

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2013

N°

Thèse

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

MELET Julien

Né le 09/01/1982 à Chambray-lès-Tours

Présentée et soutenue publiquement le 8 février 2013

TITRE

**Evolution des sous-populations lymphocytaires sous l'effet du rituximab
dans les rhumatismes inflammatoires (LYRITUX)**

Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Philippe GOUPILLE

Membres du jury : Monsieur le Professeur Gilles THIBAUT

Monsieur le Professeur Denis MULLEMAN

Monsieur le Docteur Michael HAHNE

Monsieur le Docteur David TERNANT

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Dominique PERROTIN

VICE-DOYEN

Professeur Daniel ALISON

ASSESEURS

Professeur Daniel ALISON, Moyens
Professeur Christian ANDRES, Recherche
Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue
Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie
Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS - J. BARSOTTI
A. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – M. JAN –P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC
J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTRE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H. METMAN
J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph. RAYNAUD
Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE - M.J. THARANNE
J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
M.	BARON Christophe	Immunologie
Mme	BARTHELEMY Catherine	Pédopsychiatrie
MM.	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine
d'urgence		
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et
		Immunologie clinique)
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale

Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
	LEMARIE Etienne	Pneumologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-Vénérologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénérologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	MORINIÈRE Sylvain	O.R.L.
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophthalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	Reproduction	
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénérologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie	Médecine Générale
-----	---------------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	HUAS Dominique	Médecine Générale
	LEBEAU Jean-Pierre	Médecine Générale
	MALLET Donatien	Soins palliatifs
	POTIER Alain	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mmes	ANGOULVANT Theodora	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique : addictologie
	BAULIEU Françoise	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication
Mme	BLANCHARD Emmanuelle	Biologie cellulaire
	BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
MM.	BOISSINOT Eric	Physiologie
	DESOUBEAUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
Mme	DUFOUR Diane	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	EHRMANN Stephan	Réanimation médicaleh
Mmes	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et Cytologie pathologiques
	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
M.	GIRAUDEAU Bruno	Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme	GUILLEUX Valérie	Immunologie
MM.	GUERIF Fabrice	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HOARAU Cyrille	Immunologie
	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et Cytologie pathologiques
	MARUANI Annabel	Dermatologie
MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire in vitro
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
M.	TERNANT David	Pharmacologie – toxicologie
Mme	VALENTIN-DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	BOIRON Michèle	Sciences du Médicament
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Mmes	HUAS Caroline	Médecine Générale
	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale
M.	ROBERT Jean	Médecine Générale

CHERCHEURS C.N.R.S. – INSERM

MM.	BIGOT Yves	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930

MM.	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – U 618
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
Mmes 930	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM. 930	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – U 618
Mmes 930	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM
	POULIN Ghislaine	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
-----	------------------	-----------------------

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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

Remerciements

A Monsieur le Professeur Goupille, pour toujours m'avoir soutenu dans mes entreprises. Merci de la confiance que vous m'avez témoigné.

A Monsieur le Professeur Thibault, pour votre aide et votre patience pour la réalisation de ce travail.

A Monsieur Le Professeur Valat (†), pour la qualité et la rigueur de votre enseignement.

A Denis, Monsieur le Professeur Mulleman, pour m'avoir poussé sur la voie de la recherche. Merci pour ton enthousiasme communicatif, ta disponibilité, et ton soutien.

A Monsieur le Docteur Hahne, pour m'avoir fait honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse.

A David, pour ton enseignement, ta disponibilité, et ta patience.

A Isabelle, merci de m'avoir fait découvrir et aimer la rhumatologie. Merci de ton soutien, de ta présence et de ta rigueur.

A Saloua, merci de m'avoir donné envie de me lancer dans cette spécialité. Merci de ton enseignement et de ta gentillesse.

A Emilie, Delphine, Francine, Jean-Camille, Guillaume et Florence, collègues et amis. J'ai beaucoup appris à vos côtés et merci pour tous ces bons moments passés ensemble.

A Piera, Mathilde et Matthieu, les supers co-internes de rhumato et amis.

A l'ensemble du service de rhumatologie, quelle équipe !

A Flora, Loïc, Mathilde, Sébastien, pour tout ce qu'on peut partager ensemble tous les jours.

A Virginie, ma co-interne, ma chef, ma future collègue et surtout mon amie. Merci pour tout ce que tu m'apportes dans ma vie professionnelle et personnelle.

A Caroline, Alexandre et Vanessa, pour votre amitié fidèle et sincère depuis tant d'années.

A Edouard, pour m'avoir supporté et soutenu pendant la réalisation de ce travail.

Je dédie cette thèse

A Eugène (†) et Marcelle, mes grands-parents, merci pour votre amour de la vie et votre générosité.

A tata Jeannette (†), ma nourrice. Merci de m'avoir donné le goût du travail et du savoir bien-vivre.

A mes parents, merci d'être tout simplement les meilleurs parents qu'on puisse avoir. Je suis fier d'être votre fils.

A mon frère, Aurélie et Lou, merci d'avoir toujours cru en moi.

**Evolution des sous-populations lymphocytaires sous
l'effet du rituximab dans les rhumatismes
inflammatoires (LYRITUX)**

Evolution des sous-populations lymphocytaires sous l'effet du rituximab dans les rhumatismes inflammatoires (LYRITUX).

