous-types de HLH primaire retrouvés chez l'humain. Tout comme les souris PKO, celles-ci présentent un phénotype normal et ne développent pas spontanément de HLH lorsqu'elles sont gardées dans un environnement stérile. Dans tous ces modèles, une infection virale aiguë, habituellement avec LCMV, ou parfois avec le cytomégalo virus murin (MCMV), permet l'activation du système immunitaire inné, puis le développement d'une HLH.

La souris *Jinx*, ayant une mutation du gène *UNC13D*, présente le tableau clinique de la FHL-3 lorsqu'infectée avec MCMV [98]. Une souris déficiente pour le gène *STX11* infectée avec LCMV, est un bon modèle pour la FHL-4 [99]. Des modèles murins existent aussi pour les HLH primaires associées à une déficience immunitaire, telles que la souris *ashen*, déficiente pour *RAB27A* (syndrome Griscelli de type II) [100], la souris *souris*, déficiente pour *LYST* (syndrome Chediak-Higashi) [101] et la souris *pearl*, déficiente pour *AP3B1* (syndrome Hermansky-Pudlak de type II) [102]. Ces dernières présentent l'hypopigmentation et la neutropénie associées au syndrome dont elles sont atteintes, mais ne développent une HLH que lorsqu'elles sont infectées par LCMV. Puisque le gène muté est toujours inconnu pour la FHL-1, il n'existe pas de modèle murin pour ce sous-type. Quant à la FHL-5, des souris déficientes pour le gène *STXBP2* ont été développées, mais les souris homozygotes pour cette mutation meurent avant le sevrage, et ne peuvent donc pas être utilisées en tant que modèle de HLH primaire [103].

Ces divers modèles de HLH primaire présentent tous un tableau clinique comparable au sous-type de HLH correspondant chez l'humain. Il est aussi possible d'observer chez ces souris

les mêmes variations que chez l'humain au niveau de la sévérité des symptômes, de la mortalité et des phénotypes particuliers associés à chacun des sous-types de HLH [56, 57].

### **1.5.3 Modèles murins de HLH secondaire**

Des modèles murins ont aussi été développés et étudiés pour la HLH secondaire, même s'ils sont moins fréquemment utilisés. Comme pour l'humain, ces souris ne présentent pas de mutations génétiques pouvant mener à une HLH. Le modèle murin de HLH secondaire le plus commun est créé par une stimulation répétée du TLR9 par l'injection de CpG, qui induit un MAS similaire à celui observé dans les cas de HLH secondaire chez l'humain. Ces souris présentent plusieurs symptômes cliniques de la HLH, tels qu'une cytopénie, une splénomégalie, un haut niveau de ferritine en circulation et des dommages hépatiques. Toutefois, les lymphocytes T CD8+ ne sont pas aussi fortement activés que dans les modèles murins de HLH primaire [83]. Un autre modèle permet l'induction d'une HLH secondaire associée à l'AJIS, un facteur de risque bien connu de la HLH secondaire. Ce modèle est créé par l'immunisation de souris atteintes d'AJIS (souris *Balb/c* déficiente pour IFN $\gamma$ ) avec l'adjuvant complet de Freund. Chez ces souris, cette immunisation, qui agit principalement par l'activation des TLR, provoque une sévère inflammation systémique similaire à celle observée lors d'une HLH secondaire [87]. Finalement, un autre modèle a aussi récemment été développé utilisant des souris transgéniques humanisées (NSGS et NRGS) qui développent un MAS indépendant des lymphocytes T suite à une greffe de sang de cordon, permettant d'étudier la HLH secondaire consécutive à une xénogreffe [104].

## **1.6 Problématique, hypothèse et objectifs**

En raison de l'important taux de mortalité associé à la HLH, les chercheurs sont sans cesse en quête de traitements plus efficaces afin d'améliorer le pronostic des patients et réduire la toxicité des traitements. Avec le développement de modèles murins facilitant l'étude de la HLH, de nombreuses études ont, entre autres, permis d'identifier l'IFN $\gamma$  comme étant un élément clé au développement et à la progression de la HLH et mené à de nombreux essais

cliniques chez l'humain. L'emapalumab, un anti-IFN $\gamma$ , a d'ailleurs récemment été approuvé pour le traitement de la HLH en combinaison avec de la dexaméthasone.

Toutefois, malgré l'efficacité du traitement à l'anti-IFN $\gamma$  montrée chez la souris, la résolution des symptômes de la HLH était incomplète et pourrait encore être améliorée. Considérant le « *cytokine storm* » caractéristique de la HLH, nous avons donc émis l'hypothèse que l'IFN $\gamma$  n'est sans doute pas la seule cytokine clé dans le développement de la HLH, et que l'utilisation d'une thérapie combinée ciblant simultanément plusieurs cytokines fortement impliquées dans la HLH (ou leurs voies de signalisation), serait une approche thérapeutique permettant une résolution des symptômes plus efficace qu'avec une thérapie unique. Puisque plusieurs cytokines fortement sécrétées dans le contexte de la HLH utilisent la voie JAK-STAT, nous avons déterminé que l'utilisation de ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1 et JAK2, pourrait représenter une approche thérapeutique intéressante puisque cette molécule permettrait d'inhiber simultanément la signalisation de plusieurs cytokines clés de la HLH, telles que l'IFN $\gamma$ , l'IL-6, l'IL-10 et GM-CSF.

Les objectifs de ce travail de maîtrise sont donc d'abord d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour une thérapie combinée, de tester l'inhibition de celles-ci dans le cadre d'une thérapie combinée avec de l'anti-IFN $\gamma$  ou du ruxolitinib, puis de tester l'inhibition de la voie de l'IFN $\gamma$  à l'aide de deux molécules inhibitrices simultanément.

## CHAPITRE 2: RÉSULTATS

### **Article: JAK-dependent and independent cytokines drive the pathogenicity of HLH in a murine model: targets for combination therapy**

Josée-Anne Joly<sup>1,2</sup>, Sara Bourbonnais<sup>1</sup>, Alexis Vallée<sup>1,2</sup> and Hélène Decaluwe<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

<sup>2</sup>Department of microbiology, infectiology and immunology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Cet article est en préparation pour soumission dans le journal *Blood*.

J'ai contribué aux travaux de recherche en effectuant la grande majorité des expériences qui constitueront cet article. Sara Bourbonnais a aussi grandement contribué aux travaux de recherche en effectuant les expériences préliminaires et la mise au point de ce projet avant mon arrivée au laboratoire et Alexis Vallée a contribué en fournissant de l'aide pour plusieurs expériences. Quant à l'article, j'en suis le principal auteur.

# **JAK-dependent and independent cytokines drive the pathogenicity of HLH in a murine model: targets for combination therapy**

Josée-Anne Joly<sup>1,2</sup>, Sara Bourbonnais<sup>1</sup>, Alexis Vallée<sup>1,2</sup> and Hélène Decaluwe<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CHU Sainte-Justine Research Center, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

<sup>2</sup>Department of microbiology, infectiology and immunology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Correspondence: Hélène Decaluwe, CHU Sainte-Justine Research Center. 3175, ch. de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC, Canada (H3T 1C5)

Phone: 1-514-345-4931 (ext. 5075)

E-mail: [helene.decaluwe@umontreal.ca](mailto:helene.decaluwe@umontreal.ca)

Presented at the 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Canadian Society for Immunology, Banff, AB, Canada, April 14<sup>th</sup>, 2019 and at the Annual Meeting of Inborn Errors Working Party (EBMT), London, Great-Britain, October 11<sup>th</sup>, 2019

**Running title:** Combination therapy for the treatment of HLH

**Text word count:** 4822

**Abstract word count:** 235

**Figures count:** 6

**Reference count:** 55

## Key points

- Combination therapy might be the best approach for lessening the manifestations of HLH
- Ruxolitinib should be used in combination with anti-IFN $\gamma$  in the treatment of HLH for maximal IFN $\gamma$  inhibition

## Abstract

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare, life-threatening hyper-inflammatory disease caused by defects in genes of the granule cytotoxic pathway, inducing extreme inflammation and massive tissue infiltration by activated T cells and macrophages. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only available curative treatment with a transplant-related fatality of about 20% to 25%. Thus, the development of more potent anti-inflammatory treatments would be a major advance in the treatment of HLH. We hypothesized that combined therapies targeting both JAK-dependent and independent cytokines would be more effective than either one alone to reduce the symptoms of this pathology. Using a perforin knock-out (PKO) mouse model, we first compared the effects of targeting highly expressed cytokines during HLH, such as IL-6 and IL-18, in combination with IFN $\gamma$ , on the manifestations of the disease. Next, we tested the efficacy of ruxolitinib, a Janus kinase 1/2 (JAK1/2) inhibitor, in combination with anti-IL-18 or anti-IFN $\gamma$ . We found that anti-IL-6R and anti-IL-18, when used in combination with either anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib, showed small, but not significant improvements on the pathological manifestations of HLH. However, combination therapy using ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  showed a major synergistic effect on the resolution of the symptoms of HLH. Our findings support that anti-IFN $\gamma$  and ruxolitinib, although effective independently, should be used in combination to suppress HLH progression. This is particularly relevant since the former was recently approved for treating HLH while the latter is in clinical trials.

## Introduction

Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is a rare hyperinflammatory disorder caused by genetic defects in the perforin-dependent cytolytic pathway, resulting in severely impaired cytotoxic function of natural killer (NK) and CD8<sup>+</sup> T cells. HLH is characterized by uncontrolled activation of the immune system, severe hyperinflammation, tissue infiltration of highly activated T cells and macrophages and massive inflammatory cytokines production, such as IFN $\gamma$ , IL-6, IL-18 and TNF $\alpha$ . Due to this, HLH patients display life-threatening symptoms, such as fever, cytopenia, hepatosplenomegaly, liver damage and often neurological symptoms, as well as various other manifestations of HLH, like elevated levels of ferritin and hemophagocytosis by macrophages in the bone marrow and other tissues.<sup>1-10</sup>

There are two forms of HLH, primary (or familial) and secondary (or acquired) HLH. Primary HLH affects mainly infants and young children and is caused by a mutation in genes involved in the function or the exocytosis process of cytotoxic granules<sup>1-4,8,9</sup>, such as *PRF1*, *UNC13D*, *STX11*, *STXBP2*, *RAB27A*, *LYST*, *AP3B1*, *SH2D1A* or *BIRC4*.<sup>11-15</sup> This renders NK and CD8<sup>+</sup> T cells unable to eliminate pathogens and infected antigen-presenting cells, causing a defective negative feedback loop on antigen presentation and a persistent immune activation, which in turn leads to the pathological manifestations observed in HLH.<sup>16-19</sup> Secondary HLH can affect people of any age and is more frequent than primary HLH. It is usually caused by an underlying condition, such as cancer, autoimmune diseases, immune deficiencies or severe viral infections, commonly with Epstein-Barr virus, but the factors leading to the development of secondary HLH remains unknown.<sup>1-4,8,9</sup>

The actual therapy for HLH consists of a chemotherapy-based regimen combined to steroids and cyclosporine A to reduce the initial inflammation and activation, followed, in primary HLH, by allogenic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), to prevent the recurrence of symptoms. However, these toxic treatments do not successfully or fully manage HLH symptoms in all patients, and often cause severe complications, so that the mortality rate stands around 20 to 25% before HSCT, with just around 59% of patients achieving long-term survival.<sup>1-6,20</sup> Thus, finding more effective and less toxic treatments to suppress the

hyperinflammation caused by HLH remains an important research interest to improve this disease's prognosis.

As previously shown, IFN $\gamma$ , which is found at strikingly high levels in HLH patients' serum, seems to be the main contributing cytokine for the development of HLH, since its neutralization in a perforin-deficient (PKO) mouse model considerably improved the symptoms and survival of mice.<sup>21-23</sup> Besides, emapalumab, an anti-IFN $\gamma$  monoclonal antibody has recently been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) as an alternative therapy for primary HLH.<sup>24</sup> However, other highly produced inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-18, IL-2 or TNF $\alpha$  have been described as potential therapeutic targets for the treatment of HLH.<sup>21,25</sup> Therefore, the use of a drug with a broader spectrum of activity to treat HLH, such as ruxolitinib, has become a subject of interest. Ruxolitinib, a Janus kinase 1/2 (JAK1/2) inhibitor, works by inhibiting the JAK1 and JAK2 molecules associated with cytokine receptors, which prevents phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT) and the downstream signalisation by phosphorylated STAT molecules.<sup>26</sup> It is already approved by the FDA for the treatment of some forms of myelofibrosis and polycythemia vera and have shown to be effective for the treatment of a variety of autoimmune and inflammatory diseases in clinical trials and animal models.<sup>27-34</sup> In HLH, some experiments have shown in relevant mouse models that treatment with ruxolitinib was at least as effective as treatment with anti-IFN $\gamma$  to reduce the pathological manifestations and the fatality of HLH.<sup>23,35,36</sup> It is also currently in clinical trials for the treatment of HLH. Since IFN $\gamma$ , IL-6 and IL-2 all signal through JAK1 and JAK2, treatment with ruxolitinib may represent a significant advantage over the use of a monoclonal blocking antibody, allowing for the simultaneous neutralization of several key cytokines in HLH.<sup>26</sup>

However, despite the proven benefits of ruxolitinib or anti-IFN $\gamma$  blocking antibodies on the manifestations of HLH, the above studies have all demonstrated that the reduction of HLH symptoms was incomplete. In HLH, the success of HSCT depends on the complete suppression of inflammation and T cell activation. Indeed, the absence of disease control significantly increases transplant-related mortality and graft-loss.<sup>37-39</sup> Thus, we hypothesized that IFN $\gamma$ , despite being the central cytokine driving HLH, might not be the only key cytokine contributing to the development of the pathology. To determine which cytokines could synergize with IFN $\gamma$

in HLH, we neutralized the signalisation of several highly secreted cytokines, such as IL-6 and IL-18 in combination with ruxolitinib or anti-IFN $\gamma$ . Since the serum level of IFN $\gamma$  is extremely high in HLH, we also tested a combination of anti-IFN $\gamma$  and ruxolitinib, to obtain an even greater suppression of the IFN $\gamma$  signaling pathway. Interestingly, we found that some of these cytokines, despite having little to no impact on the pathology when neutralized individually, improved the efficacy of ruxolitinib or anti-IFN $\gamma$  treatments when used concomitantly. More importantly, our study also demonstrated that a combined therapy of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  drastically improved the manifestations of HLH and that they should be used in combination instead of individually to achieve a better control of the pathology.

## **Methods**

### **Mice, virus and infection**

C57BL/6-Prf1<sup>tm1Sdz</sup>/J (PKO) and C57BL/6J (B6) mice were purchased from The Jackson Laboratory and bred in our facilities. LCMV Armstrong, provided by Rolf M. Zinkernagel (Zurich University Hospital, Switzerland), was produced on BHK-21 cells and titrated by plaque assay on Vero cells. To induce HLH, 8- to 12-week-old PKO mice were infected with  $2 \times 10^5$  plaque-forming units (PFUs) of LCMV Armstrong by intraperitoneal (i.p.) injection. Weight and body temperature were measured every 2-3 days. Clinical score was evaluated every 2-3 days by 3 to 4 evaluators and was based on 5 criteria each worth 3 points: appearance of fur, activity level, nesting, loss of body weight and loss of body temperature, with 3 points representing a normal or good phenotype and 1 point representing a poor or sick phenotype. Cell blood counts were performed by Charles River Laboratories (Shrewsbury, Massachusetts, USA) using the Advia 120 Hematology System. All virus-free mice were housed in a pathogen-free environment and infected mice were housed in specific BSL2 facilities at the CHU Sainte-Justine Research Center. All experiments were approved by the Institutional Committee for Animal Care in Research of the CHU Sainte-Justine Research Center and conducted in accordance with their guidelines.

### **Blocking antibody and JAK inhibitor treatment**

Anti-IFN $\gamma$  (XMG1.2), anti-IL-6R (15A7) and anti-IL-18 (YIGIF74-1G7) antibodies were purchased from BioXCell and given by intraperitoneal injections (200  $\mu$ g/mouse for anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-18 and 500  $\mu$ g/mouse for anti-IL-6R) every 3 days, from day 4 to day 11 post-infection (p.i.). Untreated mice were injected with 100  $\mu$ L of sterile phosphate buffered saline (PBS). Ruxolitinib (INCB018424) was purchased from Selleckchem and dissolved in DMSO to make a stock solution, which was then diluted in water containing 5% dimethylacetamide (v/v), 0.5% methylcellulose (w/v) and 0.5% Tween-20 for oral gavage. Mice were treated with ruxolitinib (4 mg/kg) twice daily by oral gavage, from day 4 to day 11 p.i. Untreated mice received 100  $\mu$ L of vehicle solution twice daily by oral gavage.

