

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2020

THESES 2020/TOU3/2047

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

MIGNÉ Hugo

**EVALUATION DU MONITORAGE DES SOUS-POPULATIONS
LYMPHOCYTAIRES DU TRAITEMENT PAR RITUXIMAB DANS LA
SCLEROSE EN PLAQUES**

Le 25 septembre 2020

Directeur de thèse : TREINER Emmanuel, MCU-PH, Immunologie

JURY

Président : BLANCHER Antoine, PU-PH, Immunologie

1^{er} assesseur : CIRON Jonathan, PH, Neurologie

2^{ème} assesseur : DE MAS MANSAT Véronique, PU-PH, Hématologie

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 2 mars 2020

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERA EVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. OLICHON A.	Biochimie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S	Biophysique
Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

TABLE DES MATIERES

SERMENT DE GALIEN.....	6
REMERCIEMENTS	10
TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
Partie 1 : Les lymphocytes B et les anti-CD20 thérapeutiques	19
Chapitre 1 : Les lymphocytes B	19
A. Généralités	19
B. Les différentes sous-populations de Lymphocytes B et leurs marqueurs immunophénotypiques	21
Chapitre 2 : Les anticorps monoclonaux anti-CD20 thérapeutiques	27
A. Historique et définition	27
B. Mécanismes d'action généraux.....	29
1. Cible.....	29
2. Mécanismes d'action.....	30
a. Induction de l'apoptose.....	30
b. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)	30
c. Cytotoxicité médiée par le complément et dépendante des anticorps (CDC).....	31
C. Les anti-CD20 et les populations lymphocytaires dans les pathologies auto-immunes	32
1. Etat des populations lymphocytaires avant traitement par Rituximab dans différentes pathologies auto-immune	32
2. Intérêt des anticorps anti-CD20 dans le traitement des pathologies auto-immunes.....	33
3. Impact du Rituximab sur les populations lymphocytaires B	35
4. Les anti-CD20 et leur utilisation dans la SEP	36
a. La sclérose en plaques.....	36
b. Rappels physio-pathologiques	38
c. La place des anti-CD20 dans le traitement de la SEP	43
d. Etat des différentes sous-populations lymphocytaires B dans la SEP	44
d. Les sous-populations lymphocytaires B des patients avec une SEP suite à un traitement par anti-CD20	47
Partie 2 : Etude	48
A. Objectif de l'étude.....	48
B. Matériel et méthode	49

1. Les patients.....	49
2. L'immunophénotypage par cytométrie en flux.....	50
3. Analyse statistique	53
C. Résultats	53
1. Population étudiée	53
2. Comparaison des immunophénotypage TBNK et immunophénotypage B étendu suivant le traitement de fond immunomodulateur précédent	57
3. Comparaison des immunophénotypes lymphocytaires avant traitement aux immunophénotypes des cycles successifs.....	64
4. Evaluation de l'impact de la dose d'entretien de Rituximab sur les différentes populations lymphocytaires	75
5. Comparaison des immunophénotypes lymphocytaires avant traitement des patients ayant une repopulation lymphocytaire B et des patients n'ayant pas de repopulation	77
D. Discussion	82
CONCLUSION	87
ANNEXES.....	89
BIBLIOGRAPHIE.....	101

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Antoine BLANCHER, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

A Monsieur le Docteur Emmanuel TREINER, merci d'avoir dirigé mon travail de thèse, pour ton soutien, ta disponibilité et tes nombreux conseils tout au long de ce travail.

A Madame le Professeur Véronique DE MAS, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, ainsi que pour votre disponibilité, votre implication dans la formation des internes. Merci pour votre soutien durant mes semestres en hématologie.

A Monsieur le Docteur Jonathan CIRON, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de nous faire bénéficier de votre expertise dans le domaine des pathologies neuroinflammatoires.

A mes parents et à ma sœur, pour votre soutien, vos encouragements, votre patience et votre amour durant toutes ces années. Un grand merci à Maman pour toute l'aide que tu m'as apporté dans la rédaction de ma thèse !

A mes grands-parents présents ou parti trop tôt, qui m'ont suivi et soutenu durant toutes ces longues années d'études.

A l'ensemble de ma familles, oncles et tantes, cousins et cousines, pièces rapportées, pour tous ces bons moments passés auprès de vous.

A Simon, mon binôme, coloc et ami de la première heure. Toutes ces années passées ensemble étaient un plaisir. A Morgane, pour ton énergie et les dernières années de colocation à partager Simon ! A Nora et Éric, pour votre maison toujours ouverte et accueillante.

A tous les Clébards, Simon, les Alexis, Ludovic, Thomas, Benoît, Marc, pour votre bonne humeur, toutes ces soirées intelligentes et ces bonnes andouillettes !

A tous mes amis de pharmacie, Cécile, Mélina et Bilel, Cassou et Martin, Cassie, Charlotte, Marine, c'est toujours un plaisir de vous retrouver.

A Mathieu, Gazeau, Douet, Louis-Marie, Erwan, mes amis d'enfance.

A Ali, pour toutes ces parties de baby (de plus ou moins mauvaise foi) ! Pour ces journées foot et ces bonnes pizzas !

A Maximin pour ta bonne humeur, ton humour tout en finesse et ces nombreux fûts de chênes partagés !

A Théo, Dorian, Alban et Xavier, pour tous ces bons moments passés à débriefer les matchs et pour ces soirées League des champions ! Mais surtout pour ce magnifique Toulouse-Monaco !

A Aude et Emeline pour toutes ces visites nocturnes de Toulouse !

A Anaïs (avec un tréma !), pour ta rigueur, ta motivation et ton aide pour l'administratif de la thèse. Mais surtout pour ces bons moments passés en stage et ailleurs !

A Imane et Charlotte, pour votre gentillesse et tous les moments Pouloulou !

A Nolwenn, pour ton enthousiasme et ces soirées cocktails qui durent jusqu'au petit matin. A Julien, pour la découverte de la vie à l'internat, pour ta bienveillance. Promis je tiendrai le carton !

A Chloé et Rémi, pour votre gentillesse et les sorties au ski !

A mes co-internes, Elodie, Anthony, Pauline, Léa, Caroline, Marine, Sabine, Nicolas, Sarah, Jean, Noémie, Laurie, Delphine, Orancie, Pierre-Luc, Pierre, Gabriella, Germain, Benjamin pour votre compagnie et votre amitié au cours des semestres passés et à venir.

Et pour finir, merci à Marie chérie, pour ton soutien, ton aide et tes nombreuses relectures ! Mais surtout pour tout le bonheur que tu m'apportes, pour ton amour. Merci de me faire rester sur mon nuage !

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique des différentes cellules appartenant à la lignée des lymphocytes B et les différents marqueurs exprimés suivant les stades (d'après lineage-biomarkers-of-the-human-immune-system de BIO-RAD®).

Figure 2 : Distribution des différentes sous-populations lymphocytaires B dans le sang périphérique en fonction de l'âge (d'après : [16]).

Figure 3 : Représentation schématique d'une molécule de Rituximab (d'après : [20]).

Figure 4 : Schéma représentant les différentes voies d'activation de l'apoptose induite par le Rituximab (d'après : [23]).

Figure 5 : Schéma des mécanismes principaux médiés par le Fragment constant entraînant la destruction des lymphocytes B ciblés par le Rituximab (d'après : [28]).

Figure 6 : Représentation des différents modes évolutifs de la sclérose en plaques (d'après : [50]).

Figure 7 : Les principaux rôles des lymphocytes B dans un organisme sain et leur possible répercussion en cas de déséquilibres dans la physiopathologie de la sclérose en plaques (d'après : [61]).

Figure 8 : Schéma résumant les différents rôles présumés des lymphocytes B (B-cells ou LB) dans l'immunopathogénèse de la sclérose en plaques (SEP) et les sites d'action de certaines thérapeutiques utilisées dans le traitement de la sclérose en plaques (d'après : [1]).

Figure 9 : Représentations schématiques de la comparaison des répartitions en pourcentage des différentes sous-populations lymphocytaires B entre un groupe de patients sains (« healthy control » HC) et différents groupes de patients atteints de sclérose en plaques : des patients avec des signes radiologiques isolés (RIS), des patients avec des signes cliniques isolés (CIS) et des patients avec une SEP-RR non traitée (RR MS) (d'après : [37]).

Figure 10 : Représentation d'une analyse par cytométrie en flux des sous-populations lymphocytaires B d'un patient avant traitement par Rituximab.

Figure 11 : Représentation d'une analyse par cytométrie en flux des sous-populations lymphocytaires B d'un patient présentant une repopulation suite à un traitement par Rituximab.

Figure 12 : Représentation de la répartition des différentes populations lymphocytaires étudiées par un immunophénotypage TBNK avant traitement par Rituximab (J0), en fonction du traitement de fond immunomodulateur (TFI), en cellules/mm³ de sang.

Figure 13 : Représentation de la répartition en pourcentage des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0), en fonction du traitement immunomodulateur (TFI).

Figure 14 : Représentation de la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) en fonction du traitement immunomodulateur (TFI), en cellules/mm³ de sang.

Figure 15 : Représentation de l'étude des variations des populations lymphocytaires entre l'état avant l'induction par Rituximab (J0) et 6 mois après la première dose de Rituximab (C1).

Figure 16 : Représentation des différentes populations lymphocytaires étudiées par l'immunophénotypage TBNK avant l'induction par Rituximab (J0) et lors des cycles de Rituximab successifs, en cellules/mm³ de sang.

Figure 17 : Représentation de la proportion de patients ayant des Lymphocytes B détectables au sein de l'ensemble des patients au cours des différents cycles.

Figure 18 : Représentation de la répartition en termes de proportion des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) et lors des cycles de Rituximab successifs des patients ayant des lymphocytes B détectables (> 5 LB/mm³ de sang).

Figure 19 : Représentation des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) et lors des cycles successifs de Rituximab des patients ayant des lymphocytes B détectables (> 5 LB/mm³ de sang), en cellules/mm³ de sang.

Figure 20 : Comparaison de la répartition des populations lymphocytaires analysée par le panel TBNK et des sous-populations lymphocytaires B, suite au premier cycle d'entretien (C2) entre les patients ayant reçu 2 g de Rituximab et ceux ayant reçu 1 g.

Figure 21 : Représentation de l'étude des populations lymphocytaires avant traitement par Rituximab (J0) entre les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (Lymphocytes B < 5 / mm³ de sang) lors des cycles de Rituximab et les patients présentant une repopulation lymphocytaire B lors d'au moins un cycle.

Figure 22 : Représentation en termes de fréquence (%) des sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) entre les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (Lymphocytes B < 5 / mm³ de sang) lors des cycles de Rituximab et les patients présentant une repopulation lymphocytaire B lors d'au moins un cycle.

Figure 23 : Représentation de l'étude des sous-populations lymphocytaires B en cellules/mm³ de sang, avant traitement par Rituximab (J0) entre les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (Lymphocytes B < 5 / mm³ de sang) lors des cycles de Rituximab et les patients présentant une repopulation lymphocytaire B lors d'au moins 1 cycle.

Tableau 1 : Effectifs et proportions des patients en fonction des pathologies.

Tableau 2 : Délais moyens entre les cycles de Rituximab.

Tableau 3 : Répartition des patients avec ou sans repopulations en fonction des antécédents de traitement de fond immunomodulateur (TFI).

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANCA : anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles

APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand

AQP4 : aquaporine 4

BAFF : B-cell activating factor ou facteur d'activation des lymphocytes B

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B cell receptor ou récepteur à l'antigène des lymphocytes B

CCP : cyclic citrulline peptides ou peptides cycliques citrullinés

CD : cluster of differentiation ou marqueur de différenciation

CDC : cytotoxicité dépendante du complément

CDF : cellules dendritique folliculaire

CHU : centre hospitalo-universitaire

CMF : cytométrie en flux

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

DICV : déficit immunitaire commun variable

EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis ou modèle expérimental de l'encéphalomyélite autoimmune

EBV : virus d'Epstein-barr

ENA : extractable nuclear antigen ou antigènes extractibles du noyau des cellules

Fc : fragment constant

FCyR : récepteur gamma au fragment constant

FDA : food & drug administration

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor ou facteur de stimulation de colonie des granulocytes et macrophages

Ig : immunoglobuline

IgIV : immunoglobulines polyvalentes intra-veineuses

IL : interleukine

IFN- γ : interféron gamma

IRM : imagerie par résonance magnétique

LB : lymphocyte B

LBreg : lymphocyte B régulateur

LCR : liquide céphalo-rachidien

LES : lupus érythémateux systémique

LNH : lymphome non Hodgkinien

LNK : lymphocyte natural killer

LT : lymphocyte T

LTreg : lymphocyte T régulateur

MOG : myelin-oligodendrocyte glycoprotein ou glycoprotéine de la myéline des oligodendrocytes

MPO : myéloperoxydase

MS4A : membrane spanning four domain superfamily A

NMO : neuromyéélite optique

PP : primairement progressive

PR : polyarthrite rhumatoïde

PR3 : protéinase 3

RR : rémittente-récurrente

SEP : sclérose en plaques

SNC : système nerveux central

SP : secondairement progressive

SS : syndrome de Sjögren

TFI : traitement de fond immunomodulateur

th1 : lymphocyte T helper 1

TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

La sclérose en plaques (SEP) est une pathologie neuro-inflammatoire, touchant principalement l'adulte jeune. Comme de nombreuses pathologies auto-immunes une prédominance féminine est retrouvée (sex-ratio : 3 femmes pour 1 homme) [1]. La SEP affecte 2,5 millions de personnes dans le monde, dont 57 000 en France (données de la Fondation de Charcot en 2018). C'est une pathologie encore mal contrôlée par les thérapeutiques immunomodulatrices usuelles, telles que le Fingolimod, l'interféron- β et le Natalizumab. Chez un certain nombre de patients réfractaires à ces thérapeutiques, l'utilisation des anticorps anti-CD20 ciblant les lymphocytes B (LB) avec en premier lieu le Rituximab puis l'Ocrélizumab a permis d'améliorer ou de retarder l'évolution de la pathologie.

Les utilisations des anticorps anti-CD20 pour le traitement d'hémopathies lymphoprolifératives puis pour le traitement de pathologies auto-immunes, ont donné suite à de nombreux travaux étudiant les dynamiques des populations lymphocytaires et plus particulièrement les sous-populations lymphocytaires B. Certaines études se sont concentrées sur les dynamiques de repopulation lymphocytaires B suite au traitement par des anticorps anti-CD20 et à la possibilité de monitorer les fréquences d'administration du Rituximab sur la détection de certaines sous-populations bien ciblées. Cependant encore peu de travaux sur ce sujet ont été réalisés dans le cadre du traitement de la SEP par anticorps anti-CD20.

L'objectif de notre étude porte sur l'étude des sous-populations lymphocytaires B des patients traités par anticorps anti-CD20 pour une SEP au centre Hospitalo-universitaire (CHU) de Toulouse, dans le service de neurologie. Nous avons décrit l'impact du traitement antérieur sur les populations lymphocytaires et les sous-populations lymphocytaires B. Puis nous avons étudié leurs variations au cours du traitement par Rituximab pour savoir si ces variations étaient superposables à celles rencontrées dans d'autres pathologies auto-immunes. Nous avons étudié plus précisément les sous-populations lymphocytaires B des patients présentant une repopulation lymphocytaire B entre deux cycles de traitement. Et enfin, nous avons cherché à identifier les patients qui vont avoir une repopulation par la

comparaison des immunophénotypes recueillis avant l'instauration du traitement par anti-CD20.

Après quelques rappels sur les LB et leur molécule de surface CD20, les rôles des LB dans la SEP sont présentés. Ensuite par l'analyse des différents immunophénotypes lymphocytaires réalisés dans la cohorte du service de neurologie du CHU de Toulouse, nous étudierons l'intérêt du suivi par un immunophénotype des sous-populations lymphocytaires B des patients traités par Rituximab dans la SEP.

Partie 1 : Les lymphocytes B et les anti-CD20 thérapeutiques

Chapitre 1 : Les lymphocytes B

A. Généralités

L'organisme humain est doté de plusieurs systèmes de défense assurant le maintien de son intégrité et permettant la lutte contre l'entrée de corps étrangers. Pour cela, il est doté de deux grands systèmes immunitaires complémentaires et interconnectés : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. C'est au sein du système immunitaire adaptatif que les LB jouent un rôle majeur. Dans ce système, les LB sont les principaux responsables de la réponse humorale, qui correspond au mécanisme de défense de l'organisme reposant sur différentes propriétés des anticorps.

Les LB représentent environ 5 à 15 % des lymphocytes circulants. Ils portent une immunoglobuline (Ig) de surface appelée B Cell Receptor (BCR), présentant le rôle de récepteur spécifique à un antigène. De nombreuses autres molécules sont exprimées à la surface des LB, généralement dénommées « Cluster of Differentiation » (CD) ou marqueur de différenciation. Les CD sont par exemple utilisés en cytométrie en flux (CMF) pour différencier les différentes sous-populations lymphocytaires. Leur intensité d'expression varie suivant l'état de différenciation et d'activation de la cellule ; ainsi certains marqueurs seront exprimés uniquement à des stades de différenciation bien définis et d'autres le seront sur l'ensemble des cellules d'une même lignée [2],[3].

La genèse des LB-2, correspondant aux LB dits « classiques », peut se diviser en deux phases principales : l'une indépendante de l'antigène ou lymphopoïèse et l'autre dépendante de l'antigène ou immunopoïèse. La lymphopoïèse permet la mise en place d'un répertoire antigénique, pendant laquelle les Lymphocytes T (LT) et les LB acquièrent un récepteur antigénique, respectivement le « T cell receptor » (TCR) et le BCR. La lymphopoïèse B se déroule au sein de la moelle osseuse et aboutit à la génération de LB matures naïfs capables

de reconnaître un antigène par leur Ig de surface. Ce phénomène débute par la différenciation de progéniteurs lymphocytaires communs en cellules pro-B. Au stade des cellules pro-B, le réarrangement des gènes VDJ codants pour les chaînes lourdes des immunoglobulines se produit. Si le réarrangement des gènes VDJ est productif, les cellules pro-B se différencient en cellules pré-B ; un pré-BCR est alors exprimé à la surface de la cellule. Le pré-BCR est constitué de deux chaînes lourdes identiques et de deux pseudo-chaînes légères, constituées elles-mêmes des protéines VpréB et $\lambda 5$. Les cellules pré-B subissent la « sélection positive », qui permet la survie des cellules pré-B exprimant un pré-BCR fonctionnel. Suite à cette sélection, le réarrangement des gènes VJ codant pour les chaînes légères se déroule. Une fois le réarrangement des gènes VJ des chaînes légères terminé, la cellule est appelée LB immature et exprime à sa surface une IgM correspondant au BCR. Le LB immature va ensuite subir la « sélection négative ». Cette sélection permettra uniquement la survie des LB exprimant un BCR capable de reconnaître avec une faible affinité des peptides présentés par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface des cellules stromales. La phase suivante est l'immunopoïèse. Elle fait intervenir de nombreux intermédiaires permettant la régulation, la prolifération et la sélection des LB efficaces dans la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène. Elle siège principalement dans les organes lymphoïdes secondaires pour aboutir à la formation de LB mémoires à longue durée de vie et de plasmocytes responsables de la production d'Ig sécrétées. Le LB mature naïf migre au niveau des organes lymphoïdes secondaires, dans les follicules où des antigènes lui seront présentés par les cellules dendritiques folliculaires. Lorsque le LB naïf rencontre l'antigène reconnu par son BCR, il pourra être activé par l'intermédiaire des LT folliculaires auxiliaires. Suite à cette activation, le LB va proliférer au sein des centres germinatifs. Il va se différencier en plasmocyte à courte durée de vie, ou bien migrer dans d'autres organes lymphoïdes secondaires, permettant ainsi une dispersion des cellules capables de répondre efficacement à l'antigène. Les mécanismes de maturation d'affinité et de commutation de classes des Ig ont alors lieu, ceci sous le contrôle de cellules dendritiques folliculaire (CDF) et de LT folliculaires auxiliaires. L'une des conséquences de l'immunopoïèse est la prolifération lymphocytaire B, laquelle comprend les mécanismes d'hypermutation somatique. L'hypermutation somatique conduit à la génération de nouveaux BCR, dont certains peuvent être auto-réactifs. De nombreux mécanismes de tolérance périphérique entrent donc en jeu pour limiter l'apparition de LB auto-réactifs.

Parmi ces mécanismes, l'induction de l'état d'anergie tient une place importante. Les LB en état d'anergie sont réfractaires aux signaux de stimulations.

Il existe une population de LB minoritaires issus de cellules souches de foie fœtal, les LB-1. Ces lymphocytes expriment un répertoire limité d'Ig. Les LB-1 sécrètent de façon constitutive des IgM dites « naturelles ». Ces IgM sont principalement dirigées contre des polysaccharides ou des lipides microbiens. A l'âge adulte, ces LB-1 sont principalement retrouvés dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et dans une moindre mesure au niveau de la zone marginale de la rate. Ils sont également présents en faible quantité dans le sang.

B. Les différentes sous-populations de Lymphocytes B et leurs marqueurs immunophénotypiques

Au sein des LB, plusieurs sous-populations lymphocytaires B ayant des fonctions et des marqueurs différents sont distinguées. La Figure 1 reprend l'ensemble des stades des LB et de ses progéniteurs avec les marqueurs de différenciation principaux.

Dans la circulation sanguine sont retrouvés majoritairement des LB matures qui sont classés en 6 sous-populations principales :

- **LB transitionnels** : de phénotype $CD19^+CD38^{high}CD24^{high}$. Le LB transitionnel est un stade intermédiaire entre le LB immature et le LB mature. En effet, le LB transitionnel exprime à la fois un pré-BCR et un BCR fonctionnel. Durant sa maturation, le pré-BCR sera de moins en moins exprimé, alors que l'expression du BCR fonctionnel augmentera. Les LB transitionnels circulent dans le sang et rejoignent les organes lymphoïdes secondaires. Certains des LB transitionnels qui ont échappé à la sélection négative au niveau central sont des LB autoréactifs. Au sein des organes lymphoïdes secondaires, suite à différents mécanismes de sélection périphérique et de tolérance, certains de ces LB auto-réactifs entrent en état d'anergie ou en apoptose. Les LB transitionnels vont ensuite se différencier : soit en LB matures naïfs dont l'activation,

la prolifération et la différenciation dépendront du contact avec l'antigène et de l'interaction avec des cellules dendritiques et des LT ; soit en LB de la zone marginale impliqués dans la réponse humorale thymo-indépendante. Dans certaines études, une partie des LB transitionnels sécrètent de l'interleukine 10 (IL-10) qui est une molécule ayant une action immuno-inhibitrice. Ces LB transitionnels sont donc décrits comme appartenant à une sous-population de LB régulateurs [4], [5].

- **LB matures naïfs** : de phénotype $CD19^+CD27^-IgD^+IgM^+$. Ils sont retrouvés dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Ce sont des LB n'ayant pas encore rencontré leur antigène spécifique mais exprimant un BCR membranaire. Suite à la rencontre avec l'antigène et après des signaux de costimulation générés par des LT auxiliaires et des cellules dendritiques, les LB matures naïfs se différencient en LB matures activés qui vont à leur tour se différencier selon deux voies possibles : soit en plasmocytes à IgM de courte durée de vie permettant une réponse immunitaire spécifique rapide, soit en LB matures mémoires qui pourront par la suite se différencier en plasmocytes sécrétant principalement des IgG. Dans l'étude de Guiseppina *et al.* les LB naïfs sont retrouvés en proportion significativement diminuée chez les sujets de plus de 75 ans [6].

- **LB matures mémoires** : de phénotype $CD19^+CD27^+$, sont des LB ayant subi les mécanismes d'hypermutation somatique et pour certaines sous-populations, de commutation isotypique. Ces LB ont des BCR de haute affinité pour l'antigène et ont la capacité de générer une réponse rapide et de forte amplitude à leur antigène spécifique respectif. Il existe plusieurs sous-populations de LB mémoires, de localisation et fonction légèrement variables.

. **LB mémoires non commutés** : de phénotype $CD19^+CD27^+IgD^+IgM^+$, sont des LB mémoires circulants, probablement issus de la zone marginale de la rate et d'origine extra-folliculaire [7]. Ces LB ont subi les mécanismes d'hypermutation somatique mais par une voie semblant être T-indépendante [8]. Cette population porte une réactivité antigénique principalement dirigée contre les germes bactériens encapsulés [9].

. **LB mémoires commutés** : de phénotype $CD19^+CD27^+IgD^-IgM^-$, sont des LB mémoires dits « classiques », ayant subi les mécanismes d'hypermutation somatique

et de commutation isotypique. Leur activation est T-dépendante et ils sont issus du centre germinatif.

. **LB matures « IgM only »** : de phénotype $CD19^+CD27^+IgD^-IgM^+$, sont des LB mémoires ayant subi le mécanisme d'hypermutation somatique mais pas celui de commutation isotypique. Ces LB ont un rôle encore mal connu, cependant certaines études montrent que les LB « IgM only » se différencient de manière moins efficace en plasmablastes suite à une stimulation et ne seraient donc pas les principales cellules responsables de la sécrétion d'IgM [10]. Par ailleurs, ces LB « IgM only » ont une tendance à retourner au niveau des centres germinatifs sous l'influence d'un environnement cytokinique induit par les polynucléaires neutrophiles, notamment par le biais de l'interféron gamma ($IFN-\gamma$) [11],[12]. Au niveau des centres germinatifs, ces LB mémoires subiraient le mécanisme de commutation isotypique pour former préférentiellement des LB mémoires de type IgG [11].

- **Plasmablastes** : de phénotype $CD19^+CD27^+CD24^-CD38^{high}$. Il s'agit d'un stade intermédiaire entre les LB mémoires activés et les plasmocytes. A ce stade, les LB sont capables de sécréter des anticorps, mais en quantité moindre par rapport aux plasmocytes.
- **LB doubles négatifs** : de phénotype $CD19^+CD27^-IgD^-$. Ils représentent une sous-population aux rôles encore mal connus. Ils sont parfois décrits comme des LB mémoires « épuisés » et sont retrouvés en proportion augmentée chez les personnes âgées (> 75ans). Cette population a elle aussi subi les mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique, mais ces LB ne sont plus capables de présentation antigénique, ceci étant dû à leur faible niveau d'expression du CD80 et du CD40 nécessaires à l'interaction avec les LT. La persistance de ces LB « épuisés » serait en partie due à une expression plus importante de la protéine B-cell lymphoma 2 (BCL-2) qui inhibe l'apoptose [6].
- **LB CD21^{low}** : de phénotype $CD19^+CD21^{low}CD38^{low}$, sont eux aussi une sous-population de LB encore mal connue. Cette population représente environ 5 % des LB dans le sang des sujets sains. La proportion de cette population augmente par ailleurs légèrement avec l'âge. Cette population est constituée de LB mémoires ayant subi la

commutation isotypique mais avec une expression de CD27 variable [13]. Récemment, il a été montré que ces cellules expriment de façon plus importante des récepteurs de chimiokines pro-inflammatoires et sont capables d'adressage au niveau tissulaire ; ainsi ces LB migrent dans la synoviale des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) [14]. Cette population comprend par ailleurs un nombre important de LB autoréactifs peu sensibles à différentes stimulations, suggérant que ces cellules ont subi un mécanisme de tolérance périphérique induisant un état proche de l'anergie. Cet état fait probablement suite à un épuisement dû à des contacts trop fréquents avec leurs antigènes spécifiques [15]. Les LB $CD19^+CD21^{low}CD38^{low}$ sont potentiellement sujets à l'apoptose par leur défaut d'expression du CD21.

Le stade de différenciation terminale des LB est le stade plasmocytaire. Les plasmocytes sont de phénotype $CD27^+CD38^+CD138^+$. Ils sont principalement retrouvés dans la moelle osseuse et sont responsables de la synthèse des anticorps. Ces cellules n'expriment pas ou très peu le CD20.