Introduction : Le rituximab, un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le CD20, induit la déplétion des lymphocytes B et a démontré son efficacité dans la polyarthrite rhumatoïde (PR). Notre objectif était d'étudier si la surveillance en routine des sous-populations lymphocytaires, et spécifiquement des cellules T, pouvait être utile chez les patients atteints de PR.

Méthodes : Toutes les données des patients traités par rituximab entre Juillet 2007 et Novembre 2012 ont été analysées dans cette étude. Les nombres de lymphocytes CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD56+ et CD19+ circulants dans le sang périphérique de ces patients ont été mesurés par cytométrie en flux avant et au décours du premier cycle de traitement. Le test statistique non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs des sous-populations lymphocytaires avant et après le premier cycle de traitement.

Résultats : Les données de 75 patients (64 atteints de PR, 11 atteints d'autres maladies inflammatoires) ont été analysées dans cette étude. Le rituximab a induit une déplétion inattendue et substantielle des cellules T affectant principalement les cellules CD4+ chez la majorité des patients. La profondeur de déplétion atteignait jusqu'à 80 % de la valeur initiale conduisant à des valeurs de cellules CD4+ inférieures à 200/ μ L. L'absence de déplétion en cellules CD4+ était associée à l'absence de réponse clinique chez les patients atteints de PR ce qui suggère que le mécanisme d'action du rituximab dépend au moins en partie des cellules T.

Conclusion : Le rituximab induit une substantielle déplétion des cellules T, cette dernière étant associée à la réponse clinique. La surveillance en routine des cellules T peut être utile au suivi de la réponse clinique et de la tolérance au traitement par rituximab chez les patients atteints de PR.

Mots-clés : rituximab, cellules T, polyarthrite rhumatoïde, réponse clinique, surveillance thérapeutique.

Lymphocyte subpopulations change in inflammatory rheumatic diseases patients treated with rituximab (LYRITUX).

Objective: Rituximab, a monoclonal antibody specifically targeting CD20, induces B-cells depletion and is effective in rheumatoid arthritis (RA). Our objective was to study whether or not a routine monitoring of lymphocyte subpopulation, especially T cells, may be useful in rituximab treated RA patients.

Methods: Data from all patients treated with rituximab between July 2007 and November 2012 in our center were studied. Peripheral blood CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD56+ and CD19+ lymphocytes counts before and during the first course of rituximab were measured by flow cytometry. A Mann-Whitney non parametric test was used to compare lymphocyte subpopulations count before and after treatment.

Results: Data from 75 patients (64 with RA, 11 with other inflammatory diseases) were analyzed in this study. Rituximab induced an unexpected and substantial T cells depletion mainly affecting CD4+ cells in the majority of the patients. The depth of depletion reached 80 percent of the initial count leading to CD4+ T cells values below 200/ μ L. Importantly, the absence of CD4+ T cells depletion was associated with the absence of clinical response suggesting that the mechanism of action of rituximab may at least partially depend on T cells.

Conclusion: Rituximab induces a substantial T cells depletion in RA patients, the latter being associated with the clinical response. Routine monitoring of T cells may be useful in the clinical setting in RA.

Keywords: rituximab, T cells, rheumatoid arthritis, clinical response, therapeutic monitoring.

Liste des abréviations

ACR	American College of Rheumatology
anti-CCP	anti-Peptides Cycliques Citrullinés
anti-TNF α	anti-Tumoral Necrosis Factor α
CD	Cluster of Differentiation
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
DAS28	Disease Activity Score on 28 joints
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FR	Facteur Rhumatoïde
NK	Natural Killer
PE	PhycoErythrin
PE-CY5	PhycoErythrin Cyanine 5
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
S2	Semaine 2
S12	Semaine 12
S24	Semaine 24
S36/48	Semaine 36 à semaine 48

SOMMAIRE

Introduction	5
Patients et Méthodes	8
1/ Patients et protocole de l'étude.....	8
2/ Phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux.....	9
3/ Analyse statistique	10
Résultats	11
1/ Patients.....	11
2/ Déplétion des lymphocytes T au cours du traitement par rituximab.....	11
3/ Association entre l'absence de déplétion des cellules T et l'absence de réponse clinique au rituximab chez les patients PR.....	15
Discussion	16
Conclusion	20
Références	21
Tables et Figures	24

Introduction

Les cellules T, et en particulier les CD4+, et les cellules B sont impliquées dans la pathogénèse de la polyarthrite rhumatoïde (PR), et réduire l'activité des lymphocytes par des traitements conventionnels ou par des anticorps monoclonaux thérapeutiques chez les patients atteints de PR a fait la preuve de son efficacité. La première preuve que les lymphocytes T CD4+ sont impliqués dans la pathogénèse de la PR est l'association de la maladie avec le polymorphisme des allèles HLA de classe II, comme HLA-DRB1, lesquels présentent les peptides antigéniques aux cellules CD4+ (1). De plus, cibler directement les cellules CD4+ avec des anticorps monoclonaux anti-CD4 a permis une amélioration clinique, bien que modeste, dans des essais cliniques préliminaires (2)(3) et l'abatacept, une protéine de fusion recombinante CTLA-4-Fc inhibant l'interaction entre CD28 et CD80/86 nécessaire pour la co-stimulation des lymphocytes T CD4+ par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), a fait la preuve de son efficacité dans la PR (4). Par ailleurs, l'expansion de sous-populations de lymphocytes CD4+ telles que CD4+CD28- (5) et CD4+CD57+ a été rapportée chez des patients atteints de PR (6).