### **Cell isolation, intranuclear staining and flow cytometry analysis**

Mice were sacrificed at day 12 p.i. and a splenocyte suspension was obtained after homogenization of the spleen through a nylon cell strainer and lysis of the red blood cells. Cells were gated on virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells using a GP<sup>33-41</sup> LCMV-specific tetramer. For intranuclear staining, cells were permeabilized with the eBiosciences fixation/permeabilization kit and stained with anti-KI67 antibodies (eBiosciences). For the staining of phosphorylated STAT (pSTAT1/3/5), spleens were harvested about 1 hour after oral gavage with ruxolitinib and splenocytes were quickly fixed and permeabilized with 1.5% formaldehyde and methanol, then stained with extracellular antibodies and anti-STAT1 (pY701), anti-STAT3 (pY705) or anti-STAT5 (pY694) BD Phosflow antibodies. All data was acquired using a BD LSRFortessa and analyzed on FlowJo.

### **Serum cytokine and ferritin levels**

Enzyme-linked immunosorbent assay kits for detecting serum IL-18 and ferritin were purchased from Abcam. All the other cytokines were detected using the 13-plex Mouse Anti-Virus Response panel from LEGENDplex (BioLegend). All kits were used according to the manufacturer's protocol.

## Statistical analysis

Data were analyzed with GraphPad Prism 7 software. Analyses were performed using unpaired *t*-tests. Statistical significance is indicated as \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 and \*\*\*\**P* < 0.0001.

## Results

### LCMV-infected PKO mice display clinical and laboratory features of HLH

We first assessed the manifestations of HLH and the serum concentration of several key cytokines in LCMV-infected PKO mice and compared them to LCMV-infected B6 mice. As expected based on previous studies<sup>21</sup>, PKO mice quickly displayed symptoms of HLH following LCMV infection, whereas B6 mice displayed normal and steady clinical features throughout the experiment. From day 4, PKO mice started losing body weight and clinical score, and the onset of hypothermia started from day 6. By day 8, the PKO mice displayed more obvious symptoms, such as ruffled fur, a hunched posture, they were less active and the loss of body weight, body temperature and clinical score was greatly significant. At day 12, PKO mice displayed severe symptoms, such as lethargy and shaking, and some had died between day 8 and 12 (Figure 1A). PKO mice sacrificed at day 12 had also developed severe pancytopenia (Figure 1B) and presented strikingly high serum levels of ferritin when compared to B6 mice or uninfected PKO mice (Figure 1C). By day 15, we observed about 50% mortality, and many mice were reaching the critical point where they had to be euthanized (data not shown). Based on these results, we chose to start our experimental treatments at disease onset (day 4), and not earlier. Although this might reduce the efficacy of drugs/antibodies, it is closer to what is done in clinic. To be able to evaluate enough mice in the untreated PKO group, we decided to sacrifice the mice at day 12.

To identify interesting potential targets for therapy, we measured the serum levels of several cytokines and chemokines implicated in the inflammatory response at different time points in B6 and PKO mice, using the concentration found in the serum of uninfected PKO mice as the basal level. As seen in HLH patients<sup>40</sup>, PKO mice presented high serum levels of several pro-inflammatory cytokines, such as IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IL-6 and IL-18, with a peak

concentration at day 8 for most of them, and IFN $\alpha$  peaking earlier and IL-18 having a late onset. Several chemokines implicated in the recruitment of effector cells during the inflammatory response were also found at a high concentration in PKO mice, with a peak concentration at day 8 also for most of them. In B6 mice, all these cytokines and chemokines, except for IL-10, which downregulates the immune response, were back to basal concentrations by day 12 (Figure 1D). To further evaluate the downstream signaling pathways involved in HLH, we also measured pSTAT1, 3 and 5 expression by flow cytometry, and found that STAT1 and STAT3 phosphorylation was abnormally high in PKO mice at any given time point. Consistent with our observations of the serum levels of cytokines and chemokines, STAT1 and STAT3 phosphorylation was back to basal levels by day 12 in B6 mice. STAT5 phosphorylation was found to be slightly higher in LCMV-infected B6 and PKO mice than in uninfected PKO mice at day 4, but then went back to normal in both B6 and PKO mice (Figure 1E). Altogether, these results validate our model and suggest that neutralizing IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-18, or the phosphorylation of STAT1 and STAT3 could be interesting potential therapeutic targets for the treatment of HLH.

### **Anti-IFN $\gamma$ therapy improves the manifestations of HLH in LCMV-infected PKO mice**

Since it has been suggested that anti-TNF $\alpha$  therapy might not be very efficient in the treatment of HLH<sup>21</sup>, we focused on IFN $\gamma$ , which has been shown to be essential to the development of HLH and proven to be an effective therapy for the treatment of HLH when neutralized in both mice and humans.<sup>21,22,24,41</sup> Thus, we treated LCMV-infected PKO mice with 200  $\mu$ g of anti-IFN $\gamma$  every 3 days, from day 4 to day 11 p.i. and mice were sacrificed the next day. We compared them with LCMV-infected B6 mice and untreated LCMV-infected PKO mice (untreated). Our results show a significant, though incomplete improvement of the loss of body weight, body temperature and clinical score in mice receiving anti-IFN $\gamma$  treatment (Figure 2A), as well as a complete recovery of neutropenia and lymphopenia (Figure 2B). However, we did not observe any resolution of anemia or thrombocytopenia with anti-IFN $\gamma$  treatment (Figure 2B). As observed for the clinical features (Figure 2A), we saw a major, but again partial reduction in the serum levels of ferritin with anti-IFN $\gamma$  treatment (Figure 2C). To further portray the precise impact and efficacy of anti-IFN $\gamma$  therapy, we assessed the activation state of the CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2D). To determine that, we stained mice CD8<sup>+</sup> T cells with a GP<sup>33-41</sup>

tetramer to find virus specific CD8<sup>+</sup> T cells and then stained with the proliferation marker KI67 (Figure 2D left) and the activation marker CD69 (Figure 2D right). Again, we could see a partial reduction of both the proliferation and the activation of LCMV-specific CD8<sup>+</sup> T cells in PKO mice receiving anti-IFN $\gamma$  treatment (Figure 2D). This supports our hypothesis, suggesting that IFN $\gamma$ , despite having a significant impact on the development of HLH, is not the only cytokine responsible for most pathological manifestations associated with HLH and that anti-IFN $\gamma$  therapy, even though effective, only results in a partial resolution of the manifestations of HLH.

To screen for candidates for combination therapy, we also measured the serum levels of pro-inflammatory cytokines that were previously determined as being of interest (Figure 1D). We found that in mice receiving anti-IFN $\gamma$  therapy, the serum levels of IL-6 remained elevated, whereas the levels of IL-18, despite being significantly lower in treated mice, was still higher than the levels observed in LCMV-infected B6 mice. TNF $\alpha$  serum level was still very high despite treatment. Surprisingly, we found that even with anti-IFN $\gamma$ , the serum levels of IFN $\gamma$  in treated mice was still abnormally high (Figure 2E). Together, these results suggest that treatment with anti-IFN $\gamma$ , despite greatly improving the manifestations of HLH in PKO mice, is insufficient on its own to efficiently control the massive activation and cytokine storm typical of HLH.

### **Combined treatment of anti-IFN $\gamma$ and anti-IL-6R or anti-IL-18 does not significantly improves the manifestations of HLH over the use of anti-IFN $\gamma$ only**

We previously determined that IL-6 and IL-18 would be interesting targets for combined therapy since their respective serum levels did not went back to normal with anti-IFN $\gamma$  treatment alone. IL-6 neutralization has been shown to be effective in humans for treating some cases of macrophage activation syndrome (MAS).<sup>42-44</sup> Moreover, IL-18 induces the production of IFN $\gamma$ , and it was reported that IL-18 knock-out mice produce less IFN $\gamma$  than their wild-type counterparts<sup>45</sup>. Recently, the use of IL-18 binding proteins have been suggested to be beneficial in humans with XIAP or NLRC4 deficiency<sup>46</sup>, which support that IL-18 could be a potential therapeutic target in HLH. We thus hypothesized that the combined neutralization of both IFN $\gamma$  and IL-6 or IL-18 signaling could achieve a better control over the pathology of HLH than either one alone. To test these possibilities, we treated LCMV-infected PKO mice with anti-IFN $\gamma$  and

500 µg of anti-IL-6 receptor (IL-6R) or 200 µg of anti-IL-18 every 3 days, from day 4 to day 11 p.i., and compared them to LCMV-infected B6 mice, untreated mice and anti-IFN $\gamma$  treated PKO mice. We decided to use 200 µg/mouse of anti-IFN $\gamma$  instead of the 500 µg/mouse dose previously published<sup>21,22</sup> to better detect treatment differences that could go undetected with a high dose of anti-IFN $\gamma$  antibodies. Moreover, when we compared low (200 µg) and high (500 µg) doses of anti-IFN $\gamma$ , we did not observe a significant difference in the improvement of clinical and hematological features of HLH (Supplemental Figure 1). Even more, ferritin levels were improved only in the 200 µg treated group. Therefore, a dose of 200 µg/mouse was used in following experiments. When PKO mice were treated with either combination of blocking antibodies, we did not observe any significant improvement of the loss of body weight and temperature when compared to mice receiving anti-IFN $\gamma$  only (Figure 3A). As with anti-IFN $\gamma$  treatment, both combination therapies yielded a complete recovery of WBC, lymphocytes and neutrophils, but anti-IFN $\gamma$  + anti-IL-18 treatment resulted in an exaggerated resolution of those 3 blood cells subsets. Anti-IFN $\gamma$  + anti-IL-18 treatment also induced a slight increase in platelets count (Figure 3B). Also, we observed a slight, but not significant improvement in the reduction of virus-specific CD8+ T cells proliferation and activation in mice receiving anti-IFN $\gamma$  + anti-IL-6R treatment compared to that of mice treated with anti-IFN $\gamma$  + anti-IL-18, which was equivalent to that of the anti-IFN $\gamma$  treated group (Figure 3C). Of note, we also found that mice receiving anti-IL-6R alone displayed worse clinical symptoms than untreated mice, had a serum level of ferritin more than twice as high than that of untreated mice and were dying, whereas mice receiving anti-IL-18 only, despite displaying visible clinical symptoms of HLH, survived (data not shown). That led us to believe that IL-6 could possibly have a protective role in the context of HLH and that IL-18 might have a significant role in the production of IFN $\gamma$  in HLH, and thus remained of great interest. Even if generally not significant based on clinical parameters, our results suggest that the simultaneous neutralization of multiple cytokines along with IFN $\gamma$  could possibly generate a positive synergistic effect to achieve a better control of the pathology.

### **Ruxolitinib improves the symptoms of HLH in LCMV-infected PKO mice**

Since ruxolitinib inhibits several key cytokines implicated in the development of HLH and that we found to be elevated in LCMV-infected PKO mice, testing ruxolitinib was a relevant

step to answer our hypothesis. Ruxolitinib had recently been shown to be efficient for the treatment of HLH in murine models<sup>35,36</sup>. However, in these models, the regimens were distinct, with either a short-course high-dose treatment, or a long-course small-dose treatment. Here we question if clinically relevant doses of ruxolitinib could be used in combination therapy to lessen the inflammation of HLH. First, we treated LCMV-infected PKO mice with 80 µg of ruxolitinib (4 mg/kg) twice a day, from day 4 to day 11 p.i., and compared them to LCMV-infected B6 mice and untreated mice. As with anti-IFN $\gamma$  treatment (Figure 2A), we observed a significant, but partial reduction in the loss of body weight, body temperature and clinical score (Figure 4A). We also observed a slight increase in platelets count and a significant increase in neutrophil counts with ruxolitinib, while the lymphopenia and anemia did not improve (Figure 4B). However, since JAK molecules are typically associated with thrombopoietin and erythropoietin receptors and G-CSF, their inhibition by ruxolitinib can result in cytopenia as a side effect.<sup>47,48</sup> Despite the improved clinical parameters, we could not observe a significant reduction in serum levels of ferritin (Figure 4C) or in the expression of the activation marker CD69 on virus-specific CD8 $^+$  T cells (Figure 4D right) with ruxolitinib treatment, but saw a great reduction in the proliferation of those cells (Figure 4D left). We next assessed the phosphorylation of STAT1 and STAT3, direct downstream targets of JAK1 and JAK2 activation. Ruxolitinib treatment led to greatly reduced pSTAT1 and pSTAT3 expression, although it did not reach baseline levels (Figure 4E). This suggests that other signaling pathways, unaffected by JAK1/2 inhibition, might still contribute to the phosphorylation of STAT proteins. When we compared treatment with either ruxolitinib or anti-IFN $\gamma$  alone, we determined that for most aspects, both treatments had a similar efficacy on the reduction of HLH symptoms (Supplemental Figure 2). However, ruxolitinib alone did not completely suppress the phosphorylation of STAT1. Finally, we assayed serum samples for key cytokines, and did not find a significant reduction in the levels of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  but, unexpectedly, found that ruxolitinib slightly increased IL-18 levels (Figure 4F), suggesting that IFN $\gamma$  production *via* alternative, IL-18-dependent pathway, might be promoted when the classical signaling pathway is inhibited by ruxolitinib.

### **Therapy combining ruxolitinib and anti-IL-18 does not result in significant improvements of the manifestations of HLH over the use of ruxolitinib only**

To verify the impact of inhibiting both JAK-dependent and JAK-independent pathways on the development of HLH, we treated LCMV-infected PKO mice with ruxolitinib and anti-IL-18, and compared them to LCMV-infected B6 mice, untreated mice and ruxolitinib treated mice. We did not observe a significant improvement on the reduction of body weight, temperature and clinical score loss (Figure 5A) and on the recovery of cytopenic blood cells populations (Figure 5B) when comparing mice receiving only ruxolitinib to those receiving the combined therapy. However, we saw a nearly 2-fold decrease of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells activation when mice received the combined therapy compared to untreated and ruxolitinib treated mice (Figure 5C right). Interestingly, the phosphorylation of STAT1 was completely reduced to basal levels with the combined therapy, whereas the phosphorylation of STAT3 was similar to that of ruxolitinib treated mice (Figure 5D), indicating that the residual STAT1 phosphorylation previously observed with ruxolitinib alone could be caused by IL-18-induced alternative pathways. Also, despite serum levels of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  still being very high with this combination therapy, IL-18 levels were reduced close to basal levels (Figure 5E).

### **Combined therapy of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$ induces major improvements of most symptoms of HLH in LCMV-infected PKO mice**

Since mice treated with ruxolitinib still had high levels of IFN $\gamma$  (Figure 4F left) and STAT1 phosphorylation above the baseline level (Figure 4E left), we then wanted to try maximizing the neutralization of IFN $\gamma$  signaling by treating LCMV-infected PKO mice with both ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$ , and compared them to LCMV-infected B6 mice, untreated mice and ruxolitinib treated mice. Surprisingly, we found that mice receiving this combination therapy started regaining body weight from day 8 until the end of the experiment, resulting in a very minimal loss of total body weight by day 12 (Figure 6A top). These mice also did not develop any hypothermia and kept a completely normal body temperature during the entire course of the experiment (Figure 6A middle), and did not display any visible symptoms of HLH, maintaining a clinical score similar to that of B6 mice (Figure 6A bottom). Mice receiving the combined treatment presented a partial recovery of lymphocytopenia, a complete, but

exaggerated resolution of neutropenia and for the first time an improvement of anemia (Figure 6B). The serum ferritin level was greatly decreased compared to both untreated mice and ruxolitinib treated mice (Figure 6C), and even slightly lower than that of anti-IFN $\gamma$  treated mice (Figure 2C), but it still was not reduced to basal levels and the virus-specific CD8 $^+$  T cells proliferation and activation was also greatly reduced (Figure 6D). As for STAT1 phosphorylation, it was found to be down to basal levels for mice receiving the combined treatment, while STAT3 phosphorylation was similar to that of ruxolitinib treated mice (Figure 6E). Finally, mice receiving a combination of anti-IFN $\gamma$  and ruxolitinib showed a striking improvement of the manifestations of HLH that was never observed with any other immunotherapy tested in our lab before. In fact, this combination therapy was so effective that these mice did not display any symptoms of HLH and presented a completely normal clinical phenotype indistinguishable from that of the B6 mice. Thus, our study strongly encourages the use of anti-IFN $\gamma$  and ruxolitinib in combination instead of a unique therapy for the treatment of primary HLH.