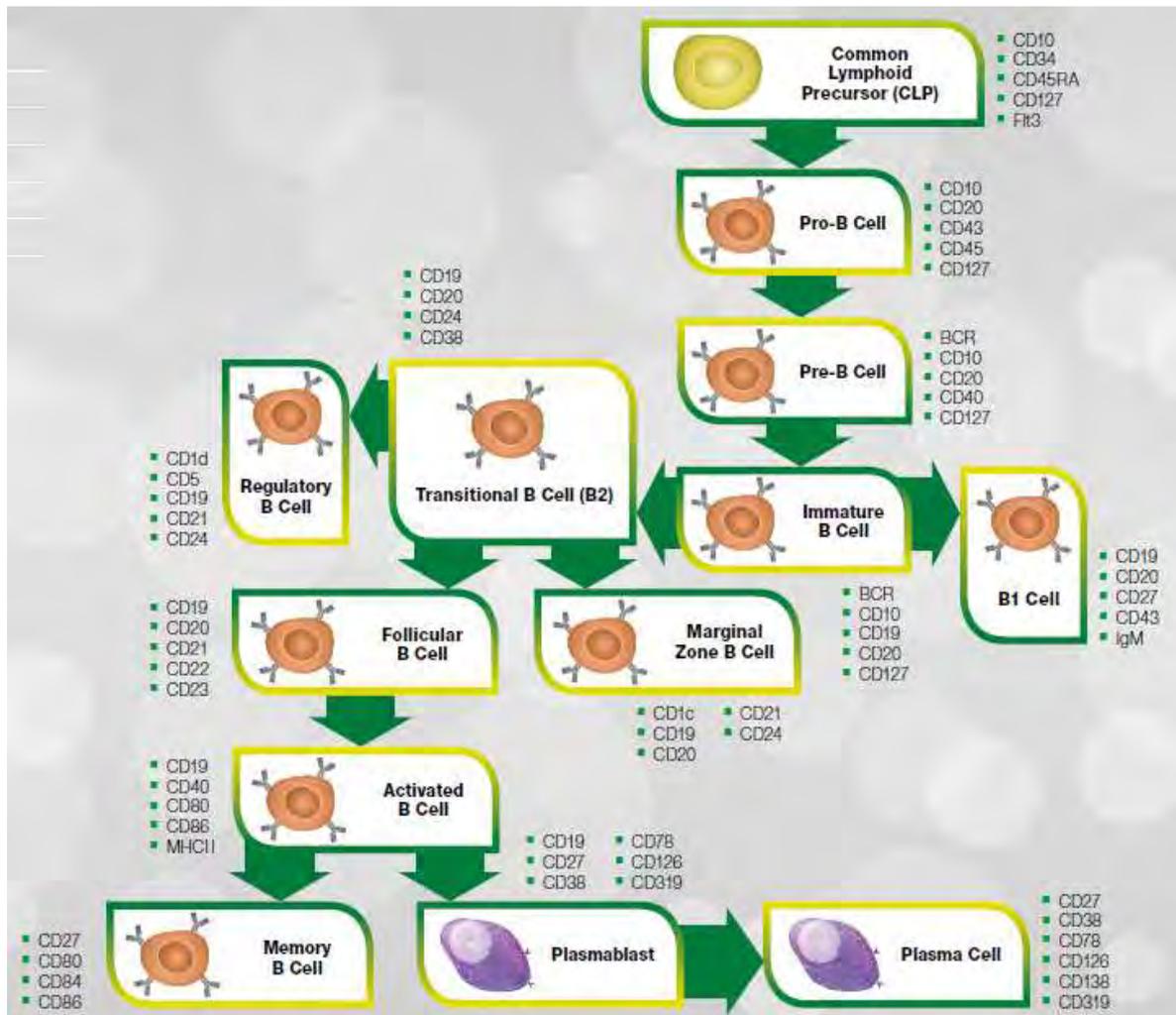


Figure 1 : Représentation schématique des différentes cellules appartenant à la lignée des lymphocytes B et les différents marqueurs exprimés suivant les stades (d'après lineage-biomarkers-of-the-human-immune-system de BIO-RAD®).

D'une manière générale, le nombre de LB circulants augmente de façon importante entre la naissance et la première année de vie, pour décroître progressivement jusqu'à la fin de l'adolescence et se stabiliser à l'âge adulte [16], [17] (Figure 2). Seul le nombre de plasmablastes circulants diminue progressivement après l'adolescence.

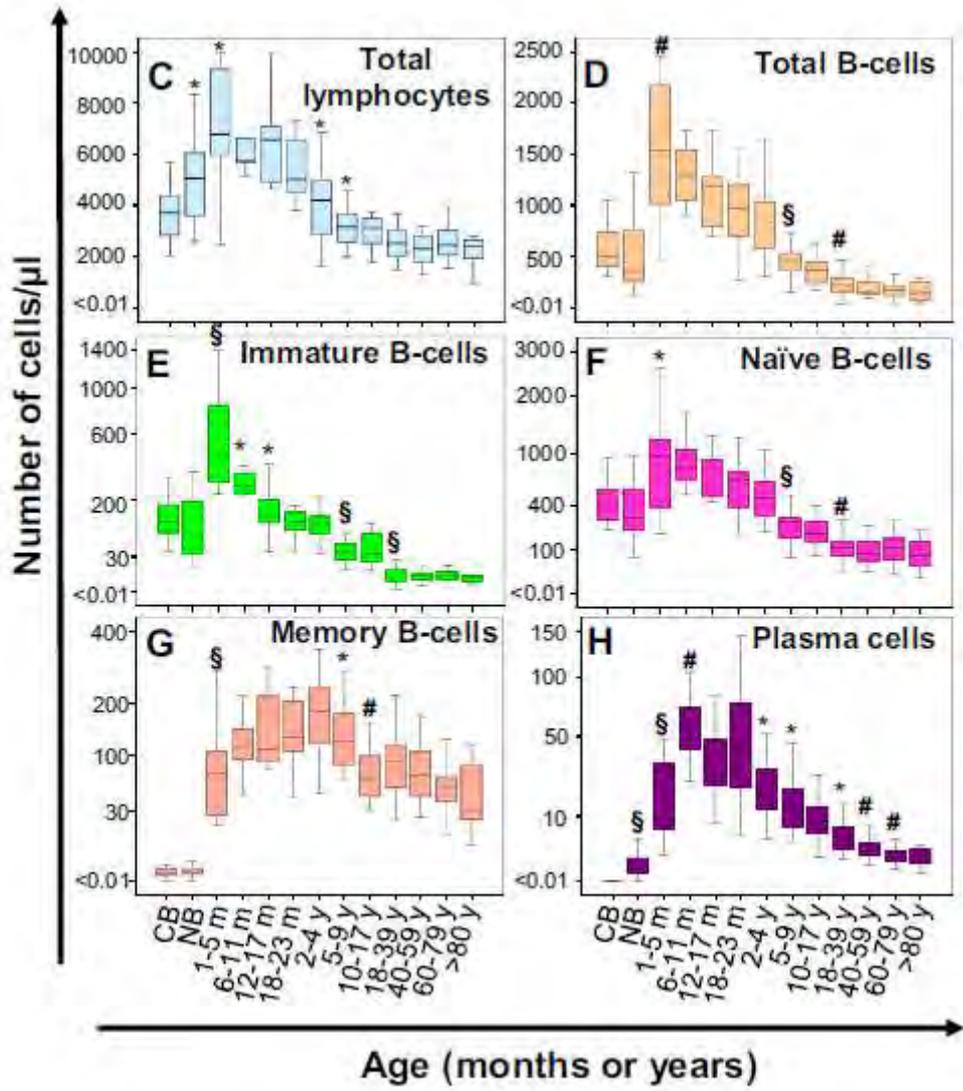


Figure 2 : Distribution des différentes sous-populations lymphocytaires B dans le sang périphérique en fonction de l'âge (d'après : [16]).

Chapitre 2 : Les anticorps monoclonaux anti-CD20 thérapeutiques

A. Historique et définition

Les anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-CD20 ont vu le jour dans les années 1990. Le Rituximab (MabThera®) a été le premier anticorps monoclonal à obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1998 en France et a été approuvé la même année aux Etats-Unis par la « Food and Drug Administration » (FDA). Cette AMM faisait suite à des résultats prometteurs obtenus dans le traitement des lymphomes folliculaires en cas de chimiorésistance ou lors d'une seconde rechute après une chimiothérapie. L'effet thérapeutique du Rituximab découle de sa fixation sur les LB exprimant le CD20 et entraînant par différents mécanismes une déplétion en LB. Le CD20 est exprimé de manière quasiment spécifique par les LB. Cette protéine semble jouer un rôle important dans la survie et la prolifération des LB par sa fonction de canal calcique [18]. Le Rituximab est un anticorps monoclonal humanisé actuellement utilisé dans de nombreuses pathologies hématologiques impliquant une prolifération maligne de LB, telles que différents types de lymphomes non Hodgkiniens (LNH) et la leucémie lymphoïde chronique. Par la suite cet anticorps a montré une efficacité certaine dans le traitement de plusieurs pathologies auto-immunes et notamment dans la PR pour laquelle il a obtenu l'AMM en 2006. Des AMM supplémentaires ont été obtenues pour le traitement des vascularites à anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA), telles que la granulomatose avec polyangéite et la polyangéite microscopique, ainsi que pour le traitement du Pemphigus vulgaris en début d'année 2019.

Son utilisation est maintenant très répandue et sort du cadre de ces AMM. En effet, son efficacité a été démontrée dans la littérature scientifique pour la prise en charge de plusieurs autres pathologies. Il occupe maintenant une place prépondérante dans le traitement de différentes maladies auto-immunes telles que les vascularites à ANCA, l'anémie hémolytique auto-immune, le purpura thrombopénique idiopathique, le LES et plus récemment dans la SEP, les neuromyérites optiques (NMO), les myasthénies et d'autres encore.

Le Rituximab est une Ig de type IgG1 (Figure 3) dont le paratope est spécifique du CD20 des lymphocytes. C'est une Ig chimérique constituée de deux parties :

- la région constante (Fc) d'origine humaine, responsable du recrutement des effecteurs du système immunitaire humain [19],
- la région Fab avec au niveau des régions variables une partie d'origine murine qui forme le paratope de l'anticorps se liant spécifiquement à l'antigène CD20.

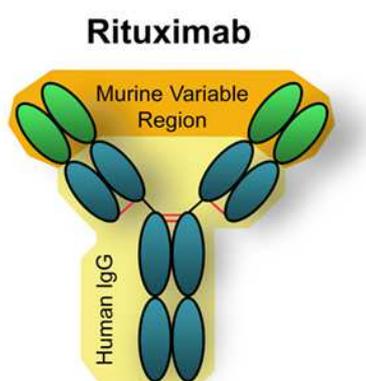


Figure 3 : Représentation schématique d'une molécule de Rituximab. En vert : les parties d'origine murine ; en bleu : les parties humanisées (d'après : [20])

Par la suite d'autres anticorps monoclonaux anti-CD20 « optimisés » ont vu le jour. Ces optimisations reposent sur une humanisation de plus en plus importante des anticorps augmentant leur tolérance et sur une modification de leur région Fc permettant de modifier leur capacité à interagir avec les effecteurs du système immunitaire. Nous mentionnerons parmi ceux-ci l'Ocrélizumab qui a obtenue l'AMM dans le traitement de la SEP.

Dans les pathologies auto-immunes, l'administration du Rituximab se déroule principalement selon deux schémas thérapeutiques, soit deux perfusions de 1000 mg à 15 jours d'intervalle, soit une perfusion de 375 mg/m² par semaine pendant quatre semaines consécutives.

Les contre-indications de l'utilisation du Rituximab dans les pathologies auto-immunes sont les suivantes : l'hypersensibilité connue à la substance active ou aux protéines d'origine murine ou de l'un de ses excipients ; les infections sévères ou évolutives ; les patients ayant un déficit immunitaire sévère ; et ceux présentant une insuffisance cardiaque sévère ou une

maladie cardiaque sévère non contrôlée. Le Rituximab est par ailleurs contre-indiqué durant la grossesse en l'absence de données suffisantes et une contraception doit être mise en place en cas d'utilisation.

B. Mécanismes d'action généraux

Le Rituximab se fixe sur le CD20 exprimé à la membrane des LB et entraîne une déplétion lymphocytaire B profonde, avec dans les heures suivant la perfusion du médicament une disparition généralement complète des lymphocytes B du compartiment sanguin.

1. Cible

La cible des anti-CD20 est la protéine CD20. C'est une protéine transmembranaire de 297 acides aminés. Elle appartient à la famille des « membrane spanning four domains superfamily A » (MS4A) [18]. Cette protéine est un marqueur très spécifique des LB, elle est exprimée dès le stade pré-B et par les LB immatures et les LB matures qu'ils soient naïfs ou mémoires. Ce marqueur n'est pas exprimé par les cellules souches hématopoïétiques et par les précurseurs les plus précoces de la lignée B. Il est par ailleurs faiblement ou non exprimé par les plasmocytes. L'expression du CD20 n'est cependant pas exclusif des LB, en effet il est exprimé par une sous-population minoritaire de LT CD8 [21].

Le rôle du CD20 est encore mal connu. Son rôle principal serait de participer à la régulation des flux calciques et donc du contrôle de nombreux mécanismes cellulaires incluant la prolifération, l'activation et la différenciation des LB [18].

2. Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action des anti-CD20 ne sont pas encore totalement élucidés, mais certains ont été mis en évidence *in-vitro*.

a. Induction de l'apoptose

La fixation de l'anticorps au CD20 induit un changement conformationnel de la protéine CD20 induisant sa phosphorylation (Figure 4). Ceci entraîne une entrée de calcium dans la cellule et donc une augmentation de la concentration intra-cellulaire en calcium, provoquant le blocage du cycle cellulaire en phase S [22]. Cette augmentation de calcium intra-cellulaire conduirait à une activation directe de la Caspase 3 aboutissant à l'apoptose.

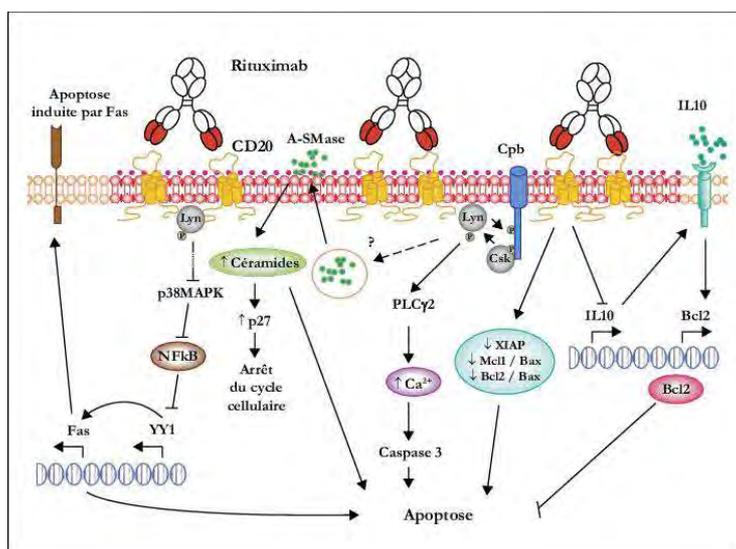


Figure 4 : Schéma représentant les différentes voies d'activation de l'apoptose induite par le Rituximab (d'après : [23]).

b. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

L'anticorps anti-CD20, une fois lié à sa cible par sa fraction Fab, se lie par sa partie constante aux récepteurs gamma du Fc des IgG (FC γ R). Ces FC γ R sont exprimés à la surface de différentes cellules immunitaires telles que les lymphocytes Natural Killer (LNK), les polynucléaires neutrophiles et les monocytes. Le lymphocyte B ciblé va ainsi être détruit soit par la libération de granulations cytotoxiques, soit par phagocytose (Figure 5) [19].

Il est intéressant de noter que certaines études montrent l'importance du gène codant pour certains FCγR dans l'efficacité du Rituximab. Ainsi, dans la prévention de rejets de greffons hépatiques ABO-incompatibles, les auteurs ont montré une meilleure efficacité du Rituximab chez les patients homozygotes avec le polymorphisme FCγRIIA-H/H131 par rapport aux patients hétérozygotes FCγRIIA-H/R131 ou homozygote FCγRIIA-R/R131. De plus, les patients homozygotes FCγRIIA-H/H131 présentent une période de déplétion plus longue et un taux d'IgM plus faible. Ceci pouvant s'expliquer par l'affinité diminuée du FCγRIIA-R/R131 pour le Fc de IgG1 par rapport au FCγRIIA-H/H131 [24]. Sur le même principe, une étude chez les enfants atteints de lymphome/leucémie à lymphocytes B matures a montré une moins bonne réponse pour les patients porteurs du polymorphisme FCγRIIA-R/R131 que pour ceux porteurs d'un autre polymorphisme. Dans le traitement des lymphomes non-Hodgkinien, les patients homozygotes FCγRIIIA-V/V158 avaient une meilleure réponse lors d'un traitement par Rituximab que les patients homozygotes FCγRIIIA-F/F158 ou hétérozygotes FCγRIIIA-F/V158. *In-vitro*, les auteurs ont montré un phénomène d'ADCC induit par le Rituximab plus important par les cellules porteuses de FCγRIIIA-V/V158 que par les cellules ayant un autre polymorphisme [25], [26]. Dans le traitement de la PR, l'impact du polymorphisme du FCγRIIIA a aussi été démontré. En effet, les patients de polymorphisme FCγRIIIA-V/V158 ont une meilleure réponse lors du traitement par Rituximab [27].

c. Cytotoxicité médiée par le complément et dépendante des anticorps (CDC)

L'anticorps anti-CD20 une fois lié à sa cible va pouvoir recruter le complexe C1 du complément par sa région Fc et entraîner l'activation de la voie classique du complément. La cascade enzymatique du complément ainsi activée va entraîner la formation d'un complexe d'attaque membranaire, qui forme un pore transmembranaire à l'origine d'une lyse osmotique de la cible. L'activation de la voie classique favorise aussi la phagocytose de la cible par accumulation de molécules C3b issues du clivage de protéines C3 du complément. En effet, les polynucléaires neutrophiles et les monocytes/macrophages expriment des récepteurs aux C3b induisant la phagocytose par opsonisation.

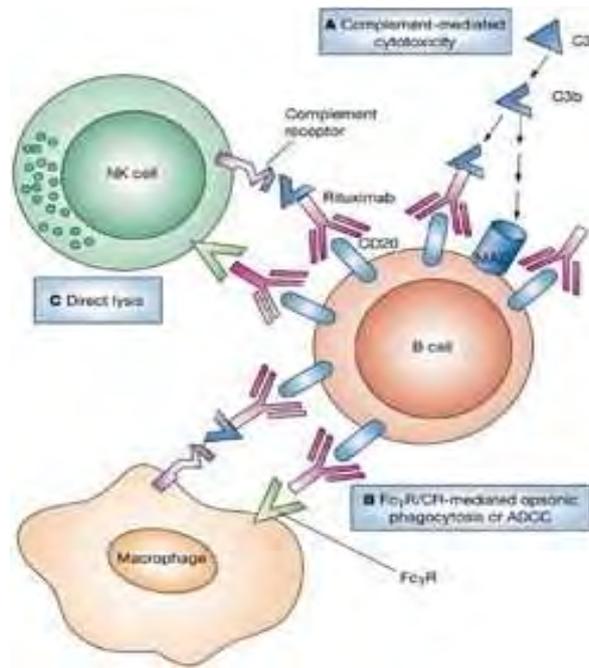


Figure 5 : Schéma des mécanismes principaux médiés par le Fragment constant entraînant la destruction des lymphocytes B ciblés par le Rituximab (d'après : [28]).

C. Les anti-CD20 et les populations lymphocytaires dans les pathologies auto-immunes

Plusieurs équipes se sont penchées sur l'étude des sous-populations lymphocytaires B dans différentes pathologies auto-immunes avant et après un traitement par anti-CD20.

1. Etat des populations lymphocytaires avant traitement par Rituximab dans différentes pathologies auto-immune

Dans certaines vascularites à ANCA et les NMO, les LB transitionnels sont retrouvés en proportion diminuée dans le groupe des patients par rapport au groupe contrôle de personnes saines [29], [30]. A l'inverse, les LB transitionnels sont en proportion augmentée dans le groupe de patients atteints de LES par rapport à celui des personnes saines [31].

Dans la PR, le LES et la NMO, la proportion de plasmablastes est augmentée et corrélée positivement aux taux d'anticorps pathologiques, tels que les anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (CCP), les anticorps anti-antigènes extractibles du noyau des cellules (ENA) et les anticorps anti-aquaporine 4 (AQP4), respectivement [32], [33].

La fréquence des LB naïfs circulants est diminuée chez les patients atteints de LES ou de PR [34].

La proportion de LB mémoires est diminuée dans la PR et le LES [32]. Concernant les sous-populations lymphocytaires B mémoires, il a été montré que les LB mémoires non commutés sont diminués à la fois dans la PR et le LES [34]. Dans la PR, la diminution des LB mémoires n'est pas corrélée à la durée de la pathologie, contrairement à la quantité des LB mémoires commutés [32]. Concernant les LB « IgM only », une diminution de leur proportion et de leur concentration sanguine a été observée chez les patients atteints de PR [32].

Pour les autres sous-populations lymphocytaires B, les LB CD21^{low} apparaissent comme surreprésentés dans le lupus érythémateux systémique (LES) [13], [35], la PR [32], mais aussi dans d'autres pathologies dysimmunitaires telles que l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et certains déficits immunitaires communs variables [14]. Enfin, les LB doubles négatifs sont augmentés dans certaines pathologies auto-immunes incluant le LES, le syndrome de Sjögren (SS) [36] et la PR [37], mais aussi chez des patients ayant une infection par le VIH ou par un rotavirus [36]. Cette augmentation serait potentiellement due aussi à l'hyperstimulation chronique de ces lymphocytes.

2. Intérêt des anticorps anti-CD20 dans le traitement des pathologies auto-immunes

Les anticorps anti-CD20 dont le Rituximab est le chef de file, sont maintenant largement utilisés dans le traitement des pathologies auto-immunes systémiques ou neuro-inflammatoires. Ces pathologies sont d'origines multifactorielles, avec des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs d'exposition environnementaux. Les physiopathologies de ces maladies sont mal connues, mais elles ont en commun une dérégulation du système immunitaire et dans une certaine mesure une levée de la tolérance au soi. Cette auto-réactivité est à l'origine d'une dégradation par différents mécanismes de l'intégrité et de la fonctionnalité des tissus humains ; ce qui conduit à des handicaps fonctionnels pouvant être gravissimes sans prise en charge thérapeutique. Un état pro-inflammatoire est retrouvé chez la majeure partie des patients avec une augmentation systémique ou localisée de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). Dans certaines de ces pathologies telles que la

PR, les vascularites à ANCA, le Pemphigus vulgaris ainsi que dans la NMO, il a été démontré la présence d'auto-anticorps pathogènes. Dans ces pathologies, l'efficacité du Rituximab reposerait sur la déplétion des cellules responsables de la synthèse de ces auto-anticorps. Cependant, les plasmocytes responsables de la synthèse de la très grande majorité des auto-anticorps n'expriment pas ou très peu le CD20. Dans la PR par exemple, les taux des auto-anticorps diminuent sous Rituximab, mais le taux des Ig total dans le sang reste constant au moins dans les premières années de traitement [38]. Ce phénomène a été retrouvé chez les patients atteints de NMO [33]. Ces données suggèrent :

- soit une durée de vie des plasmocytes responsables de la synthèse des auto-anticorps inhabituellement courte et c'est leur absence de renouvellement par des LB mémoires auto-réactifs ayant été déplétés par le Rituximab, qui conduit à une diminution du taux d'anticorps auto-immuns ;
- soit une diminution de stimulation des plasmocytes par une baisse de l'inflammation au niveau systémique et de leur micro-environnement ;
- soit une synthèse des auto-anticorps imputable à une autre population lymphocytaire B. En effet, certains auteurs proposent qu'une partie des cellules responsables de la synthèse des auto-anticorps seraient des plasmablastes [39],[32].

Le Rituximab aurait ainsi un effet de remise à zéro du répertoire des LB par la génération de nouveaux LB mémoires à partir des LB transitionnels puis naïfs issus de l'effort de régénération faisant suite à la déplétion des LB. Ces LB transitionnels puis naïfs, avant de former des LB mémoires doivent passer les points de contrôle de tolérance périphérique, permettant ainsi d'inhiber la formation de nouveaux LB auto-réactifs.

Actuellement le spectre et la fréquence d'utilisation des anti-CD20 dans les pathologies auto-immunes continuent d'augmenter. Le Rituximab est ainsi un traitement de 2^{ème} ou de 3^{ème} ligne dans la PR et de 1^{ère} ligne dans certaines vascularites. En effet, il peut être utilisé en traitement d'induction de première intention des vascularites associées au ANCA en alternative au traitement d'induction par cyclophosphamide. Dans le LES, les anti-CD20 sont utilisés de plus en plus précocement. Dans la NMO, le Rituximab est maintenant utilisé dans certains centres comme un traitement d'induction de première ligne en association avec les corticoïdes et des cures d'Ig polyvalentes en intra-veineuse (IgIV).

3. Impact du Rituximab sur les populations lymphocytaires B

L'administration de Rituximab conduit à une déplétion rapide en LB, mais cette déplétion n'est pas totale. En effet, une persistance des LB est observée au niveau des organes lymphoïdes secondaires [40]. Dans la PR, une cure de Rituximab entraîne bien une déplétion sanguine en LB. Cependant, dans des biopsies d'organes lymphoïdes secondaires, l'équipe de Ramwadhoebe.T *et al.* a montré une déplétion en LB naïfs et en LB mémoires non commutés, mais une persistance de LB mémoires commutés, qui expriment pourtant le CD20, et une persistance de plasmocytes [40]. La persistance de follicules lymphocytaires B ayant conservés leur structure malgré la déplétion a par ailleurs été observée. Le même phénomène est décrit chez les patients ayant reçu du Rituximab pour une greffe rénale ABO-incompatible [41]. Une modification des fonctions des LB présents dans les tissus lymphoïdes secondaires a par ailleurs été montrée, avec dans une certaine mesure une modification du répertoire des Ig et un changement de classe. D'après certaines études, la repopulation du compartiment sanguin par les LB ferait suite à la régénération des tissus lymphoïdes secondaires par la formation de nouveaux centres germinatifs [42].

Suite au traitement par anti-CD20, une lymphopénie B profonde est instaurée. La période d'efficacité biologique du Rituximab est généralement définie comme la période entre l'administration du Rituximab et la repopulation lymphocytaire B. Elle correspond donc à la durée de la déplétion sanguine en LB. Au CHU de Toulouse, les LB sont considérés absents s'ils sont en quantité inférieure à 5 cellules/mm³ de sang. La période de déplétion sanguine en LB est très variable selon les individus et les pathologies. En effet, les schémas d'induction usuels employés sont les suivants : quatre perfusions de 375mg de Rituximab espacées d'une semaine ou deux perfusions de 1000mg espacées de deux semaines. Indépendamment de ces schémas, la durée moyenne de déplétion en LB est de 8 mois dans la PR et d'autres connectivites alors qu'elle est beaucoup plus importante dans les vascularites à ANCA, avec une durée moyenne de 21 à 26 mois [43], [44], [45].

Lors de la repopulation lymphocytaire B on observe en premier lieu une augmentation de la proportion des LB transitionnels et des plasmablastes, puis des LB naïfs et plus tardivement des LB mémoires. Le taux de LB mémoires reste cependant bien inférieur au taux initial et ce jusqu'à 2 ans après le traitement par le Rituximab. Dans la PR, les vascularites à ANCA et les NMO, très peu de rechutes surviennent lors de la déplétion en LB. En effet l'étude de

J. Leandro *et al.* et l'étude de P. Roll *et al.* ont montré qu'aucun patient atteint de PR n'a rechuté durant la période de déplétion [43], [44]. De même dans les vascularites à ANCA, 57 % des patients ayant une repopulation ont rechuté alors que seulement 22 % des patients ont rechuté pendant la période de déplétion. Pour ces derniers, la rechute était accompagnée d'une élévation des anticorps anti-myéloperoxydase (MPO) ou des anticorps anti-protéinase 3 (PR3) [46]. Ces études montrent donc l'intérêt d'un monitoring des patients reposant sur le suivi de certaines sous-populations lymphocytaires B, notamment celui des LB mémoires, qui dans ces pathologies semble être un marqueur pertinent et complémentaire pour prédire un risque accru de rechute. Cette stratégie de monitoring sur les LB mémoires a d'ailleurs été étudiée dans deux études où des patients atteints de NMO étaient traités par le Rituximab. Dans ces deux études, le dépassement du seuil de 0,05 % en LB mémoires dans le sang au sein des cellules mononucléées entraînait une nouvelle administration de Rituximab. Ce schéma thérapeutique s'est avéré au moins aussi performant en termes d'efficacité que le schéma classique reposant sur une perfusion tous les 6 mois. De plus, ce schéma a permis une réduction du nombre global d'administration de Rituximab chez les patients sans repopulation, mais aussi de rapprocher les cures chez les patients ayant des repopulations précoces ; et ainsi de rétablir l'efficacité du Rituximab chez certains de ces patients [39], [47].

4. Les anti-CD20 et leur utilisation dans la SEP

a. La sclérose en plaques

La SEP est définie comme une pathologie inflammatoire du système nerveux central (SNC), touchant préférentiellement l'adulte jeune entre 20 et 40 ans, avec une prédominance féminine et un sex-ratio de 3 femmes pour 1 homme. L'inflammation chronique du SNC peut entraîner par plusieurs mécanismes une destruction des gaines de myéline qui protègent les axones, entraînant une diminution ou un défaut de transmission des influx nerveux, aboutissant à un handicap pouvant être sévère.

La prévalence de la SEP suit un gradient nord/sud, avec une fréquence 2 fois plus importante dans les pays scandinaves par rapport aux pays méditerranéens. En France, la prévalence est importante avec 1 cas pour 1000 habitants [1].

Des facteurs génétiques de prédisposition sont observés chez les patients atteints de SEP, pour lesquels différents gènes dits de susceptibilité sont décrits. Parmi ceux-ci, sont retrouvés certains gènes appartenant au CMH tel que l'allèle HLA-DRB1*15:01 [48], présenté comme le facteur génétique le plus à risque dans le développement de la SEP. Des polymorphismes au niveau du FCγR semblent avoir un impact sur le développement de la pathologie et la sévérité de la SEP. Ces polymorphismes sont retrouvés dans d'autres pathologies auto-immunes [49]. Les polymorphismes et leurs impacts supposés seront détaillés par la suite. Par ailleurs, des facteurs environnementaux sont aussi mis en cause comme l'infection par le virus d'Epstein-barr (EBV), le tabagisme, une carence en vitamine D et l'obésité.