Les lymphocytes B sont responsables de la production des auto-anticorps tels que les facteurs rhumatoïdes (FR) et les anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP) observés au cours de la PR. Le rituximab, un anticorps chimérique anti-CD20 monoclonal induisant la déplétion des cellules B matures et des cellules pré-B, est efficace et couramment utilisé dans la PR (7)(8). Les rôles des cellules B et T dans la pathogénèse de la PR et des maladies auto-immunes peuvent en fait être étroitement liés, en raison des fonctions CPA des lymphocytes B. Les cellules B activées sont considérées comme fondamentales dans la coordination de la fonction des cellules T. En effet, des souris transgéniques susceptibles de développer le spectre des maladies auto-immunes (glomérulonéphrite, vascularite, maladies de peau) ne

manifestent aucun symptôme après la déplétion des lymphocytes B qui est elle-même associée à une diminution substantielle des CD4+ et CD8+ (9). Chez l'homme, Sfikakis *et al.* ont souligné que, en conséquence de la déplétion des cellules B, la rémission clinique de la néphrite lupique était aussi associée à une diminution de l'activation des lymphocytes T auxiliaires, ce qui suggère que les lymphocytes B jouent un rôle en favorisant le développement de la maladie, indépendamment de la production d'auto-anticorps (10).

Bien que le rituximab semble être modestement plus efficace chez les patients FR positifs que chez les patients FR négatifs, son efficacité n'est cependant pas limitée aux patients qui produisent des auto-anticorps, ce qui suggère que la fonction des cellules T peut également être modifiée par le rituximab (11)(12). Le fait que plusieurs cas de maladies infectieuses opportunistes habituellement observées chez les patients déficients en CD4+ aient été rapportées chez des patients souffrant de PR et traités par rituximab (13)(14)(15)(16)(17)(18) constitue aussi un argument en faveur d'une action du rituximab sur le compartiment cellulaire T impliqué dans la pathogénèse de la PR. De plus, certains de ces patients qui avaient un nombre de CD4+ bas avant traitement ont montré une diminution supplémentaire de leur nombre de CD4+ recueilli au moment du diagnostic de l'infection opportuniste (13)(14).

Bien que le phénotypage lymphocytaire peut être recommandé avant chaque cycle de traitement par rituximab afin d'identifier les patients à haut risque d'infections (19), l'étude des variations des sous-populations lymphocytaires au cours du traitement par rituximab a essentiellement été centrée sur le compartiment B. Dans une étude pilote, Vital *et al.* ont utilisé la cytométrie en flux hautement sensible afin de montrer que le degré de déplétion des cellules B, plus que la dose de rituximab, détermine la réponse clinique (20). D'autre part, une augmentation du nombre des cellules IgD+CD27+ B mémoires au moment de la réplétion a

été identifiée comme étant associée à l'absence de réponse (21), alors que l'augmentation du nombre de cellules NK après traitement serait quant à elle corrélée à la réponse clinique (22). L'objectif de cette étude était donc d'analyser les variations des populations lymphocytaires, et en particulier des cellules T, au cours du traitement par rituximab des rhumatismes inflammatoires et d'étudier la relation entre les variations des lymphocytes et la réponse clinique chez les patients atteints de PR.

Patients et Méthodes

1/ Patients et protocole de l'étude

Les patients de l'étude étaient ceux pour lesquels une indication de traitement par rituximab avait été retenue parmi les patients suivis dans le service de rhumatologie du Centre Hospitalier Universitaire de TOURS quelle que soit la maladie. Le protocole de traitement des patients atteints de PR était en conformité avec les recommandations de la Société Française de Rhumatologie (19). Les patients ont été traités avec deux perfusions de 1000 mg de rituximab à un intervalle de deux semaines et étaient revus en consultation à la 12^{ème} semaine (S12), à la 24^{ème} (S24) et entre la 36^{ème} et la 48^{ème} semaine (S36/48) ou avant en fonction de l'activité de la maladie et de la récurrence des symptômes. L'activité de la maladie était évaluée par le DAS28 (disease activity score on 28 joints) avant traitement et à chaque visite de suivi.

Dans notre centre, le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux est réalisé pour vérifier le niveau de déplétion des cellules B induit par le rituximab après la première et la seconde perfusion et à chaque visite des patients suivis en routine. Donc l'approbation éthique et le consentement écrit n'ont pas été demandés dans cette analyse.

Les caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques ont été recueillies au moment de l'initiation du traitement. Les patients ont été classés selon les critères EULAR à S24 comme bons répondeurs, répondeurs modérés ou non répondeurs (23).