## Discussion

Despite current standard of care, the fatality of HLH remains elevated, thus making the research for new, more effective treatments of prime importance. Previous studies in mouse models have shown that the development of HLH was mainly driven by IFN $\gamma$ <sup>21</sup>, and that the use of anti-IFN $\gamma$  blocking antibodies<sup>21-23</sup> or ruxolitinib<sup>23,35,36</sup>, improved survival, as well as the clinical and hematological manifestations of HLH. However, none of these studies obtained a complete resolution of the symptoms of HLH. Given the fact that HLH is characterized by a massive cytokine storm, this led us to hypothesize that other cytokines might act in synergy with IFN $\gamma$  to drive the pathology and that a therapy neutralizing several of these cytokines might be the best approach to treat HLH. Here, we demonstrate that a treatment combining the use of anti-IFN $\gamma$  blocking antibodies and ruxolitinib results in a remarkable improvement of most manifestations of HLH in a murine model of primary HLH. Our study also suggests that other cytokines, like IL-6 and IL-18, that can be targeted with blocking antibodies or binding proteins,

while they contribute to the pathology, have no significant clinical impact when used in combination to either anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib.

Previous studies have shown in mouse models that treatment with anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib, significantly increased survival and lessened inflammation and pathological manifestation of HLH.<sup>21-23,35,36</sup> However, it was also suggested that ruxolitinib could be slightly more effective than anti-IFN $\gamma$  at reducing inflammation in HLH and enhanced survival of mice even after treatment discontinuation.<sup>36</sup> This is believed to be due to the ability for JAK inhibitors such as ruxolitinib to neutralize the signalization of many key cytokines in the development of HLH, including IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-2 and IL-12. Also, the neutropenia induced by ruxolitinib (at doses of 90 mg/kg twice daily) is also believed to play an additional role in dampening inflammation in HLH, as a recent study reported that treatment with anti-IFN $\gamma$  concomitantly with a neutrophil depletion, yielded similar results than those observed with ruxolitinib, even enhancing survival after the treatment was discontinued.<sup>23</sup> In our study, however, we did not observe a significant advantage of ruxolitinib over anti-IFN $\gamma$  after 12 days, while using a clinically relevant dose of ruxolitinib (4 mg/kg twice daily)<sup>49</sup>. On that matter, our results are consistent with those obtained by Maschalidi *et al.* at day 11 post-infection using ruxolitinib at a clinically relevant dose of 1 mg/kg twice daily.<sup>36</sup> This suggested that, when used at a clinically relevant dose, ruxolitinib is as good, but not better, than anti-IFN $\gamma$  for lessening inflammation in a murine model of primary HLH.

Our study also demonstrates that, when treating with either anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib, some pathological manifestations of HLH, such as the loss of body weight and body temperature, anemia, and the proliferation and activation of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells, were only partially resolved by day 12 post-infection. Thus, we aimed to discover if the simultaneous inhibition of IFN $\gamma$  and other highly secreted cytokines could allow a better resolution of the symptoms than what we observed with anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib alone. First, we inhibited IL-6R and could observed a slight, but not significant tendency to improve the symptoms of HLH when combined with anti-IFN $\gamma$ . However, when we only neutralized IL-6R, we observed a slight worsening of HLH symptoms. These results were confusing since tocilizumab, an anti-IL-6R, has shown effective in some cases of MAS in humans.<sup>42</sup> IL-6 can signal both through its receptor, or by an alternative pathway called transsignaling, and mice studies in sepsis,

atherosclerosis and obesity induced inflammation have reported that IL-6 could have both protective and damaging effects on inflammation.<sup>50-52</sup> This suggested that IL-6 could potentially play a complex, misunderstood, double-edge role in HLH.

In this study, we also show a potentially interesting role for IL-18 in the high IFN $\gamma$  production found in HLH. Combined with anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-18 showed a partial resolution of cytopenia, better than that observed with anti-IFN $\gamma$  only and, when combined with ruxolitinib, resulted in a complete downregulation of STAT1 phosphorylation, which we did not achieve with ruxolitinib only. Interestingly, mice receiving anti-IL-18 only survived, despite being visibly ill, suggesting a significant role for IL-18 on survival in this model. This could be due to the fact that IL-18, in synergy with IL-12, strongly induces the production of IFN $\gamma$  by T cells and NK cells.<sup>53</sup> Since IL-18 signals by a signaling pathway dependent on the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), it does not require any elements of the JAK/STAT signaling pathway. Thus, ruxolitinib has no effect on the IFN $\gamma$  production induced by IL-18. Since we observed a significant increase in IL-18 serum level after ruxolitinib treatment, we suspect that IFN $\gamma$  production *via* IL-18 signaling might be upregulated with ruxolitinib treatment, however we do not know yet the possible cause for this. Moreover, since IL-18 binding proteins are currently in trials in humans with XIAP and NLRC4 deficiency<sup>46</sup>, it is also possible that our PKO model might not be the most appropriate to see a possible synergistic effect of combined therapies using anti-IL-18. Therefore, despite our mitigated results on the use of anti-IL-18 in combination therapy, we believe that it should be investigated further.

The striking improvements in HLH manifestations observed with the neutralization of IFN $\gamma$  by both ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  are definitely the most telling results obtained in this study. Our results confirmed what was already known, that IFN $\gamma$  is the main driving cytokine in primary HLH<sup>21</sup>, but they also suggested that IFN $\gamma$  serum levels might be so high in HLH that the use of multiple IFN $\gamma$  neutralizing compounds might be necessary to achieve a maximal inhibition of IFN $\gamma$  signaling in the context of HLH. Also, our results demonstrate that ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  blocking antibodies induce a great synergistic effect on the resolution of HLH symptoms, instead of a redundant effect, showing that it is possible to greatly increase the efficacy of treatments with the use of combination therapy. Furthermore, when we consider the short half-life of ruxolitinib<sup>27,54,55</sup> in the body and the incomplete inhibition of the signaling

downstream of JAK1 and JAK2 with this treatment, we believe that ruxolitinib should not be used by itself for the treatment of HLH, but as part of a combination therapy. Finally, our study strongly supports the use of a combined therapy of anti-IFN $\gamma$  and ruxolitinib, instead of either one alone, for the treatment of primary HLH and encourages further investigation in the distinct role of other cytokines as potential targets for combination therapy.

## **Acknowledgements**

This work was supported by funds from the Fondation de Cancérologie Charles-Bruneau and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

## **Authorship**

**Contribution:** J-A.J., S.B. and A.V. performed experiments; J-A.J., S.B. and H.D. designed the research; J-A.J. and H.D. analyzed the data and wrote the paper.

**Conflict of interests:** The authors declare no conflict of interests.

**Correspondence:** Hélène Decaluwe (helene.decaluwe@umontreal.ca)  
CHU Sainte-Justine Research Center  
3175, ch. de la Côte-Sainte-Catherine  
Montréal, QC, Canada (H3T 1C5)  
Phone: 1-514-345-4931 (ext. 5075)

## References

1. Janka GE. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu Rev Med.* 2012;63:233-246.
2. Janka GE. Hemophagocytic syndromes. *Blood Rev.* 2007;21(5):245-253.
3. Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:127-131.
4. Chandrakasan S, Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J Pediatr.* 2013;163(5):1253-1259.
5. Jordan MB, Allen CE, Weitzman S, Filipovich AH, McClain KL. How I treat hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 2011;118(15):4041-4052.
6. Henter JI, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;48(2):124-131.
7. Lehmborg K, McClain KL, Janka GE, Allen CE. Determination of an appropriate cut-off value for ferritin in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(11):2101-2103.
8. Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic syndromes--an update. *Blood Rev.* 2014;28(4):135-142.
9. Rosado FG, Kim AS. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: an update on diagnosis and pathogenesis. *Am J Clin Pathol.* 2013;139(6):713-727.
10. Risma K, Jordan MB. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: updates and evolving concepts. *Curr Opin Pediatr.* 2012;24(1):9-15.
11. zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet.* 2005;14(6):827-834.
12. Menasche G, Pastural E, Feldmann J, et al. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet.* 2000;25(2):173-176.
13. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science.* 1999;286(5446):1957-1959.
14. Kogl T, Muller J, Jessen B, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in syntaxin-11-deficient mice: T-cell exhaustion limits fatal disease. *Blood.* 2013;121(4):604-613.
15. Jessen B, Kogl T, Sepulveda FE, de Saint Basile G, Aichele P, Ehl S. Graded defects in cytotoxicity determine severity of hemophagocytic lymphohistiocytosis in humans and mice. *Front Immunol.* 2013;4:448.
16. de Saint Basile G, Menasche G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(8):568-579.
17. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(12):940-952.
18. Terrell CE, Jordan MB. Perforin deficiency impairs a critical immunoregulatory loop involving murine CD8(+) T cells and dendritic cells. *Blood.* 2013;121(26):5184-5191.

19. Jenkins MR, Rudd-Schmidt JA, Lopez JA, et al. Failed CTL/NK cell killing and cytokine hypersecretion are directly linked through prolonged synapse time. *J Exp Med*. 2015;212(3):307-317.
20. Trottestam H, Horne A, Arico M, et al. Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: long-term results of the HLH-94 treatment protocol. *Blood*. 2011;118(17):4577-4584.
21. Jordan MB, Hildeman D, Kappler J, Marrack P. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood*. 2004;104(3):735-743.
22. Pachlopnik Schmid J, Ho CH, Chretien F, et al. Neutralization of IFNgamma defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice. *EMBO Mol Med*. 2009;1(2):112-124.
23. Albeituni S, Verbist KC, Tedrick PE, et al. Mechanisms of action of ruxolitinib in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2019;134(2):147-159.
24. Administration USFaD. FDA approves emapalumab for hemophagocytic lymphohistiocytosis. 2018; <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-emapalumab-hemophagocytic-lymphohistiocytosis>. Accessed May 20, 2019.
25. Takada H, Ohga S, Mizuno Y, et al. Oversecretion of IL-18 in haemophagocytic lymphohistiocytosis: a novel marker of disease activity. *Br J Haematol*. 1999;106(1):182-189.
26. Banerjee S, Biehl A, Gadina M, Hasni S, Schwartz DM. JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs*. 2017;77(5):521-546.
27. Quintas-Cardama A, Vaddi K, Liu P, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(15):3109-3117.
28. Santos FP, Verstovsek S. Efficacy of ruxolitinib for myelofibrosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(10):1465-1473.
29. McKeage K. Ruxolitinib: A Review in Polycythaemia Vera. *Drugs*. 2015;75(15):1773-1781.
30. Choi J, Cooper ML, Alahmari B, et al. Pharmacologic blockade of JAK1/JAK2 reduces GvHD and preserves the graft-versus-leukemia effect. *PLoS One*. 2014;9(10):e109799.
31. Spoerl S, Mathew NR, Bscheider M, et al. Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. *Blood*. 2014;123(24):3832-3842.
32. Heine A, Held SA, Daecke SN, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood*. 2013;122(7):1192-1202.
33. Mackay-Wiggan J, Jabbari A, Nguyen N, et al. Oral ruxolitinib induces hair regrowth in patients with moderate-to-severe alopecia areata. *JCI Insight*. 2016;1(15):e89790.
34. Hsu L, Armstrong AW. JAK inhibitors: treatment efficacy and safety profile in patients with psoriasis. *J Immunol Res*. 2014;2014:283617.

35. Das R, Guan P, Sprague L, et al. Janus kinase inhibition lessens inflammation and ameliorates disease in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2016;127(13):1666-1675.
36. Maschalidi S, Sepulveda FE, Garrigue A, Fischer A, de Saint Basile G. Therapeutic effect of JAK1/2 blockade on the manifestations of hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice. *Blood*. 2016;128(1):60-71.
37. Trottestam H, Berglof E, Horne A, et al. Risk factors for early death in children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr*. 2012;101(3):313-318.
38. Horne A, Janka G, Maarten Egeler R, et al. Haematopoietic stem cell transplantation in haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 2005;129(5):622-630.
39. Allen CE, Marsh R, Dawson P, et al. Reduced-intensity conditioning for hematopoietic cell transplant for HLH and primary immune deficiencies. *Blood*. 2018;132(13):1438-1451.
40. Madkaikar M, Shabrish S, Desai M. Current Updates on Classification, Diagnosis and Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH). *Indian J Pediatr*. 2016;83(5):434-443.
41. Prencipe G, Caiello I, Pascarella A, et al. Neutralization of IFN-gamma reverts clinical and laboratory features in a mouse model of macrophage activation syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1439-1449.
42. Faguer S, Vergez F, Peres M, et al. Tocilizumab added to conventional therapy reverses both the cytokine profile and CD8+Granzyme+ T-cells/NK cells expansion in refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol*. 2016;34(1):55-57.
43. Wunderlich M, Stockman C, Devarajan M, et al. A xenograft model of macrophage activation syndrome amenable to anti-CD33 and anti-IL-6R treatment. *JCI Insight*. 2016;1(15):e88181.
44. Rios-Fernandez R, Callejas-Rubio JL, Garcia-Rodriguez S, Sancho J, Zubiaur M, Ortego-Centeno N. Tocilizumab as an Adjuvant Therapy for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Associated With Visceral Leishmaniasis. *Am J Ther*. 2016;23(5):e1193-1196.
45. Pien GC, Nguyen KB, Malmgaard L, Satoskar AR, Biron CA. A unique mechanism for innate cytokine promotion of T cell responses to viral infections. *J Immunol*. 2002;169(10):5827-5837.
46. Marsh RA, Jordan MB, Talano JA, et al. Salvage therapy for refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis: A review of the published experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(4).
47. Saeed I, McLornan D, Harrison CN. Managing side effects of JAK inhibitors for myelofibrosis in clinical practice. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(7):617-625.
48. Mascarenhas J, Hoffman R. Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. *Clin Cancer Res*. 2012;18(11):3008-3014.

49. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659-661.
50. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, et al. Selective blockade of interleukin-6 transsignaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med*. 2011;39(6):1407-1413.
51. Kraakman MJ, Allen TL, Whitham M, et al. Targeting gp130 to prevent inflammation and promote insulin action. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15 Suppl 3:170-175.
52. Schuett H, Oestreich R, Waetzig GH, et al. Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(2):281-290.
53. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol*. 1996;26(7):1647-1651.
54. Ogama Y, Mineyama T, Yamamoto A, et al. A randomized dose-escalation study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ruxolitinib (INC424) in healthy Japanese volunteers. *Int J Hematol*. 2013;97(3):351-359.
55. Shi JG, Chen X, McGee RF, et al. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of orally dosed INCB018424 phosphate in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2011;51(12):1644-1654.

**Figure 1. LCMV-infected PKO mice display clinical and hematological features of HLH as well as abnormally high serum levels of pro-inflammatory cytokines.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight, body temperature (middle panel) and clinical score (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice and LCMV-infected PKO mice. Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (white blood cells [WBC], lymphocytes [LYMP], neutrophils [NEUT], hemoglobin [HGB], hematocrit [HCT] and platelets [PLT]) of uninfected and LCMV-infected PKO mice at day 12 p.i. (C) Serum concentration of ferritin of uninfected PKO mice, LCMV-infected B6 mice and LCMV-infected PKO mice at day 12 p.i., measured by ELISA. (D) Serum level of cytokines (left panel) and chemokines (right panel) of uninfected PKO mice, LCMV-infected B6 mice and LCMV-infected PKO mice at day 4, 8 and 12 p.i., measured by LEGENDplex (by ELISA for IL-18). (E) Mean fluorescence intensity (MFI) of GP33+ CD8+ T cells expressing pSTAT1 (left panel), pSTAT3 (middle panel) and pSTAT5 (right panel) of uninfected PKO mice, LCMV-infected B6 mice and LCMV-infected PKO mice at day 4, 8 and 12 p.i. Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 12 independent experiments with at least 4 mice in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

**Figure 2. Anti-IFN $\gamma$  therapy improves the manifestations of HLH in LCMV-infected PKO mice.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight, body temperature (middle panel) and clinical score (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice, LCMV-infected PKO mice (untreated) and mice treated with anti-IFN $\gamma$ . Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (WBC, LYMP, NEUT, HGB, HCT and PLT) of uninfected PKO mice, untreated mice and mice treated with anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i. (C) Serum concentration of ferritin of uninfected PKO mice, LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice treated with anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i., measured by ELISA. (D) Frequency of GP33+ CD8+ T cells expressing the proliferation marker KI67 (left panel) and the activation marker CD69 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice treated with anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i. (E) Serum level of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-18 of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice treated with anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i., measured by LEGENDplex (by ELISA for IL-18). Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 5

independent experiments with at least 4 mice in each group.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  and  $****P < 0.0001$ .