L'expression clinique est très variable et s'exprime généralement par l'apparition de troubles moteurs. Dans ces troubles, un déficit de la marche ou de l'équilibre est retrouvé, ainsi que des paralysies plus ou moins importantes de certains membres, une névrite optique rétrobulbaire, des troubles sensitifs avec des picotements ou fourmillements, des sensations d'hypoesthésies, des sensations de décharges électriques le long de la colonne vertébrale.

Il existe trois formes cliniques principales, à savoir (Figure 6) :

- La forme rémittente-récurrente (RR), composée exclusivement de poussées entrecoupées de phases de latence, durant lesquelles une absence de progression de la maladie est observée. Avec une récupération plus ou moins complète des symptômes induits par les poussées durant les phases de latence. Cette forme représente environ 85 % des formes débutantes de SEP.
- La forme secondairement progressive (SP) est l'évolution de la forme RR, où une progression de la pathologie est observée durant les périodes séparant 2 crises. Cette forme se développe environ 15 à 20 ans après le début de l'apparition de la forme RR.
- La forme primaire progressive (PP) se caractérise d'emblée par une pathologie de progression constante et par une aggravation continue sans phase de latence.

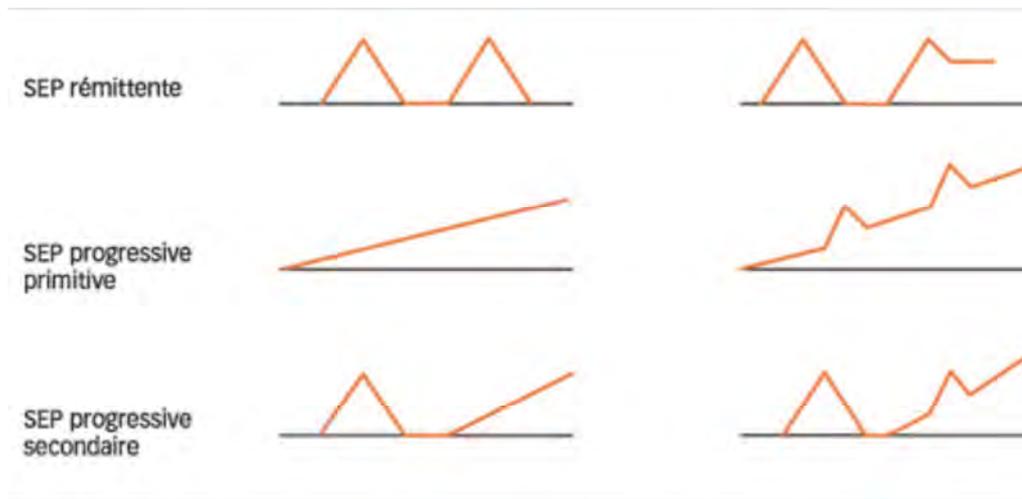


Figure 6 : Représentation des différents modes évolutifs dans le temps de la sclérose en plaques (SEP) (d'après : [50]).

b. Rappels physio-pathologiques

Traditionnellement, la SEP était présentée comme une pathologie auto-immune principalement médiée par les LT. Ce modèle découlait de plusieurs arguments, tels que le taux de LT infiltrant le liquide céphalorachidien (LCR) très supérieur au taux de LB et la mise en évidence d'un déséquilibre de la balance des LT régulateurs (LTreg) par rapport aux LT pro-inflammatoires, en faveur de l'inflammation. Le modèle murin expérimental d'encéphalomyélite auto-immune ou « experimental autoimmune encephalomyelitis » (EAE) vient renforcer cette pensée. L'EAE est induite par l'injection chez l'animal d'un mélange composé d'une protéine de la gaine de myéline et d'adjuvants provoquant une forte réponse immunitaire. Cette injection induit une réponse auto-immune dirigée contre la gaine de myéline. Une démyélinisation découle de cette réponse, ce qui permet de mimer dans une certaine mesure la pathologie humaine [1]. Dans ce modèle, c'est la présentation des antigènes aux LT qui est le point de départ de la pathologie. En effet, après activation de ces LT porteurs d'un TCR autoréactifs, ils migrent dans le SNC et déclenchent les premiers mécanismes de la dégradation des gaines de myéline [51]. Des modèles d'EAE passifs existent. Ils reposent sur l'injection à des animaux naïfs, de LT CD4 ou LT CD8 autoréactifs [52],[53] issus de cultures de lymphocytes purifiées provenant d'animaux atteints d'EAE. Des nouveaux modèles d'EAE apparaissent progressivement. Certains reposent sur des modifications génétiques induisant l'expression par les LT de TCR autoréactifs issus des clones de LT CD4 d'animaux immunisés activement [54]. Ces derniers modèles permettent la

génération d'animaux atteints d'EAE spontanée et sont donc plus proche de la pathologie retrouvée chez l'Homme.

Cependant, dans les années 1950 sont mises en évidence des bandes oligoclonales dans le LCR de 90 % des patients atteints de SEP. Ces bandes oligoclonales ne sont pas retrouvées dans le sérum. Cette dissociation SNC/périphérie montrait une synthèse intrathécale d'Ig et donc suggérait un rôle des LB dans la physiopathologie de la SEP. La détection de LB au niveau des lésions du SNC à tous les stades de la pathologie renforce le rôle présumé des LB dans la SEP. En 2004, a été montré la formation de structures « lymphoïde folliculaire-like » situés dans les SNC, dans lesquelles on retrouve des LB, des plasmocytes et des cellules dendritiques folliculaires [55]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans la SEP, les cibles de la réponse humorale sont très variables d'un sujet à l'autre et sont en réalité un mélange de cibles antigéniques du soi mais aussi du non soi [1], [56].

Il a également été montré que certains polymorphismes au niveau des FCyR pouvaient entraîner des profils de susceptibilité différents à cette pathologie. Par exemple dans des modèles murins d'EAE, les souris FCyR +/+ développent une infiltration du SNC par des cellules inflammatoires et une dégradation de la gaine de myéline plus importantes que les souris FCyR -/-. Chez ces souris résistantes à l'induction de l'EAE, les auteurs ont pourtant montré une immunisation périphérique contre les antigènes de la gaine de myéline utilisés pour induire l'EAE. D'autres études ont également montré que des formes sévères d'EAE sont plus fréquentes chez les souris ne produisant pas d'anticorps, or l'un des rôles majeurs de certains FCyR est l'induction de l'apoptose lors de l'ADCC et de l'opsonisation via les anticorps. L'impact du FCyR dans la SEP ne repose donc pas uniquement sur ces deux mécanismes dépendants des anticorps. Les auteurs suggèrent que le rôle principal des FCyR dans le développement de l'EAE serait leur implication dans le processus de présentation de l'antigène aux LT par les macrophages et les cellules dendritiques [57].

Chez l'Homme, les patients homozygotes FCyRIIA-H/H131 ont une pathologie de sévérité diminuée par rapport aux patients homozygotes FCyRIIA-R/R131. Le récepteur FCyRIIA de polymorphisme R/R131 entrainerait un défaut de clairance des complexes immuns. Cette défaillance pourrait être à l'origine d'une exposition plus longue aux antigènes du soi, favorisant ainsi la survenue de phénomènes auto-immuns. La proportion de ce polymorphisme est décrite comme augmentée chez les patients atteints de vascularites à ANCA [49]. Au niveau du SNC, le FCyR est important pour la maturation et la différenciation

des oligodendrocytes et de leurs précurseurs. Dans les zones de remyélinisations des patients atteints de SEP, les oligodendrocytes exprimant le FCγR ont été retrouvés en quantité trois fois supérieure par rapport aux zones démyélinisées, alors que les oligodendrocytes n'exprimant pas le FCγR étaient retrouvés en quantité équivalente dans les différentes zones. A l'inverse, les cellules de la microglie ayant certaines fonctions se rapprochant des macrophages, exprimaient plus fortement le FCγR dans les zones démyélinisées [58].

L'efficacité des thérapies par anti-CD20 confirme le rôle critique des LB dans la SEP. Cependant, la rationalité de l'utilisation des anti-CD20 ne repose pas sur le fait de diminuer la synthèse d'anticorps auto-réactifs et pathogènes via la déplétion des LB mémoires auto-réactifs comme cela est décrit dans les vascularites à ANCA ou les NMO. L'effet anti-inflammatoire obtenu par la déplétion en LB, repose probablement sur une diminution des autres fonctions des LB (Figure 7 et 8). Comme par exemple leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes, de cellules sécrétrices de cytokines pro-inflammatoires et leur rôle dans le maintien et la génération des centres germinatifs au sein des follicules lymphoïdes. En effet il a été montré que les LB mémoires des patients sont capables :

- d'induire une prolifération et une localisation méningée (brain-homing) des LT CD4⁺ helper de type 1 (Th1) auto-réactifs notamment par leur fonction de cellules présentatrices d'antigène, il en découle une augmentation locale de la production de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IFN-γ par ces mêmes LT CD4⁺ [59].
- de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [60] et le TNF-α. Ces cytokines induisent le recrutement de cellules de l'immunité innée, participant à l'augmentation de l'état inflammatoire du micro-environnement. Cet état inflammatoire est en partie responsable de la destruction des gaines de myélines.
- de produire des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et l'IL-35, permettant de polariser la réponse lymphocytaire T et le maintien d'une tolérance.

Dans la SEP, des perturbations de l'équilibre du ratio entre LB régulateurs (LBreg) et LB pro-inflammatoires ont été montrées.

Table 1 Antibody-dependent and -Independent Functions of B cells in Health and Disease.

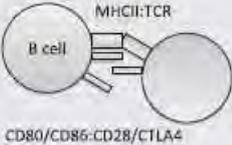
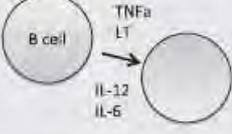
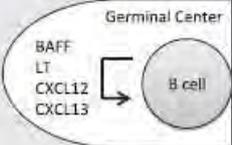
B cell Function		In Health	In Disease
Antibody (Ab) production (by plasmablasts; plasma cells)		Essential for humoral immunity; Abs activate complement, neutralize and opsonize pathogens	Production of auto-Abs targeting self antigens
Antigen (Ag) presentation		Ag-specific T cell stimulation through Ag/ MHC:TCR and costimulatory molecules, particularly robust B cell APC function for cognate antigens	Autoreactive B cells can function as effective APCs, and solicit T cell help thereby promoting disease
Regulation (Bregs)		Regulatory B cells (Breg) help to maintain homeostasis and protect from autoimmunity. Several subsets described; IL-10 implicated in regulation	Deficient Breg function contributes to unchecked autoimmune responses
Bystander activation (antigen-independent)		Activated B cell cytokines and chemokines promote local T cell and myeloid cell responses, which need not require cognate T cell: B cell Ag recognition	Promote autoimmunity by secreting proinflammatory cytokines, such as LT and TNFα
Lymphogenesis		B cell cytokines and chemokines contribute to generation and maintenance of germinal centers in lymph follicles; essential to adaptive responses	Ectopic follicle-like structures form within target organs; may promote ongoing local immune injury

Figure 7 : Les principaux rôles des lymphocytes B dans un organisme sain et leur possible répercussion en cas de déséquilibres dans la physiopathologie de la sclérose en plaques (d'après : [61])

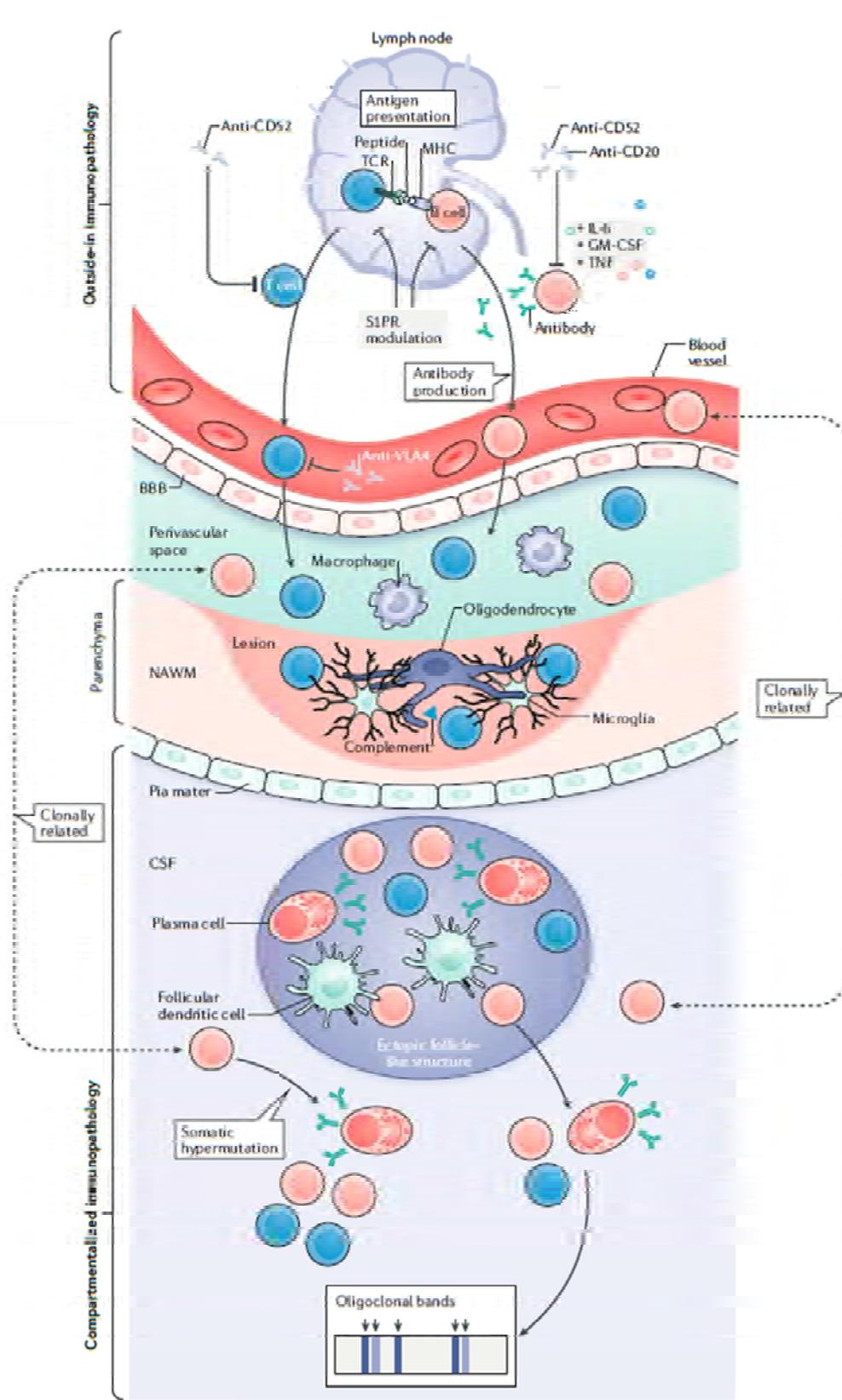


Figure 8 : Schéma résumant les différents rôles présumés des lymphocytes B (B-cells ou LB) dans l'immunopathogénèse de la sclérose en plaques (SEP) et les sites d'action de certaines thérapeutiques utilisées dans le traitement de la SEP. Avec dans le secteur périphérique, au sein des tissus lymphoïdes secondaire, la présentation d'antigènes issues des protéines de myélines aux lymphocytes T (T-cells ou LT) auto-réactifs, aboutissant d'une part au maintien

du pool de LB et LT auto-réactifs pouvant migrer dans le liquide céphalorachidien (LCR ou CSF) et d'autre part à l'entretien d'un état inflammatoire en périphérie et enfin à la synthèse d'anticorps auto-réactifs. Des follicules lymphoïdes ectopiques sont présents dans le système nerveux central (SNC) où sont retrouvés des LB, des LT, des plasmocytes et des cellules dendritiques. Dans ces follicules, la stimulation et la prolifération in-situ de LT et de LB auto-réactifs est activée, ainsi qu'une synthèse intrathécale d'anticorps. La présence de dépôts d'anticorps et de protéines du complément sur les lésions au niveau de la substance blanche (« normal-appearing white matter » ou NAWN) suppose une participation des anticorps dans la destruction des gaines de myéline. (d'après : [1]).

c. La place des anti-CD20 dans le traitement de la SEP

Actuellement, l'utilisation des anti-CD20 dans la SEP peut varier selon les centres de soin. L'Ocrélizumab a obtenu l'AMM dans le traitement de première intention des SEP-PP avec une activité inflammatoire [62]. Au CHU de Toulouse, le Rituximab est utilisé en première intention dans les formes de SEP-SP et lors d'échec ou d'intolérance aux traitements de première intention des formes de SEP-RR.

Ces stratégies thérapeutiques reposent sur différentes études comme celle de Castillo-Trivino *et al.* [63] qui reprend quatre études regroupant au total 559 patients et évaluant l'efficacité et la sécurité du traitement de la SEP par le Rituximab. L'une des quatre études se concentre sur le traitement des SEP-PP et les trois autres sur le traitement des SEP-RR. Une diminution significative des rechutes a été retrouvée chez les patients traités par Rituximab par rapport aux patients traités par un placebo, avec une réduction du taux de rechute de 56 % aux 24^{ème} et 52^{ème} semaines pour une étude et de 75 % aux 24^{ème} et 48^{ème} semaines pour une autre étude. Ces chiffres de réduction du taux de rechute sont décrits comme similaires ou supérieurs à ceux obtenus avec le Natalizumab qui est un inhibiteur de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ ou « very late antigene 4 » (VLA-4). VLA-4 joue un rôle majeur dans la diapédèse des lymphocytes et son inhibition conduit à une diminution de ce phénomène et donc à un défaut de passage des lymphocytes dans les tissus, notamment dans le SNC. Lors de l'utilisation du Rituximab associé à de l'interféron- β ou à de l'acétate de glatiramère, les auteurs ont observé une diminution du taux de rechute de 81 % à la 52^{ème} semaine [64]. De plus, les patients sous Rituximab présentaient une diminution d'au moins 88 % des lésions

réhaussées au gadolinium à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui est un paramètre majeur dans le diagnostic et le suivi des patients atteints de SEP.

d. Etat des différentes sous-populations lymphocytaires B dans la SEP

L'efficacité de l'utilisation des anti-CD20 dans le traitement de certaines formes de SEP a confirmé le rôle important des LB dans la physiopathologie de la SEP. Chez les patients atteints de maladies auto-immunes, certaines sous-populations lymphocytaires B présentent des variations à la fois quantitatives et fonctionnelles par rapport aux sujets sains. Il est donc intéressant d'étudier ces sous-populations chez les patients atteints de SEP. Par ailleurs, l'analyse de ces mêmes sous-populations s'est révélée intéressante pour le suivi ou le monitoring du traitement par anti-CD20 des NMO et de certaines vascularites à ANCA. L'analyse de ces sous-populations dans la SEP, avant la mise en route du traitement ou lors du suivi d'un traitement par anti-CD20 semble donc pertinente. Ce travail pourrait contribuer à apporter des éléments complémentaires dans la compréhension de la physiopathologie de la SEP et dans l'amélioration de sa prise en charge. Le compartiment sanguin étant le compartiment le plus facile d'accès, plusieurs auteurs ont analysé les différentes représentations des sous-populations lymphocytaires B dans le sang.

Ainsi, Linker *et al.* ont étudié les sous-populations lymphocytaires de patients atteints de SEP. Ils ont montré une diminution de la proportion des LB mémoires et des LB régulateurs (LBreg) dans le sang des patients atteints de SEP-RR par rapport aux sujets sains. Lors des rechutes, ils ont observé une réduction des LBreg et principalement des LBreg naïfs (CD27⁻) [65]. A l'inverse une autre étude montrait une augmentation de la proportion en LB mémoires dans le sang lors des rechutes [66]. D'autres études ont mis en évidence un déséquilibre de la balance dans le compartiment sanguin des LB pro-inflammatoires *versus* les LBreg en faveur du secteur pro-inflammatoire chez les patients atteints de SEP. Par ailleurs dans le SNC, les LB pro-inflammatoires ont été retrouvés en proportion importante et étaient constitués pour la majorité de LB mémoires. Des plasmablastes et des plasmocytes ont aussi été retrouvés en proportion importante dans le SNC.

A l'inverse, l'étude de Michel *et al.* a montré l'absence de modification de la proportion sanguine de LBreg chez les patients atteints de SEP. Cette étude a aussi montré la

persistance de la capacité de ces LBreg à inhiber la prolifération des LT CD4⁺CD25⁻ impliqués dans le mécanisme d'autoimmunité de la SEP [67].

Dans l'étude de Li *et al.*, la sous-population LB CD27⁺CD24^{high}CD25^{high}CD86^{high}CD49d^{high}CD38^{low} apparaît comme augmentée chez les patients atteints de SEP. Cette sous-population est décrite par les auteurs comme productrice de GM-CSF [60], elle est donc considérée comme pro-inflammatoire.

Guerrier *et al.* [37] ont montré qu'une augmentation du ratio IL-6/IL-10 serait associée à une évolutivité de la pathologie à court terme (dans les 6 mois) chez les patients ayant une activité radiologique isolée ou une atteinte clinique isolée. Ce déséquilibre est expliqué par une altération de la représentation des LB transitionnels au niveau sanguin, qui sont pour les auteurs une source importante d'IL-10. Cependant dans leur étude, les auteurs ne mettaient pas en évidence de différence de proportion en LB transitionnels dans le sang entre le groupe contrôle et les groupes de patients atteints de SEP (Figure 9). Par contre, ils mettaient en avant une répartition plus hétérogène des LB transitionnels chez les patients atteints de SEP. Concernant les autres sous-populations lymphocytaires B, les auteurs ont observé une variation significative uniquement de la proportion LB CD19⁺CD27⁻IgD⁻ (double négatif) et exclusivement chez les patients présentant une activité clinique de la pathologie. Ces LB doubles négatifs sont mentionnés comme ayant des caractéristiques pro-inflammatoires et sont décrits par d'autres études, comme anormalement élevés chez certains patients atteints de SEP [68].

Enfin, l'étude de Baker *et al.* [69] a analysé deux essais cliniques du traitement de la SEP. Dans les deux essais, les molécules utilisées induisaient une déplétion des LB et inhibaient la synthèse des anticorps. L'une des molécules était le tabalumab qui inhibe la voie du facteur d'activation des lymphocytes B (BAFF) et l'autre était l'atacept qui inhibe « A Proliferation-Inducing Ligand » (APRIL) ; ces deux cibles cytokiniques appartiennent à la famille du TNF. Ces deux essais se sont soldés par des échecs thérapeutiques. En effet, malgré une déplétion des LB, ces traitements n'ont pas conduit à une diminution des rechutes. Ceci est expliqué dans l'étude par la persistance des LB mémoires. De plus, l'atacept a entraîné une augmentation des LB mémoires et une augmentation de l'activité de la maladie.

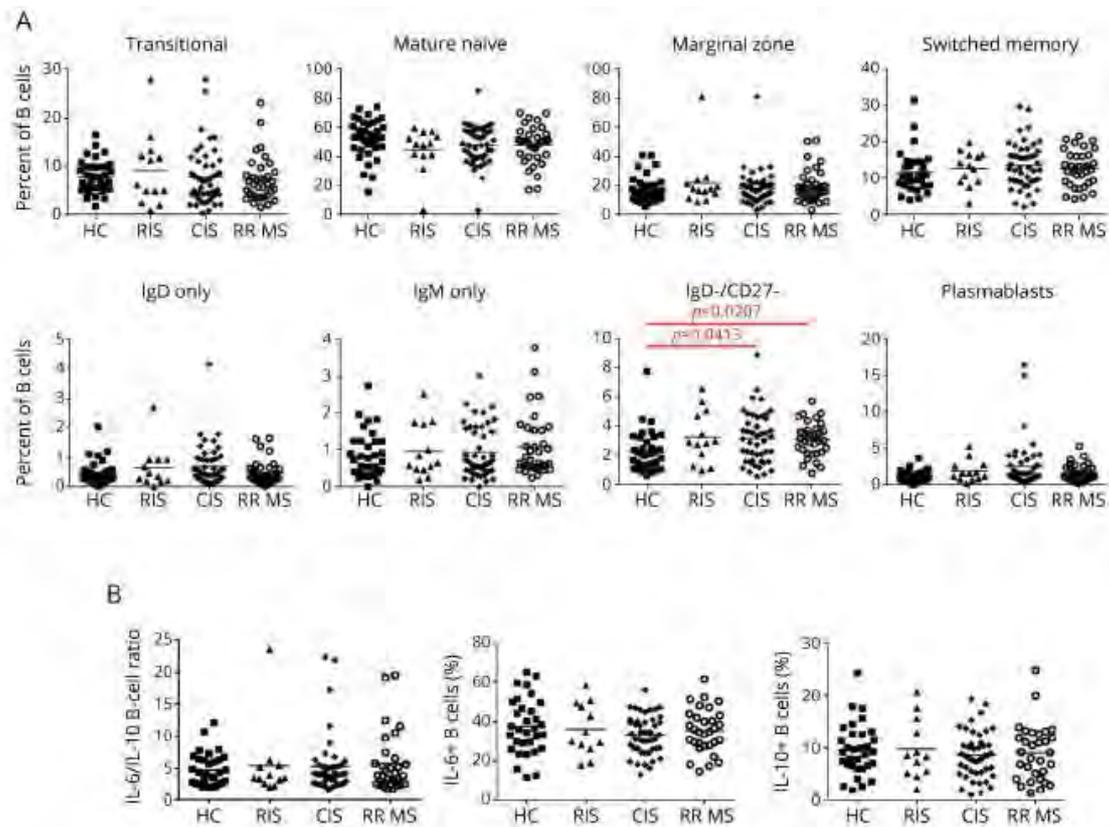


Figure 9 : Représentations schématiques de la comparaison des répartitions en pourcentage des différentes sous-populations lymphocytaires, B entre un groupe de patients sains (« healthy control » HC) et différents groupes de patients atteints de sclérose en plaques : des patients avec des signes radiologiques isolés (RIS), des patients avec des signes cliniques isolés (CIS) et des patients avec une SEP-RR non traitée (RR MS). (d'après : [37])

Ces différentes études semblent donc montrer un déséquilibre de la balance LB pro-inflammatoires/LBreg. Ce déséquilibre entrainerait une augmentation de la concentration en interleukines pro-inflammatoires et donc contribuerait à l'entretien et à l'aggravation de la pathologie. Les LB mémoires semblent avoir un rôle important dans la pathogénèse. De plus, les variations des sous-populations lymphocytaires B entre les patients atteints de SEP et les sujets sains semblent minimales ; seuls des échantillons de taille suffisante permettraient de mettre en évidence des différences significatives.

d. Les sous-populations lymphocytaires B des patients avec une SEP suite à un traitement par anti-CD20

Le traitement par anti-CD20 conduit comme attendu à une déplétion en LB chez ces patients. Cette déplétion touche le compartiment sanguin mais aussi le compartiment central, avec une déplétion retrouvée aussi dans le LCR [70]. Une diminution de la quantité des LT était par ailleurs retrouvée en central et en périphérie, ainsi qu'une variation transitoire du rapport LT CD4/LT CD8.

Comme dans les autres pathologies auto-immunes, les premières populations lymphocytaires B présentes suite à une repopulation sont : les LB transitionnels, les plasmablastes et les LB naïfs. Les auteurs mettaient en avant la baisse du caractère pro-inflammatoire de ces LB, avec une augmentation de la proportion de LBreg qui sont majoritairement des LB transitionnels ou naïfs [1]. La remise à zéro du répertoire antigénique suite à l'action du Rituximab conduit à la génération d'un nouveau pool de LB mémoires ayant un répertoire antigénique différent et surtout une activité pro-inflammatoire inférieure au pool précédent. Dans cette hypothèse, une correction de la balance des LB pro-inflammatoires par rapport aux LB reg apparaîtrait comme un effet prolongé du Rituximab.

Dans l'étude de Ellrichmann *et al.* dans laquelle les patients ont reçu un cycle de Rituximab tous les 9,7 mois en moyenne, le taux de LB avant la cure suivante n'était pas prédictif des rechutes, mais un taux réduit de LB était associé à de meilleurs scores cliniques et radiologiques [71]. Dans cette étude les auteurs évoquent l'intérêt d'un monitoring des administrations d'anti-CD20 par certaines sous-populations lymphocytaires B, notamment par les LB mémoires.

Partie 2 : Etude

A. Objectif de l'étude

Dans la littérature, peu d'auteurs ont étudié les sous-populations lymphocytaires B sur plusieurs années chez des patients atteints de SEP et traités par Rituximab. Nous avons voulu dans ce travail évaluer l'intérêt du monitoring par un immunophénotypage lymphocytaire B étendu des patients atteints de SEP et traités par Rituximab.

Ainsi nous avons étudié :

- Le nombre de patients qui présentaient une repopulation entre deux cures et nous avons cherché à identifier les sous-populations lymphocytaires B qui caractérisent ces repopulations.
- L'impact de la durée de traitement par Rituximab sur ces mêmes sous-populations lymphocytaires B chez les patients présentant une repopulation.
- L'impact des différents traitements de fond immunomodulateurs (TFI) sur les immunophénotypes avant l'instauration du traitement par Rituximab et sur la proportion de patients présentant une repopulation.
- De façon complémentaire, les variations des LT, LT CD4, LT CD8 et LNK au cours d'un traitement par Rituximab.
- Les immunophénotypes avant le début du traitement par Rituximab, afin de chercher à identifier les patients qui vont présenter une repopulation entre deux cycles.
- L'impact de la modification de la dose d'entretien de Rituximab sur les populations et sous-populations lymphocytaires B.