2/ Phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux

Les analyses phénotypiques ont été réalisées conformément à une procédure standardisée sur le sang total sans lavage en utilisant un appareil Preplus (Beckman Coulter Inc, Villepinte, France). Des échantillons de sang (100 µL) ont été incubés avec des anticorps anti-CD3 conjugués au FITC, des anti-CD56 conjugués au PE et des anti-CD19 conjugués au PE-CY5 (20 µL) ou avec des anticorps anti-CD8 conjugués au FITC et des anti-CD4 conjugués au PE ou avec des anticorps anti-CD45RA conjugués au FITC, des anti-CD45RO conjugués au PE et anti-CD4 conjugués au PE-CY5 (tous de Beckman Coulter) pendant 15 min à 18-20 °C. La lyse des globules rouges et la fixation cellulaire ont été réalisées en utilisant un appareil TQ-Prep et le système réactif ImmunoPrep (Beckman Coulter) en suivant les recommandations du fabricant. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytomètre en flux EPICS-XL-MCL (Beckman Coulter). Une fenêtre a été placée autour des lymphocytes sur le cytogramme "taille-structure" de diffraction de lumière aux petits (FSC: forward scatter) et aux grands angles (SSC : side scatter). Un minimum de 5000 évènements a été acquis pour chaque détermination.

3/ Analyse statistique

Test de Mann-Whitney

Ce test a été utilisé pour :

- comparer les phénotypes lymphocytaires recueillis avant traitement et les phénotypes lymphocytaires recueillis à la 2^{ème} semaine (S2), S12, S24, S36/48, et qui étaient exprimés en nombre absolu, en pourcentage de variation et en valeur absolue de variation par rapport aux valeurs avant traitement,
- comparer les caractéristiques avant traitement des patients PR et non-PR,
- comparer les pourcentages et les valeurs absolues de variation à S24 entre les groupes de patients bons répondeurs, répondeurs modérés et non répondeurs,
- analyser l'association entre le nombre de CD4+ avant traitement et les caractéristiques des patients,
- analyser l'association entre variation en CD4+ et caractéristiques des patients.

Test exact de Fischer :

Ce test a été utilisé pour comparer les caractéristiques avant traitement des patients PR et non PR.

Test de corrélation de Pearson :

Ce test a été utilisé pour :

- analyser l'association entre le nombre de CD4+ avant traitement et les caractéristiques des patients,
- analyser l'association entre variation en CD4+ et caractéristiques des patients.

Résultats

1/ Patients

Soixante-quinze patients ont été traités par rituximab entre juillet 2007 et novembre 2012 dans le service de rhumatologie du Centre Hospitalier Universitaire de Tours. L'indication de traitement a été retenue pour 64 patients présentant une PR selon les critères ACR (American College of Rheumatology) de 1987 et pouvant avoir un syndrome de Gougerot-Sjögren secondaire associé. Sept patients atteints de Gougerot-Sjögren primaire, 3 patients atteints de rhumatisme psoriasique et 1 patient présentant un syndrome de chevauchement ont aussi été traités par rituximab et constituaient notre population non-PR.

Les caractéristiques des patients avant traitement sont reportées dans la **table 1**.

2/ Déplétion des lymphocytes T au cours du traitement par rituximab

Chez les patients atteints de PR et qui ont été traités par plusieurs cycles de rituximab, l'analyse en cytométrie en flux des sous-populations lymphocytaires a montré une déplétion attendue et immédiate des lymphocytes B après chaque cycle de rituximab et était suivie par une reconstitution dans les 9 à 12 mois suivants (**figure 1**). Notre attention a été attirée par l'observation de substantielles déplétions des cellules T affectant spécifiquement la population CD4+. Les cycles de déplétion/reconstitution des lymphocytes des CD4+ et des lymphocytes B suivaient le même profil en fonction du temps, ce qui implique que l'effet sur les lymphocytes T était sans ambiguïté relié au traitement par rituximab, bien que la déplétion des cellules T était retardée après chaque cycle comparée à la déplétion des lymphocytes B.

A la lumière de ces observations, nous avons collecté les nombres de CD19+, CD3+, CD4+, CD8+ et CD3-CD56+ mesurés avant et à S2, S12, S24 et S36/48 après un premier cycle de rituximab chez 64 patients atteints de PR et 11 patients non-PR. Les médianes en nombre absolu, les médianes de pourcentage par rapport au nombre total de lymphocytes, le minimum et maximum à chaque temps de recueil de données sont reportés dans la **table 2** pour la population PR (et dans la **table 3 supplémentaire** pour la population non-PR).

Un premier résultat inattendu était que les valeurs avant traitement des CD4+ et du ratio CD4+/CD8+ étaient significativement plus élevées chez les patients atteints de PR que chez les autres patients et que les valeurs normales utilisées dans notre laboratoire et décrites dans la littérature (24)(25)(26)(27). Les CD4+ avant traitement étaient plus élevés chez les femmes en comparaison aux hommes ($p < 0.001$), chez les patients FR négatifs en comparaison aux patients FR positifs ($p < 0.04$) et chez les patients sans érosion radiologique en comparaison aux patients avec érosions radiologiques ($p < 0.03$), alors que l'âge, la durée de la maladie, le traitement concomitant par méthotrexate ou prednisone, la valeur du DAS28 avant traitement, le nombre d'articulations gonflées initial, le nombre d'articulations douloureuses initial, la valeur de la vitesse de sédimentation initiale, la valeur de la protéine C réactive initiale, et le statut anti-CCP n'étaient pas associés avec la valeur de CD4+ avant traitement. Notons qu'il existait une tendance ($p < 0.09$) pour les patients avec antécédents de traitement par anti-TNF α à présenter des nombres de CD4+ plus élevés que les natifs d'anti-TNF α .