**Figure 3. Combined treatment of anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-6R or anti-IL-18 does not significantly improves the manifestations of HLH over the use of anti-IFN $\gamma$  only but suggests that IL-6 and IL-18 play a role in the development of the pathology.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight and body temperature (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice, mice receiving anti-IFN $\gamma$ , a combination of anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-6R or a combination of anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-18. Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (WBC, LYMP, NEUT, HGB, HCT and PLT) of uninfected PKO mice, untreated mice, mice receiving anti-IFN $\gamma$ , a combination of anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-6R or a combination of anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-18 at day 12 p.i. (C) Frequency of GP33 $^{+}$  CD8 $^{+}$  T cells expressing the proliferation marker KI67 (left panel) and the activation marker CD69 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice, mice receiving anti-IFN $\gamma$ , a combination of anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-6R or a combination of anti-IFN $\gamma$  and anti-IL-18 at day 12 p.i. Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 4 independent experiments with at least 4 mice in each group.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  and  $****P < 0.0001$ .

**Figure 4. Ruxolitinib improves the symptoms of HLH in LCMV-infected PKO mice.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight, body temperature (middle panel) and clinical score (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice treated with ruxolitinib. Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (WBC, LYMP, NEUT, HGB, HCT and PLT) of uninfected PKO mice, untreated mice and mice treated with ruxolitinib at day 12 p.i. (C) Serum concentration of ferritin of uninfected PKO mice, LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice treated with ruxolitinib at day 12 p.i., measured by ELISA. (D) Frequency of GP33 $^{+}$  CD8 $^{+}$  T cells expressing the proliferation marker KI67 (left panel) and the activation marker CD69 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice treated with ruxolitinib at day 12 p.i. (E) Mean fluorescence intensity (MFI) of GP33 $^{+}$  CD8 $^{+}$  T cells expressing pSTAT1 (left panel) and pSTAT3 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice treated with ruxolitinib at day 12 p.i. (F) Serum level of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-18 of LCMV-

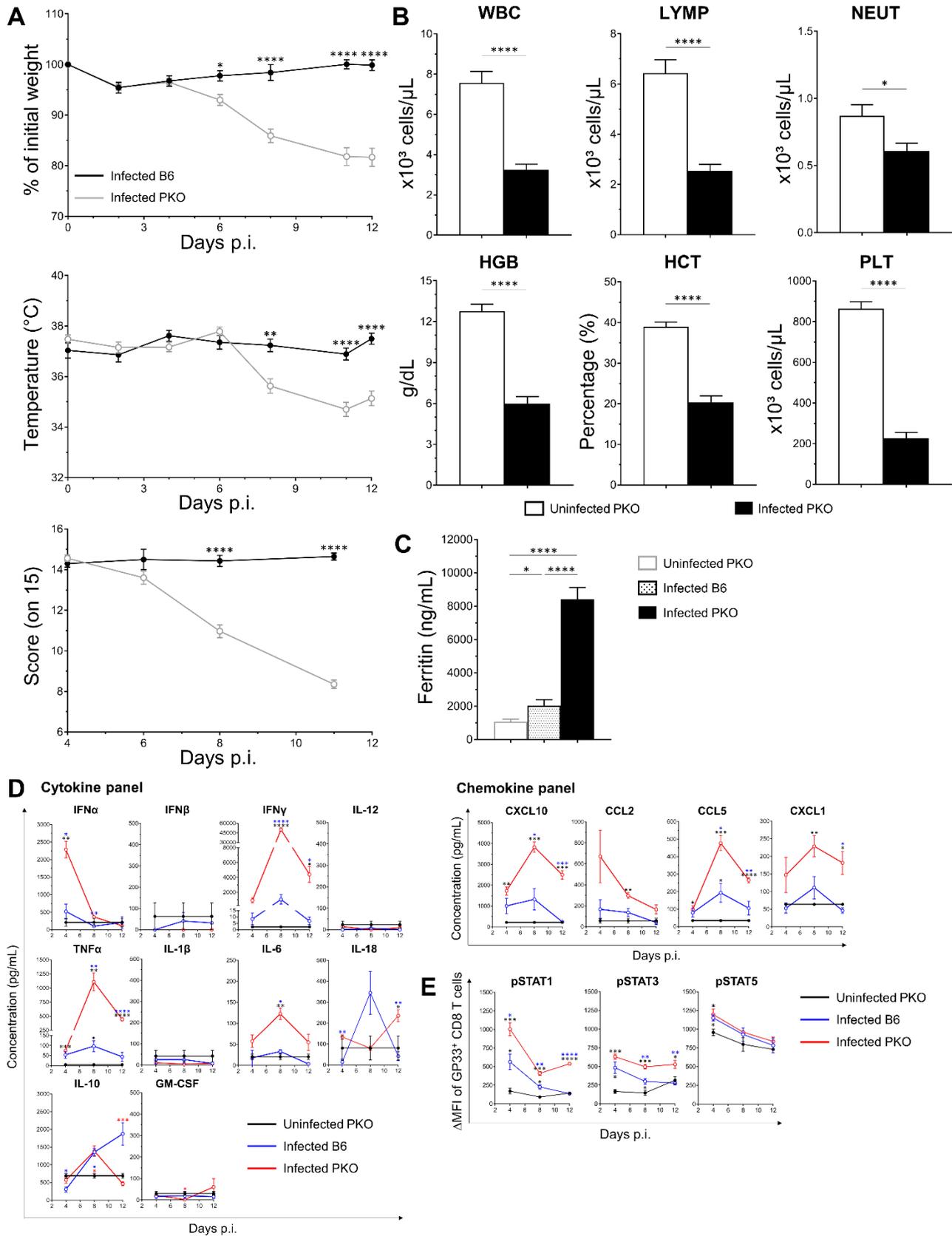
infected B6 mice, untreated mice and mice treated with ruxolitinib at day 12 p.i., measured by LEGENDplex (by ELISA for IL-18). Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 7 independent experiments with at least 4 mice in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

**Figure 5. Therapy combining ruxolitinib and anti-IL-18 does not result in significant improvements of the manifestations of HLH over the use of ruxolitinib only.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight, body temperature (middle panel) and clinical score (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IL-18. Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (WBC, LYMP, NEUT, HGB, HCT and PLT) of uninfected PKO mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IL-18 at day 12 p.i. (C) Frequency of GP33+ CD8+ T cells expressing the proliferation marker KI67 (left panel) and the activation marker CD69 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IL-18 at day 12 p.i. (D) Mean fluorescence intensity (MFI) of GP33+ CD8+ T cells expressing pSTAT1 (left panel) and pSTAT3 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IL-18 at day 12 p.i. (E) Serum level of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-18 of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IL-18 at day 12 p.i., measured by LEGENDplex (by ELISA for IL-18). Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 4 independent experiments with at least 4 mice in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

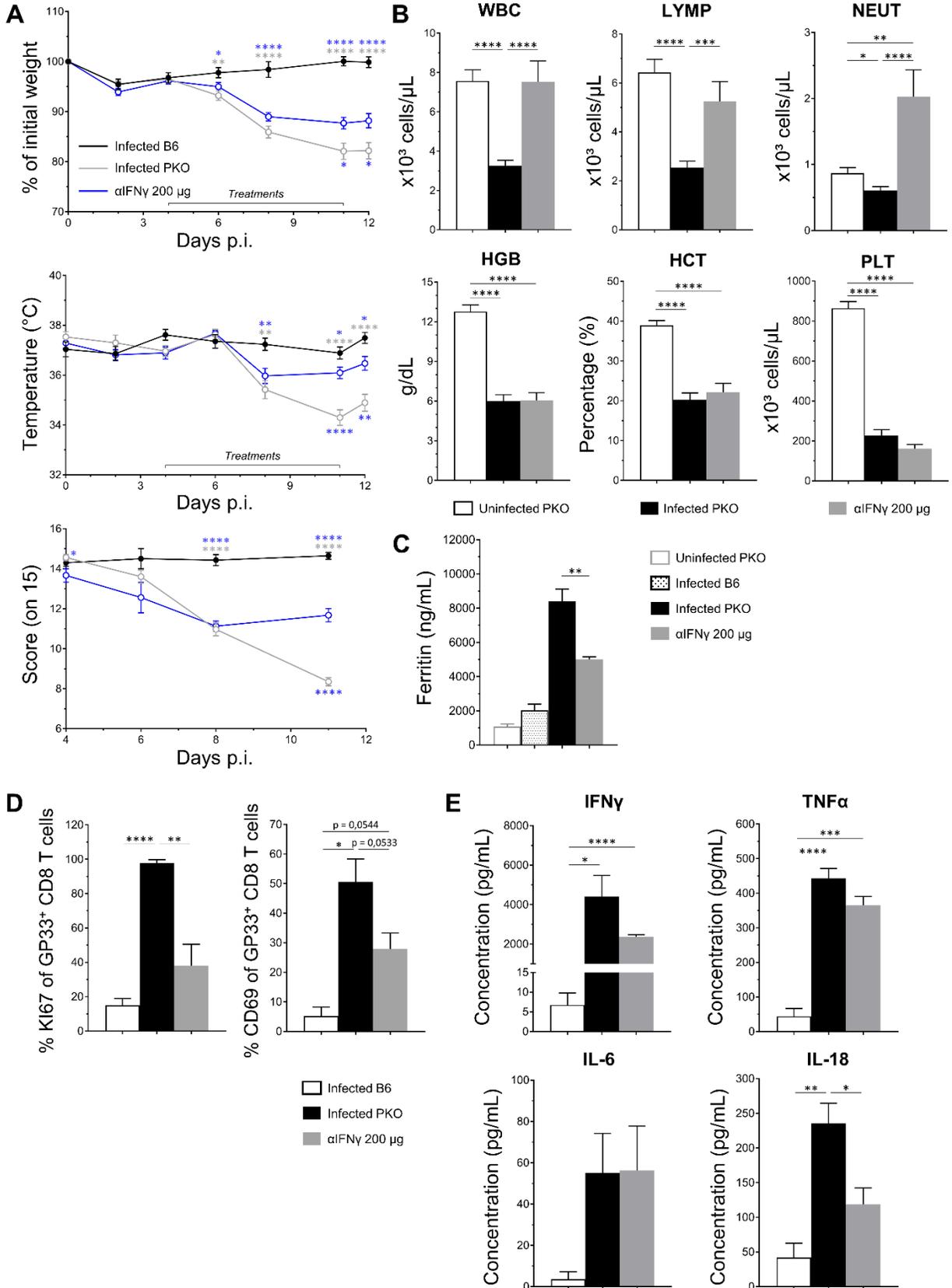
**Figure 6. Combined therapy of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  induces major improvements of most symptoms of HLH in LCMV-infected PKO mice.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight, body temperature (middle panel) and clinical score (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$ . Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (WBC, LYMP, NEUT, HGB, HCT and PLT) of uninfected PKO mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i. (C) Serum concentration of ferritin of uninfected PKO

mice, LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i., measured by ELISA. (D) Frequency of GP33+ CD8+ T cells expressing the proliferation marker KI67 (left panel) and the activation marker CD69 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i. (E) Mean fluorescence intensity (MFI) of GP33+ CD8+ T cells expressing pSTAT1 (left panel) and pSTAT3 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i. (F) Serum level of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-18 of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving ruxolitinib or a combination of ruxolitinib and anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i., measured by LEGENDplex (by ELISA for IL-18). Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 3 independent experiments with at least 4 mice in each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