B. Matériel et méthode

1. Les patients

Nous avons réalisé une étude rétrospective sur des patients atteints de pathologies neuro-inflammatoires, traités par Rituximab et suivis au CHU de Toulouse sur une période de 4 ans.

Nous avons fait une extraction de données par le biais du logiciel BI 4[®] et du système informatique du laboratoire Molis[®]. A partir du fichier transmis par la pharmacie dans lequel étaient recensés les patients ayant eu des administrations de Rituximab, nous avons sélectionné ceux pris en charge dans le service de neurologie. Nous avons ensuite sélectionné les patients pour lesquels nous avons au minimum un immunophénotypage lymphocytaire avant l'instauration du traitement par Rituximab et un immunophénotypage 6 mois après l'instauration. Nous avons ensuite contrôlé cette base de données en confirmant la date d'instauration et retenu les patients atteints de l'une des pathologies neuro-inflammatoires suivante : SEP, NMO, maladie de Suzac, encéphalite auto-immune, myasthénie avec anticorps, polyradiculonévrite démyélinisante, pathologie démyélinisante non étiquetée ou neuropathie motrice multifocale à blocs de conduction ; ceci par l'intermédiaire du système d'information patient du CHU, Orbis[®].

Au total, nous avons étudié 238 patients atteints d'une pathologie neuroinflammatoire et ayant eu une instauration de traitement par Rituximab entre le 1^{er} janvier 2016 et le 30 juin 2019 au CHU de Toulouse. Ces patients ont tous bénéficié d'une induction par deux injections de 1 g de Rituximab espacées de deux semaines. Il existe ensuite deux schémas d'entretien. Le premier repose sur deux perfusions de 1 g espacées de 15 jours, répétées tous les 6 mois. Le second schéma repose sur une perfusion de 1 g tous les 6 mois. Quarante et un patients ont reçu leur deuxième cycle de Rituximab selon le premier schéma et parmi eux, huit patients ont aussi reçu leur troisième cycle de Rituximab selon ce schéma. Ces patients ayant reçu des cycles d'entretiens selon le premier schéma ont par la suite reçu les cures d'entretien selon le second schéma.

Les immunophénotypages lymphocytaires ont été réalisés avant l'initiation du traitement par Rituximab (J0) puis avant chaque cycle d'entretien. Ainsi l'immunophénotypage représente l'effet à 6 mois de la perfusion précédente, soit C1 correspond à

l'immunophénotypage effectué 6 mois après le premier cycle, C2 correspond à l'immunophénotypage à 6 mois du second cycle, et ainsi de suite jusqu'à C5.

Nous avons été confrontés à des données manquantes, ce qui entraîne une différence au niveau des effectifs entre les patients ayant reçu un cycle de Rituximab et les patients pour lesquels nous disposons d'un immunophénotypage. Ceci peut s'expliquer par un oubli de prescription ou de prélèvement de l'immunophénotypage avant un cycle d'entretien, d'un prélèvement coagulé, d'un arrêt de traitement et donc de l'absence d'un immunophénotypage à 6 mois de la cure précédente, ou encore de patients perdus de vue ou suivis dans un autre centre.

2. L'immunophénotypage par cytométrie en flux

L'analyse par CMF a été réalisée sur des prélèvements de sang périphérique dans le laboratoire d'immunologie du CHU de Toulouse. Les LT, LB et LNK ont été identifiés par une analyse tétra-couleur pour distinguer les marqueurs CD45, CD56, CD19, CD3 à l'aide du kit de Beckman Coulter®. La quantification a été effectuée par l'ajout de fluorosphères calibrées selon les instructions du fournisseur (Beckman Coulter®). Le phénotypage des LB a été réalisé dans les échantillons des patients ayant des cellules CD19⁺ en quantité supérieure à 5 cellules/mm³ de sang. Cette analyse a été effectuée avec le « Duraclone IM B cells assay kit » (Beckman Coulter®). Les données de la CMF ont été acquises sur le cytomètre en flux Navios et analysées à l'aide du logiciel Kaluza (Beckman Coulter®), (Figure 10 et 11).

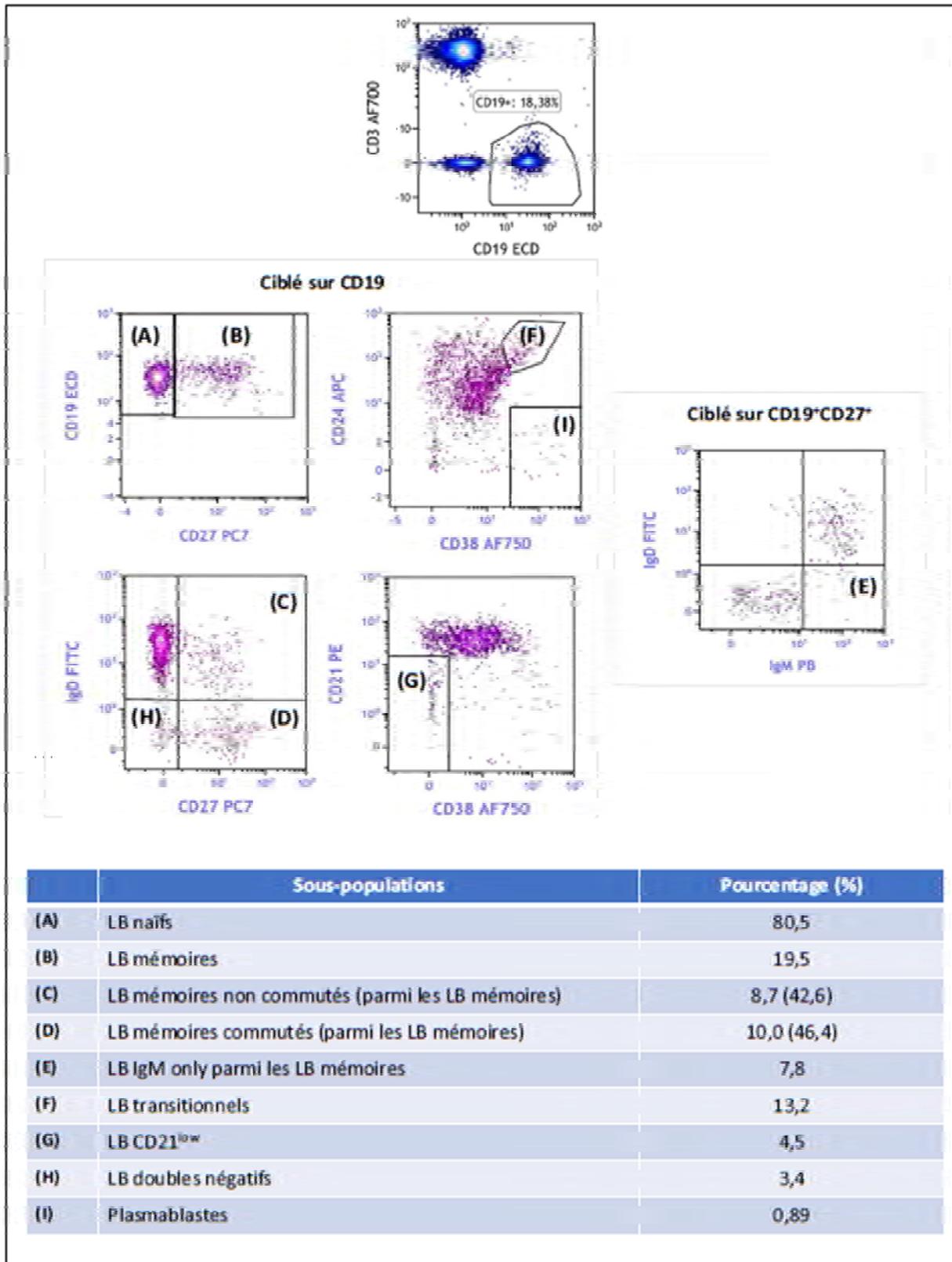


Figure 10 : Représentation d'une analyse par cytométrie en flux des sous-populations lymphocytaires B d'un patient avant traitement par Rituximab

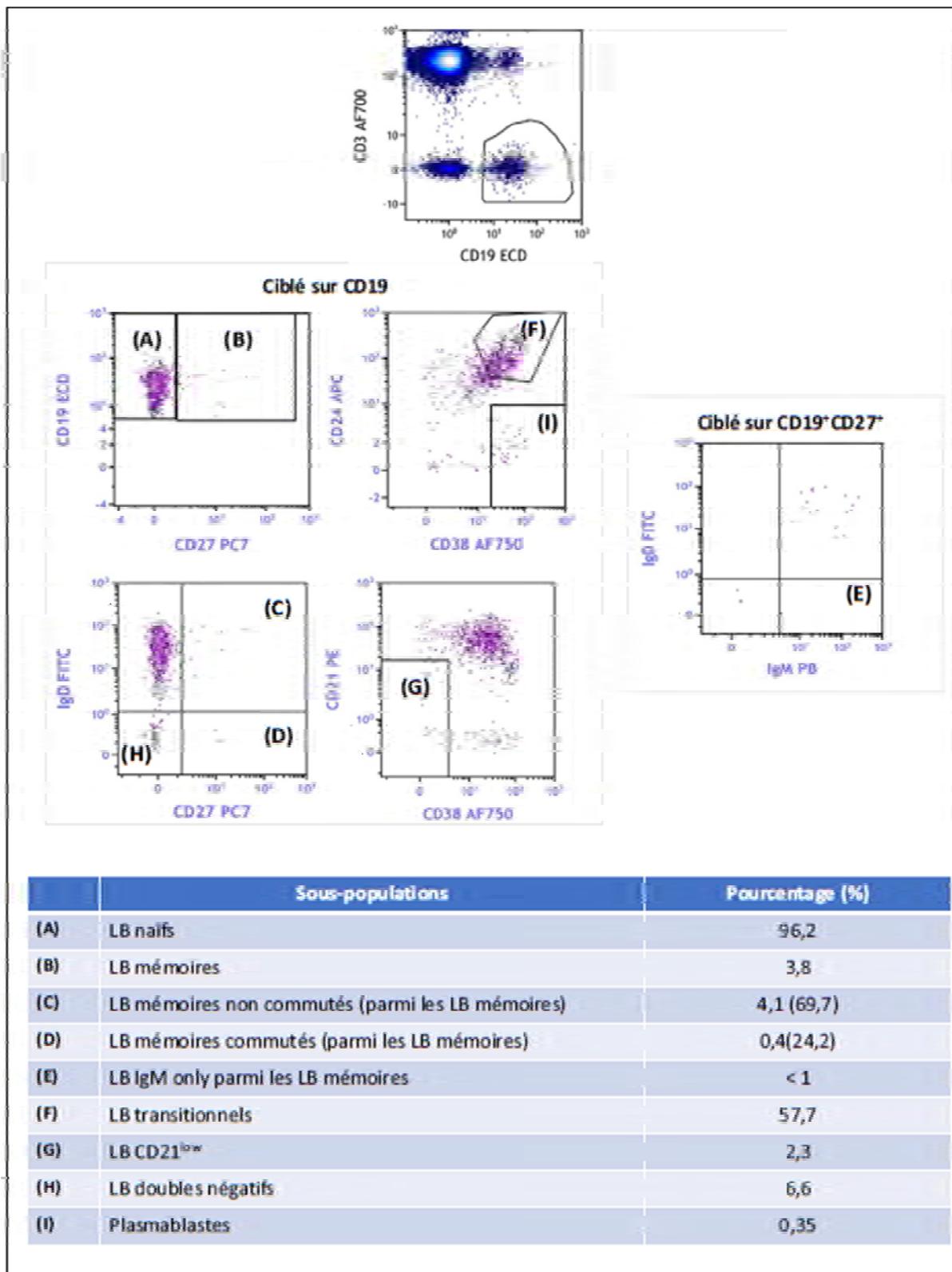


Figure 11 : Représentation d'une analyse par cytométrie en flux des sous-populations lymphocytaires B d'un patient présentant une repopulation suite à un traitement par Rituximab.

3. Analyse statistique

Concernant l'analyse statistique, les données sont représentées par la médiane associée à l'écart type. Nous avons utilisé le logiciel GraphPad Prism 8 (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA, USA) et réalisé les analyses statistiques avec les tests suivants : le test de Kruskal-Wallis pour les tests en comparaison multiple avec une correction de Dunn's ; le test de Wilcoxon-Mann-Whitney apparié ou non apparié suivant les analyses, avec un risque alpha de 5 % ; et enfin, le test exact de Fisher avec un risque alpha de 5 %.

C. Résultats

1. Population étudiée

Nous avons étudié 238 patients, dont 137 femmes et 101 hommes. L'âge moyen était de 48 ans avec comme extrêmes 17 et 77 ans.

Sur les 238 patients (Tableau 1), 207 étaient atteints de SEP soit 87 %, dont 35 patients atteints de forme PP, 68 de forme RR dont 2 formes frontières avec une NMO, ainsi que 104 de forme SP. Pour le reste des patients, notre cohorte comprenait 14 patients atteints de NMO (3 avec des anticorps anti-AQP4, 9 avec des anticorps anti-myélin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) et 1 mal étiqueté avec un doute entre une NMO séronégative et une maladie de Bechet), 3 patients atteints de maladie de Suzac, 5 atteints d'encéphalite auto-immune, 3 atteints de myasthénie avec des auto-anticorps spécifiques, 4 atteints de polyradiculonévrite démyélinisante, 1 atteint de pathologie démyélinisante non étiquetée et 1 atteint de neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction.

Répartition pathologie	Effectif (proportion en %)	Sous-Effectif (sous-proportion en %)
SEP PP seul	35 (14,7 %)	32 (13,4 %)
SEP PP + pathologie autoimmune systémique		3 (1,3 %)
SEP RR seul	68 (28,6 %)	64 (26,9 %)
SEP RR + pathologie autoimmune systémique		2 (0,8 %)
SEP RR frontière NMO		2 (0,8 %)
SEP SP	104 (43,7 %)	104 (43,7 %)
Total SEP	207 (87,0 %)	NA
NMO	14 (5,9 %)	14 (5,9 %)
Maladie de Suzac	17 (7,1 %)	3 (1,3 %)
Encéphalite auto-immune		5 (2,1 %)
Myasthénie avec présence d'anticorps		3 (1,3 %)
Polyradiculonévrite démyélinisante		4 (1,7 %)
Pathologie démyélinisante non étiquetée		1 (0,4 %)
Neuropathie motrice multifocale avec blocs de conduction		1 (0,4 %)
TOTAL		238

Tableau 1 : Effectifs et proportions des patients en fonction des pathologies.

Nous avons souhaité nous concentrer sur les patients atteints de SEP (207 patients). Dans cette pathologie, contrairement à la NMO et certaines myasthénies, les auto-anticorps ne sont pas considérés comme les éléments principaux porteurs de la pathogénicité. La répartition des sous-populations lymphocytaires et la cinétique de repopulation peuvent donc être potentiellement différentes entre la SEP et la NMO ou les myasthénies. Dans notre étude 73 patients avaient reçu cinq cures de Rituximab au total, 74 avaient reçu quatre cures, 49 avaient reçu trois cures, 11 avaient reçu deux cures et aucun patient n'avait reçu une unique cure. Dans le tableau ci-dessous (Tableau 2) sont répertoriés les délais moyens entre deux cures ainsi que les valeurs extrêmes. Le délai moyen entre deux cures était de 6,1 mois avec comme extrêmes 4,0 et 7,8 mois.

	Moyenne (minimum ; maximum)	Ecart-type
Nombre de cycles/patient	3,9 (2 ; 5)	NA
Délais entre les cycles (j)	184,1 (121 ; 233)	17,1
Délais entre J0-C1 (j)	185,9 (142 ; 233)	12,3
Délais entre C1-C2 (j)	185,6 (142 ; 230)	15,5
Délais entre C2-C3 (j)	183,5 (124 ; 224)	15,0
Délais entre C3-C4 (j)	179,7 (121 ; 207)	16,4
Délais entre C4-C5 (j)	179,5 (146 ; 201)	12,4

Tableau 2 : Délais moyens en jours (j) entre les cycles de Rituximab

Concernant les antécédents de traitement de fond immunomodulateur (TFI) des 207 patients, nous avons pris en compte uniquement un antécédent de TFI durant l'année précédant l'instauration du traitement par Rituximab. Ainsi nous avons classé les patients en 6 groupes (Nom : effectif et proportion) :

- Aucun TFI : 59 soit 28,5 %
- Natalizumab : 48 soit 23,2 %
- Fingolimod : 28 soit 13,5 %
- IFN- β : 12 soit 5,8 %
- Corticoïdes : 13 soit 6,3 %
- Autres TFI : 47 soit 22,7 %

La répartition des patients dans le groupe « autre TFI » était la suivante : 11 patients sous acétate de glatiramère, 10 sous cyclophosphamide, 9 sous fumarate de diméthyle, 9 sous tériflunomide, 3 sous azathioprine, 2 sous méthotrexate, 2 sous alemtuzumab, 1 sous acide mycophénolique.

Nous avons donc analysé les immunophénotypages avant induction et lors des cycles d'entretien. En premier lieu, le panel TBNK nous a permis l'analyse des différentes populations lymphocytaires majoritaires au niveau sanguin, à savoir les LB, les LT, les LNK ainsi que les 2 grandes sous-populations lymphocytaires T, les LT CD4 et les LT CD8. Ensuite, nous avons analysé les immunophénotypages lymphocytaires B étendus, permettant l'analyse des sous-populations lymphocytaires B décrites précédemment.

Dans le traitement de la SEP par Rituximab, les cures d'entretiens sont espacées de six mois pour éviter une éventuelle repopulation lymphocytaire B entre deux cures. Cependant nous

observons une proportion non négligeable de patients présentant une repopulation. Nous nous sommes donc basés sur ces patients pour analyser les sous-populations lymphocytaires B lors des repopulations. Ce nombre de patients est néanmoins restreint. Ceci entraîne un défaut de puissance, notamment lors de l'analyse des sous-populations lymphocytaires B lors du 5^{ème} cycle.

Ainsi nous avons analysé :

- Pour le bilan avant l'instauration du traitement par Rituximab (J0) : un immunophénotypage TBNK pour 206 patients, dont 173 avec les données pour les LT CD4 et LT CD8 et un immunophénotypage lymphocytaire B étendu pour 204 patients.
- Pour le bilan représentant l'effet à 6 mois de l'induction du Rituximab (C1) : un TBNK pour 192 patients, dont 172 avec les données pour les LT CD4 et LT CD8 et un immunophénotypage lymphocytaire B étendu pour 48 patients.
- Pour le bilan représentant l'effet à 6 mois du 2^{ème} cycle du Rituximab (C2) : un TBNK pour 182 patients, dont 179 avec les données pour les LT CD4 et LT CD8 et un immunophénotypage lymphocytaire B étendu pour 26 patients.
- Pour le bilan représentant l'effet à 6 mois du 3^{ème} cycle du Rituximab (C3) : un TBNK pour 141 patients, dont 141 avec les données pour les LT CD4 et LT CD8 et un immunophénotypage lymphocytaire B étendu pour 19 patients.
- Pour le bilan représentant l'effet à 6 mois du 4^{ème} cycle du Rituximab (C4) : un TBNK pour 72 patients, dont 72 avec les données pour les LT CD4 et LT CD8 et un immunophénotypage lymphocytaire B étendu pour 9 patients.
- Pour le bilan représentant l'effet à 6 mois du 5^{ème} cycle du Rituximab (C5) : un TBNK pour 55 patients, dont 55 avec les données pour les LT CD4 et LT CD8 et un immunophénotypage lymphocytaire B étendu pour 4 patients.

2. Comparaison des immunophénotypage TBNK et immunophénotypage B étendu suivant le traitement de fond immunomodulateur précédent

L'étude de Dooley *et al.* [72] a montré une différence de répartition des différentes sous-populations lymphocytaires suivant le TFI. Nous avons donc voulu comparer notre cohorte à la leur et apporter des éléments complémentaires par l'analyse de populations lymphocytaires supplémentaires.

Nous avons séparé les patients de notre cohorte en 6 groupes pour lesquels sont indiqués respectivement le nombre de patients avec un immunophénotypage TBNK et le nombre de patients avec numération LT CD4/ LTCD8 (X et Y) :

- Groupe 1 : patients sans TFI l'année précédant la mise sous Rituximab (59 et 52)
- Groupe 2 : patients traités par Natalizumab l'année précédant la mise sous Rituximab (48 et 43)
- Groupe 3 : patients traités par Fingolimod l'année précédant la mise sous Rituximab (28 et 19)
- Groupe 4 : patients traités par interféron- β l'année précédant la mise sous Rituximab (12 et 11)
- Groupe 5 : patients traités par corticoïdes l'année précédant la mise sous Rituximab (12 et 10)
- Groupe 6 : patients traités par un autre TFI l'année précédant la mise sous Rituximab (46 et 37)

Nous avons comparé les immunophénotypes TBNK avant induction par Rituximab de chaque groupe à celui des patients du groupe sans TFI (Figure 12). Nous avons ainsi mis en évidence que seul un traitement par Natalizumab ou par Fingolimod dans l'année qui a précédé la mise sous Rituximab avaient un effet significatif sur les immunophénotypes analysés par un panel TBNK avant traitement par anti-CD20 des patients.

En effet, nous avons observé chez les patients traités par Natalizumab par rapport aux patients sans TFI : une augmentation significative du nombre des lymphocytes totaux, des LB, des LNK (P -value $\leq 0,0001$), des LT (P -value = 0,0278) et des LT CD8 (P -value = 0,0080).

A l'inverse, pour les patients traités par Fingolimod par rapport aux patients sans TFI, nous avons observé une diminution significative du nombre des lymphocytes totaux (P-value = 0,001), des LB, des LT et des LT CD4 (P-value \leq 0,0001). Il est à noter une diminution du rapport LT CD4/ LT CD8 des patients sous Fingolimod (P-value \leq 0,0001). Le nombre de LNK et de LT CD8 de ces patients n'étaient pas significativement différents de celui des patients sans TFI.

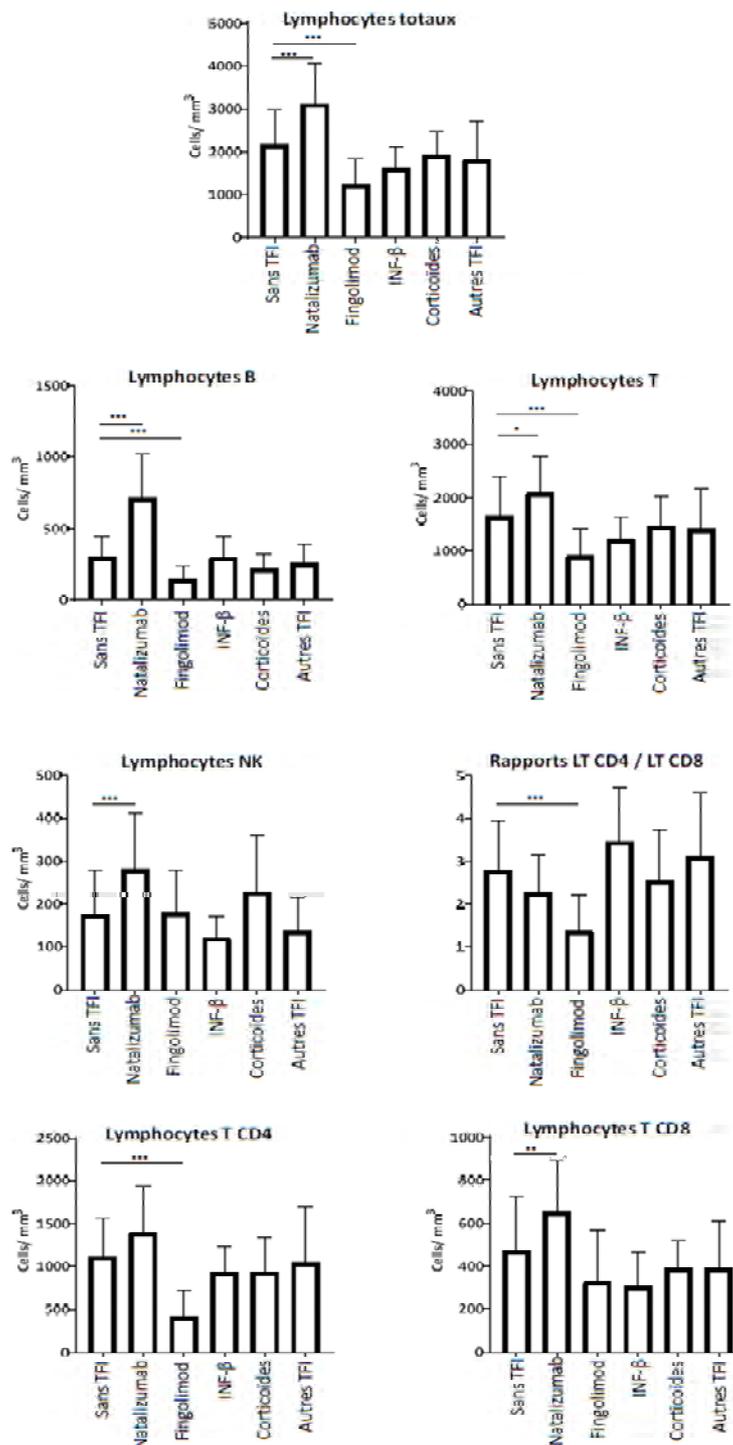


Figure 12 : Représentation de la répartition des différentes populations lymphocytaires étudiées par un immunophénotypage TBNK avant traitement par Rituximab (J0), en fonction du traitement de fond immunomodulateur (TFI). Les médianes apparaissent encadrées par l'intervalle de confiance à 95 %, en cellules/mm³ de sang (cells/mm³). Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre le groupe sans TFI et les autres groupes sont indiqués. Une P-value < 0,05 est considérée comme significative avec *P<0,05 ; **P< 0,01 ; ***P<0,001. INF-β : Interféron-β ; NK : Natural Killer.

Concernant l'analyse des immunophénotypages lymphocytaires B étendus, nous avons des données pour 59 patients sans TFI, pour 48 patients sous Natalizumab, pour 27 patients sous Fingolimod, pour 12 patients sous IFN- β , pour 12 patients sous corticoïdes et pour 45 patients sous un autre TFI.

En termes de proportions (Figure 13), nous avons obtenu les résultats suivants :

- Pour les LB transitionnels, le Fingolimod entraîne une augmentation significative de leur proportion par rapport aux patients sans TFI (P – value < 0,0001).
- Pour les LB naïfs, les patients sous Natalizumab présentent une proportion diminuée de cette sous-population par rapport aux patients sans TFI (P – value = 0,0018).
- Pour les LB mémoires nous avons observé logiquement l'exact opposé, avec une augmentation de la proportion de LB mémoires chez les patients sous Natalizumab par rapport aux patients sans TFI (P – value = 0,0018).
- Pour les plasmablastes, le Natalizumab entraîne une diminution de leur proportion par rapport aux patients sans TFI (P – value < 0,0010).
- Pour les LB CD19⁺CD21^{low} et les LB doubles négatifs, ils ne semblent pas modulés par les TFI.
- Pour les sous-populations de LB mémoires, nous avons observé une augmentation de la proportion des LB mémoires commutés et non commutés, chez les patients sous Natalizumab par rapports aux patients sans TFI (respectivement : P – value = 0,0054 et 0,0032). Par ailleurs, nous n'avons pas observé de variation de proportion pour les LB « IgM only » suivant les TFI.

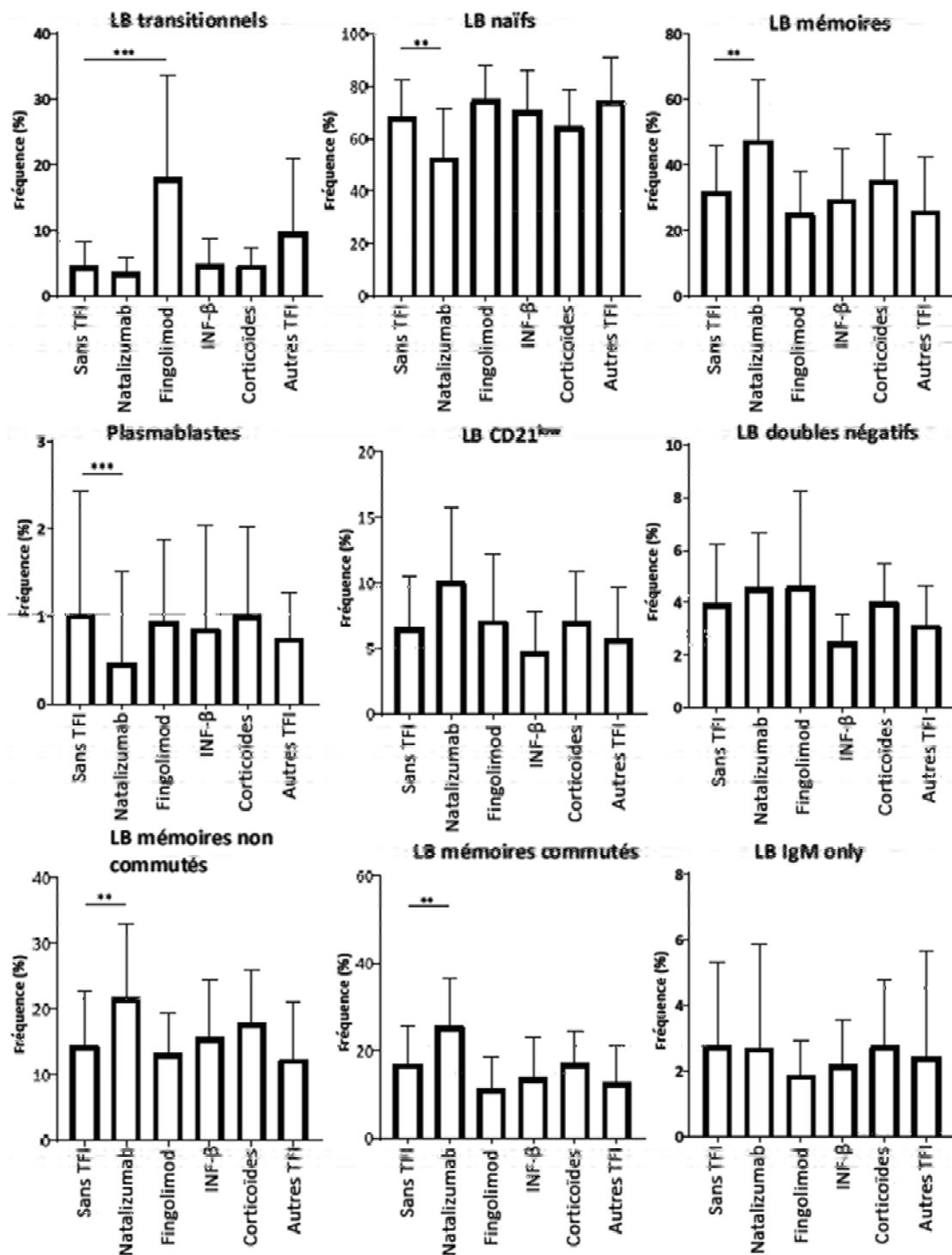


Figure 13 : Représentation de la répartition en pourcentage des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0), en fonction du traitement immunomodulateur (TFI). Les médianes apparaissent encadrées par l'intervalle de confiance à 95 %, en pourcentage des LB dans le sang. Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre le groupe sans TFI et les autres groupes sont indiqués. Une P - value < 0,01 est considérée comme significative avec **P < 0,01 ; ***P < 0,001. INF-β : Interféron- β ; LB : lymphocytes B ; IgM : immunoglobuline de type M.