De manière attendue, la déplétion des cellules B était quasi constamment complète à S2, persistait pendant 6 mois et recouvrait partiellement la valeur initiale après 9 à 12 mois. Conformément, les pourcentages de cellules T et de cellules NK étaient sensiblement augmentés de S2 à S24, alors que les pourcentages de cellules CD4+ et CD8+ n'étaient que peu affectés. D'autre part, bien que les nombres de CD4+, CD8+ et CD3+ comparés à la

valeur initiale étaient inchangés à S2, leurs nombres étaient substantiellement diminués à S12 (en moyenne de 40%, 22% et 42% ; respectivement), et à S24 et S36/48 pour les cellules CD4+ et CD3+ (en moyenne 32%, et 29% à S24 et 19%, et 14% à S36/48 ; respectivement). Ainsi, la déplétion en cellules T affectant principalement les CD4+ était retardée dans le temps en comparaison avec la déplétion très précoce des cellules B mais le profil d'évolution des cellules B et T était similaire avec une déplétion persistant jusqu'au 6^{ème} mois et suivie d'une reconstitution partielle. Il est important de noter i) que le nombre de CD4+ atteignait une valeur inférieure à 200 cellules/ μ L pour 3 de nos patients atteints de PR (4,7%) et qu'un d'entre eux avait développé une candidose oro-pharyngée extensive, ii) que l'effet du rituximab observé sur les populations lymphocytaires n'était pas restreint aux patients souffrant de PR puisque un effet similaire a été mis en évidence pour la population non-PR, et iii) que cet effet n'était pas associé à la valeur des CD4+ avant traitement chez les patients atteint de PR. La déplétion induite par le rituximab sur les cellules T était indépendante du sexe, du statut FR, du statut anti-CCP, de la présence d'érosions radiologiques et du traitement concomitant par méthotrexate ou corticostéroïdes (résultats non montrés).

Une étude plus précise de l'effet de déplétion induit par le rituximab sur les cellules T a été réalisée sur 52 patients pour lesquels les données de cytométrie en flux avant traitement et au moins une fois au décours du premier cycle de rituximab étaient disponibles. Nous avons donc calculé les pourcentages de variation (augmentation et diminution) des cellules CD3+, CD4+ et CD8+ à S2, S12, S24 et S36/48 suivant le premier cycle de traitement en rapport avec les valeurs observées avant traitement (**figure 2**). Bien que d'importantes variations aient été observées chez certains patients à S2, il n'y avait pas de variation significative excepté une minime diminution des cellules CD8+. Par ailleurs nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les valeurs observées à S12 et celles observées à S24 et S36/48 (résultats

non montrés). La déplétion en CD4+ dominait systématiquement celle des CD8+. A S12, la moitié des patients présentait une diminution de leurs CD4+ comprise entre 22% et 63% et un quart des patients avaient une déplétion excédant 63% et atteignait 77% pour l'un d'entre eux. Par ailleurs, certains patients avaient une importante augmentation (jusqu'à 57%) de leur cellules CD4+. Les résultats observés à la S24 étaient similaires, bien que la diminution était moins marquée quoique toujours significative à S36/48. Nous avons observé des résultats similaires quand les valeurs étaient exprimées en valeur absolue de variation entre les valeurs collectées aux différents temps et les valeurs avant traitement si ce n'est que l'effet maximal de déplétion concernait la population CD3+ à S24. Ainsi, quelques patients pouvaient présenter une diminution excédant 2000 CD4+/ μ L (**figure 4 supplémentaire**). Enfin, nous avons analysé l'évolution des CD4+ naïfs et des CD4+ mémoires en utilisant respectivement les marqueurs CD45RA et CD45RO chez 10 patients ayant présenté une déplétion de leurs CD4+ au cours du traitement par rituximab. Les résultats ont montré que les pourcentages de CD4+CD45RA+ et de CD4+CD45RO+ n'étaient pas modifiés durant le traitement suggérant que la déplétion induite par le rituximab affectait autant les cellules naïves que les cellules mémoires (résultats non montrés).

3/ Association entre l'absence de déplétion des cellules T et l'absence de réponse clinique au rituximab chez les patients PR.

Afin d'étudier la possibilité d'une association entre l'évolution des cellules T et la réponse au traitement par rituximab chez les patients PR, nous avons utilisé les données de 41 patients pour lesquels la réponse clinique et les données de cytométrie en flux étaient disponibles à S24. Les patients ont été classés en trois groupes en fonction de leur réponse EULAR : non répondeurs (n=11), répondeurs modérés (n=15) et bons répondeurs (n=15) et les pourcentages de variation des CD3+, CD4+ et CD8+ de chaque groupe ont été comparés (**figure 3**). Les diminutions de CD4+ et CD3+ observées à S24 chez les répondeurs modérés (en moyenne 38% et 37%, respectivement) et les bons répondeurs (en moyenne 43% et 47%, respectivement) étaient significativement plus élevées que les faibles variations observées chez les non répondeurs (en moyenne 7% et 7% respectivement). Les résultats de variation des cellules CD8+ n'étaient pas significativement différents entre les groupes. Ainsi, l'absence de déplétion des CD4+ était associée à l'absence de réponse à S24.