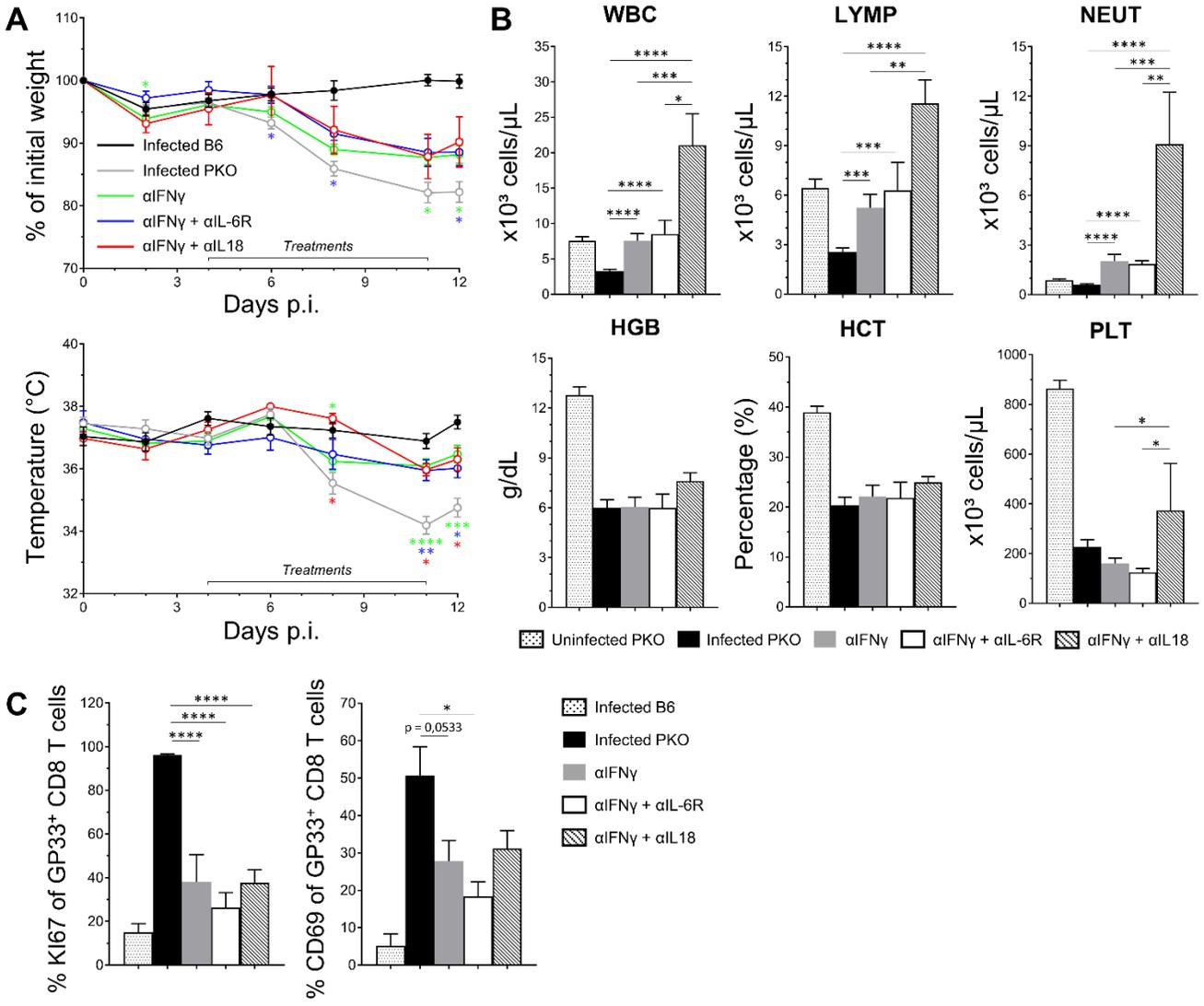
**Figure 1**



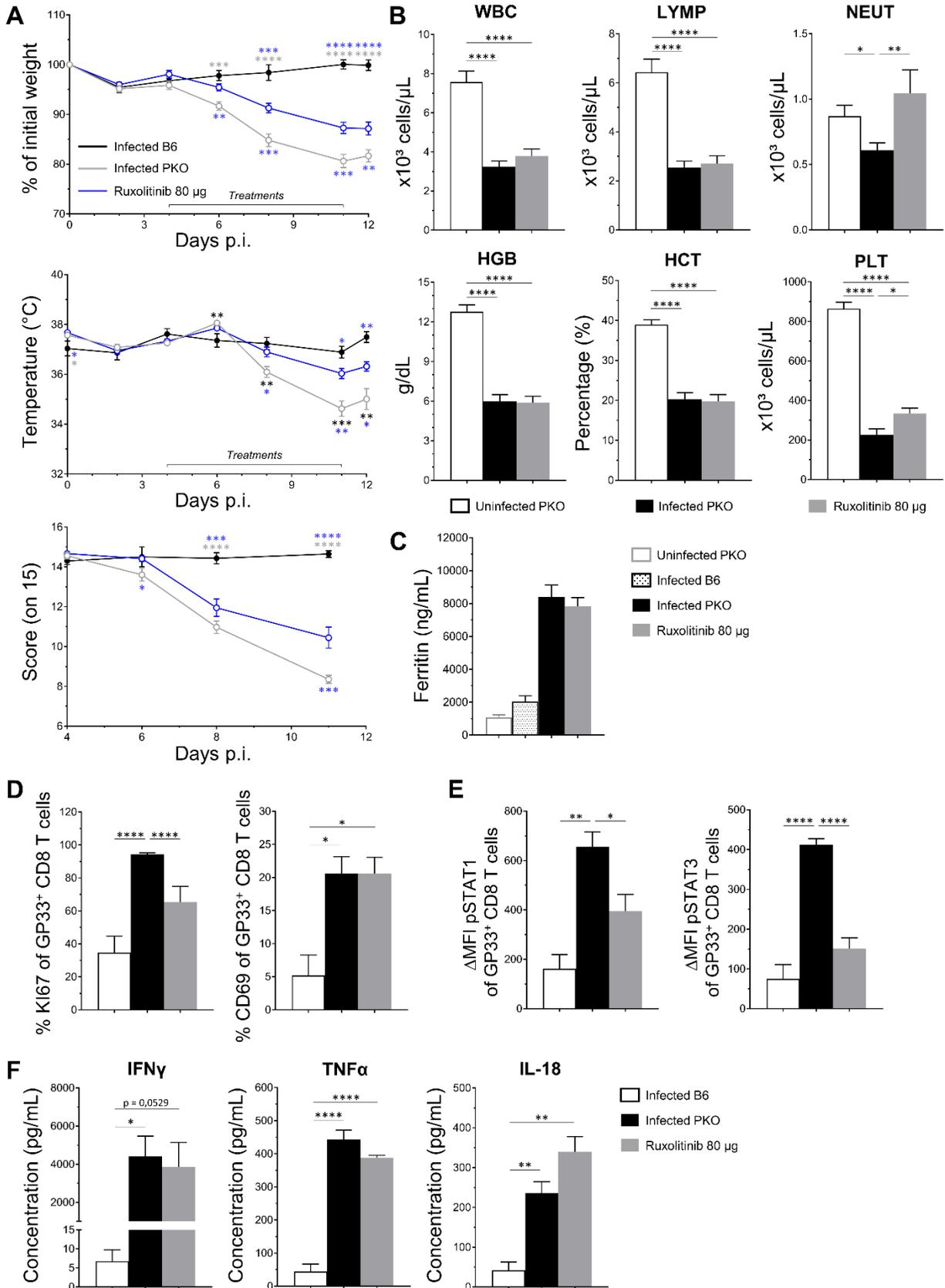
**Figure 2**



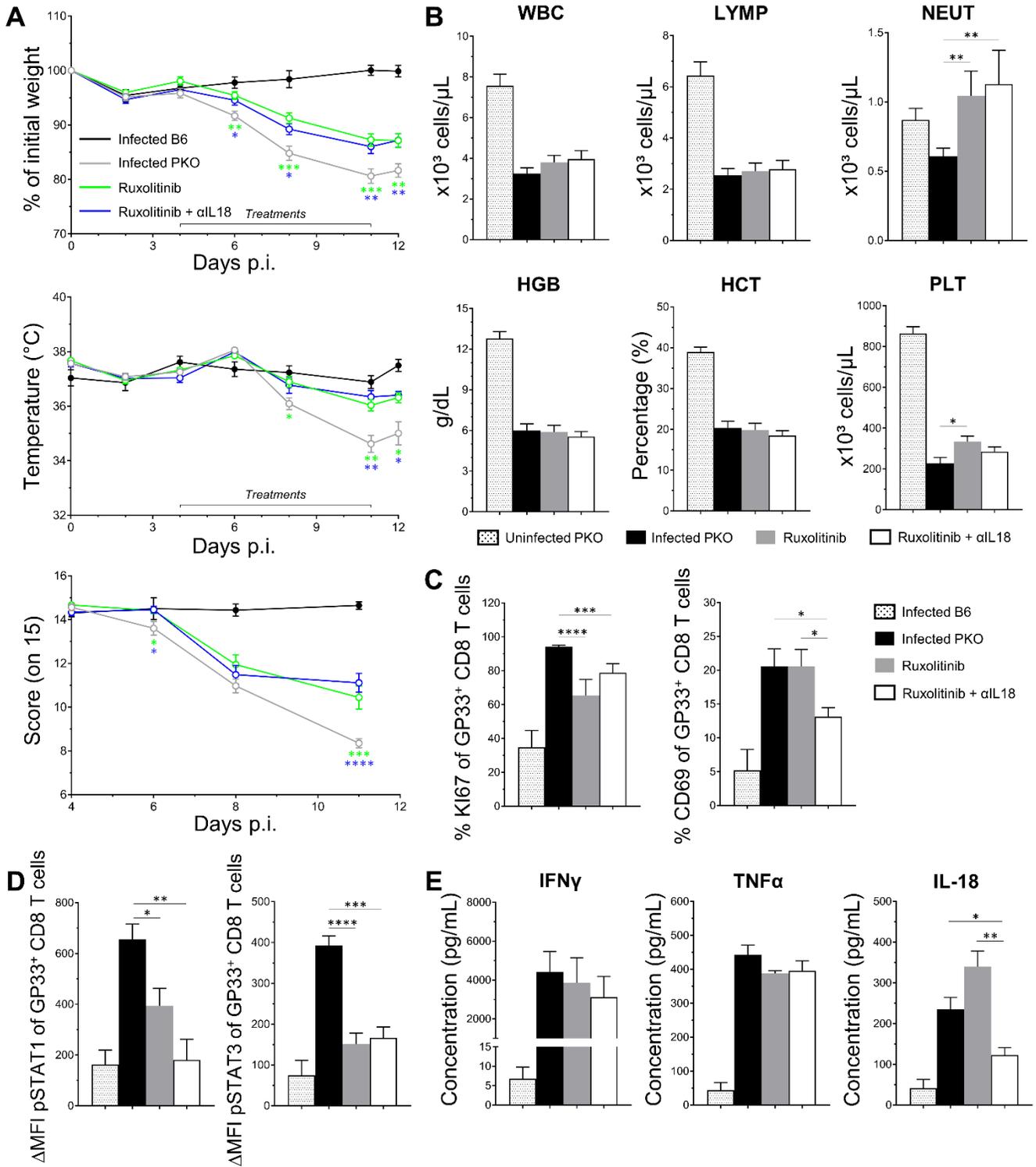
**Figure 3**



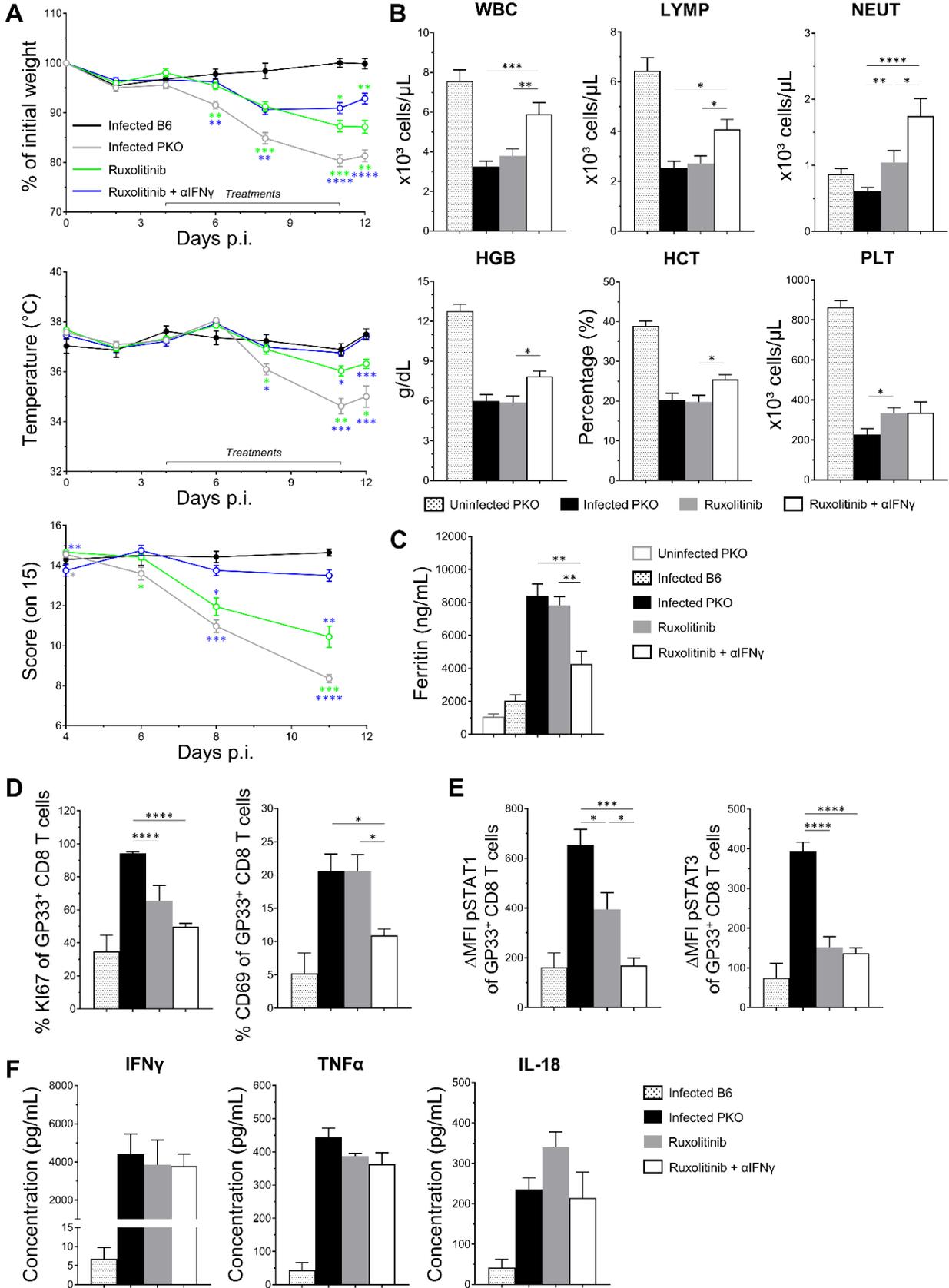
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

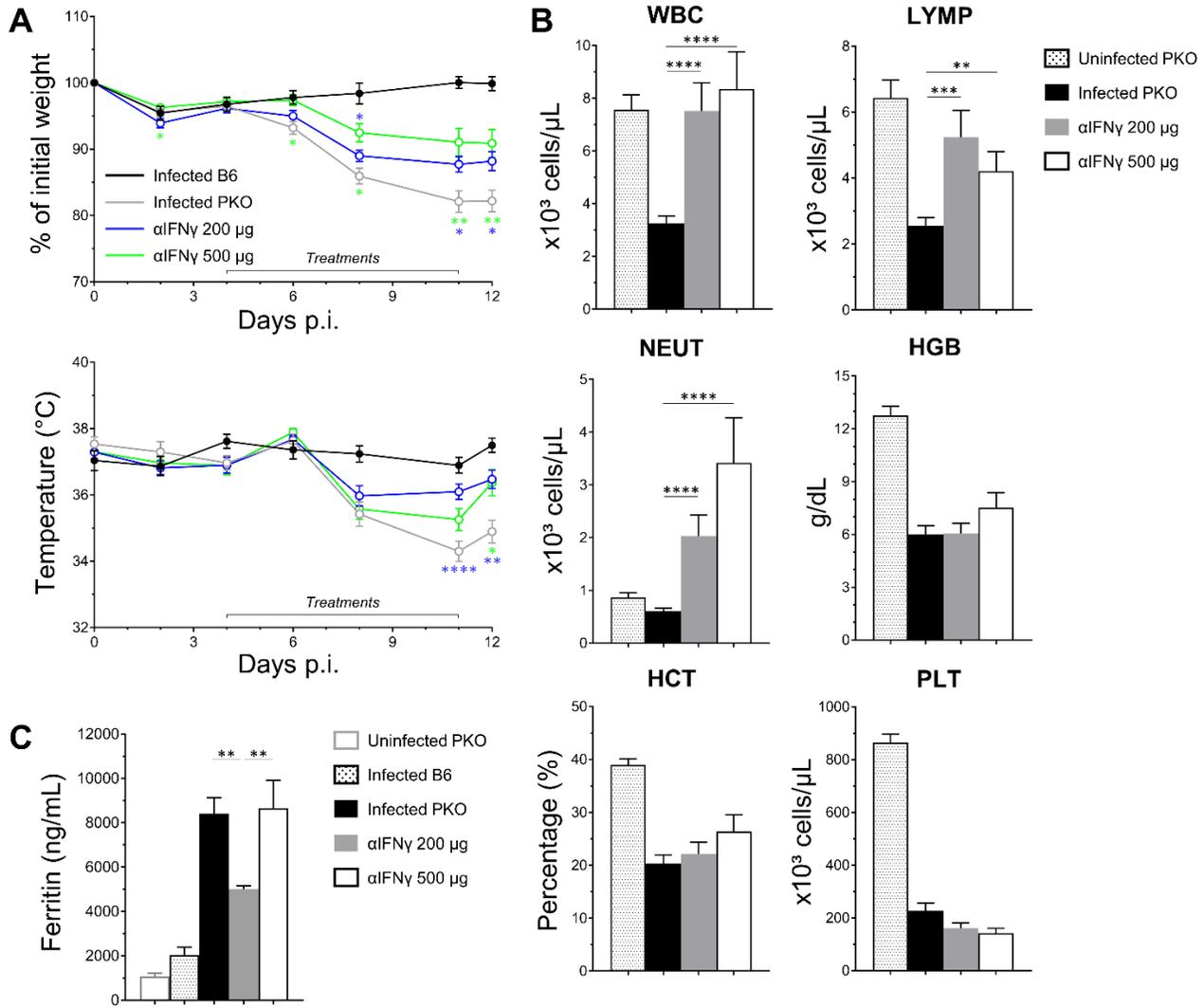


## Supplemental material

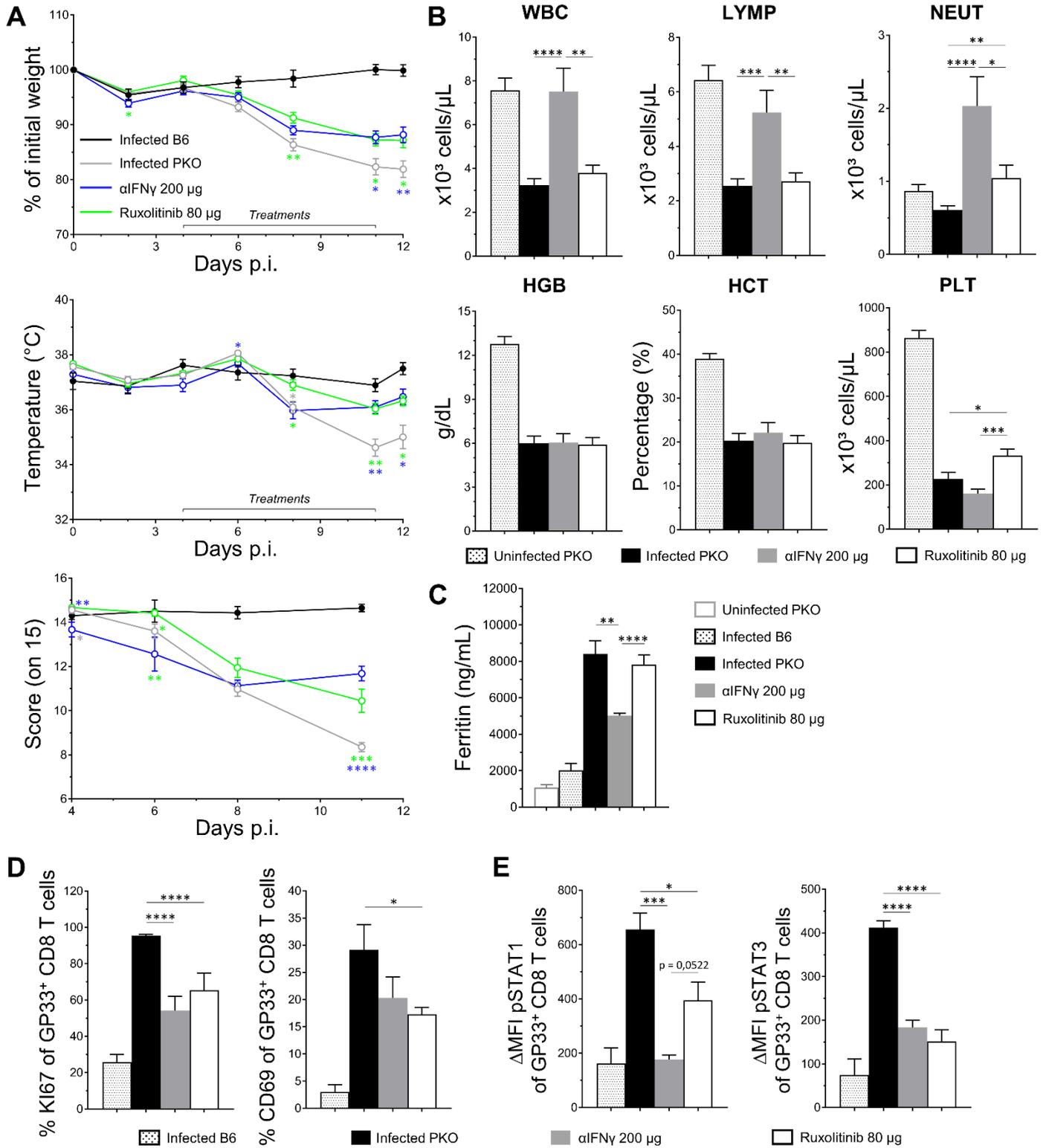
**Supplemental Figure 1. Comparison between a dose of 200 µg and 500 µg of anti-IFN $\gamma$  on the manifestations of HLH in LCMV-infected PKO mice.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight and body temperature (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving 200 µg or 500 µg of anti-IFN $\gamma$ . Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (WBC, LYMP, NEUT, HGB, HCT and PLT) of uninfected PKO mice, untreated mice and mice receiving 200 µg or 500 µg of anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i. (C) Serum concentration of ferritin of uninfected PKO mice, LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving 200 µg or 500 µg of anti-IFN $\gamma$  at day 12 p.i., measured by ELISA. Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 4 independent experiments with at least 4 mice in each group. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 and \*\*\*\* $P$  < 0.0001.