Lorsque nous avons étudié les sous-populations lymphocytaires B (Figure 14) en termes de concentration, nous avons observé globalement le même phénomène. Le Natalizumab entraîne une augmentation des concentrations des différentes sous-populations lymphocytaires B et le Fingolimod présente une tendance (moins systématique), à diminuer ces dernières. Par ailleurs, les autres TFI n'entraînent pas de variation significative de la représentation des différentes sous-populations dans la circulation sanguine. Il est à noter que le nombre de plasmablastes circulants ne varie pas quel que soit le TFI.

Ainsi, nous avons observé chez les patients traités par Natalizumab par rapport aux patients sans TFI, une augmentation significative de l'ensemble des sous-populations lymphocytaires B à l'exception des plasmablastes ($P - \text{value} \leq 0,0010$, sauf pour les LB naïfs pour lesquels la $P - \text{value} = 0,0012$).

A l'inverse, pour les patients traités par Fingolimod nous avons observé une diminution par rapport aux patients sans TFI, des sous-populations suivantes : les LB naïfs, les LB mémoires, les LB mémoires commutés, les LB « IgM only » et les LB doubles négatifs ($P - \text{value} \leq 0,0100$).

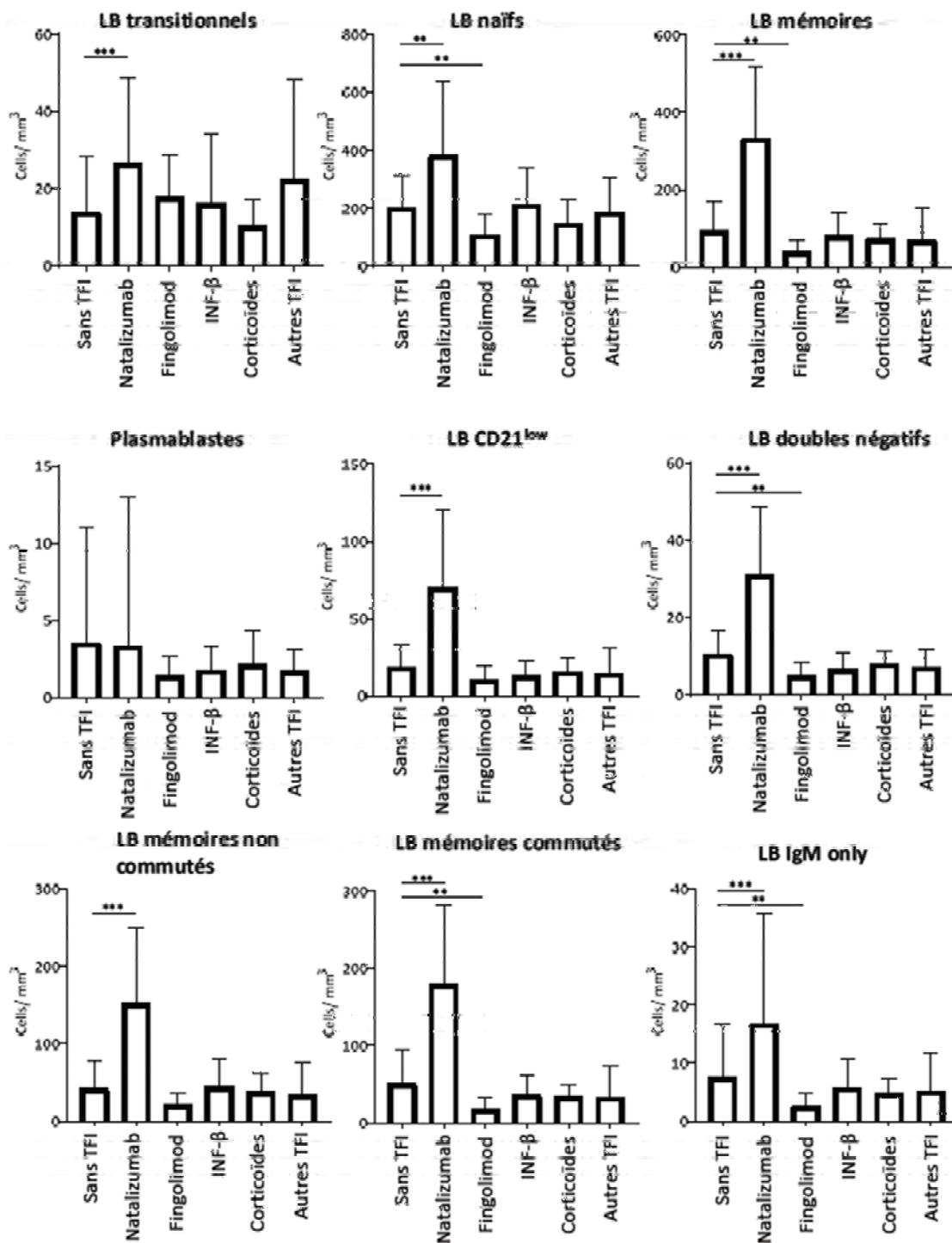


Figure 14 : Représentation de la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) en fonction du traitement immunomodulateur (TFI). Les médianes apparaissent encadrées par l'intervalle de confiance à 95 %, en cellules/mm³ de sang (cells/mm³). Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre le groupe sans TFI et les autres groupes sont indiqués. Une P – value < 0,01 est considérée comme significative avec **P < 0,01 ; ***P < 0,001. IFN-β : Interféron- β ; LB : lymphocytes B ; IgM : immunoglobuline de type M.

Les résultats obtenus semblent cohérents avec les mécanismes d'action des différents médicaments. En effet, le Natalizumab inhibe la diapédèse des lymphocytes et entraîne donc leur rétention au niveau du compartiment sanguin. A l'inverse, le Fingolimod induit une séquestration des lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes secondaires, entraînant donc une diminution de leur représentation sanguine. Le Natalizumab semble modifier de façon importante la représentation des différentes sous-populations lymphocytaires B, avec une modification des proportions de l'ensemble des sous-populations, sauf en ce qui concerne les LB CD21^{low}, les LB doubles négatifs et les LB « IgM only ». Le Fingolimod lui entraîne une augmentation importante de la proportion de LB transitionnels avec une multiplication par un facteur 3 de leur proportion par rapport aux patients sans TFI (respectivement : 12 +/- 15,7 et 4 +/- 3,8).

3. Comparaison des immunophénotypes lymphocytaires avant traitement aux immunophénotypes des cycles successifs

Nous voulions savoir si les variations des différentes populations lymphocytaires du panel TBNK des patients atteints de SEP et traités par Rituximab seraient similaires aux variations observées pour les patients atteints d'autres pathologies auto-immunes également traités par Rituximab. Nous avons donc étudié 191 immunophénotypes TBNK pour le J0 et le C1, 182 pour le C2, 140 pour le C3, 71 pour le C4 et 54 pour le C5. Concernant les LT CD4 et LT CD8, nous avons analysé 152 immunophénotypes pour le J0 et le C1, 151 pour le C2, 110 pour le C3, 43 pour le C4 et 31 pour le C5.

Nous avons observé une diminution significative (P – value < 0,0001) en nombre de cellules/mm³ de sang, entre l'état avant induction (J0) et le premier cycle de Rituximab (C1) pour les populations lymphocytaires suivantes : les lymphocytes totaux, les LB, les LT, les LT CD4 et les LT CD8 (Figure 15). Ces diminutions significatives étaient retrouvées entre l'état avant traitement et les cycles suivants (C2, C3, C4 et C5) (Figure 16).

Il est à noter que nous avons observé une diminution de 28,7 % entre la moyenne du nombre de LT avant l'induction et la moyenne du nombre de LT lors des différents cycles.

Sur ce même principe, nous avons obtenu une baisse de 26,7 % de la moyenne des LT CD4 et de 33,2 % de la moyenne des LTCD8 après la mise sous Rituximab.

Nous avons observé par ailleurs une augmentation du rapport LT CD4/ LT CD8 entre l'immunophénotypage avant l'induction et les immunophénotypages réalisés sous Rituximab. Ainsi entre J0 et C1, nous avons obtenu une augmentation de ce ratio avec une P – value = 0,0069 et entre J0 et les cycles suivants (C2, C3, C4, C5), nous avons obtenu une augmentation avec une P – value < 0,0001. De plus, nous avons observé une tendance à l'augmentation de ce rapport LT CD4/ LT CD8 au cours des cycles avec par exemple, une médiane à 2,35 +/- 1,28 pour J0, passant à 2,58 +/- 1,47 à C2 et pour finir à 2,96 +/- 1,5 pour C5. Cependant les différences entre les cycles ne sont pas statistiquement significatives.

Pour les lymphocytes NK, contrairement aux autres populations, nous n'avons pas observé de différence significative entre le nombre de LNK/mm³ de sang avant le début du traitement et lors des cycles successifs.

Nous disposons d'un immunophénotypage TBNK des 5 cycles de Rituximab pour 34 de nos patients. Suite à une analyse statistique en données appariées, nous n'observons pas de variations significatives des LT, des LB et des LNK sur les immunophénotypages réalisés pendant la période d'entretien (C1, C2, C3, C4, C5). Nous n'avons cependant pas pu étudier les variations potentielles des LT CD4 et des LT CD8, car nous ne disposons des données complètes uniquement pour 11 patients.

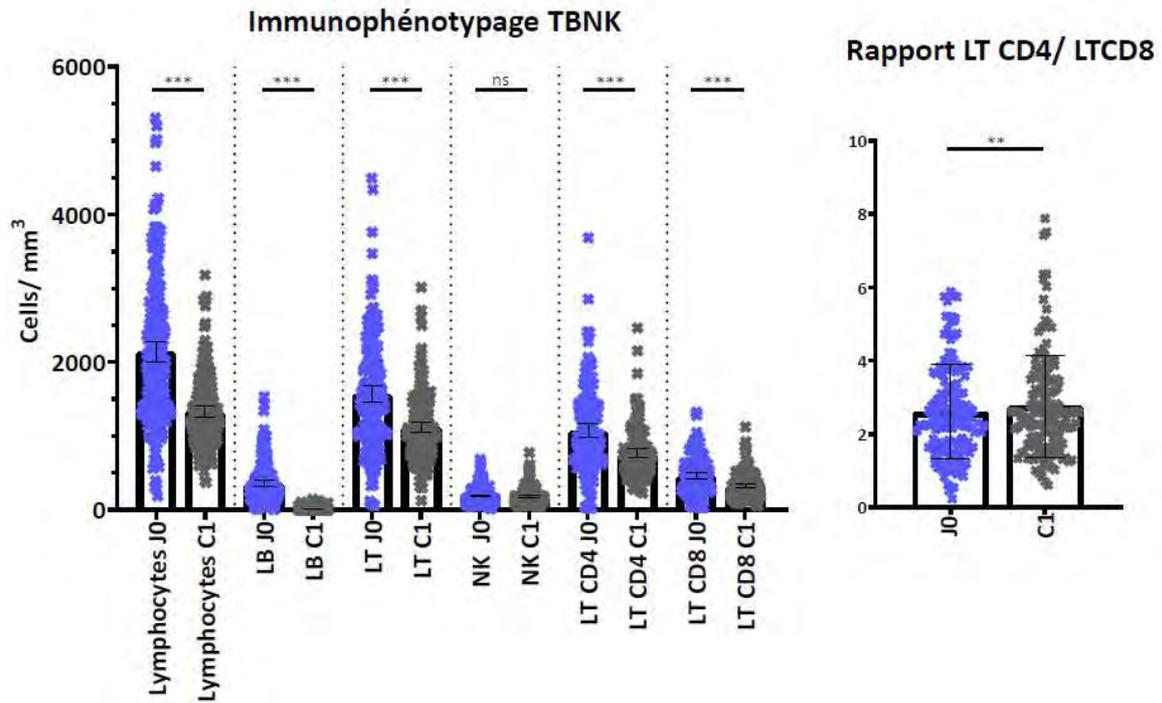


Figure 15 : Représentation de l'étude des variations des populations lymphocytaires entre l'état avant l'induction par Rituximab (J0) et 6 mois après la première dose de Rituximab (C1). Les médianes apparaissent encadrées par l'intervalle de confiance à 95, en cellules/mm³ de sang (cells/mm³). L'état initial (J0) est représenté en bleu, l'état à 6 mois du 1^{er} cycle de Rituximab (C1) en gris. Une P-value < 0,05 est considérée comme significative avec **P < 0,01 ; ***P < 0,0001. Les résultats non significatifs sont indiqués (ns). LB : lymphocytes B ; LT : lymphocytes T ; NK : lymphocytes Natural Killer.

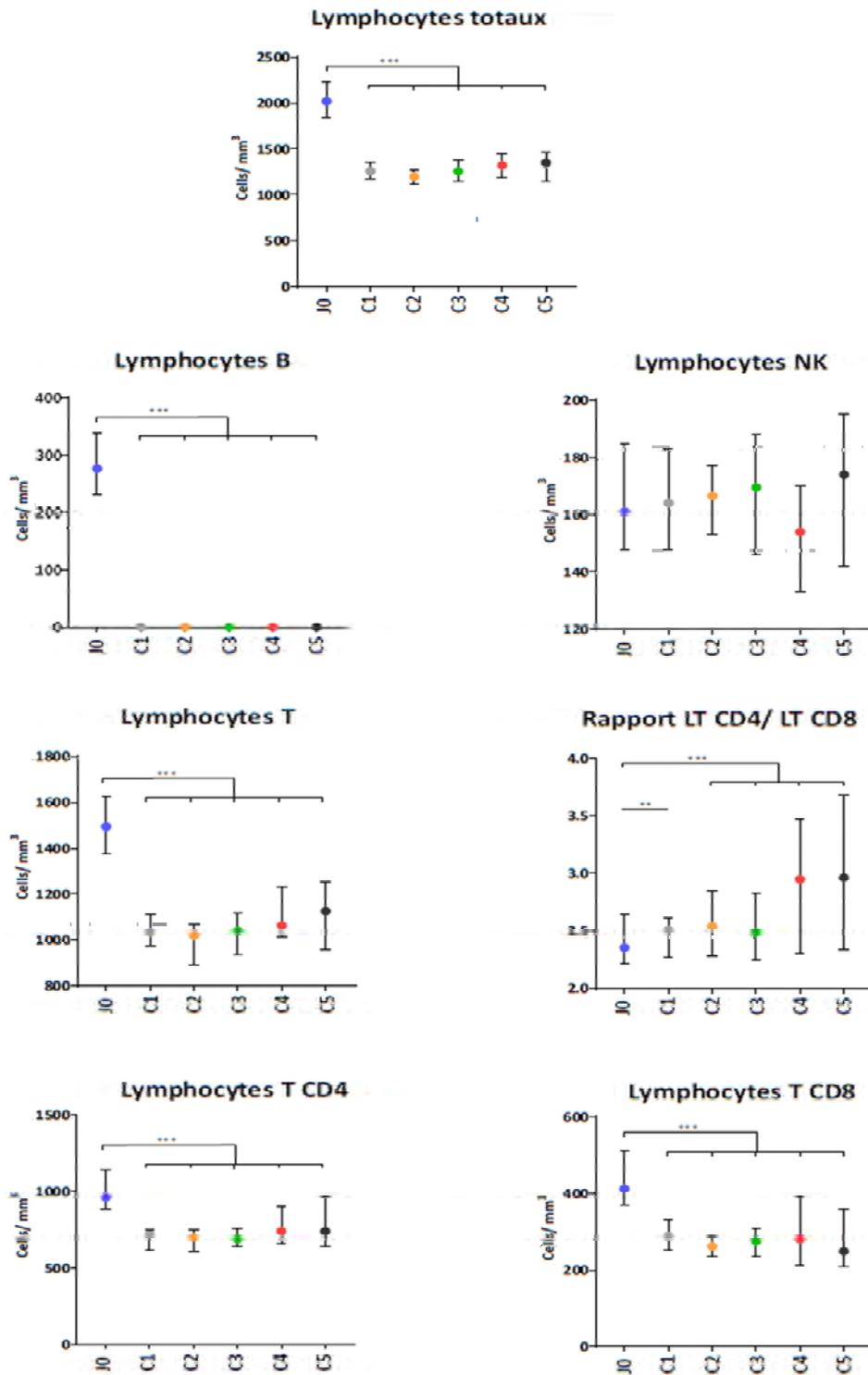


Figure 16 : Représentation des différentes populations lymphocytaires étudiées par l'immunophénotypage TBNK avant l'induction par Rituximab (J0) et lors des cycles de Rituximab successifs, en cellules/mm³ de sang (cells/mm³). Les points représentant les différentes médianes sont encadrées par l'intervalle de confiance à 95 %. Les points bleus symbolisent l'état initial (J0) ; les points gris, l'état à 6 mois du 1^{er} cycle du Rituximab (C1) ; les points jaunes, l'état à 6 mois du 2^{ème} cycle (C2) ; les points verts, l'état à 6 mois du 3^{ème} cycle (C3) ; les points rouges, l'état à 6 mois du 4^{ème} cycle (C4) et les points noirs, l'état à 6 mois du 5^{ème} cycle (C5). Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre les différents cycles sont indiqués. Une P – value < 0,01 est considérée comme significative avec **P < 0,01 ; ***P < 0,0001.

Certains patients présentent au cours des cycles une repopulation lymphocytaire B, définie comme des LB > 5 cellules/ mm³ de sang. Au total, 37,2 % des patients présentent (77 sur 207) au moins une repopulation lors de notre étude. Certains patients présentent plusieurs repopulations, ainsi 1 patient présente cinq repopulations, 2 patients présentent quatre repopulations, 8 patients en présentent trois, 30 patients en présentent deux et 61 patients en présentent une seule. Pour les patients ne présentant pas de repopulation, le délai moyen entre les dates d'administrations du Rituximab et l'immunophénotypage correspondant est de 191,7 j. Pour les patients présentant au moins une repopulation, le délai moyen entre l'immunophénotypage sur le quel est observé la première repopulation et la date d'administration du Rituximab précédente est de 193,1 j. Au total, après l'induction (C1) nous avons 61 patients présentant une repopulation, 34 patients après le premier cycle d'entretien (C2), 22 patients à C3, 12 patients à C4 et 5 patients à C5. Cette proportion de patients ayant une repopulation lymphocytaire B est non négligeable (entre 31,8 et 9,1 % suivant les cycles) et peut paraître surprenante alors que le Rituximab est administré tous les six mois dans le but d'éviter les repopulations.

De plus, nous observons une tendance à la diminution de la proportion de patients ayant des LB quantifiables suite à la répétition des cycles (Figure 17). Cependant, seule la différence de proportion de patients avec des LB quantifiables entre C1 et les cycles suivants sont significatifs, avec entre C1 et C2 une P - value = 0,0043, entre C1 et C3 une P - value = 0,0008, entre C1 et C4 une P - value = 0,0140 et entre C1 et C5 une P - value = 0,0005 (Fisher's exact test).

Par ailleurs, la proportion de patient présentant une repopulation n'est pas dépendante de la forme de SEP (test d'indépendance du Khi - 2, avec une P - value = 0,3511).

Proportion de patients ayant des LB détectables au cours des cycles

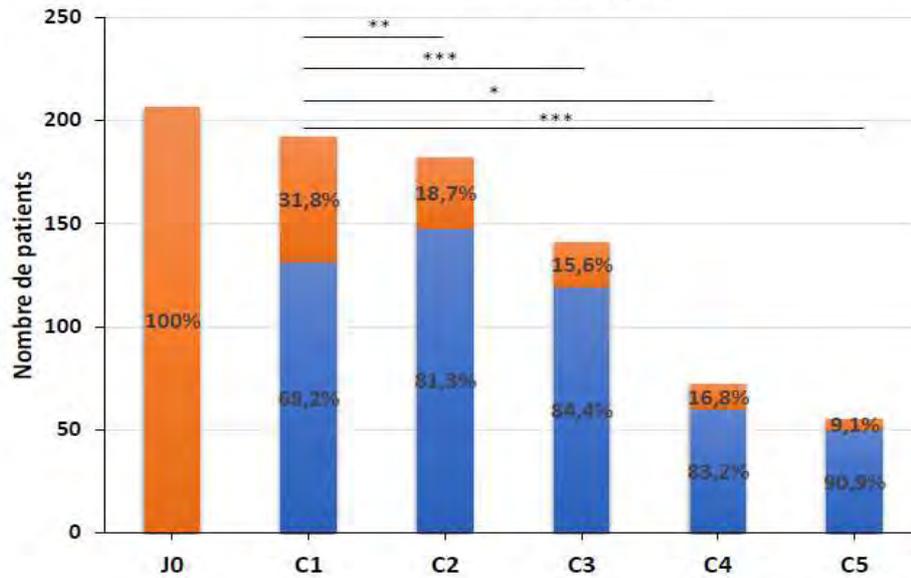


Figure 17 : Représentation de la proportion de patients ayant des Lymphocytes B (LB) détectables au sein de l'ensemble des patients au cours des différents cycles. En orange sont représentés les patients ayant des LB détectables ($> 5 \text{ LB/mm}^3$ de sang), en bleu les patients ayant des LB indétectables ($< 5 \text{ LB/mm}^3$ de sang). Les proportions sont indiquées en pourcentage. Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre les différents cycles sont indiqués. Une P -value $< 0,05$ est considérée comme significative avec $*P < 0,05$; $**P < 0,01$; $***P < 0,001$.

Le nombre relativement important de patients présentant une repopulation B sous Rituximab nous a permis d'étudier les sous-populations lymphocytaires B et leur évolution au cours des cycles de Rituximab. Ainsi, nous avons pu évaluer si les variations des sous-populations lymphocytaires B présentes lors d'une repopulation étaient semblables à celles observées chez les patients atteints d'autres pathologies auto-immunes traités aussi par Rituximab. De plus, nous avons souhaité étudier l'impact de la durée du traitement par Rituximab sur la répartition en termes de fréquence et de concentration des différentes sous-populations lymphocytaires B et ainsi mettre en évidence certaines tendances liées à la répétition des cycles de Rituximab.

Nous disposons des immunophénotypes lymphocytaires B avant l'induction pour 205 patients. Pour les cycles suivants, nous avons étudié les patients présentant une

repopulation et ayant eu un immunophénotypage étendu, à savoir 48, 26, 19, 9 et 4 patients respectivement pour C1, C2, C3, C4, C5. Le faible effectif de patients présentant une repopulation à C5 nous empêche de mettre en évidence des différences significatives entre J0 et C5. Cependant, les valeurs médianes des proportions des différentes sous-populations lymphocytaires B obtenues au C5 semblent être comparables à celles retrouvées après la mise sous-Rituximab et semblent donc différer de J0.

Lorsque nous avons comparé les immunophénotypages lymphocytaires B avant induction à ceux obtenus durant le traitement par Rituximab (C1 ou C2 ou C3 ou C4 ou C5) et donc correspondant aux immunophénotypages de repopulation (Figure 18), nous avons observé une augmentation significative de la proportion de quatre sous-populations lymphocytaires B. En premier lieu, la proportion de LB transitionnels augmente significativement (P -value $< 0,0001$) entre J0 et les cycles suivants (hormis entre J0 et C5 où la P -value = $0,0106$). De même, nous avons observé une augmentation significative de la proportion de LB naïfs entre J0 et C2 (P -value $< 0,0010$), entre J0 et C3 (P -value $< 0,0010$), entre J0 et C1 (P -value $< 0,0100$) et entre J0 et C4 (P -value $< 0,0100$). La proportion de plasmablastes augmente aussi significativement entre J0 et C1 (P -value $< 0,0001$), entre J0 et C2 (P -value $< 0,0001$) et entre J0 et C3 (P -value = $0,0033$). Enfin, nous avons aussi mis en évidence une augmentation de la proportion des LB doubles négatifs entre J0 et C2, entre J0 et C3 (P -value $< 0,0010$), entre J0 et C4 (P -value $< 0,0010$) et entre J0 et C5 (P -value = $0,0333$). Concernant les LB doubles négatifs, nous notons une tendance à l'augmentation de leur proportion chez les patients présentant une repopulation suite à la répétition des cycles d'entretien. En effet, les proportions étaient croissantes au fil des cycles avec 3,3 % à J0 ; 5,3 % à C1 ; 8,0 % à C2 ; 11,0 % à C3 ; 13,0 % à C4 et 13,8 % à C5.

A l'inverse, nous avons observé une diminution significative de la proportion des LB mémoires sur les immunophénotypages de repopulation, avec une P -value = $0,0022$ pour J0 *versus* C1, une P -value $< 0,0010$ pour J0 *versus* C2 et J0 *versus* C3 et enfin, une P -value $< 0,0100$ pour J0 *versus* C4. Il en est de même pour les LB mémoires non commutés, avec une P -value $< 0,0001$ entre J0 et les cycles suivants, hormis entre J0 et C5 où la diminution n'était pas considérée comme significative. Concernant les LB mémoires commutés, nous ne mettons pas en évidence de différence de proportion entre les différents cycles. Cependant, nous observons une tendance à la diminution de la médiane

des proportions de cette sous-population. En effet, les proportions sont décroissantes au fil des cycles avec 14,8 % à J0 ; 9,5 % à C1 ; 8,9 % à C2 ; 6,4 % à C3 ; 4,0 % à C4 et 2,2 % à C5

Les proportions de LB mémoires commutés, de LB « IgM only » et de LB CD21^{low}, elles, ne présentaient pas de variation significative.

Lorsque nous comparons les immunophénotypes des patients présentant une repopulation en fonction des cycles, nous n'observons pas de variation significative de la proportion des différentes sous-populations lymphocytaires B. La répartition en termes de proportion des différentes sous-populations lymphocytaires B lors d'une repopulation ne semblait donc pas dépendante de la durée de traitement par Rituximab. Nous observons cependant une tendance à l'augmentation de la proportion des LB doubles négatifs et à la diminution des LB mémoires commutés. Ces deux résultats sont à nuancer devant l'importance des différents écart-types.