Par ailleurs nous avons analysé la possibilité d'une association entre la déplétion observée à S24 et le délai séparant le premier cycle d'un second de traitement par rituximab chez 24 des 32 patients pour lesquels une indication de second cycle avait été retenue et pour lesquels nous avons l'analyse des sous-populations lymphocytaires à S24 (**figure 5 supplémentaire**). Les résultats montraient que les patients ayant reçu le second cycle après 12 mois avaient tendance ($p=0.06$) à présenter une déplétion plus profonde que les patients qui recevaient le second cycle entre le 6^{ème} et le 12^{ème} mois (en moyenne 46% versus 15% respectivement).

Discussion

A notre connaissance, cette étude est la première à montrer que le rituximab induit une substantielle déplétion des cellules T affectant principalement les cellules CD4+ dans la majorité des patients PR et non-PR, et pouvant conduire à des valeurs de CD4 + inférieures à 200 cellules/ μ L dans certains cas. Par ailleurs, nous avons démontré que l'absence de déplétion en CD4+ est associée à l'absence de réponse clinique au rituximab chez les patients atteints de PR. Enfin, les patients atteints de PR présentaient des nombres de cellules CD4+ avant traitement plus élevés par rapport aux patients non-PR.

Avant d'aborder le résultat majeur de ce travail, il est nécessaire d'insister sur cette dernière observation inattendue, c'est-à-dire que le nombre de cellules CD4+ était pour certains patients atteints de PR au moins de ~30% au-dessus de ceux observés pour les patients non-PR et pour la population générale (24). Il a été décrit que les patients atteints de PR pouvait présenter des pourcentages plus élevés de cellules CD4+ que les volontaires sains ou les patients souffrant d'arthrose (28)(29)(30)(31). Aussi, le ratio CD4+/CD8+ médian de notre étude était de 2.5, un résultat concordant avec d'autres qui ont également rapporté une augmentation significative du ratio dans la PR comparé à une population contrôle de sujets sains (3.4 versus 1.8) (32). Les valeurs élevées observées de CD4+ dans notre population de PR peuvent être partiellement expliquées par le fait que 83% de nos patients étaient des femmes, connues pour exprimer un plus grand pourcentage de cellules CD4+ que les hommes (26). Il faut cependant noter que les nombres de CD4+ avant traitement des patients PR étaient plus élevés que chez les non-PR, en dépit du fait que tous les non-PR étaient des femmes. La valeur élevée des CD4+ de nos patients avant traitement soulève la question d'une forme particulière de la maladie. Le fait que les patients FR négatifs et sans érosion

radiologique présentait des valeurs de CD4+ plus élevées que les autres suggère que les patients avec un meilleur pronostic, pourraient présenter une forme spécifique de la maladie. Ou alors, les valeurs élevées de CD4+ pourraient être imputées à l'effet de traitements précédents. En effet, il y avait une tendance vers une augmentation des CD4+ chez les patients qui avaient été traités par anti-TNF α avant le rituximab en comparaison avec les natifs d'anti-TNF α . Cependant aucune donnée n'est disponible ce jour sur les variations des populations lymphocytaires sous anti-TNF α . Il est donc difficile d'établir une relation de cause à effet.

Le résultat principal de notre étude est d'avoir mis en évidence un effet de déplétion induit par le rituximab de longue durée et réversible sur les populations CD4+ (naïve et mémoire) et sur la population CD8+ dans une moindre mesure. A notre connaissance, seulement trois études ont évalué l'effet du rituximab sur le compartiment cellulaire T. Dans une première étude concernant seulement 17 patients aucune différence significative entre les valeurs de CD4+ avant traitement et après traitement n'a été rapportée. Cependant, la médiane de CD4+ avant traitement dans cette étude était beaucoup plus basse que celle de nos patients (630/ μ L versus 1286 cellules/ μ L) et 6 des 17 patients avaient reçu des doses plus faibles de traitement (33). Dans un deuxième travail dont l'objectif principal était d'étudier le tissu synovial de 24 patients atteints de PR et traités par rituximab pour identifier des facteurs prédictifs de réponse clinique, le nombre total de cellules T et les nombres des sous-populations T recueillis dans le sang périphérique ne variaient pas à la 16^{ème} semaine, mais le nombre de cellules T était significativement diminué dans le tissu synovial (34). Leandro *et al.* ont analysé les variations du phénotypage lymphocytaire chez 24 patients atteints de PR et traités par rituximab et n'ont pas trouvé de différence significative entre les valeurs de CD4+ à l'inclusion et après traitement. Toutefois, les résultats n'apparaissent pas dans l'article, et