**Supplemental Figure 2. Comparison between treatment with anti-IFN $\gamma$  and treatment with ruxolitinib on the manifestations of HLH in LCMV-infected PKO mice.** (A) Body weight (top panel) depicted as the percentage of the initial weight, body temperature (middle panel) and clinical score (bottom panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated and mice receiving anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib. Measures were taken every 2-3 days, from day 0 to day 12 p.i. (B) Hematological parameters (WBC, LYMP, NEUT, HGB, HCT and PLT) of uninfected PKO mice, untreated mice and mice receiving anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib at day 12 p.i. (C) Serum concentration of ferritin of uninfected PKO mice, LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib at day 12 p.i., measured by ELISA. (D) Frequency of GP33+ CD8+ T cells expressing the proliferation marker KI67 (left panel) and the activation marker CD69 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib at day 12 p.i. (E) Mean fluorescence intensity (MFI) of GP33+ CD8+ T cells expressing pSTAT1 (left panel) and pSTAT3 (right panel) of LCMV-infected B6 mice, untreated mice and mice receiving anti-IFN $\gamma$  or ruxolitinib at day 12 p.i. Data (mean  $\pm$  SEM) are representative of 2 to 7 independent experiments with at least 4 mice in each group. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 and \*\*\*\* $P$  < 0.0001.

**Supplemental Figure 1**



Supplemental Figure 2



## CHAPITRE 3: DISCUSSION

Malgré la constante amélioration des méthodes de diagnostic et de traitement de la HLH au cours des dernières décennies, le taux de mortalité associé à la HLH demeure élevé. C'est pourquoi les chercheurs continuent à rechercher sans cesse de meilleures options thérapeutiques. Récemment, la FDA a approuvé l'utilisation d'emapalumab, un anti-IFN $\gamma$ , pour le traitement de la HLH et le ruxolitinib, un JAK1/2 inhibiteur, est présentement l'objet de nombreux essais cliniques, après avoir démontré son efficacité dans une myriade de maladies inflammatoires ainsi que dans des modèles murins de HLH. D'autres études testent aussi l'utilisation d'alemtuzumab, un inhibiteur de CD52, qui a montré une amélioration encourageante des symptômes chez des patients atteints de HLH primaire réfractaire aux traitements conventionnels [105, 106], ou encore l'utilisation d'ATG (« *antithymocyte globulins* ») en combinaison avec de la chimiothérapie au lieu de la dexaméthasone, qui a aussi été démontré efficace en tant que thérapie de première ligne pour le traitement de la HLH primaire [107]. D'autres inhibiteurs de cytokines sont aussi testés chez des patients atteints de certaines formes particulières de HLH, comme l'inhibition de l'IL-18 chez les patients ayant une mutation XIAP ou NLRC4, ou encore l'inhibition de l'IL-1R chez les patients ayant une HLH associée à l'AJIS [106, 108]. Suite à la publication de plusieurs études démontrant l'efficacité indiscutable, mais limitée, d'un traitement à l'anti-IFN $\gamma$  [89-91] ou au ruxolitinib [109-111] pour le traitement de la HLH dans des modèles murins, nous avons voulu découvrir une option thérapeutique plus efficace encore afin d'améliorer le pronostic de la HLH. Notre étude sur les thérapies combinées poursuit cet objectif et s'inscrit dans la foulée des découvertes récentes sur le traitement de la HLH.

### 3.1 Le ciblage de l'IFN $\gamma$ dans le traitement de la HLH

De précédentes études dans des modèles murins par les groupes de Jordan *et al.*, Pachlopnik Schmid *et al.* et Prencipe *et al.* ont démontré que l'IFN $\gamma$  est la principale cytokine impliquée dans le développement de la HLH et que l'inhibition de cette cytokine permet d'améliorer la survie et d'obtenir une amélioration de plusieurs des symptômes associés à la

HLH. En effet, ces études ont observé, dans des modèles murins de HLH primaire et secondaire, une amélioration drastique de la survie, une réduction de la perte de poids et de température corporelle, une résolution partielle de la cytopénie ainsi qu'une réduction de l'infiltration lymphocytaire au niveau du SNC suite à un traitement avec de l'anti-IFN $\gamma$  [89-91]. Ces découvertes ont éventuellement mené à des études cliniques testant l'utilisation d'emapalumab, un anti-IFN $\gamma$ , puis, récemment, à son approbation par la FDA pour le traitement de la HLH primaire chez l'humain [94, 95].

Toutefois, malgré les résultats positifs obtenus avec l'inhibition de l'IFN $\gamma$  dans les études murines mentionnées précédemment, la résolution des symptômes était incomplète. Dans l'optique d'améliorer l'efficacité des traitements de la HLH, nous avons donc émis l'hypothèse que d'autres cytokines pourraient être impliquées dans le développement de la HLH, et que l'inhibition de certaines d'entre elles, en concomitance avec l'inhibition de l'IFN $\gamma$ , permettrait d'observer une meilleure résolution des symptômes. L'IL-6, principalement responsable de la fièvre, et l'IL-18, une cytokine inductrice de la production d'IFN $\gamma$ , sont des cytokines inflammatoires fortement sécrétées dans le contexte de la HLH [80, 85]. En conséquence, nous avons déterminé que ces deux cytokines constitueraient des cibles potentiellement intéressantes dans le cadre d'une thérapie combinée avec de l'anti-IFN $\gamma$  dans des souris PKO infectées avec LCMV Armstrong, un modèle de HLH primaire. Afin de pouvoir détecter plus aisément le potentiel effet synergique des traitements combinés, nous avons conduit des expériences préliminaires afin de déterminer si l'anti-IFN $\gamma$  pourrait être utilisé à une dose plus faible que la dose de 500  $\mu$ g par souris habituellement publiée. De fait, nous avons déterminé que l'administration de 200  $\mu$ g d'anti-IFN $\gamma$  par souris était suffisant pour obtenir une amélioration des manifestations de la HLH comparable à celle obtenue avec une forte dose d'anticorps bloquants. Ce dosage a donc été celui utilisé dans les expériences subséquentes.

### **3.1.1 Thérapie combinée d'anti-IFN $\gamma$ et d'anti-IL-6R**

D'abord, nous avons voulu tester si l'inhibition de l'IL-6R, en combinaison avec l'IFN $\gamma$ , permettrait d'obtenir un impact synergique sur la réduction des principaux symptômes de la HLH. Ce choix fut basé sur les résultats rapportés par quelques études cliniques actuellement en cours chez l'humain testant le tocilizumab, un anti-IL-6R. Cette cytokine inflammatoire est

typiquement élevée dans le sérum des patients atteints de HLH, et quelques études de cas chez des patients atteints de HLH secondaire ont suggéré que cette drogue pourrait être efficace pour améliorer la survie et atténuer certains symptômes associés à la HLH, comme la surproduction de cytokines inflammatoires et la prolifération des CTL [104, 112-114].

Dans notre étude, des souris traitées uniquement avec de l'anti-IFN $\gamma$  ont servi de référence pour évaluer la présence d'une synergie entre les deux traitements. Chez ces souris, nous avons obtenu une amélioration des symptômes très comparable à celle rapportée dans la littérature [89-91]. Quant aux souris recevant le traitement combiné d'anti-IFN $\gamma$  et d'anti-IL-6R, nous avons pu observer une légère tendance vers une accentuation de la résolution de certains symptômes de la HLH. Par exemple, l'augmentation du nombre de lymphocytes semblait légèrement plus élevée et la réduction de la fréquence de lymphocytes T CD8+ spécifiques au virus exprimant le marqueur de prolifération KI67 et le marqueur d'activation CD69 était plus marquée que chez les souris recevant l'anti-IFN $\gamma$  seul. Malgré ces observations encourageantes, l'analyse statistique des données n'a pas montré de différence statistiquement significative soutenant un avantage de la thérapie combinée par rapport à l'anti-IFN $\gamma$  seul. Toutefois, cette même tendance a pu être observée de façon consistante dans le cadre de plusieurs expériences indépendantes, confirmant qu'il s'agit bien d'un effet synergique réel, quoique minime.

Considérant les résultats obtenus chez l'humain, et compte tenu de l'implication de l'IL-6 dans la fièvre, nous nous serions attendus à un effet plus considérable de la thérapie combinée sur les symptômes de la HLH. De plus, dans notre étude, les souris ne recevant que de l'anti-IL-6R montraient même une légère aggravation de leurs symptômes, de même qu'une augmentation très marquée du niveau de ferritine dans le sérum par rapport aux souris non-traitées (données non montrées). Ces résultats inattendus pourraient être expliqués par le fait que dans les modèles murins de HLH, les souris, au lieu de développer de la fièvre comme chez l'humain, perdent plutôt la capacité de réguler leur température corporelle, un phénomène caractérisé par une perte de température corporelle. Il est donc possible que le rôle de l'IL-6 dans la HLH soit différent entre l'humain et la souris, et qu'il serait plutôt associé à un rôle protecteur chez la souris dans un contexte de HLH. D'ailleurs, des études dans différents contextes inflammatoires ont rapporté un rôle à la fois protecteur et nuisible pour l'IL-6 [115-

117], suggérant une certaine dualité mal comprise dans le rôle de cette cytokine dans certains contextes particuliers. Ainsi, malgré le fait que nos résultats ne démontrent pas que la combinaison d'anti-IFN $\gamma$  et d'anti-IL-6R soit meilleure que l'utilisation d'anti-IFN $\gamma$  seul, le léger effet synergique observé encourage notre hypothèse et la poursuite de la recherche d'une thérapie combinée pour le traitement de la HLH.

### **3.1.2 Thérapie combinée d'anti-IFN $\gamma$ et d'anti-IL-18**

Dans le même ordre d'idée, nous avons ensuite testé l'inhibition combinée de l'IL-18 et de l'IFN $\gamma$ . Nous avons choisi de cibler l'IL-18 pour plusieurs raisons. D'abord, une étude a rapporté que dans la HLH, le niveau d'IL-18 dans le sérum est corrélé avec la sévérité des symptômes [85]. De plus, d'autres études ont montré que l'IL-18, en synergie avec l'IL-12, induit fortement la production d'IFN $\gamma$  par les cellules T et les cellules NK [86] et la production de TNF $\alpha$  par les cellules NK [28]. Finalement, l'inhibition de l'IL-18 est actuellement à l'étude chez des patients présentant les mutations génétiques XIAP et NLRC4, dans une étude clinique toujours en cours dont les résultats n'ont pas encore été publiés (NCT03113760). Puisque nous savons que l'IFN $\gamma$  joue un rôle clé dans le développement de la HLH, l'inhibition d'une cytokine inductrice d'IFN $\gamma$  en combinaison avec l'inhibition de l'IFN $\gamma$  lui-même, nous a semblé une approche thérapeutique intéressante.

Nous avons effectué nos expériences de la même manière que pour la combinaison d'anti-IFN $\gamma$  et d'anti-IL-6R décrite précédemment. Chez les souris recevant la combinaison d'anti-IFN $\gamma$  et d'anti-IL-18, nous avons observé un effet synergique majeur de la thérapie combinée sur la résolution de la cytopénie par rapport aux souris recevant l'anti-IFN $\gamma$  seul. En effet, les souris recevant la thérapie combinée présentaient une augmentation majeure (voire quelque peu exagérée), du nombre de globules blancs, de lymphocytes et de neutrophiles. Une résolution partielle du nombre de plaquettes, ainsi qu'une légère tendance vers une augmentation de l'hémoglobine et de l'hématocrite a aussi pu être observée chez ces souris par rapport aux souris traitées à l'anti-IFN $\gamma$  seulement. Toutefois, aucun autre effet significatif n'a pu être observé démontrant une meilleure résolution des symptômes de la HLH avec la thérapie combinée qu'avec l'anti-IFN $\gamma$ .

L'effet de la thérapie combinée sur la résolution de la cytopénie était attendu. En effet, l'IL-18 induit la production de TNF $\alpha$  par les cellules NK [28], et TNF $\alpha$ , en combinaison avec l'IFN $\gamma$ , est principalement responsable de la cytopénie observée dans la HLH [49, 78]. Il est donc logique que l'inhibition combinée d'IFN $\gamma$  et d'IL-18 provoque un effet positif sur la résolution de la cytopénie. Quant à l'anémie, représentée par les niveaux d'hémoglobine et d'hématocrite, les études sur l'utilisation d'anti-IFN $\gamma$  dans des modèles murins montraient une résolution de celle-ci beaucoup plus tard dans l'expérience (au-delà de 12 jours post-infection), et après un traitement de plus longue durée. Ces études ne montraient pas de résolution de l'anémie à 11 jours post-infection, mais celles-ci débutaient aussi les traitements un peu plus tard que nous [89, 90]. Il est donc possible que nous n'ayons pas observé de résolution de l'anémie uniquement parce que nos expériences s'arrêtaient trop tôt pour qu'elle soit observable. Toutefois, puisque nous n'avons pas fait d'expériences de plus longue durée avec ces traitements, cette hypothèse est invérifiable. Aussi, fait intéressant, nous avons constaté que les souris traitées seulement avec de l'anti-IL-18 survivaient, alors qu'elles montraient pourtant des symptômes visibles de maladie (données non montrées). Ceci suggère que la seule inhibition de l'IL-18 entraîne une diminution de la production d'IFN $\gamma$  suffisante pour améliorer considérablement la survie dans un contexte de HLH. Ainsi, bien que nos résultats ne démontrent pas non plus d'avantage majeur de l'utilisation de cette thérapie combinée par rapport à l'anti-IFN $\gamma$  seul, nous croyons que le rôle d'IL-18 dans la HLH mériterait d'être étudié de manière plus approfondie. En particulier, puisque l'inhibition de l'IL-18 est présentement à l'essai chez des patients atteints des mutations XIAP et NLRC4, il est possible que la combinaison d'anti-IFN $\gamma$  et d'anti-IL-18 serait plus bénéfique dans des modèles murins présentant les mêmes mutations.