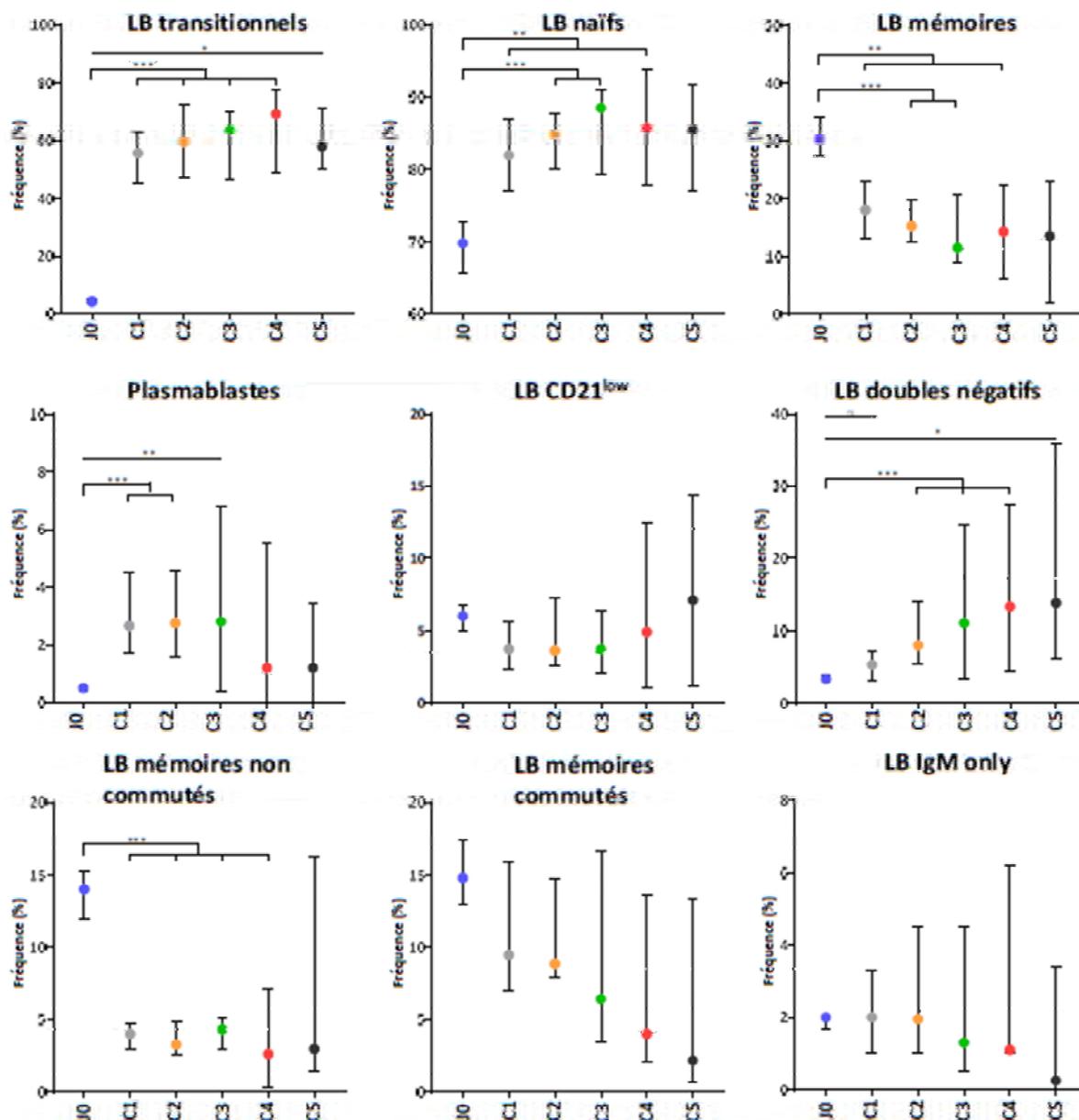


Figure 18 : Représentation de la répartition en termes de proportion des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) et lors des cycles de Rituximab successifs des patients ayant des lymphocytes B (LB) détectables ($> 5 \text{ LB/mm}^3$ de sang). Les points représentent les différentes médianes encadrées par l'intervalle de confiance à 95%. Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre les différents cycles sont indiqués. Une P -value $< 0,05$ est considérée comme significative avec * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Concernant les valeurs absolues de lymphocytes B circulant exprimées en cellules/mm³ de sang (Figure 19), nous avons observé une diminution significative nette de l'ensemble des sous-populations lymphocytaires B entre les valeurs des patients avant l'instauration du traitement et les valeurs des patients ayant des LB détectables lors des cycles suivants ; ceci à l'exception des LB transitionnels et des plasmablastes.

Cette diminution des sous-populations lymphocytaires B est cohérente. Elle s'explique puisque l'ensemble des sous-populations lymphocytaires B étudiées expriment le CD20 et sont ciblées par le Rituximab, et par le fait que les LB transitionnels ainsi que les plasmablastes sont en quantité faible au niveau du compartiment sanguin. De plus, ce sont les deux premières sous-populations qui réapparaissent lors d'une repopulation faisant suite à la fin de l'efficacité biologique du Rituximab. En effet, entre l'immunophénotypage avant traitement de l'ensemble des patients et les immunophénotypages des patients présentant une repopulation en LB lors des différents cycles (C1, C2, C3 et C4), nous avons observé une diminution significative (P – value < 0,0001) des sous-populations suivantes : des LB naïfs, des LB mémoires et des différentes sous-populations de LB mémoires, ainsi que des LB CD21^{low}, des LB doubles négatifs. Il est à préciser que lorsque nous comparons les doubles négatifs entre J0 et C4, la diminution était moins fortement significative (P – value = 0,0175).

Nous avons obtenu peu de variations significatives lorsque nous comparons les sous-populations entre J0 et C5 ; cela étant dû au trop faible effectif de patients (n = 4) ayant une repopulation après le 5^{ème} cycle. Cependant les médianes obtenues à C5 se rapprochent de celles obtenues lors des précédents cycles et semblent donc différer de J0. Dans ce sens et malgré notre faible effectif à C5, nous observons tout de même une diminution significative du nombre de LB naïfs entre J0 et C5 (P – value = 0,0155), du nombre de LB mémoires (P – value = 0,0019), du nombre de LB mémoires non commutés (P – value = 0,0069) et du nombre de LB mémoires commutés (P – value = 0,0012). Enfin, nous avons observé aussi une diminution significative des LB CD21^{low} entre J0 et C5 (P – value = 0,0160).

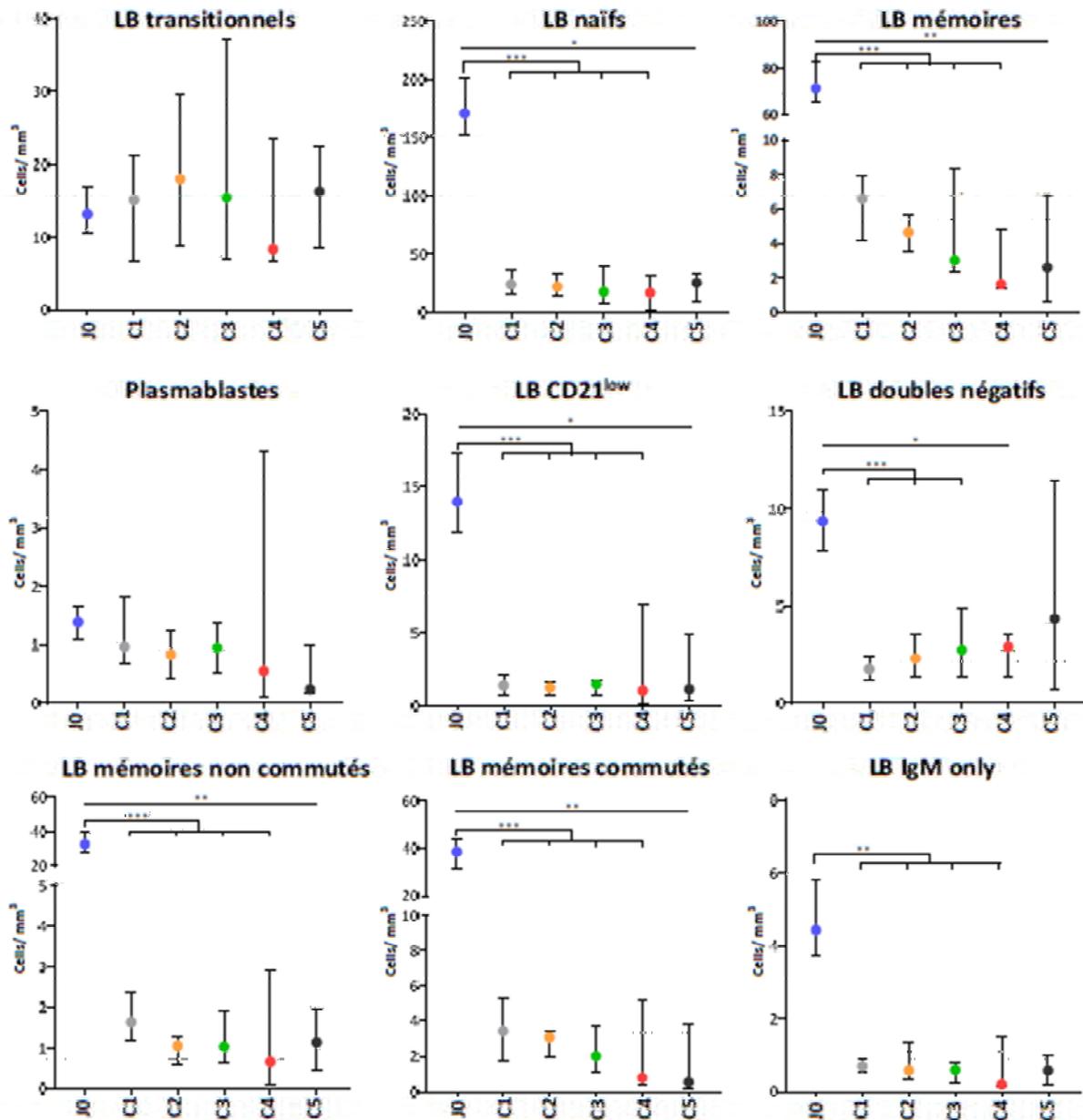


Figure 19 : Représentation des différentes sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) et lors des cycles successifs de Rituximab des patients ayant des lymphocytes B (LB) détectables ($> 5 \text{ LB/mm}^3$ de sang), en cellules/ mm^3 de sang (cells/mm^3). Les points représentent les différentes médianes encadrées par l'intervalle de confiance à 95%. Les points bleus symbolisent l'état initial (J0) ; les points gris, l'état à 6 mois du 1^{er} cycle du Rituximab (C1) ; les points jaunes, l'état à 6 mois du 2^{ème} cycle (C2) ; les points verts, l'état à 6 mois du 3^{ème} cycle (C3) ; les points rouges, l'état à 6 mois du 4^{ème} cycle (C4) et les points noirs, l'état à 6 mois du 5^{ème} cycle (C5). Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre les différents cycles sont indiqués. Une P-value $< 0,05$ est considérée comme significative avec * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4. Evaluation de l'impact de la dose d'entretien de Rituximab sur les différentes populations lymphocytaires

Dans notre étude, les premiers patients atteints de SEP et traités par Rituximab recevaient une cure d'entretien, comprenant 2 administrations de 1 g séparées de 2 semaines, soit 2 g au total. A partir de juillet 2017, il a été décidé au CHU de Toulouse de faire passer la dose d'entretien du traitement par Rituximab dans le traitement de la SEP, de 2x1 g à 1x1 g. C'est pourquoi nous avons souhaité étudier si ce changement de posologie avait un impact sur les représentations des différentes sous-populations lymphocytaires. Dans notre étude, 41 patients ont reçu la première cure d'entretien à la posologie de 2 g et 166 patients ont reçu la première cure d'entretien à la posologie de 1 g. Nous avons donc comparé les immunophénotypes C2 (Figure 20), correspondant à l'effet à 6 mois de la première cure d'entretien de Rituximab. Il est à noter que nous avons des données de C2 uniquement pour 28 patients ayant reçu 2 g et pour 164 patients ayant reçu 1 g.

Nous n'avons pas observé de différences significatives en termes de valeurs absolues (cellules/mm³) entre les deux schémas d'entretien concernant les populations lymphocytaires analysées par le panel TBNK.

Concernant les sous-populations lymphocytaires B, la proportion de LB doubles négatifs est augmentée chez les patients ayant reçu une dose d'entretien de 1x1g (P – value = 0,0216). A l'inverse, la proportion de LB mémoires non commutés est diminuée chez ces patients (P – value = 0,0012). En termes de valeurs absolues, les patients ayant reçu 1x1g de Rituximab, présentent un nombre diminué de LB IgM only (P – value = 0,0168) et de LB mémoires non commutés (P – value = 0,0389).

De plus, 20 patients sur les 28 (71,4 %) ayant reçu une première cure d'entretien à 2 g ne présentent pas de repopulation lymphocytaire B à 6 mois de cette cure. Pour les patients ayant reçu la première cure d'entretien à 1 g, nous avons 111 patients sur 164 (67,7 %) qui ne présentent pas de repopulation à 6 mois. Les proportions de patients sans repopulation ne sont donc pas significativement différentes entre nos deux groupes (test Khi - 2, risque $\alpha = 5 \%$, P – value = 0,6940). L'effet d'une cure d'entretien à 2 g de Rituximab sur les différentes populations lymphocytaires au niveau sanguin semble peu différer d'une cure d'entretien à 1 g de Rituximab.

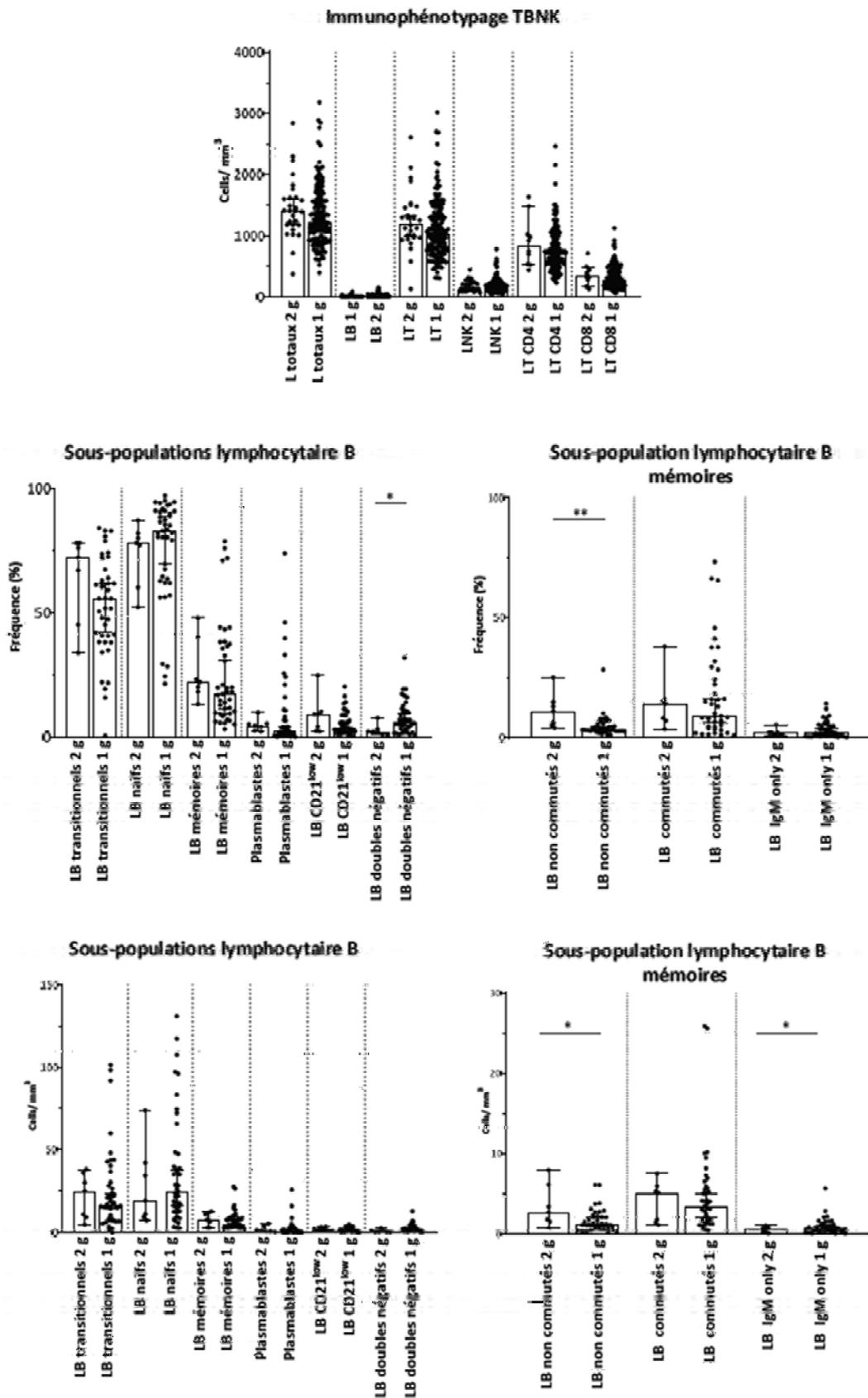


Figure 20 : Comparaison de la répartition des populations lymphocytaires analysée par le panel TBNK et des sous-populations lymphocytaires B suite au premier cycle d'entretien (C2) entre les patients ayant reçu 2 g de Rituximab et ceux ayant reçu 1 g. Les médianes

apparaissent encadrées de l'intervalle de confiance à 95 %, avec l'immunophénotypage TBNK en en cellules/mm³ (cells/mm³) et l'immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires B en pourcentage et en cellules/mm³. Seuls les résultats significatifs des tests statistiques entre les différents cycles sont indiqués. Une P – value < 0,05 est considérée comme significative avec *P < 0,05 ; **P < 0,01. LB : Lymphocytes B ; LT : Lymphocytes T ; LNK : lymphocytes Natural Killer.

5. Comparaison des immunophénotypes lymphocytaires avant traitement des patients ayant une repopulation lymphocytaire B et des patients n'ayant pas de repopulation

Certains patients présentaient au cours des cycles une repopulation lymphocytaire B, définie comme des LB > 5 cellules/mm³ de sang. Nous avons donc souhaité évaluer si des différences au niveau des immunophénotypes avant traitement par Rituximab existaient entre les patients présentant une repopulation (repop+) et ceux n'en présentant pas (repop-) (Figure 21).

Dans notre étude 77 patients présentaient au moins une repopulation (repop+). Sur ces 77 patients, 76 avaient un immunophénotypage TBNK et 66 avaient une numération de LTCD4 et LTCD8. Concernant les patients sans repopulation (repop-), l'effectif était de 114 et l'intégralité de ces patients avait eu un immunophénotypage TBNK et 96 avaient eu une numération LTCD4, LTCD8.

En comparant l'immunophénotypage avant traitement par Rituximab de ces 76 patients aux patients n'ayant jamais présentés de repopulation, nous avons observé une diminution du nombre de LNK des patients du groupe repop+ (P – value = 0,0097). Aucune différence significative n'est mise en évidence sur le reste du panel TBNK et sur la numération LT CD4/ LT CD8.

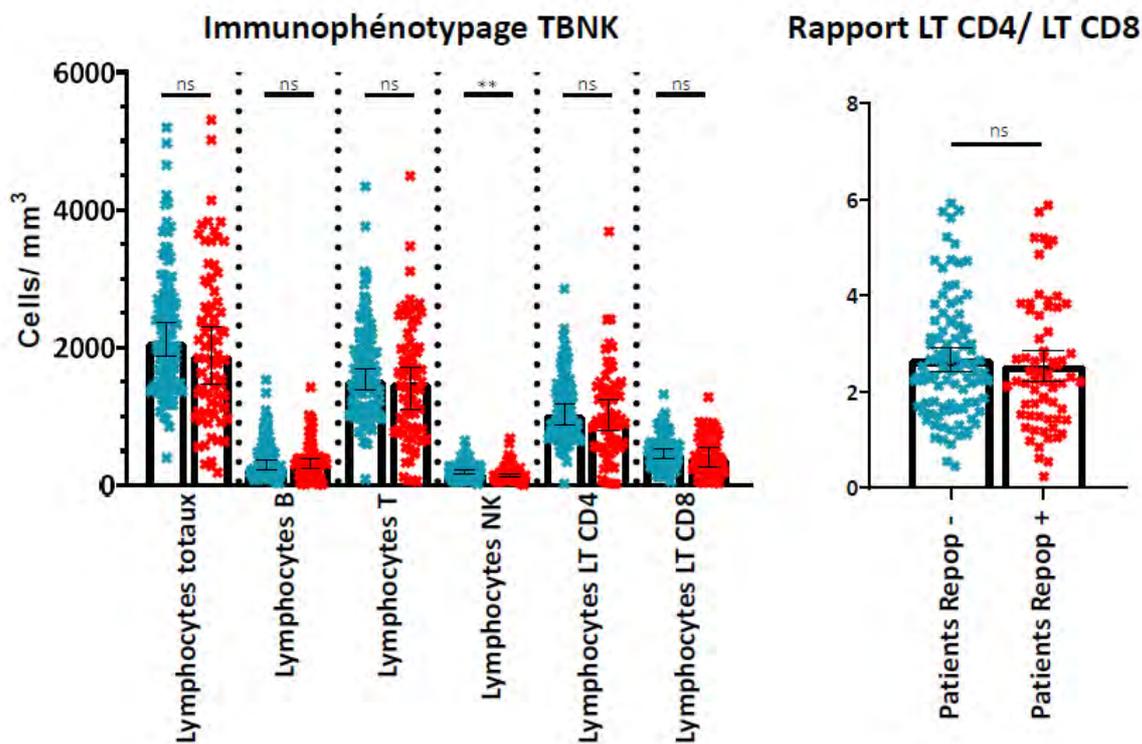


Figure 21 : Représentation de l'étude des populations lymphocytaires avant traitement par Rituximab (J0) entre les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (Lymphocytes B < 5 / mm³ de sang) lors des cycles de Rituximab et les patients présentant une repopulation lymphocytaire B lors d'au moins un cycle. Les médianes apparaissent encadrées par l'intervalle de confiance à 95, en cellules/mm³ de sang (cells/mm³). En bleu sont représentés les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (repop -) et en rouge les patients ayant une repopulation lymphocytaire B (repop +). Une P – value < 0,05 est considérée comme significative avec ; **P < 0,01. Les résultats non significatifs sont indiqués (ns). LT : lymphocytes T ; NK : Natural Killer.

Concernant l'immunophénotypage lymphocytaire B avant traitement par Rituximab nous avons des données pour 113 patients sans repopulation et pour 75 patients présentant une repopulation.

Lorsque nous avons étudié la répartition en termes de proportion des sous-populations lymphocytaires B (Figure 22), nous avons observé chez les patients repop+ une augmentation de la proportion des LB transitionnels (P – value = 0,0008), des LB naïfs (P – value = 0,0043) et des plasmablastes (P – value = 0,0065). Il est intéressant de noter que ces trois sous-populations sont les premières sous-populations présentes lors de la

repopulation. A l'inverse, nous observons une diminution significative de la représentation des LB mémoires (P – value = 0,0043), des LB mémoires non commutés (P – value = 0,0017), des LB mémoires commutés (P – value = 0,0126), des LB CD21^{low} (P – value = 0,0279) et enfin des LB doubles négatifs (P – value = 0,0466). La seule sous-population ne présentant pas de différence de représentation entre nos deux groupes de patients est celle des LB « IgM only »

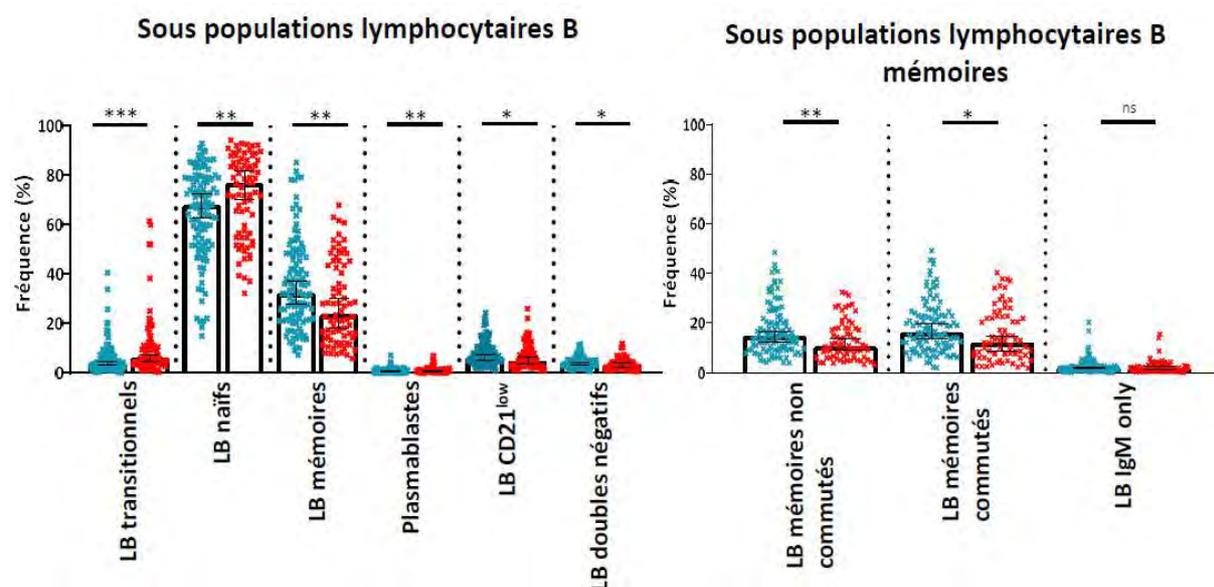


Figure 22 : Représentation en termes de fréquence (%) des sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) entre les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (Lymphocytes B < 5 / mm³ de sang) lors des cycles de Rituximab et les patients présentant une repopulation lymphocytaire B lors d'au moins un cycle. Les médianes apparaissent encadrées par l'intervalle de confiance à 95 %. En bleu sont représentés les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (repop -) et en rouge les patients ayant une repopulation lymphocytaire B (repop +). Une P – value < 0,01 est considérée comme significative avec ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001. Les résultats non significatifs sont indiqués (ns). LB : lymphocytes B.

Concernant l'analyse en valeurs absolues (Figure 23), nous observons un nombre initial de LB transitionnels et de plasmablastes significativement supérieur chez les patients présentant une repopulation (respectivement P – value = 0,0128 et 0,0117). Nous n'observons pas de variation sur le plan quantitatif entre nos deux groupes de patients pour les autres sous-populations lymphocytaires B.

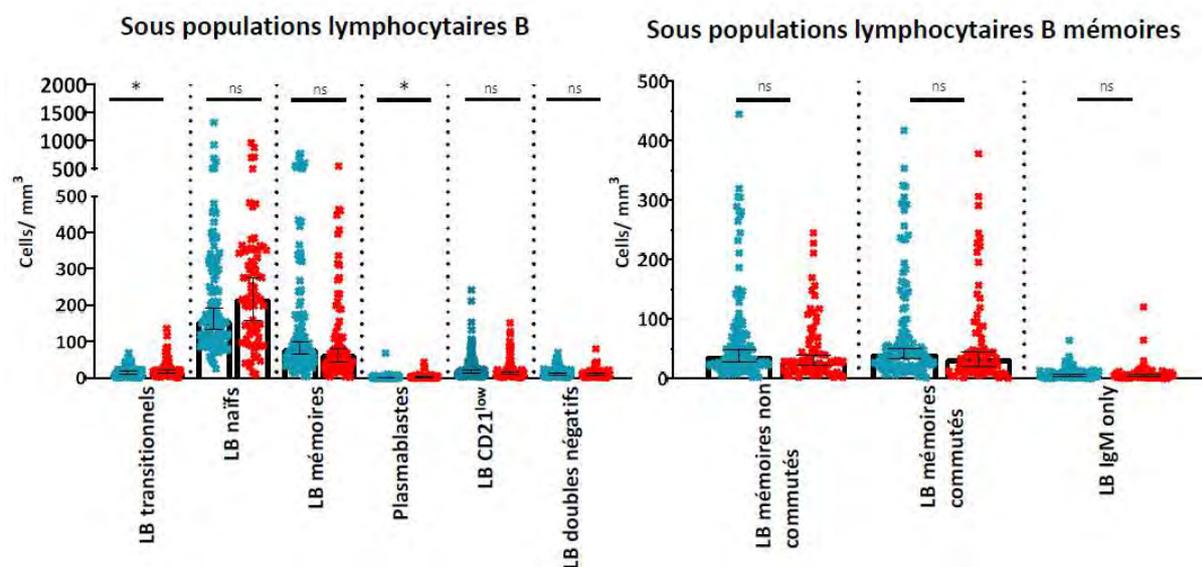


Figure 23 : Représentation de l'étude des sous-populations lymphocytaires B avant traitement par Rituximab (J0) entre les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (Lymphocytes B < 5 / mm³ de sang) lors des cycles de Rituximab et les patients présentant une repopulation lymphocytaire B lors d'au moins un cycle. Les médianes apparaissent encadrées par l'intervalle de confiance à 95 %, en cellules / mm³ de sang (cells/mm³). En bleu sont représentés les patients n'ayant pas de repopulation lymphocytaire B (repop -) et en rouge les patients ayant une repopulation lymphocytaire B (repop +). Une P – value < 0,05 est considérée comme significative avec ; *P<0,05. Les résultats non significatifs sont indiqués (ns). LB : lymphocytes B.

Nous avons ensuite voulu déterminer si les variations observées à J0, entre les patients du groupe repop+ et les patients du groupe repop-, pouvaient être liées à l'effet d'un antécédent de TFI. Pour rappel, seul un antécédent de traitement par Natalizumab ou par Fingolimod entraîne une modification de l'immunophénotypage initial par rapport aux patients sans TFI.

Tout d’abord, nous avons réalisé un test d’indépendance du Khi - 2 pour déterminer si la proportion de patients présentant une repopulation était dépendante de l’antécédent de TFI (Tableau 3). Pour être dans les bonnes conditions d’application du test, nous avons regroupé en un unique groupe les patients traités par IFN- β , par corticoïdes ou appartenant au groupe « autre TFI ». En effet, nous avons précédemment montré l’absence de différences des immunophénotypes initiaux entre ces trois groupes de patients. Nous obtenons $X^2= 4,20$; ce qui au risque $\alpha = 0,05$ est non significatif. Dans notre étude, nous n’observons donc pas de dépendance entre l’antécédent de TFI et la proportion de patients ayant une repopulation. Nous n’avons donc pas de surreprésentation des patients ayant un antécédent de traitement par Natalizumab ou Fingolimod dans les groupes de patients avec ou sans repopulation.

	Effectif de patients avec repopulation (proportion)	Patients sans repopulation
Sans TFI	22 (39,3 %)	34
Natalizumab	13 (28,3 %)	33
Fingolimod	10 (45,5 %)	12
IFN-β	4 (40,0 %)	6
Corticoïdes	2 (20,0 %)	8
Autres TFI	26 (55,3 %)	21

Tableau 3 : Répartition des patients avec ou sans repopulation en fonction des antécédents des traitements de fond immunomodulateurs (TFI). IFN- β : interféron β .