plus de la moitié des patients avaient déjà reçu un cycle de rituximab dans les 8 à 46 mois précédents. Il est possible que l'effet de déplétion induit par le rituximab ait persisté après le 8^{ème} mois et biaisé leurs résultats. Cette déplétion des CD4+ induite par le rituximab n'était pas dépendante des valeurs initiales de CD4+ de nos patients puisque i) il n'y avait pas de relation entre les valeurs de CD4+ avant traitement et les variations observées à S12 et S24, et ii) cet effet était aussi observé chez les patients non-PR qui présentaient des valeurs de CD4+ initiales comprises dans les limites normales. À ce jour, peu d'études ont mis en évidence des modifications des sous-populations CD4+ au cours de la déplétion des cellules B induite par le rituximab (10)(35)(36). Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer ce phénomène. Une première hypothèse serait que le rituximab cible le CD20 exprimé par les cellules T. Cependant Leandro *et al.* ont mis en évidence que seulement 3,2% des cellules CD3+ du sang périphérique exprimaient des niveaux faibles de CD20. Un effet indirect du rituximab est donc peu probable (35). Un effet indirect du rituximab sur les cellules T semble être plus crédible. Le rituximab est connu pour agir en réduisant la production d'auto-anticorps en induisant la déplétion des cellules B auto-réactives. Cependant l'efficacité du rituximab n'est pas restreinte aux patients FR positifs ou anti-CCP positifs ce qui implique un autre mécanisme d'action. Nous supposons que le rituximab pourrait inhiber la voie d'activation des CD4+ initiée par la fonction CPA des cellules B. Ceci pourrait expliquer la déplétion retardée de la population T chez certains patients suivant la déplétion des cellules B et le retour aux valeurs initiales parallèle à la diminution de l'effet du traitement.

Un des résultats les plus intéressants est la relation entre la déplétion des CD4+ et les résultats cliniques alors que la déplétion des cellules B affecte tous les patients quelle que soit leur réponse. Bien que la valeur de CD4+ initiale semblait n'être associée ni à l'activité de la maladie ni à la réponse clinique à S24, l'absence de déplétion CD4+ était associée à la non-

réponse au traitement à S24. Conformément à ce résultat, la profondeur de déplétion en CD4+ à la S24 semble être associée avec l'intervalle de temps entre le premier et le second cycle, en d'autres termes avec la récurrence de la maladie. Ce résultat pourrait aider les cliniciens à i) prendre la décision d'interrompre le rituximab chez les patients présentant une réponse faible et une absence de déplétion en CD4+ après un 1^{er} cycle de traitement, et ii) décider du moment de la réalisation d'un nouveau cycle chez les autres. De plus, cette déplétion induite par le rituximab sur les cellules T ne se limitait pas à la population PR, et il serait intéressant d'étudier l'association entre la déplétion des cellules T et la réponse clinique dans d'autres maladies auto-immunes.

À ce jour, le phénotypage lymphocytaire chez les patients atteints de PR et traités par rituximab a pour but d'identifier les patients à haut risque d'infection. Nous avons mis en évidence une diminution de plus 70% des cellules CD4+ pouvant conduire à des valeurs inférieures à 200 CD4+/ μ L chez certains patients, valeur seuil en dessous de laquelle des infections opportunistes peuvent se développer (37). Plusieurs cas d'infections opportunistes habituellement observées chez les patients déficients en CD4+ ont été rapportés chez des patients atteints de PR et traités par rituximab. Compte tenu de nos résultats, les cliniciens devraient porter une attention particulière sur le nombre de CD4+ avant et après un cycle d'anticorps monoclonaux anti-CD20 puisque le rituximab peut favoriser le développement d'infections opportunistes en particulier chez les patients ayant un nombre de CD4+ avant traitement bas (13)(14). Par ailleurs, le bénéfice d'une prophylaxie primaire chez ces patients semble être un point essentiel à prendre en considération.

Conclusion

Nous avons mis en évidence que le rituximab pouvait induire une diminution significative des lymphocytes T du sang périphérique, en particulier les cellules CD4+, chez la majorité des patients. Les patients atteints de PR avaient des valeurs de CD4+ avant traitement significativement supérieures à la valeur standard, et bien que ni l'activité de la maladie ni la réponse au traitement à S24 n'étaient en relation avec ce résultat, l'absence de déplétion était associée à la non-réponse au traitement à S24. Nos résultats confirment l'utilité de la surveillance des cellules T chez les patients atteints de PR et traités par rituximab. D'une part, la surveillance des cellules CD4+ peut aider le clinicien dans sa prise de décision puisque les patients sans diminution des CD4+ sont moins susceptibles de répondre cliniquement que ceux qui présentent une déplétion. D'autre part, les patients avec un nombre de CD4+ avant traitement bas devraient être surveillés pour éviter le développement d'infections opportunistes.