### **3.2 Le ruxolitinib pour le traitement de la HLH**

Actuellement, le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1 et JAK2, est l'une des plus intéressantes thérapies à l'étude [17]. En effet, le ruxolitinib permet l'inhibition de la signalisation de l'IFN $\gamma$ , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-2 ainsi que plusieurs autres cytokines fortement impliquées dans le développement de la HLH. De plus, cette molécule a déjà été approuvée par

la FDA pour le traitement de la « *polycythemia vera* » et de certaines formes de myélofibrose [118, 119]. Il est aussi présentement à l'étude chez l'humain pour le traitement de plusieurs maladies inflammatoires, telles que le psoriasis [120], l'arthrite rhumatoïde [121, 122] et la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) [123-125], et son efficacité pour le traitement de la HLH a été démontrée dans plusieurs modèles murins [109-111] et dans des cas isolés chez l'humain où il a été utilisé comme thérapie alternative [126-128]. Le ruxolitinib est présentement l'objet de nombreux essais cliniques pour le traitement de la HLH dont les résultats semblent encourageants jusqu'à présent.

Chez la souris, les groupes de Das *et al.*, Maschalidi *et al.* et Albeituni *et al.* ont récemment démontré une importante amélioration de la survie, une réduction des symptômes cliniques, tels que la perte de poids et de température, ainsi qu'une résolution partielle de la cytopénie dans des modèles de HLH primaire et secondaire [109-111]. Toutefois, comme pour les études testant l'anti-IFN $\gamma$ , la résolution des symptômes de la HLH était toujours incomplète avec l'utilisation de ruxolitinib. Étant donné la capacité du ruxolitinib à neutraliser la signalisation de plusieurs cytokines intéressantes, incluant l'IFN $\gamma$ , et son efficacité pour réduire les symptômes de la HLH, nous nous sommes naturellement intéressés à l'inclure dans notre étude. C'est donc dans le même ordre d'idée que précédemment que nous avons voulu tester quelques thérapies combinées avec le ruxolitinib. En raison des résultats obtenus précédemment, et puisque le ruxolitinib inhibe déjà l'IL-6, entre autres, nous avons décidé de ne pas tester une thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IL-6R. Toutefois, la signalisation de l'IL-18, qui utilise la voie NF- $\kappa$ B, est indépendante de la voie JAK-STAT et n'est donc aucunement affectée par le ruxolitinib, et nous étions intéressés à étudier l'inhibition de l'IL-18 en combinaison avec d'autres cytokines. Nous avons donc voulu tester l'efficacité d'une combinaison de ruxolitinib et d'anti-IL-18 sur la réduction des symptômes associés à la HLH dans notre modèle de HLH primaire. Dans le but d'utiliser une approche expérimentale plus rapprochée d'un contexte clinique réel, nous avons décidé d'administrer une dose thérapeutique de 4 mg/kg de ruxolitinib, deux fois par jour, dose comparable à celle habituellement utilisée dans un contexte clinique chez l'humain, plutôt que la très forte dose de 90 mg/kg deux fois par jour souvent utilisée chez la souris [109, 110]. Afin de déterminer la dose à utiliser chez la souris, nous nous sommes basés

sur les travaux de Reagan-Shaw *et al.*, qui prennent en considération les variations biologiques entre les humains et les souris pour l'absorption de molécules administrées par voie orale [129].

### **3.2.1 Thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IL-18**

Dans nos expériences testant la thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IL-18, nous avons utilisé des souris recevant uniquement du ruxolitinib pour servir de référence afin d'évaluer le potentiel effet synergique du traitement combiné. Chez les souris recevant le traitement combiné, nous n'avons pas observé de différence majeure au niveau des principales manifestations cliniques de la HLH et de la cytopénie avec les souris traitées avec le ruxolitinib seul, mais nous avons pu observer une réduction de la fréquence des lymphocytes T CD8+ spécifiques au virus exprimant CD69 chez les souris recevant la thérapie combinée. Par contre, la combinaison de ruxolitinib avec l'anti-IL-18 a permis d'obtenir une inhibition complète de la phosphorylation de STAT1, revenue au niveau obtenu chez une souris B6 infectée au jour 12 post-infection, alors que la phosphorylation de STAT1 était seulement partiellement inhibée chez les souris recevant uniquement du ruxolitinib. De plus, nos expériences ont montré que lorsque les souris recevaient la thérapie combinée, le niveau d'IL-18 dans le sérum était fortement diminuée, alors que lorsqu'elles étaient traitées seulement avec du ruxolitinib, la concentration d'IL-18 était augmentée, suggérant que la production d'IFN $\gamma$  par la voie alternative de l'IL-18 pourrait être potentiellement suractivée lorsque les souris sont traitées avec du ruxolitinib.

Considérant l'effet non négligeable de l'anti-IL-18 sur la résolution de la cytopénie lorsque combiné à l'anti-IFN $\gamma$ , nous nous serions attendus à obtenir un impact similaire lorsque combiné avec le ruxolitinib. Ceci est sans doute dû au fait que le ruxolitinib est connu pour avoir un effet immunosuppresseur pouvant causer une cytopénie, et que son impact était sans doute suffisamment important pour inhiber celui de l'anti-IL-18 [130]. Les études de Das *et al.* et Albeituni *et al.*, quant à elles, avaient observé une légère augmentation de quelques paramètres hématologiques, comme le nombre de plaquettes et l'hémoglobine, mais ces études utilisaient une dose de 90 mg/kg de ruxolitinib, deux fois par jour [109, 110]. Dans l'étude de Maschalidi *et al.* utilisant une dose thérapeutique de 1 mg/kg deux fois par jour, en revanche, seule une augmentation de l'hématocrite était observée au jour 11 post-infection [111], mais le traitement

était débuté plus tard dans l'infection. En résumé, l'utilisation d'une thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IL-18 dans notre modèle ne présente pas d'avantage significatif par rapport à l'utilisation de ruxolitinib seul. Toutefois, pour les raisons mentionnées plus tôt, il n'est pas exclu que la thérapie combinée pourrait présenter un meilleur avantage dans d'autres modèles.

### **3.3 Ruxolitinib *versus* anti-IFN $\gamma$ : quel est plus efficace?**

Les groupes de Maschalidi *et al.* et de Albeituni *et al.* ont tous deux suggéré que le ruxolitinib serait plus efficace que l'anti-IFN $\gamma$  pour le traitement de la HLH dans des modèles murins de HLH primaire. Celles-ci ont d'ailleurs montré que l'utilisation de ruxolitinib permettait d'obtenir un effet thérapeutique bénéfique jusqu'à une semaine après l'arrêt du traitement, un effet qui n'était pas observé avec l'anti-IFN $\gamma$  [109, 111]. Selon eux, la neutropénie causée par le ruxolitinib serait responsable de cet effet protecteur, car le même effet peut être observé chez des souris traitées avec de l'anti-IFN $\gamma$  suite à une déplétion des neutrophiles [109].

Afin de valider ces observations, nous avons comparé l'efficacité de ces deux traitements sur la réduction des manifestations de la HLH dans notre modèle de HLH primaire. À jour 12 post-infection, avec une dose thérapeutique de 4 mg/kg de ruxolitinib, nous n'avons pas observé d'avantage significatif du ruxolitinib par rapport à l'anti-IFN $\gamma$ . À l'exception de quelques différences au niveau de certains paramètres hématologiques, nous avons observé une efficacité très similaire entre les deux traitements quant à leur capacité à améliorer les symptômes de la HLH. Le groupe de Maschalidi *et al.*, utilisant aussi une dose thérapeutique, suggère un avantage du ruxolitinib par rapport à l'anti-IFN $\gamma$  seulement suite à un traitement de deux à trois semaines, alors qu'à jour 11 post-infection, leurs résultats sont comparables à ceux obtenus dans notre étude [111]. Ceci suggère qu'à court terme, le ruxolitinib est aussi efficace, mais pas meilleur que l'anti-IFN $\gamma$  pour le traitement de la HLH.

### **3.4 L'inhibition de l'IFN $\gamma$ à l'aide d'une thérapie combinée**

Les résultats observés lors du traitement avec une thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IFN $\gamma$  sont définitivement les plus marquants obtenus dans le cadre de notre étude. Toutes les combinaisons de thérapies essayées précédemment, même si elles permettaient d'identifier un rôle pour certaines cytokines dans le développement de la HLH, ne permettaient pas d'obtenir une meilleure résolution des symptômes qu'avec l'utilisation d'anti-IFN $\gamma$  ou de ruxolitinib seuls. Connaissant l'importance de l'IFN $\gamma$  dans le développement de la HLH [89] et à quel point sa concentration dans le sérum est élevée dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse qu'il était peut-être nécessaire d'utiliser plusieurs approches simultanément afin de neutraliser l'IFN $\gamma$  de façon optimale dans un contexte de HLH. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons traité des souris PKO infectées avec une combinaison de ruxolitinib et d'anti-IFN $\gamma$ .

Chez les souris recevant la thérapie combinée, nous avons pu observer une résolution presque complète de la majorité des symptômes de la HLH. À partir de jour 8 post-infection, ces souris commençaient à reprendre le poids qu'elles avaient perdues plus tôt dans l'expérience, un phénomène que nous n'avions observé avec aucun des traitements essayés précédemment. De plus, ces souris n'ont eu aucune variation de leur température corporelle et leur score clinique est resté très similaire à celui des souris B6 infectées tout au long de l'expérience, bien au-delà de celui des souris traitées au ruxolitinib. Les souris recevant la thérapie combinée ne présentaient aucun symptôme visible de HLH et, d'un point de vue clinique, présentaient un phénotype indiscernable de celui des souris B6. Quant à la cytopénie, certaines populations de cellules, telles que les globules blancs, les lymphocytes et les neutrophiles, étaient revenues à des niveaux dans les normales chez ces souris, alors qu'une augmentation modeste, mais bien réelle, de l'hémoglobine et de l'hématocrite a aussi été observée. Les niveaux de ferritine dans le sérum ainsi que la prolifération et l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques au virus sont aussi drastiquement diminués, et sont presque revenus au niveau observé chez des souris B6 infectées. Finalement, la phosphorylation de STAT1 est complètement rétablie à un niveau de base.

Les résultats de ces expériences démontrent que la combinaison de ruxolitinib et d'anti-IFN $\gamma$  génère un effet de synergie majeur sur la résolution des symptômes de la HLH dans un

modèle murin de HLH primaire, permettant de prévenir et résoudre la plupart des manifestations de la HLH après une seule semaine de traitement. De fait, ils démontrent aussi qu'il est possible d'améliorer considérablement l'efficacité des immunothérapies existantes par l'utilisation d'une combinaison de thérapies ciblant surtout l'IFN $\gamma$ . Toutefois, les mécanismes sous-jacents pouvant expliquer le net avantage de la thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IFN $\gamma$  observé sont encore mal compris. En effet, les résultats publiés dans la littérature scientifique, de même que ceux obtenus dans notre laboratoire, tendent à démontrer que l'effet drastique obtenu avec la thérapie combinée ne peut être observé lors de l'administration d'une dose plus élevée de l'une ou l'autre de ces molécules dans le cadre d'une monothérapie [89-91, 109-111], suggérant un mécanisme plus complexe qu'une simple meilleure inhibition de l'IFN $\gamma$  pour expliquer l'effet bénéfique de la thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IFN $\gamma$ . Aussi, puisque l'inhibition des JAK par le ruxolitinib est incomplète, comme en témoigne le niveau de phosphorylation de STAT1 encore partiellement élevé, et que les JAK inhibiteurs ont une courte demi-vie dans l'organisme [121, 131-133], nous suggérons que le ruxolitinib ne devrait pas être utilisé en tant que monothérapie dans un contexte inflammatoire aussi sévère que la HLH. Finalement, nos travaux supportent fortement l'utilisation d'anti-IFN $\gamma$  en concomitance avec le ruxolitinib pour le traitement de la HLH primaire.

## CHAPITRE 4 : CONCLUSION

La difficulté des protocoles de traitements actuels à réduire de manière optimale l'inflammation associée à la HLH et le taux de mortalité élevé qui en résulte fait du développement de nouvelles immunothérapies, plus efficaces et moins toxiques que les traitements actuels pour la HLH, un sujet de grand intérêt. C'est la volonté de contribuer à résoudre cette problématique qui a mené à l'élaboration des travaux de recherche présentés dans ce mémoire.

Dans le cadre de notre étude, nous avons suggéré que l'IL-18, malgré les résultats mitigés obtenus dans notre modèle, pourrait jouer un rôle non négligeable dans le développement de la HLH. Afin d'approfondir notre compréhension du rôle de cette cytokine dans ce contexte, il pourrait être pertinent de tester l'inhibition de l'IL-18, seul ou en combinaison avec de l'anti-IFN $\gamma$  ou du ruxolitinib, dans des modèles murins représentatifs des sous-types de HLH chez lequel il est actuellement à l'étude chez l'humain. Ceci nous permettrait de déterminer si, dans un contexte plus pertinent, l'IL-18 serait plus efficace dans le cadre d'une thérapie combinée qu'en tant que thérapie unique.

Aussi, la thérapie combinée d'anti-IFN $\gamma$  et de ruxolitinib que nous proposons pour le traitement de la HLH ne neutralise pas la signalisation de l'IL-18, qui est pourtant une cytokine reconnue pour induire la production d'IFN $\gamma$ , en grande partie responsable du développement de la HLH. Il serait donc intéressant de voir si l'utilisation d'une thérapie triple combinant du ruxolitinib, de l'anti-IFN $\gamma$  et de l'anti-IL-18 permettrait d'achever complètement la résolution des anomalies résiduelles associées à la HLH que nous pouvons encore observer chez les souris traitées avec de l'anti-IFN $\gamma$  et du ruxolitinib.

Finalement, les travaux effectués pendant ma maîtrise, dans un modèle murin de HLH primaire, ont permis de démontrer que l'utilisation d'une thérapie combinée de ruxolitinib et d'anti-IFN $\gamma$  serait une option thérapeutique plus efficace que l'utilisation de l'un ou l'autre de ces traitements seuls pour le traitement de la HLH. Notre étude est la première de son genre à étudier la possibilité de combiner plusieurs thérapies dans le contexte de la HLH et pourrait, nous l'espérons, éventuellement ouvrir la voie à des études chez l'humain.

# Bibliographie

1. Murphy, K., *Janeway's immunobiology*. 8 ed. 2012, États-Unis: Garland Science. 868.
2. Judy A. Owen, J.P., Sharon A. Stranford, *Immunologie, Le cours de Janis Kuby*. 7 ed. 2014, Paris: Dunod. 800.
3. Moukambi, F., *Études de la dynamique des cellules Tfh et T CD4 mémoires au cours de l'infection au VIH*, in *Microbiologie et immunologie*. 2017, Université Laval. p. 184.
4. Szabo, S.J., et al., *Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 713-58.
5. Zhang, J.M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain*. *Int Anesthesiol Clin*, 2007. **45**(2): p. 27-37.
6. Amatya, N., A.V. Garg, and S.L. Gaffen, *IL-17 Signaling: The Yin and the Yang*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(5): p. 310-322.
7. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 89-102.
8. Song, A., et al., *Salient type 1 interleukin 1 receptor expression in peripheral non-immune cells*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 723.
9. Rider, P., et al., *IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation*. *J Immunol*, 2011. **187**(9): p. 4835-43.
10. Dinarello, C.A., *Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity*. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 8-27.
11. Viennois, E., F. Chen, and D. Merlin, *NF-kappaB pathway in colitis-associated cancers*. *Transl Gastrointest Cancer*, 2013. **2**(1): p. 21-29.
12. Kim, B.S., Y.J. Park, and Y. Chung, *Targeting IL-17 in autoimmunity and inflammation*. *Arch Pharm Res*, 2016. **39**(11): p. 1537-1547.
13. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(10): p. a016295.
14. Tenhumberg, S., et al., *Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(40): p. 27200-7.

15. Mihara, M., et al., *IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(4): p. 143-59.
16. Hodge, J.A., et al., *The mechanism of action of tofacitinib - an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2016. **34**(2): p. 318-28.
17. Banerjee, S., et al., *JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects*. Drugs, 2017. **77**(5): p. 521-546.
18. Kalliolias, G.D. and L.B. Ivashkiv, *TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(1): p. 49-62.
19. Sabio, G. and R.J. Davis, *TNF and MAP kinase signalling pathways*. Semin Immunol, 2014. **26**(3): p. 237-45.
20. Walter, M.R., *The molecular basis of IL-10 function: from receptor structure to the onset of signaling*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **380**: p. 191-212.
21. Letterio, J.J. and A.B. Roberts, *Regulation of immune responses by TGF-beta*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 137-61.
22. Yang, L., Y. Pang, and H.L. Moses, *TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression*. Trends Immunol, 2010. **31**(6): p. 220-7.
23. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
24. Bretscher, P.A., *On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases*. Scand J Immunol, 2014. **79**(6): p. 361-76.
25. Teng, M.W., et al., *IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 719-29.
26. Tugues, S., et al., *New insights into IL-12-mediated tumor suppression*. Cell Death Differ, 2015. **22**(2): p. 237-46.
27. Sedimbi, S.K., T. Hagglof, and M.C. Karlsson, *IL-18 in inflammatory and autoimmune disease*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(24): p. 4795-808.