D. Discussion

L'étude des immunophénotypages des 207 patients atteints de SEP nous a permis de répondre à plusieurs de nos interrogations. Et elle donne des arguments supplémentaires pour confirmer l'intérêt d'un monitoring par un immunophénotypage des sous-populations lymphocytaires B des patients traités par Rituximab dans la SEP. De plus, cette étude a permis d'apporter des éléments complémentaires concernant les effets des différents TFI sur les sous-populations lymphocytaires. Nous avons également pu évaluer l'impact d'un traitement répété et prolongé par anti-CD20 sur ces mêmes sous-populations. Ce travail a permis de préciser le profil de repopulation, encore peu étudié dans la SEP, mais déjà bien identifié dans d'autres pathologies comme la NMO par exemple. Nous avons essayé d'identifier les patients susceptibles de présenter une repopulation entre deux cures par l'analyse des immunophénotypages avant traitement. Et enfin, nous avons pu observer l'impact du changement de schéma d'entretien sur les sous-populations lymphocytaires B.

Dans notre étude, seul un antécédent de traitement par Natalizumab ou Fingolimod entraîne une variation de la représentation des différentes populations lymphocytaires et ce de façon opposée. En effet, le Natalizumab entraîne une augmentation et le Fingolimod une diminution du nombre de cellules. Les variations sous ces deux traitements sont importantes et touchent en terme quantitatif la majorité des sous-populations lymphocytaires. Ces fluctuations sont par ailleurs déjà connues [73], [72] et sont cohérentes avec les mécanismes d'action de ces deux molécules. Nous observons néanmoins quelques discordances entre notre étude et l'étude de Dooley.J *et al.* [72]. En effet, nous constatons sous Natalizumab des variations de certaines populations lymphocytaires et sous-populations lymphocytaires B non retrouvées dans l'étude de Dooley.J *et al.* Ceci est probablement dû à leur faible effectif de patients sous Natalizumab (9 patients) par rapport à l'effectif de notre étude (48 patients). Cependant, des études avec des effectifs plus importants de patients traités par Natalizumab montrent elles aussi, une augmentation des LT, des LB, des LNK et des LB mémoires [74],[75]. A l'inverse, notre effectif de patients sous IFN- β est faible (12 patients), ce qui peut expliquer que nous ne mettons pas en évidence de variation significative chez ces sujets.

A notre connaissance, notre étude est la première à analyser les variations des populations lymphocytaires analysées par le panel TBNK des patients atteints de SEP et traités par

Rituximab, au sein d'une cohorte aussi importante et sur une période aussi longue. Un traitement de fond par Rituximab induit bien sûr une diminution quantitative des LB, mais aussi des LT, des LT CD4 et LT CD8. En effet, nous avons observé une diminution d'environ d'un tiers des LT et des sous-populations lymphocytaires T majeures (LT CD4 et LTCD8). Cette diminution quantitative semble être plus importante pour les LT CD8 et conduit à une élévation significative du rapport LT CD4/ LT CD8. Ces variations sont similaires à celles observées chez les patients atteints de PR et traités par Rituximab [76]. Dans la PR, il a été montré qu'une absence de déplétion des LT CD4 suite à un traitement par Rituximab était associée à une absence de réponse clinique [76]. De plus, les LT CD4 jouant un rôle majeur dans la physiopathologie de la SEP, il serait donc très intéressant d'étudier si la réponse clinique au Rituximab est associée à la diminution des LT CD4. Cependant nos résultats diffèrent de ceux observés par Ellrichmann *et al.* [71]. En effet, dans cette étude les LT CD4 en valeur absolue diminuent lors du premier cycle de Rituximab, mais reviennent à l'état initial par la suite. De plus, aucune variation quantitative des LT CD8 n'était mise en évidence.

Par ailleurs, l'étude de Waisman.A *et al.* [21] propose que l'efficacité thérapeutique du Rituximab dans le traitement de la SEP découle principalement de son action de déplétion d'une sous-population de LT CD8 exprimant le CD20. En effet, cette population est retrouvée en proportion augmentée chez les patients atteints de SEP. Mais cette sous-population est minoritaire et résumer l'effet thérapeutique du Rituximab à la seule déplétion de cette sous-population peut paraître réducteur. Cependant, de plus en plus de travaux montrent le rôle important des LT CD8 dans la SEP. En effet, les LT CD8 sont retrouvés en quantité bien supérieure aux LT CD4 dans le SNC au niveau des espaces périvasculaires et dans les lésions parenchymateuses [77]. De plus, ces LT CD8 sont activés dans les lésions parenchymateuses et une corrélation est retrouvée entre la quantité de LT CD8 présente et l'importance des dommages axonaux. Les LT CD8 jouent probablement un rôle d'effecteur terminal majeur dans la pathogénèse de la SEP. La diminution des LT CD8 induite par le Rituximab découle possiblement de la diminution des LB qui induit une diminution des LT CD4 et de l'état pro-inflammatoire. Ainsi l'efficacité clinique du Rituximab est peut-être le reflet de la diminution des LT CD8, retrouvée notamment dans notre étude.

Enfin, nous observons l'absence de variation des quantités de LNK suite à un traitement par Rituximab, pouvant s'expliquer par l'indépendance des LNK pour leur survie et prolifération vis-à-vis des LB.

Nos résultats viennent donc renforcer l'importance des LB dans la survie et la prolifération des LT CD4 et LT CD8.

Il est intéressant de noter que plus d'un tiers des patients (37,2 %) présente au moins une repopulation lors du traitement. De plus, cette proportion est probablement sous-estimée car la période d'analyse de notre étude ne nous permet pas de recueillir les données correspondant à deux ans de traitement pour l'intégralité de nos patients. Par ailleurs, nous observons une tendance à la diminution du nombre de patients ayant une repopulation suite à la répétition des cycles d'entretien par Rituximab. Cette diminution ne semble pas liée à un rapprochement des cycles de Rituximab, puisque les durées moyennes entre les cycles (Tableau 2) ne diffèrent pas significativement. Cette donnée pourrait suggérer que la répétition des administrations de Rituximab va entraîner une déplétion de plus en plus profonde au niveau des organes lymphoïdes secondaires et ainsi diminuer les capacités de régénération des LB [42]. Cependant, les cures d'entretiens sont parfois rapprochées pour les patients présentant plusieurs repopulations. Le nombre de patients concernés est toutefois très minoritaire. Néanmoins, ceci pourrait contribuer à fausser notre interprétation de la diminution du nombre de patients présentant des repopulations.

Notre analyse des patients présentant une repopulation lymphocytaire B lors d'un traitement par Rituximab montre que lors de la repopulation, les immunophénotypes sont similaires à ceux observés dans la PR, le LES et la NMO. Ces repopulations correspondent à une augmentation des LB transitionnels qui sont issus de l'effort de régénération de la moelle osseuse entraîné par la déplétion en LB induite par le Rituximab. Les plasmablastes sont également surreprésentés. Ils expriment peu le CD20 et selon certains auteurs, ils sont issus de la régénération ayant lieu au niveau des centres germinatifs à partir des LB mémoires qui ont survécu à la déplétion au sein des organes lymphoïdes secondaires [42]. Les LB naïfs sont aussi logiquement retrouvés en proportion augmentée lors de la repopulation. Il est à noter que le nombre de LB transitionnels et de plasmablastes reste inchangé, alors que l'ensemble des autres sous-populations lymphocytaires B est retrouvé en quantité très inférieure par rapport à l'état avant induction.

A notre connaissance, notre étude est la première à montrer une augmentation de la proportion des LB doubles négatifs lors de la repopulation. De plus, la proportion de LB doubles négatifs semble augmenter avec la durée de traitement par Rituximab et la répétition des cycles. Ce point est intéressant à signaler. En effet, les LB doubles négatifs

sont présentés comme des LB mémoires « épuisés » et retrouvés en quantité augmentée chez les personnes âgées. L'administration répétée de Rituximab pourrait donc être à l'origine d'un épuisement des LB mémoires ayant survécu dans les organes lymphoïdes secondaires et responsables de la régénération lymphocytaire B périphérique. Ces LB mémoires à force d'être stimulés par les déplétions successives pourraient être à l'origine de ces LB doubles négatifs. Enfin, si les LB CD21^{low} et LB « IgM only » voient leur concentration diminuer entre l'état initial et la repopulation, leur représentation en termes de proportion ne semble pas affectée. L'analyse de ces sous-populations chez des patients traités par Rituximab est cependant délicate. En effet, un nombre restreint de patients présentent une repopulation. De plus, ces patients ont un nombre de LB faible pouvant conduire à des imprécisions de mesure des sous-populations lymphocytaires B par CMF.

La dose d'entretien du Rituximab (2x1g ou 1x1g) ne semble pas avoir d'effet majeur sur les différentes populations et sous-populations lymphocytaires étudiées. De plus, les patients ayant une dose d'entretien diminuée (1x1g) ne présentent pas de repopulation plus fréquente. L'utilisation d'une dose d'entretien réduite ne semble donc pas délétère sur le plan des immunophénotypages, mais cela est à confirmer par une confrontation aux données cliniques de ces patients.

Enfin, lorsque nous comparons les immunophénotypages TBNK et lymphocytaires B étendus avant traitement par Rituximab (J0) des patients présentant une repopulation à ceux des patients sans repopulation, nous mettons en évidence une variation significative en termes de concentration, uniquement pour trois populations. Tout d'abord, nous avons observé une quantité moins importante des LNK chez les patients présentant une repopulation. Ce résultat est intéressant car les LNK sont des effecteurs recrutés par le Rituximab pour induire la destruction des LB via l'ADCC. Une quantité inférieure en LNK pourrait donc favoriser une repopulation précoce. Puis, nous avons observé une quantité supérieure des LB transitionnels et des plasmablastes à J0 des patients présentant une repopulation, or ces sous-populations sont les premières à être détectées lors d'une repopulation. En termes de proportion, nous retrouvons une surreprésentation de ces deux dernières sous-populations, ainsi que de celle des LB naïfs qui forment par ailleurs la troisième population à apparaître lors d'une régénération. Par ailleurs, nous avons montré que ces variations n'étaient pas dépendantes d'un éventuel TFI.

Notre travail comporte néanmoins certaines limites. En effet, nous avons centré notre étude sur l'analyse du compartiment sanguin, or les lymphocytes sont très majoritairement présents au niveau des organes lymphoïdes. Nous avons donc analysé les représentations et les variations des différentes populations lymphocytaires et sous-populations lymphocytaires B par un échantillonnage qui peut être critiquable. De plus, la SEP est une pathologie atteignant le SNC. Cependant le SNC est séparé de la circulation sanguine par la barrière hémato-encéphalique, qui est une barrière peu perméable et très sélective. Ainsi, les populations lymphocytaires présentes dans le SNC et responsables de la majorité des événements d'immuno-pathogénèse sont potentiellement différents de ceux présents dans la circulation sanguine. L'analyse du compartiment sanguin est donc imparfaite et insuffisante, mais de par sa facilité d'accès reste intéressante. Ensuite, nos techniques d'analyse utilisées par la CMF nous permettent de faire une étude phénotypique, mais non fonctionnelle des différentes populations lymphocytaires. Par exemple, nous n'avons pas analysé le caractère pro-inflammatoire de nos différentes sous-populations. De plus, le manque d'homogénéité des immunomarquages entre les différentes études rend difficiles leur comparaison et la compréhension globale du rôle des LB dans la SEP.

Enfin, nous avons constaté une perte de données importante qui pouvait être liée aux difficultés et aux aléas de la prise en charge des patients ; ce malgré une volonté de systématisation des analyses. A cela vient se rajouter le fait que les patients évoluent peu sous Rituximab, rendant le recueil d'informations cliniques sur la période de l'étude insuffisant. Ce défaut d'informations complique l'interprétation de nos résultats, et les rend peu applicables en pratique.

CONCLUSION

La SEP est une pathologie neuro-inflammatoire de physiopathologie complexe dans laquelle des études récentes mettent en avant les rôles multiples des LB. Pour ces raisons, les anticorps thérapeutiques anti-CD20 ciblant principalement les LB sont de plus en plus fréquemment utilisés et montrent des résultats intéressants dans la prise en charge des patients. Dans certaines pathologies auto-immunes traitées par Rituximab, il a été montré l'intérêt d'un suivi des LT et notamment des LT CD4, mais aussi l'intérêt d'un monitoring des administrations de Rituximab basé sur la surveillance de certaines sous-populations lymphocytaires B dans le compartiment sanguin.

Notre étude a permis de faire un état des lieux sur une analyse large bien que non exhaustive, des populations lymphocytaires et des sous-populations lymphocytaires B. Ainsi, nous avons complété l'analyse des immunophénotypes de repopulations suite à une déplétion induite par le Rituximab. Nous avons montré qu'une part importante des patients présente une repopulation lymphocytaire B et ce malgré un traitement d'entretien par Rituximab. Nous avons confirmé que les sous-populations lymphocytaires B présentes lors de la repopulation étaient celles des LB transitionnels, des plasmablastes et celle des LB naïfs, comme cela était décrit dans d'autres pathologies auto-immunes traitées par anti-CD20. Nous avons montré qu'une déplétion en LB conduisait dans la SEP à une diminution des LT, touchant plus fortement les LT CD8 et entraînant une augmentation du rapport LT CD4/ LT CD8. De plus, lors d'une repopulation, la proportion des LB doubles négatifs semble augmenter avec la répétition des cycles de Rituximab. Nous avons montré que les patients présentant une repopulation entre deux cycles ont une quantité de LNK inférieure aux autres patients, avant l'instauration du traitement par anti-CD20 ; or les LNK sont des effecteurs importants pour l'activité du Rituximab. De plus avant l'instauration d'un traitement par Rituximab, nous avons observé une sur-représentation des sous-populations lymphocytaires B majoritaires lors d'une repopulation, telles que celles des LB transitionnels, des plasmablastes et des LB naïfs. Ces différences avant traitement sont par ailleurs indépendantes d'un antécédent de TFI. Enfin, une cure d'entretien d'une unique perfusion de Rituximab de 1 g par rapport à une cure d'entretien comprenant deux perfusions de 1 g

n'entraîne pas de différence majeure au niveau de la représentation des différentes populations lymphocytaires étudiées.

L'intérêt du suivi des populations lymphocytaires et des sous-populations lymphocytaires B pourrait être renforcé par l'intégration et l'analyse des données cliniques des patients, sur une période d'étude suffisante pour observer les éventuelles évolutivités de la pathologie des patients. Le déclenchement des perfusions d'un traitement par anticorps anti-CD20 monitoré sur le suivi des sous-populations lymphocytaires B, plus particulièrement celle des LB mémoires, mériterait d'être étudié dans l'objectif d'une médecine plus personnalisée et efficace.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Répartition nombre de cycle par patients

	Nombre de patients
1 cycle au total	0
2 cycles au total	11
3 cycles au total	49
4 cycles au total	74
5 cycles au total	73

ANNEXE 2 : Statistiques descriptives des TBNK à J0 (cell/mm³) suivant le traitement de fond immunomodulateur l'année précédant l'instauration du Rituximab

		Médiane (min ; max) en Cell/mm ³	Ecart-type en Cell/mm ³
Lymphocytes	Sans TFI	2024 (637 ; 5198)	828,4
	Natalizumab	3045 (280 ; 5307)	957,5
	Fingolimod	1246 (187 ; 2607)	602
	Cortico seul	1927 (1136 ; 2713)	556,9
	Interféron-β	1560 (989 ; 2416)	481,2
	Autre TFI	1546 (560 ; 5015)	879
LB	Sans TFI	264 (107 ; 927)	151,6
	Natalizumab	722 (8 ; 1533)	310,7
	Fingolimod	119,5 (9 ; 383)	95,98
	Cortico seul	203 (61 ; 431)	97,98
	Interféron-β	321,5 (90 ; 565)	155,3
	Autre TFI	186 (44 ; 636)	145,1
LT	Sans TFI	1538 (341 ; 4340)	718,2
	Natalizumab	2049 (62 ; 3760)	686,8
	Fingolimod	973,5 (71 ; 2166)	510,9
	Cortico seul	1437 (791 ; 2469)	555,3
	Interféron-β	1161 (800 ; 2043)	401,3
	Autre TFI	1190 (325 ; 4492)	759,2
LNK	Sans TFI	155 (55 ; 685)	105,2
	Natalizumab	264 (109 ; 650)	131,8
	Fingolimod	156 (62 ; 459)	101,7
	Cortico seul	191 (71 ; 512)	130,7
	Interféron-β	122 (25 ; 216)	49,26
	Autre TFI	125,5 (6 ; 355)	78,18
LT CD4	Sans TFI	1000 (268 ; 2412)	451,7
	Natalizumab	1262 (26 ; 2855)	539,5
	Fingolimod	445 (22 ; 1054)	305,6
	Cortico seul	927 (463 ; 1680)	397
	Interféron-β	967 (552 ; 1409)	302
	Autre TFI	849 (238 ; 3686)	656,1
LT CD8	Sans TFI	412 (70 ; 1323)	257,6
	Natalizumab	638 (31 ; 1280)	240,6
	Fingolimod	254 (29 ; 844)	241,9
	Cortico seul	364,5 (202 ; 618)	130,6
	Interféron-β	237 (164 ; 632)	162
	Autre TFI	366 (90 ; 921)	226,2
CD4/CD8	Sans TFI	2,652 (0,900 ; 5,747)	1,164
	Natalizumab	2,222 (0,839 ; 5,196)	0,8999
	Fingolimod	1,187 (0,227 ; 3,479)	0,8498
	Cortico seul	2,217 (1,163 ; 4,723)	1,172
	Interféron-β	3,489 (1,746 ; 5,886)	1,262
	Autre TFI	2,677 (1,114 ; 5,929)	1,478

ANNEXE 3 : Statistiques descriptives des sous-populations lymphocytaires B à J0 (cell/mm³) suivant le traitement de fond immunomodulateur l'année précédant l'instauration du Rituximab

		Médiane (min ; max) en cells/ mm ³	Ecart-type (cells/ mm ³)
LB transitionnels	Sans TFI	9,43 (0,74 ; 75,60)	14,73
	Natalizumab	22,37 (0,00 ; 135,40)	22,24
	Fingolimod	14,27 (2,82 ; 57,45)	11,26
	Autre TFI	9,34 (0,00 ; 115,50)	25,88
	Corticoïdes	9,70 (1,46 ; 19,14)	6,73
	Interféron-β	9,58 (0,27 ; 53,86)	18,19
LB naïfs	Sans TFI	160,70 (51,12 ; 509,60)	110,70
	Natalizumab	347,00 (0,00 ; 1323,00)	257,80
	Fingolimod	88,49 (10,19 ; 275,80)	71,71
	Autre TFI	135,40 (31,68 ; 508,80)	120,00
	Corticoïdes	115,10 (28,06 ; 300,70)	84,71
	Interféron-β	213,80 (44,79 ; 481,90)	128,40
LB mémoires	Sans TFI	76,10 (14,30 ; 447,70)	76,19
	Natalizumab	330,30 (0,00 ; 774,30)	185,10
	Fingolimod	37,01 (2,07 ; 107,20)	29,10
	Autre TFI	43,23 (8,16 ; 500,10)	82,70
	Corticoïdes	66,78 (28,24 ; 130,30)	37,49
	Interféron-β	53,63 (21,12 ; 227,50)	61,23
LB mémoires non commutés	Sans TFI	31,64 (5,72 ; 244,70)	36,76
	Natalizumab	139,20 (0,00 ; 444,30)	98,22
	Fingolimod	20,92 (1,51 ; 68,94)	16,38
	Autre TFI	19,05 (4,32 ; 244,80)	42,20
	Corticoïdes	28,47 (11,77 ; 76,67)	23,61
	Interféron-β	33,39 (11,52 ; 125,20)	36,20
LB mémoires commutés	Sans TFI	38,92 (8,58 ; 227,60)	44,74
	Natalizumab	162,40 (0,00 ; 417,20)	102,50
	Fingolimod	14,80 (0,31 ; 49,79)	14,22
	Autre TFI	20,57 (3,36 ; 256,50)	40,76
	Corticoïdes	28,73 (14,43 ; 66,58)	15,82
	Interféron-β	27,07 (7,68 ; 100,80)	25,89
LB IgM only	Sans TFI	4,96 (0,00 ; 64,44)	9,13
	Natalizumab	13,70 (0,00 ; 120,30)	18,96
	Fingolimod	2,62 (0,00 ; 10,36)	2,27
	Autre TFI	3,22 (0,48 ; 36,95)	6,64
	Corticoïdes	4,29 (0,57 ; 10,88)	2,62
	Interféron-β	3,60 (1,52 ; 16,95)	4,89
Plasmablastes	Sans TFI	1,36 (0,00 ; 43,57)	7,47
	Natalizumab	1,46 (0,00 ; 67,69)	9,70
	Fingolimod	0,98 (0,00 ; 4,46)	1,33
	Autre TFI	1,41 (0,00 ; 5,59)	1,40
	Corticoïdes	1,79 (0,00 ; 8,50)	2,22
	Interféron-β	1,27 (0,00 ; 5,09)	1,55
LB CD19+CD21low	Sans TFI	13,61 (3,50 ; 86,21)	15,16

	Natalizumab	57,04 (0,00 ; 242,20)	50,26
	Fingolimod	6,96 (0,39 ; 36,11)	9,10
	Autre TFI	8,95 (1,50 ; 87,56)	16,51
	Corticoïdes	13,66 (4,95 ; 35,05)	9,76
	Interféron-β	7,28 (4,72 ; 35,64)	10,22
LB doubles négatifs	Sans TFI	10,36 (2,31 ; 27,28)	6,03
	Natalizumab	31,07 (0,00 ; 79,80)	17,34
	Fingolimod	4,38 (1,00 ; 15,72)	3,63
	Autre TFI	5,88 (1,32 ; 21,32)	4,77
	Corticoïdes	7,89 (3,05 ; 13,82)	3,35
	Interféron-β	5,07 (1,91 ; 12,66)	4,14

ANNEXE 4 : Répartition des patients avec ou sans repopulation suivant les pathologies. SEP-RR : sclérose en plaques récurrente rémittente ; SEP-SP : sclérose en plaques secondairement progressive ; SEP-PP : sclérose en plaque principalement progressive.

	Patients avec repopulation (nombre et proportion)	Patients sans repopulation (nombre et proportion)
SEP-RR	29 (46,8 %)	33 (53,2 %)
SEP-SP	34 (35,4 %)	62 (64,6 %)
SEP-PP	14 (42,4 %)	19 (57,6 %)

ANNEXE 5: Statistiques descriptives des population lymphocytaires étudiées par un immunophénotypage TBNK à l'état initial (J0) et lors des cycles successifs de Rituximab.

Lymphocytes		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm3	Ecart-type (Cells/mm3)
J0	2020,0 (187 ; 5307)	1014,0
C1	1256,0 (371 ; 3179)	493,2
C2	1198,0 (349 ; 3356)	481,1
C3	1254,0 (590 ; 3649)	498,2
C4	1320,0 (517 ; 2524)	432,5
C5	1351,0 (559 ; 2609)	417,3
Lymphocytes B		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm3	Ecart-type (Cells/mm3)
J0	277,0 (8 ; 1533)	282,4
C1	0,0 (0 ; 146)	25,2
C2	0,0 (0 ; 110)	14,9
C3	0,0 (0 ; 120)	17,2
C4	0,0 (0 ; 67)	10,7
C5	0,0 (0 ; 36)	7,7
Lymphocytes T		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm3	Ecart-type (Cells/mm3)
J0	1493,0 (62 ; 4492)	762,5
C1	1033,0 (127 ; 3013)	476,8
C2	1021,0 (288 ; 3149)	458,5
C3	1040,0 (373 ; 3448)	465,8
C4	1063,0 (366 ; 2210)	396,7
C5	1127,0 (392 ; 2141)	385,1
Lymphocytes NK		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm3	Ecart-type (Cells/mm3)
J0	161,0 (17 ; 685)	115,3
C1	164,0 (43 ; 778)	110,0
C2	166,5 (41 ; 652)	102,6
C3	169,5 (38 ; 1343)	135,1
C4	154,0 (39 ; 1156)	138,9
C5	174,0 (58 ; 458)	90,2
Lymphocytes TCD4		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm3	Ecart-type (Cells/mm3)
J0	960,5 (22 ; 3686)	576,2
C1	718,5 (226 ; 2466)	354,5
C2	698,0 (245 ; 2343)	341,7
C3	688,0 (290 ; 2879)	380,2
C4	741 (344 ; 1662)	331,6
C5	740 (391 ; 1470)	309,1
Lymphocytes TCD8		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm3	Ecart-type (Cells/mm3)
J0	412,0 (29 ; 1323)	262,2
C1	289,0 (62 ; 1123)	181,9

C2	262,0 (73 ; 1023)	172,2
C3	276,0 (81 ; 857)	164,1
C4	281,0 (104 ; 716)	156,7
C5	249,0 (96 ; 654)	149,6
Rapport LT CD4/ CD8		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	Ecart-type
J0	2,35 (0,23 ; 5,89)	0,104
C1	2,51 (0,60 ; 7,88)	0,113
C2	2,58 (0,61 ; 8,23)	0,120
C3	2,48 (0,78 ; 7,42)	0,128
C4	2,95 (0,87 ; 7,27)	0,233
C5	2,96 (1,26 ; 7,76)	0,269

ANNEXE 6 : Statistiques descriptives des population lymphocytaires (en %) étudiées par un immunophénotypage B étendu à l'état initial (J0) et lors des cycles successifs de Rituximab.

Lymphocytes B transitionnels		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	4,3 (0,0 ; 61,4)	9,407
C1	55,6 (0,3 ; 84,1)	19,92
C2	59,5 (14,0 ; 87,1)	19,24
C3	63,5 (9,2 ; 85,6)	21,14
C4	69,1 (9,5 ; 77,4)	21,55
C5	57,9 (50,5 ; 71,4)	9,455
Lymphocytes B naïfs		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	69,8 (14,8 ; 94,2)	17,75
C1	82,0 (21,3 ; 97,0)	19,55
C2	84,8 (13,4 ; 93,4)	17,11
C3	88,5 (15,0 ; 95,2)	18,46
C4	85,7 (75,1 ; 94,4)	6,823
C5	85,5 (76,9 ; 91,8)	7,072
Lymphocytes B mémoires		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	30,2 (5,8 ; 85,2)	17,74
C1	18,1 (3,0 ; 78,7)	19,55
C2	15,3 (6,6 ; 86,6)	17,1
C3	11,5 (4,8 ; 85,1)	18,47
C4	14,3 (5,6 ; 24,9)	6,811
C5	13,6 (2,1 ; 23,1)	9,638
Lymphocytes B mémoires non commutés		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	14,0 (3,2 ; 49,9)	9,459
C1	4,0 (1,0 ; 28,3)	5,327
C2	3,3 (0,9 ; 39,2)	7,158

C3	4,3 (1,0 ; 9,6)	2,283
C4	2,6 (0,0 ; 7,2)	2,949
C5	3,0 (1,4 ; 16,3)	6,992
Lymphocytes B mémoires commutés		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	14,8 (1,8 ; 49,1)	10,41
C1	9,5 (0,9 ; 73,3)	17,92
C2	8,9 (1,0 ; 51,4)	12,54
C3	6,4 (0,3 ; 82,3)	18,6
C4	4,0 (1,9 ; 14,9)	5,342
C5	2,2 (0,7 ; 13,3)	5,858
Lymphocytes B IgM only		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	2,0 (0,0 ; 20,3)	2,666
C1	2,0 (0,1 ; 14,0)	3,143
C2	2,0 (0,2 ; 13,7)	4,236
C3	1,3 (0,0 ; 26,0)	5,961
C4	1,1 (0,3 ; 6,5)	2,376
C5	0,3 (0,0 ; 3,4)	1,634
Plasmablastes		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	0,5 (0,0 ; 7,0)	1,076
C1	2,7 (0,0 ; 73,8)	14,22
C2	2,8 (0,0 ; 44,9)	9,812
C3	2,8 (0,0 ; 50,0)	11,23
C4	1,2 (0,0 ; 9,6)	3,296
C5	1,2 (0,0 ; 3,4)	1,529
LB CD19 ⁺ CD21 ^{low}		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	6,0 (1,0 ; 25,9)	4,894
C1	3,7 (0,3 ; 24,6)	5,251
C2	3,6 (0,5 ; 14,4)	4,066
C3	3,7 (0,4 ; 14,8)	3,606
C4	4,9 (0,0 ; 14,5)	4,931
C5	7,1 (1,1 ; 14,3)	7,129
Lymphocytes B doubles négatifs		
	Médiane (min ; max) en %	Ecart-type (%)
J0	3,3 (0,5 ; 11,8)	2,263
C1	5,3 (0,5 ; 31,8)	6,314
C2	8,0 (1,4 ; 44,3)	11,83
C3	11,0 (0,5 ; 45,9)	12,36
C4	13,3 (3,6 ; 76,5)	22,61
C5	13,8 (6,1 ; 35,7)	13,33

ANNEXE 7 : Statistiques descriptives des population lymphocytaires (en cellules/mm³) étudiées par un immunophénotypage B étendu à l'état initial (J0) et lors des cycles successifs de Rituximab.

Lymphocytes B transitionnels		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	13,2 (0,0 ; 135,4)	19,69
C1	15,1 (0,3 ; 98,3)	21,02
C2	18,0 (1,8 ; 79,6)	19,2
C3	15,4 (1,3 ; 78,4)	23,55
C4	8,3 (1,7 ; 51,9)	15,26
C5	16,3 (8,6 ; 22,5)	5,841
Lymphocytes B naïfs		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	170,8 (10,2 ; 1323,0)	180,2
C1	24,1 (2,3 ; 131,2)	31,42
C2	22,2 (1,3 ; 93,4)	22,09
C3	17,7 (2,2 ; 84,7)	24,13
C4	16,9 (1,4 ; 62,4)	19,87
C5	25,5 (9,7 ; 33,5)	10,3
Lymphocytes B mémoires		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	71,2 (2,1 ; 774,3)	154,3
C1	6,6 (1,5 ; 27,7)	5,592
C2	4,6 (1,4 ; 16,7)	3,181
C3	3,0 (1,4 ; 12,4)	3,368
C4	1,6 (1,1 ; 5,3)	1,558
C5	2,6 (0,7 ; 6,7)	2,553
Lymphocytes B mémoires non commutés		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	32,4 (1,5 ; 444,3)	75,23
C1	1,6 (0,3 ; 8,0)	1,73
C2	1,1 (0,1 ; 8,4)	1,778
C3	1,0 (0,2 ; 7,3)	1,782
C4	0,7 (0,1 ; 2,9)	1,047
C5	1,1 (0,4 ; 2,0)	0,6656
Lymphocytes B mémoires commutés		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	38,5 (0,3 ; 417,2)	84,98
C1	3,4 (0,5 ; 26,0)	5,123
C2	3,1 (0,4 ; 6,7)	1,71
C3	2,0 (0,1 ; 19,8)	4,565
C4	0,9 (0,2 ; 6,3)	2,247
C5	0,5 (0,2 ; 3,9)	1,736

Lymphocytes B IgM only		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	4,4 (0,0 ; 120,3)	12,04
C1	0,7 (0,1 ; 5,7)	0,9741
C2	0,6 (0,1 ; 3,5)	0,7893
C3	0,6 (0,1 ; 6,2)	1,499
C4	0,2 (0,1 ; 4,4)	1,393
C5	0,6 (0,2 ; 1,0)	0,5699
Plasmablastes		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	1,4 (0,0 ; 67,7)	6,302
C1	1,0 (0,2 ; 25,8)	4,543
C2	0,8 (0,0 ; 4,5)	1,113
C3	0,9 (0,2 ; 12,0)	3,008
C4	0,5 (0,1 ; 4,3)	1,77
C5	0,2 (0,2 ; 1,0)	0,4521
LB CD19⁺CD21^{low}		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	14,0 (0,4 ; 242,2)	35,86
C1	1,4 (0,2 ; 4,9)	1,249
C2	1,2 (0,2 ; 3,4)	0,87
C3	1,5 (0,3 ; 3,0)	0,7717
C4	1,0 (0,1 ; 6,9)	2,177
C5	1,1 (0,3 ; 5,0)	2,141
Lymphocytes B doubles négatifs		
	Médiane (min ; max) en Cells/mm³	Ecart-type (Cells/mm³)
J0	9,4 (1,0 ; 79,8)	13,73
C1	1,7 (0,3 ; 13,0)	2,229
C2	2,3 (0,6 ; 8,0)	2,26
C3	2,7 (0,3 ; 15,7)	3,664
C4	2,9 (1,2 ; 13,8)	3,886
C5	4,321	4,562

ANNEXE 8 : Statistiques descriptives de l'étude des populations lymphocytaires initiales (cellules/mm³ de sang) étudié par un immunophénotypage TBNK entre les patients n'ayant pas de LB détectables lors des cycles de Rituximab et des patients présentant des LB détectables lors d'au moins 1 cycle

	Patients sans repopulation	Patients avec repopulation
	Lymphocytes	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	2070,0 (399 ; 5198)	1877,0 (187 ; 5307)
Ecart-type (Cells/mm ³)	919,5	1136
	Lymphocytes B	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	254,5 (29 ; 1533)	315,0 (8 ; 1425)
Ecart-type (Cells/mm ³)	286,3	277,5
	Lymphocytes T	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	1527,0 (91 ; 4340)	1477,0 (62 ; 4492)
Ecart-type (Cells/mm ³)	682,5	861,6
	Lymphocytes NK	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	185,5 (17 ; 650)	144,0 (6 ; 685)
Ecart-type (Cells/mm ³)	112,5	119,8
	Lymphocytes TCD4	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	1021,0 (26 ; 2855)	941,0 (22 ; 3686)
Ecart-type (Cells/mm ³)	485,4	665,3
	Lymphocytes TCD8	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	461,0 (58 ; 1323)	389,0 (29 ; 1280)
Ecart-type (Cells/mm ³)	244,1	279
	Rapport LT CD4/ CD8	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	2,4 (0,4 ; 5,9)	2,2 (0,2 ; 5,9)
Ecart-type (Cells/mm ³)	1,2	1,3

ANNEXE 9 : Statistiques descriptives de l'étude des sous-population lymphocytaires B initiales (cellules/mm³ de sang) entre les patients n'ayant pas de LB détectables lors des cycles de Rituximab et des patients présentant des LB détectables lors d'au moins 1 cycle

	Patients sans repopulation	Patients avec repopulation
	LB transitionnels	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	12,0 (0,0 ; 69,1)	17,1 (0,3 ; 135,4)
Ecart-type (Cells/mm ³)	14,02	25,73
	LB naïfs	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	157,2 (24,7 ; 1323,0)	217,8 (10,2 ; 964,7)
Ecart-type (Cells/mm ³)	182,3	185,1
	LB mémoires	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	79,2 (4,3 ; 774,3)	65,5 (2,1 ; 550,3)
Ecart-type (Cells/mm ³)	171,3	129,7
	LB mémoires non commutés	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	36,8 (1,7 ; 444,3)	28,5 (1,5 ; 244,7)
Ecart-type (Cells/mm ³)	85,37	54,23
	LB mémoires commutés	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	41,8 (1,2 ; 417,2)	32,7 (0,3 ; 377,8)
Ecart-type (Cells/mm ³)	90,01	82,02
	LB IgM only	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	4,8 (0,0 ; 64,3)	4,0 (0,0 ; 120,3)
Ecart-type (Cells/mm ³)	8,958	16,22
	Plasmablastes	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	1,1 (0,0 ; 67,7)	1,8 (0,0 ; 43,6)
Ecart-type (Cells/mm ³)	6,446	6,672
	LB CD19+CD21^{low}	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	15,7 (2,1 ; 242,2)	12,5 (0,4 ; 151,1)
Ecart-type (Cells/mm ³)	39,54	31,6
	LB doubles négatifs	
Médiane (min ; max) en Cells/mm ³	10,0 (1,4 ; 70,0)	8,5 (1,0 ; 79,8)
Ecart-type (Cells/mm ³)	14,46	12,47

ANNEXE 10 : Statistiques descriptives de l'étude des sous-population lymphocytaires B initiales (en % dans le sang) entre les patients n'ayant pas de LB détectables lors des cycles de Rituximab et des patients présentant des LB détectables lors d'au moins 1 cycle.

	Patients sans repopulation	Patients avec repopulation
	LB transitionnels	
Médiane (min ; max) en %	3,9 (0,0 ; 40,5)	5,8 (0,3 ; 61,4)
Ecart-type (%)	6,304	12,89
	LB naïfs	
Médiane (min ; max) en %	67,8 (14,8 ; 92,8)	76,6 (32,2 ; 94,2)
Ecart-type (%)	18,08	16,68
	LB mémoires	
Médiane (min ; max) en %	32,2 (7,2 ; 85,2)	23,4 (5,8 ; 67,8)
Ecart-type (%)	18,07	16,67
	LB mémoires non commutés	
Médiane (min ; max) en %	14,6 (3,9 ; 48,4)	10,4 (3,2 ; 32,4)
Ecart-type (%)	9,948	7,773
	LB mémoires commutés	
Médiane (min ; max) en %	16,1 (1,9 ; 49,1)	12,1 (1,8 ; 40,3)
Ecart-type (%)	10,34	10,48
	LB IgM only	
Médiane (min ; max) en %	2,0 (0,0 ; 20,3)	1,9 (0,0 ; 15,4)
Ecart-type (%)	2,836	2,618
	Plasmablastes	
Médiane (min ; max) en %	0,5 (0,0 ; 7,0)	0,6 (0,0 ; 6,9)
Ecart-type (%)	0,9201	1,322
	LB CD19+CD21^{low}	
Médiane (min ; max) en %	6,4 (1,0 ; 24,2)	4,8 (1,0 ; 25,9)
Ecart-type (%)	4,808	4,951
	LB doubles négatifs	
Médiane (min ; max) en %	3,5 (0,6 ; 11,6)	3,0 (0,5 ; 11,8)
Ecart-type (%)	2,198	2,274

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. J. Sabatino, « B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases », p. 18.
- [2] A. Chevailler *et al.*, *Immunologie fondamentale et immunopathologie: enseignements thématique et intégré : tissu lymphoïde et sanguin, immunopathologie et immuno-intervention*, 2ème édition. 65, rue Camille-Demoulins, 92442 Issy-les-Moulineaux cedex, France: Elsevier Masson SAS, 2018.
- [3] « Chap_3.pdf ». Consulté le: août 29, 2020. [En ligne]. Disponible sur: http://www.cri-net.com/ckfinder/userfiles/files/formation/fichesImmuno/Chap_3.pdf.
- [4] Y. Iwata *et al.*, « Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells », *Blood*, vol. 117, n° 2, p. 530-541, janv. 2011, doi: 10.1182/blood-2010-07-294249.
- [5] C. Quan *et al.*, « Impaired regulatory function and enhanced intrathecal activation of B cells in neuromyelitis optica: distinct from multiple sclerosis », *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.*, vol. 19, n° 3, p. 289-298, mars 2013, doi: 10.1177/1352458512454771.
- [6] G. Colonna-Romano *et al.*, « A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people », *Mech. Ageing Dev.*, vol. 130, n° 10, p. 681-690, oct. 2009, doi: 10.1016/j.mad.2009.08.003.
- [7] S. Weller, « Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire », *Blood*, vol. 104, n° 12, p. 3647-3654, déc. 2004, doi: 10.1182/blood-2004-01-0346.
- [8] S. Weller *et al.*, « CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, n° 3, p. 1166-1170, janv. 2001, doi: 10.1073/pnas.98.3.1166.
- [9] J. Spencer, M. E. Perry, et D. K. Dunn-Walters, « Human marginal-zone B cells », *Immunol. TODAY*, p. 6.
- [10] Y. Tashiro *et al.*, « High-affinity IgM+ memory B cells are defective in differentiation into IgM antibody-secreting cells by re-stimulation with a T cell-dependent antigen », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 14559, déc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-32926-w.
- [11] M. Seifert *et al.*, « Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n° 6, p. E546-E555, févr. 2015, doi: 10.1073/pnas.1416276112.
- [12] F. Ethuin *et al.*, « Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12 », *Lab. Invest.*, vol. 84, n° 10, p. 1363-1371, oct. 2004, doi: 10.1038/labinvest.3700148.
- [13] K. Thorarinsdottir *et al.*, « CD21-low B cells in human blood are memory cells », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 185, n° 2, p. 252-262, août 2016, doi: 10.1111/cei.12795.
- [14] M. Rakhmanov *et al.*, « Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 32, p. 13451-13456, août 2009, doi: 10.1073/pnas.0901984106.
- [15] I. Isnardi *et al.*, « Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones », *Blood*, vol. 115, n° 24, p. 5026-5036, juin 2010, doi: 10.1182/blood-2009-09-243071.
- [16] E. Blanco *et al.*, « Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 141, n° 6, p. 2208-2219.e16, juin 2018, doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.017.
- [17] H. Morbach, E. M. Eichhorn, J. G. Liese, et H. J. Girschick, « Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 162, n° 2, p. 271-279, nov. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04206.x.
- [18] M. Kanzaki, H. Shibata, H. Mogami, et I. Kojima, « Expression of Calcium-permeable Cation Channel CD20 Accelerates Progression through the G1 Phase in Balb/c 3T3 Cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 22, p. 13099-13104, févr. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.22.13099.

- [19] G. Cartron, H. Watier, J. Golay, et P. Solal-Celigny, « From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy », *Blood*, vol. 104, n° 9, p. 2635-2642, nov. 2004, doi: 10.1182/blood-2004-03-1110.
- [20] T. M. Pierpont, C. B. Limper, et K. L. Richards, « Past, Present, and Future of Rituximab—The World’s First Oncology Monoclonal Antibody Therapy », *Front. Oncol.*, vol. 8, 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00163.
- [21] A. Waisman et A. Ebering, « Unraveling the T–B tangle in anti-CD20 multiple sclerosis therapy », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 116, n° 51, p. 25376-25377, déc. 2019, doi: 10.1073/pnas.1919044116.
- [22] D. Shan, J. A. Ledbetter, et O. W. Press, « Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells », *Cancer Immunol. Immunother. Clin.*, vol. 48, n° 12, p. 673-683, mars 2000, doi: 10.1007/s002620050016.
- [23] A. Probst, G. Cartron, et H. Watier, « Mécanismes d’action des anticorps monoclonaux recombinants utilisés en oncologie », *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 93, n° 4, p. 107-112, avr. 2006.
- [24] H. Sakai *et al.*, « Effect of Fc- γ Receptor Polymorphism on Rituximab-Mediated B Cell Depletion in ABO-Incompatible Adult Living Donor Liver Transplantation », *Transplant. Direct*, vol. 3, n° 6, p. e164, juin 2017, doi: 10.1097/TXD.0000000000000683.
- [25] B. Burkhardt *et al.*, « Impact of Fc gamma-receptor polymorphisms on the response to rituximab treatment in children and adolescents with mature B cell lymphoma/leukemia », *Ann. Hematol.*, vol. 95, n° 9, p. 1503-1512, sept. 2016, doi: 10.1007/s00277-016-2731-x.
- [26] G. Cartron *et al.*, « Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc γ R11a gene », vol. 99, n° 3, p. 6, 2002.
- [27] A. Ruysen-Witrand *et al.*, « Fc γ receptor type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab », *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 71, n° 6, p. 875- 877, juin 2012, doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200337.
- [28] R. P. Taylor et M. A. Lindorfer, « Drug Insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease—the immune complex decoy hypothesis », *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, vol. 3, n° 2, p. 86- 95, févr. 2007, doi: 10.1038/ncprheum0424.
- [29] N. Lapse, W. H. Abdulahad, A. Rutgers, C. G. M. Kallenberg, C. A. Stegeman, et P. Heeringa, « Altered B cell balance, but unaffected B cell capacity to limit monocyte activation in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in remission », *Rheumatology*, vol. 53, n° 9, p. 1683- 1692, sept. 2014, doi: 10.1093/rheumatology/keu149.
- [30] J. Han *et al.*, « Circulating regulatory B cell subsets in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders », *Neurol. Sci.*, vol. 38, n° 7, p. 1205- 1212, juill. 2017, doi: 10.1007/s10072-017-2932-7.
- [31] A. Vossenkämper, P. M. K. Lutalo, et J. Spencer, « Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Transitional B cells in systemic lupus erythematosus and Sjögren’s syndrome: clinical implications and effects of B cell-targeted therapies », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 167, n° 1, p. 7- 14, janv. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04460.x.
- [32] J. McComish, J. Mundy, T. Sullivan, S. M. Proudman, et P. Hissaria, « Changes in peripheral blood B cell subsets at diagnosis and after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory parameters », *Int. J. Rheum. Dis.*, vol. 18, n° 4, p. 421- 432, mai 2015, doi: 10.1111/1756-185X.12325.
- [33] N. Chihara *et al.*, « Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, n° 9, p. 3701- 3706, mars 2011, doi: 10.1073/pnas.1017385108.
- [34] C. Wei, S. Jenks, et I. Sanz, « Polychromatic flow cytometry in evaluating rheumatic disease patients », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 17, n° 1, p. 46, déc. 2015, doi: 10.1186/s13075-015-0561-1.
- [35] C. Wehr *et al.*, « A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE », *Clin. Immunol.*, vol. 113, n° 2, p. 161- 171, nov. 2004, doi: 10.1016/j.clim.2004.05.010.
- [36] Y.-C. B. Wu, D. Kipling, et D. K. Dunn-Walters, « The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood », *Front. Immunol.*, vol. 2, p. 81, 2011, doi: 10.3389/fimmu.2011.00081.

- [37] T. Guerrier *et al.*, « Proinflammatory B-cell profile in the early phases of MS predicts an active disease », *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation*, vol. 5, n° 2, p. e431, mars 2018, doi: 10.1212/NXI.0000000000000431.
- [38] M. Rehnberg, S. Amu, A. Tarkowski, M. I. Bokarewa, et M. Brisslert, « Short- and long-term effects of anti-CD20 treatment on B cell ontogeny in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 11, n° 4, p. R123, 2009, doi: 10.1186/ar2789.
- [39] S.-H. Kim, « Repeated Treatment With Rituximab Based on the Assessment of Peripheral Circulating Memory B Cells in Patients With Relapsing Neuromyelitis Optica Over 2 Years », *Arch. Neurol.*, vol. 68, n° 11, p. 1412, nov. 2011, doi: 10.1001/archneurol.2011.154.
- [40] T. H. Ramwadhoebe *et al.*, « Effect of rituximab treatment on T and B cell subsets in lymph node biopsies of patients with rheumatoid arthritis », *Rheumatology*, vol. 58, n° 6, p. 1075-1085, juin 2019, doi: 10.1093/rheumatology/key428.
- [41] E. G. Kamburova, H. J. P. M. Koenen, K. J. E. Borgman, I. J. ten Berge, I. Joosten, et L. B. Hilbrands, « A Single Dose of Rituximab Does Not Deplete B Cells in Secondary Lymphoid Organs but Alters Phenotype and Function: Rituximab Alters B Cells in Human Lymph Nodes », *Am. J. Transplant.*, vol. 13, n° 6, p. 1503-1511, juin 2013, doi: 10.1111/ajt.12220.
- [42] J. H. Anolik *et al.*, « Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy », *Arthritis Rheum.*, vol. 56, n° 9, p. 3044-3056, sept. 2007, doi: 10.1002/art.22810.
- [43] M. J. Leandro, G. Cambridge, M. R. Ehrenstein, et J. C. W. Edwards, « Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 54, n° 2, p. 613-620, févr. 2006, doi: 10.1002/art.21617.
- [44] P. Roll, A. Palanichamy, C. Kneitz, T. Dorner, et H.-P. Tony, « Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis », *Arthritis Rheum.*, vol. 54, n° 8, p. 2377-2386, août 2006, doi: 10.1002/art.22019.
- [45] J. Thiel *et al.*, « B cell repopulation kinetics after rituximab treatment in ANCA-associated vasculitides compared to rheumatoid arthritis, and connective tissue diseases: a longitudinal observational study on 120 patients », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 19, n° 1, p. 101, déc. 2017, doi: 10.1186/s13075-017-1306-0.
- [46] N. Venhoff *et al.*, « Reconstitution of the peripheral B lymphocyte compartment in patients with ANCA-associated vasculitides treated with rituximab for relapsing or refractory disease », *Autoimmunity*, vol. 47, n° 6, p. 401-408, sept. 2014, doi: 10.3109/08916934.2014.914174.
- [47] M. Cohen *et al.*, « Monitoring CD27 + memory B-cells in neuromyelitis optica spectrum disorders patients treated with rituximab: Results from a bicentric study », *J. Neurol. Sci.*, vol. 373, p. 335-338, févr. 2017, doi: 10.1016/j.jns.2017.01.025.
- [48] International Multiple Sclerosis Genetics Consortium *et al.*, « Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis », *Nature*, vol. 476, n° 7359, p. 214-219, août 2011, doi: 10.1038/nature10251.
- [49] B. A. Binstadt, R. S. Geha, et F. A. Bonilla, « IgG Fc receptor polymorphisms in human disease: Implications for intravenous immunoglobulin therapy », *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 111, n° 4, p. 697-703, avr. 2003, doi: 10.1067/mai.2003.1380.
- [50] P. Gallien, B. Nicolas, et A. Guichet, « Le point sur la sclérose en plaques », *Kinésithérapie Rev.*, vol. 12, n° 125, p. 17-22, mai 2012, doi: 10.1016/j.kine.2012.04.005.
- [51] B. Becher, I. Bechmann, et M. Greter, « Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain », *J. Mol. Med.*, vol. 84, n° 7, p. 532-543, juill. 2006, doi: 10.1007/s00109-006-0065-1.
- [52] A. G. Baxter, « The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, n° 11, p. 904-912, nov. 2007, doi: 10.1038/nri2190.
- [53] E. S. Huseby, « Cutting Edge: Myelin Basic Protein- Specific Cytotoxic T Cell Tolerance Is Maintained In Vivo by a Single Dominant Epitope in H-2k Mice », p. 5.
- [54] G. Krishnamoorthy, A. Holz, et H. Wekerle, « Experimental models of spontaneous autoimmune disease in the central nervous system », *J. Mol. Med.*, vol. 85, n° 11, p. 1161-1173, oct. 2007, doi: 10.1007/s00109-007-0218-x.

- [55] B. Serafini, B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano, et F. Aloisi, « Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis », *Brain Pathol. Zurich Switz.*, vol. 14, n° 2, p. 164-174, avr. 2004, doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00049.x.
- [56] S. M. Brändle *et al.*, « Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, n° 28, p. 7864-7869, juill. 2016, doi: 10.1073/pnas.1522730113.
- [57] K.-B. Abdul-Majid *et al.*, « Fc Receptors are Critical for Autoimmune Inflammatory Damage to the Central Nervous System in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis », *Scand. J. Immunol.*, vol. 55, n° 1, p. 70-81, janv. 2002, doi: 10.1046/j.1365-3083.2002.01024.x.
- [58] J. Nakahara et S. Aiso, « Fc Receptor-Positive Cells in Remyelinating Multiple Sclerosis Lesions », *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 65, n° 6, p. 582-591, juin 2006, doi: 10.1097/00005072-200606000-00006.
- [59] I. Jelcic *et al.*, « Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis », *Cell*, vol. 175, n° 1, p. 85-100.e23, sept. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.08.011.
- [60] R. Li *et al.*, « Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy », *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n° 310, p. 310ra166-310ra166, oct. 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aab4176.
- [61] B. Barun et A. Bar-Or, « Treatment of multiple sclerosis with Anti-CD20 antibodies », *Clin. Immunol.*, vol. 142, n° 1, p. 31-37, janv. 2012, doi: 10.1016/j.clim.2011.04.005.
- [62] « ocrevus_pic_ins_avis_3_ct16833.pdf ». Consulté le: mai 07, 2020. [En ligne]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2018-07/ocrevus_pic_ins_avis_3_ct16833.pdf.
- [63] T. Castillo-Trivino, D. Braithwaite, P. Bacchetti, et E. Waubant, « Rituximab in Relapsing and Progressive Forms of Multiple Sclerosis: A Systematic Review », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 7, p. e66308, juill. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066308.
- [64] R. T. Naismith *et al.*, « Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: A 52-week phase II trial », *Neurology*, vol. 74, n° 23, p. 1860-1867, juin 2010, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e24373.
- [65] S. Knippenberg *et al.*, « Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission », *J. Neuroimmunol.*, vol. 239, n° 1, p. 80-86, oct. 2011, doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.08.019.
- [66] N. Claes, J. Fraussen, P. Stinissen, R. Hupperts, et V. Somers, « B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions », *Front. Immunol.*, vol. 6, déc. 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00642.
- [67] L. Michel *et al.*, « Unaltered regulatory B-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis », *Clin. Immunol.*, vol. 155, n° 2, p. 198-208, déc. 2014, doi: 10.1016/j.clim.2014.09.011.
- [68] J. Fraussen *et al.*, « Phenotypic and Ig Repertoire Analyses Indicate a Common Origin of IgD-CD27- Double Negative B Cells in Healthy Individuals and Multiple Sclerosis Patients », *J. Immunol.*, vol. 203, n° 6, p. 1650-1664, sept. 2019, doi: 10.4049/jimmunol.1801236.
- [69] D. Baker, G. Pryce, L. K. James, K. Schmierer, et G. Giovannoni, « Failed B cell survival factor trials support the importance of memory B cells in multiple sclerosis », *Eur. J. Neurol.*, vol. 27, n° 2, p. 221-228, févr. 2020, doi: 10.1111/ene.14105.
- [70] L. Piccio *et al.*, « Changes in B- and T-Lymphocyte and Chemokine Levels With Rituximab Treatment in Multiple Sclerosis », *Arch. Neurol.*, vol. 67, n° 6, p. 707-714, juin 2010, doi: 10.1001/archneurol.2010.99.
- [71] G. Ellrichmann *et al.*, « Peripheral CD19+ B-cell counts and infusion intervals as a surrogate for long-term B-cell depleting therapy in multiple sclerosis and neuromyelitis optica/neuromyelitis optica spectrum disorders », *J. Neurol.*, vol. 266, n° 1, p. 57-67, janv. 2019, doi: 10.1007/s00415-018-9092-4.
- [72] J. Dooley *et al.*, « Immunologic profiles of multiple sclerosis treatments reveal shared early B cell alterations », *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation*, vol. 3, n° 4, p. e240, août 2016, doi: 10.1212/NXI.0000000000000240.

- [73] T. J. Braley et B. M. Segal, « B-cell Targeting Agents in the Treatment of Multiple Sclerosis », *Curr. Treat. Options Neurol.*, vol. 15, n° 3, p. 259–269, juin 2013, doi: 10.1007/s11940-013-0232-y.
- [74] D. Baker, M. Marta, G. Pryce, G. Giovannoni, et K. Schmierer, « Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis », *EBioMedicine*, vol. 16, p. 41–50, févr. 2017, doi: 10.1016/j.ebiom.2017.01.042.
- [75] A. Harrer *et al.*, « Lymphocyte Subsets Show Different Response Patterns to In Vivo Bound Natalizumab—A Flow Cytometric Study on Patients with Multiple Sclerosis », *PLOS ONE*, vol. 7, n° 2, p. e31784, févr. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031784.
- [76] J. Mélet, D. Mulleman, P. Goupille, B. Ribourtout, H. Watier, et G. Thibault, « Rituximab-Induced T Cell Depletion in Patients With Rheumatoid Arthritis: Association With Clinical Response: Rituximab-Induced T Cell Depletion and Clinical Response in RA », *Arthritis Rheum.*, vol. 65, n° 11, p. 2783–2790, nov. 2013, doi: 10.1002/art.38107.
- [77] B. J. Kaskow et C. Baecher-Allan, « Effector T Cells in Multiple Sclerosis », *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 8, n° 4, p. a029025, avr. 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a029025.

EVALUATION DU MONITORAGE DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES DU TRAITEMENT PAR RITUXIMAB DANS LA SCLEROSE EN PLAQUES

Présentée et soutenue publiquement par : MIGNÉ Hugo

Directeur de thèse : TREINER Emmanuel, MCU-PH, Immunologie

CHU Toulouse Purpan, Bâtiment Pierre Paul Riquet, vendredi 25 septembre 2020

RESUMÉ

Les anticorps monoclonaux anti-CD20 induisant une déplétion des lymphocytes B sont utilisés pour le traitement de la sclérose en plaques. Nous avons étudié les données des immunophénotypages pour 207 patients traités par Rituximab au Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse entre Janvier 2016 et Décembre 2019. Les populations lymphocytaires circulant dans le sang ont été analysées par cytométrie en flux, avant l'instauration du traitement et avant chaque cure d'entretien. Comme attendu, le Rituximab entraîne une déplétion profonde en lymphocytes B, mais aussi une déplétion en lymphocytes T CD4 et CD8 d'environ 30 %. De façon surprenante 37,2% des patients présentent au moins une repopulation. A l'état initial, ces patients ont une proportion augmentée de lymphocytes B transitionnels, de plasmablastes et de lymphocytes B naïfs par rapport aux patients sans repopulation, tandis qu'ils présentent une quantité inférieure de lymphocytes Natural Killer. De façon intéressante seules de faibles différences sur les populations lymphocytaires ont été observées entre les traitements d'entretien de 2 ou 1 g de Rituximab.

ASSESSMENT OF MONITORING OF LYMPHOCYTARY SUB-POPULATIONS OF RITUXIMAB TREATMENT IN MULTIPLE SCLEROSIS

Anti-CD20 monoclonal antibodies inducing B lymphocyte depletion are used for the treatment of multiple sclerosis. We studied the immunophenotyping data for 207 patients treated with Rituximab at the Toulouse University Hospital Center between January 2016 and December 2019. The lymphocyte populations circulating in the blood were analyzed by flow cytometry, before the initiation of the treatment and before each maintenance treatment. As expected, Rituximab induces a profound depletion of B lymphocytes, but also a 30 % depletion of CD4 and CD8 T lymphocytes. Surprisingly 37.2% of patients present at least one repopulation. At baseline, these patients have an increased proportion of transitional B lymphocytes, plasmablasts and naive B lymphocytes compared to patients without repopulation, while they have a lower amount of Natural Killer lymphocytes. Interestingly, only small differences in lymphocyte populations were observed between maintenance treatments of 2 or 1 g of Rituximab.

MOTS-CLES : Sclérose en plaques, Rituximab, lymphocytes, suivi thérapeutique, immunophénotypage

DISCIPLINE administrative : Diplôme d'études spécialisées de Biologie médicale

LABORATOIRE : Immunologie CHU de Toulouse Purpan

Institut Fédératif de Biologie (IFB) 330 Avenue de Grande Bretagne 31059 Toulouse