28. Puren, A.J., et al., *Interleukin-18 (IFN $\gamma$ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 $\beta$  via TNF $\alpha$  production from non-CD14 $^+$  human blood mononuclear cells.* J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 711-21.
29. de Saint Basile, G., G. Menasche, and A. Fischer, *Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(8): p. 568-79.
30. Orange, J.S., *Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 713-25.
31. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Mechanisms of granule-dependent killing.* Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 251-62.
32. Suk, K., et al., *Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) and tumor necrosis factor alpha synergism in ME-180 cervical cancer cell apoptosis and necrosis. IFN $\gamma$  inhibits cytoprotective NF-kappa B through STAT1/IRF-1 pathways.* J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 13153-9.
33. Suk, K., et al., *IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death.* J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4481-9.
34. Voskoboinik, I., M.J. Smyth, and J.A. Trapani, *Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 940-52.
35. Siegel, R.M., et al., *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity.* Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 469-74.
36. de Saint Basile, G. and A. Fischer, *The role of cytotoxicity in lymphocyte homeostasis.* Curr Opin Immunol, 2001. **13**(5): p. 549-54.
37. Terrell, C.E. and M.B. Jordan, *Perforin deficiency impairs a critical immunoregulatory loop involving murine CD8(+) T cells and dendritic cells.* Blood, 2013. **121**(26): p. 5184-91.
38. Lykens, J.E., et al., *Perforin is a critical physiologic regulator of T-cell activation.* Blood, 2011. **118**(3): p. 618-26.

39. Lee, S.H., et al., *Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection*. J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2235-51.
40. Lang, P.A., et al., *Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(4): p. 1210-5.
41. Lan, R.Y., et al., *Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2005. **4**(6): p. 351-63.
42. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
43. Zuniga, E.I., et al., *Innate and Adaptive Immune Regulation During Chronic Viral Infections*. Annu Rev Virol, 2015. **2**(1): p. 573-97.
44. Dyck, L. and K.H.G. Mills, *Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases*. Eur J Immunol, 2017. **47**(5): p. 765-779.
45. Henter, J.I., et al., *Incidence in Sweden and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Acta Paediatr Scand, 1991. **80**(4): p. 428-35.
46. Schneider, E.M., et al., *Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytotoxicity but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2891-8.
47. Kogawa, K., et al., *Perforin expression in cytotoxic lymphocytes from patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis and their family members*. Blood, 2002. **99**(1): p. 61-6.
48. Janka, G.E., *Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Annu Rev Med, 2012. **63**: p. 233-46.
49. Janka, G.E., *Hemophagocytic syndromes*. Blood Rev, 2007. **21**(5): p. 245-53.
50. Zhang, K., et al., *Hypomorphic mutations in PRF1, MUNC13-4, and STXBP2 are associated with adult-onset familial HLH*. Blood, 2011. **118**(22): p. 5794-8.

51. Ohadi, M., et al., *Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(1): p. 165-71.
52. Stepp, S.E., et al., *Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1957-9.
53. Feldmann, J., et al., *Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3)*. Cell, 2003. **115**(4): p. 461-73.
54. zur Stadt, U., et al., *Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(6): p. 827-34.
55. Cote, M., et al., *Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3765-73.
56. Sepulveda, F.E., et al., *Distinct severity of HLH in both human and murine mutants with complete loss of cytotoxic effector PRF1, RAB27A, and STX11*. Blood, 2013. **121**(4): p. 595-603.
57. Jessen, B., et al., *Graded defects in cytotoxicity determine severity of hemophagocytic lymphohistiocytosis in humans and mice*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 448.
58. Zhang, K., et al., *Synergistic defects of different molecules in the cytotoxic pathway lead to clinical familial hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Blood, 2014. **124**(8): p. 1331-4.
59. Madkaikar, M., S. Shabrish, and M. Desai, *Current Updates on Classification, Diagnosis and Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH)*. Indian J Pediatr, 2016. **83**(5): p. 434-43.
60. Menasche, G., et al., *Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 173-6.

61. Chiang, S.C.C., et al., *Differences in Granule Morphology yet Equally Impaired Exocytosis among Cytotoxic T Cells and NK Cells from Chediak-Higashi Syndrome Patients*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 426.
62. Enders, A., et al., *Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II*. Blood, 2006. **108**(1): p. 81-7.
63. Rigaud, S., et al., *XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome*. Nature, 2006. **444**(7115): p. 110-4.
64. Nichols, K.E., et al., *Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13765-70.
65. Nagy, N. and E. Klein, *Deficiency of the proapoptotic SAP function in X-linked lymphoproliferative disease aggravates Epstein-Barr virus (EBV) induced mononucleosis and promotes lymphoma development*. Immunol Lett, 2010. **130**(1-2): p. 13-8.
66. Bryceson, Y.T., et al., *Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1906-15.
67. Salvador, C., et al., *Hemophagocytic lymphohistiocytosis after allogeneic bone marrow transplantation during chronic norovirus infection*. Hematol Oncol, 2014. **32**(2): p. 102-6.
68. O'Brien, M.M., et al., *Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia presenting with hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(2): p. 381-3.
69. Fardet, L., et al., *Reactive haemophagocytic syndrome in 58 HIV-1-infected patients: clinical features, underlying diseases and prognosis*. AIDS, 2010. **24**(9): p. 1299-306.
70. Imashuku, S., et al., *Biomarker and morphological characteristics of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Med Pediatr Oncol, 1998. **31**(3): p. 131-7.
71. Goudarzipour, K., M. Kajiyazdi, and A. Mahdaviyani, *Epstein-barr virus-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2013. **7**(1): p. 42-5.

72. Schulert, G.S. and A.A. Grom, *Pathogenesis of macrophage activation syndrome and potential for cytokine- directed therapies*. *Annu Rev Med*, 2015. **66**: p. 145-59.
73. Chandrakasan, S. and A.H. Filipovich, *Hemophagocytic lymphohistiocytosis: advances in pathophysiology, diagnosis, and treatment*. *J Pediatr*, 2013. **163**(5): p. 1253-9.
74. Lachmann, G., et al., [*Hemophagocytic lymphohistiocytosis : A diagnostic challenge on the ICU*]. *Anaesthesist*, 2016. **65**(10): p. 776-786.
75. Lehmborg, K., et al., *Determination of an appropriate cut-off value for ferritin in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Pediatr Blood Cancer*, 2014. **61**(11): p. 2101-3.
76. Komp, D.M., J. McNamara, and P. Buckley, *Elevated soluble interleukin-2 receptor in childhood hemophagocytic histiocytic syndromes*. *Blood*, 1989. **73**(8): p. 2128-32.
77. Henter, J.I., et al., *HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Pediatr Blood Cancer*, 2007. **48**(2): p. 124-31.
78. Rosado, F.G. and A.S. Kim, *Hemophagocytic lymphohistiocytosis: an update on diagnosis and pathogenesis*. *Am J Clin Pathol*, 2013. **139**(6): p. 713-27.
79. Filipovich, A.H., *Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: p. 127-31.
80. Osugi, Y., et al., *Cytokine production regulating Th1 and Th2 cytokines in hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Blood*, 1997. **89**(11): p. 4100-3.
81. Jenkins, M.R., et al., *Failed CTL/NK cell killing and cytokine hypersecretion are directly linked through prolonged synapse time*. *J Exp Med*, 2015. **212**(3): p. 307-17.
82. Vick, E.J., et al., *Proliferation through activation: hemophagocytic lymphohistiocytosis in hematologic malignancy*. *Blood Adv*, 2017. **1**(12): p. 779-791.
83. Behrens, E.M., et al., *Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome-like disease in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(6): p. 2264-77.
84. Risma, K. and M.B. Jordan, *Hemophagocytic lymphohistiocytosis: updates and evolving concepts*. *Curr Opin Pediatr*, 2012. **24**(1): p. 9-15.
85. Takada, H., et al., *Oversecretion of IL-18 in haemophagocytic lymphohistiocytosis: a novel marker of disease activity*. *Br J Haematol*, 1999. **106**(1): p. 182-9.

86. Micallef, M.J., et al., *Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production*. Eur J Immunol, 1996. **26**(7): p. 1647-51.
87. Avau, A. and P. Matthys, *Therapeutic Potential of Interferon-gamma and Its Antagonists in Autoinflammation: Lessons from Murine Models of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis and Macrophage Activation Syndrome*. Pharmaceuticals (Basel), 2015. **8**(4): p. 793-815.
88. Muhl, H. and J. Pfeilschifter, *Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(9): p. 1247-55.
89. Jordan, M.B., et al., *An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8+ T cells and interferon gamma are essential for the disorder*. Blood, 2004. **104**(3): p. 735-43.
90. Pachlopnik Schmid, J., et al., *Neutralization of IFN-gamma defeats haemophagocytosis in LCMV-infected perforin- and Rab27a-deficient mice*. EMBO Mol Med, 2009. **1**(2): p. 112-24.
91. Prencipe, G., et al., *Neutralization of IFN-gamma reverts clinical and laboratory features in a mouse model of macrophage activation syndrome*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(4): p. 1439-1449.
92. Trottestam, H., et al., *Chemoimmunotherapy for hemophagocytic lymphohistiocytosis: long-term results of the HLH-94 treatment protocol*. Blood, 2011. **118**(17): p. 4577-84.
93. Bergsten, E., et al., *Confirmed efficacy of etoposide and dexamethasone in HLH treatment: long-term results of the cooperative HLH-2004 study*. Blood, 2017. **130**(25): p. 2728-2738.
94. Administration, U.S.F.a.D. *FDA approves emapalumab for hemophagocytic lymphohistiocytosis*. 2018 [cited 2019 May 20]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/fda-approves-emapalumab-hemophagocytic-lymphohistiocytosis>.
95. *Emapalumab for primary haemophagocytic lymphohistiocytosis*, in *Evidence Briefing : February 2018*, N.I.f.H.R.I. Observatory, Editor. 2018.

96. Administration, U.S.F.a.D., *GAMIFANT (emapalumab-lzsg) injection, for intravenous use*. 2018: USA.
97. Althaus, C.L., V.V. Ganusov, and R.J. De Boer, *Dynamics of CD8+ T cell responses during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection*. *J Immunol*, 2007. **179**(5): p. 2944-51.
98. Crozat, K., et al., *Jinx, an MCMV susceptibility phenotype caused by disruption of Unc13d: a mouse model of type 3 familial hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *J Exp Med*, 2007. **204**(4): p. 853-63.
99. Kogal, T., et al., *Hemophagocytic lymphohistiocytosis in syntaxin-11-deficient mice: T-cell exhaustion limits fatal disease*. *Blood*, 2013. **121**(4): p. 604-13.
100. Pachlopnik Schmid, J., et al., *A Griscelli syndrome type 2 murine model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(11): p. 3219-25.
101. Jessen, B., et al., *Subtle differences in CTL cytotoxicity determine susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice and humans with Chediak-Higashi syndrome*. *Blood*, 2011. **118**(17): p. 4620-9.
102. Jessen, B., et al., *The risk of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type 2*. *Blood*, 2013. **121**(15): p. 2943-51.
103. Mouse Genome Informatics, T.J.L. *Stxbp2 Gene Detail*. 2019 [cited 2019 May 23]; Available from: <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:107370>.
104. Wunderlich, M., et al., *A xenograft model of macrophage activation syndrome amenable to anti-CD33 and anti-IL-6R treatment*. *JCI Insight*, 2016. **1**(15): p. e88181.
105. Marsh, R.A., et al., *Salvage therapy of refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis with alemtuzumab*. *Pediatr Blood Cancer*, 2013. **60**(1): p. 101-9.
106. Marsh, R.A., et al., *Salvage therapy for refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis: A review of the published experience*. *Pediatr Blood Cancer*, 2017. **64**(4).
107. Mahlaoui, N., et al., *Immunotherapy of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with antithymocyte globulins: a single-center retrospective report of 38 patients*. *Pediatrics*, 2007. **120**(3): p. e622-8.

108. Miettunen, P.M., et al., *Successful treatment of severe paediatric rheumatic disease-associated macrophage activation syndrome with interleukin-1 inhibition following conventional immunosuppressive therapy: case series with 12 patients*. *Rheumatology (Oxford)*, 2011. **50**(2): p. 417-9.
109. Albeituni, S., et al., *Mechanisms of action of ruxolitinib in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Blood*, 2019. **134**(2): p. 147-159.
110. Das, R., et al., *Janus kinase inhibition lessens inflammation and ameliorates disease in murine models of hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Blood*, 2016. **127**(13): p. 1666-75.
111. Maschalidi, S., et al., *Therapeutic effect of JAK1/2 blockade on the manifestations of hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice*. *Blood*, 2016. **128**(1): p. 60-71.
112. Faguer, S., et al., *Tocilizumab added to conventional therapy reverses both the cytokine profile and CD8+Granzyme+ T-cells/NK cells expansion in refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Hematol Oncol*, 2016. **34**(1): p. 55-7.
113. Grom, A.A., A. Horne, and F. De Benedetti, *Macrophage activation syndrome in the era of biologic therapy*. *Nat Rev Rheumatol*, 2016. **12**(5): p. 259-68.
114. Rios-Fernandez, R., et al., *Tocilizumab as an Adjuvant Therapy for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Associated With Visceral Leishmaniasis*. *Am J Ther*, 2016. **23**(5): p. e1193-6.
115. Barkhausen, T., et al., *Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model*. *Crit Care Med*, 2011. **39**(6): p. 1407-13.
116. Kraakman, M.J., et al., *Targeting gp130 to prevent inflammation and promote insulin action*. *Diabetes Obes Metab*, 2013. **15 Suppl 3**: p. 170-5.
117. Schuett, H., et al., *Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(2): p. 281-90.
118. McKeage, K., *Ruxolitinib: A Review in Polycythaemia Vera*. *Drugs*, 2015. **75**(15): p. 1773-81.

119. Santos, F.P. and S. Verstovsek, *Efficacy of ruxolitinib for myelofibrosis*. Expert Opin Pharmacother, 2014. **15**(10): p. 1465-73.
120. Hsu, L. and A.W. Armstrong, *JAK inhibitors: treatment efficacy and safety profile in patients with psoriasis*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 283617.
121. Fridman, J.S., et al., *Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5298-307.
122. MacFarlane, L.A. and D.J. Todd, *Kinase inhibitors: the next generation of therapies in the treatment of rheumatoid arthritis*. Int J Rheum Dis, 2014. **17**(4): p. 359-68.
123. Spoerl, S., et al., *Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease*. Blood, 2014. **123**(24): p. 3832-42.
124. Choi, J., et al., *Pharmacologic blockade of JAK1/JAK2 reduces GvHD and preserves the graft-versus-leukemia effect*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109799.
125. Assouan, D., et al., *Ruxolitinib as a promising treatment for corticosteroid-refractory graft-versus-host disease*. Br J Haematol, 2018. **181**(5): p. 687-689.
126. Sin, J.H. and M.L. Zangardi, *Ruxolitinib for secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: First case report*. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2017.
127. Slostad, J., et al., *Ruxolitinib as first-line treatment in secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis: A single patient experience*. Am J Hematol, 2018. **93**(2): p. E47-E49.
128. Broglie, L., et al., *Ruxolitinib for treatment of refractory hemophagocytic lymphohistiocytosis*. Blood Adv, 2017. **1**(19): p. 1533-1536.
129. Reagan-Shaw, S., M. Nihal, and N. Ahmad, *Dose translation from animal to human studies revisited*. FASEB J, 2008. **22**(3): p. 659-61.
130. Saeed, I., D. McLornan, and C.N. Harrison, *Managing side effects of JAK inhibitors for myelofibrosis in clinical practice*. Expert Rev Hematol, 2017. **10**(7): p. 617-625.
131. Shi, J.G., et al., *The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of orally dosed INCB018424 phosphate in healthy volunteers*. J Clin Pharmacol, 2011. **51**(12): p. 1644-54.

132. Ogama, Y., et al., *A randomized dose-escalation study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ruxolitinib (INC424) in healthy Japanese volunteers*. Int J Hematol, 2013. **97**(3): p. 351-9.
133. Quintas-Cardama, A., et al., *Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3109-17.