Références

1. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* nov 1987;30(11):1205-1213.
2. Scheerens H, Su Z, Irving B, Townsend MJ, Zheng Y, Stefanich E, et al. MTRX1011A, a humanized anti-CD4 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled study incorporating pharmacodynamic biomarker assessments. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13(5):R177.
3. Choy EH, Connolly DJ, Rapson N, Jeal S, Brown JC, Kingsley GH, et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical effects of a humanized IgG1 anti-CD4 monoclonal antibody in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford).* oct 2000;39(10):1139-1146.
4. Kremer JM, Dougados M, Emery P, Durez P, Sibilia J, Shergy W, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator abatacept: twelve-month results of a phase iib, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* août 2005;52(8):2263-2271.
5. Weyand CM, Bryl E, Goronzy JJ. The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.).* 2000;48(5):429-435.
6. Imberti L, Sottini A, Signorini S, Gorla R, Primi D. Oligoclonal CD4+ CD57+ T-cell expansions contribute to the imbalanced T-cell receptor repertoire of rheumatoid arthritis patients. *Blood.* 15 avr 1997;89(8):2822-2832.
7. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* sept 2006;54(9):2793-2806.
8. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 17 juin 2004;350(25):2572-2581.
9. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J. Exp. Med.* 17 mai 1999;189(10):1639-1648.
10. Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, Vigklis V, Fragiadaki KG, Iniotaki A, et al. Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand: an open-label trial. *Arthritis Rheum.* févr 2005;52(2):501-513.
11. Couderc M, Mathieu S, Pereira B, Glace B, Soubrier M. Predictive factors of rituximab response in rheumatoid arthritis: Results from a french university hospital. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 8 oct 2012;
12. Isaacs JD, Cohen SB, Emery P, Tak PP, Wang J, Lei G, et al. Effect of baseline rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibody serotype on rituximab clinical response: a meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 11 juin 2012;
13. Teichmann LL, Woenckhaus M, Vogel C, Salzberger B, Schölmerich J, Fleck M. Fatal *Pneumocystis pneumonia* following rituximab administration for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* août 2008;47(8):1256-1257.
14. Clifford DB, Ances B, Costello C, Rosen-Schmidt S, Andersson M, Parks D, et al. Rituximab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in rheumatoid arthritis. *Arch. Neurol.* sept 2011;68(9):1156-1164.

15. Van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO 3rd, Keystone EC, Fleischmann RM, Furst DE, et al. Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann. Rheum. Dis.* 7 nov 2012;
16. Fleischmann RM. Progressive multifocal leukoencephalopathy following rituximab treatment in a patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* nov 2009;60(11):3225-3228.
17. Vallet H, Houitte R, Azria A, Mariette X. Cytomegalovirus colitis and hypo-IgG after rituximab therapy for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* mai 2011;38(5):965-966.
18. Wingfield T, Jani M, Krutikov M, Mayer J, Uriel A, Marks J, et al. Cryptococcal meningitis in an HIV-negative patient with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Rheumatology (Oxford).* sept 2011;50(9):1725-1727.
19. Pham T, Fautrel B, Gottenberg J-E, Goupille P, Hachulla E, Masson C, et al. Rituximab (MabThera) therapy and safety management. Clinical tool guide. *Joint Bone Spine.* juin 2008;75 Suppl 1:S1-99.
20. Vital EM, Dass S, Rawstron AC, Buch MH, Goëb V, Henshaw K, et al. Management of nonresponse to rituximab in rheumatoid arthritis: Predictors and outcome of re-treatment. *Arthritis & Rheumatism.* 2010;62(5):1273-9.
21. Roll P, Dörner T, Tony H-P. Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: Predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis & Rheumatism.* 2008;58(6):1566-75.
22. Lurati A, Bertani, Re, Marrazza, Bompane, Scarpellini. NK cell count as predictor of clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Biologics: Targets and Therapy.* avr 2012;83.
23. Van Gestel AM, Prevoo ML, Van 't Hof MA, Van Rijswijk MH, Van de Putte LB, Van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum.* janv 1996;39(1):34-40.
24. Hannel I, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyère M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol. Today.* juin 1992;13(6):215, 218.
25. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, et al. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica.* juin 1999;84(6):499-504.
26. Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric German study. *Clin. Immunol.* août 2005;116(2):192-197.
27. Maini MK, Gilson RJ, Chavda N, Gill S, Fakoya A, Ross EJ, et al. Reference ranges and sources of variability of CD4 counts in HIV-seronegative women and men. *Genitourin Med.* févr 1996;72(1):27-31.
28. Pawłowska J, Mikosik A, Soroczynska-Cybula M, Jóźwik A, Łuczkiwicz P, Mazurkiewicz S, et al. Different distribution of CD4 and CD8 T cells in synovial membrane and peripheral blood of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2009;47(4):627-632.
29. Smoleńska Z, Pawłowska J, Daca A, Soroczyńska-Cybula M, Witkowski J, Bryl EM. Disease activity in patients with long-lasting rheumatoid arthritis is associated with changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 21 déc 2012;122(12):591-598.
30. Dejaco C, Duftner C, Klauser A, Schirmer M. Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatol. Int.* janv 2010;30(3):297-303.

31. Pawlik A, Ostanek L, Brzosko I, Brzosko M, Masiuk M, Machalinski B, et al. The expansion of CD4+CD28- T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2003;5(4):R210-213.
32. Hussein MR, Fathi NA, El-Din AME, Hassan HI, Abdullah F, Al-Hakeem E, et al. Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. *Pathol. Oncol. Res.* sept 2008;14(3):321-328.
33. Feuchtenberger M, Müller S, Roll P, Waschbisch A, Schäfer A, Kneitz C, et al. Frequency of regulatory T cells is not affected by transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol J.* 2008;2:81-88.
34. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann. Rheum. Dis.* juill 2008;67(7):917-925.
35. Leandro MJ, Cambridge G, Ehrenstein MR, Edwards JCW. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* févr 2006;54(2):613-620.
36. Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, et al. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology (Oxford).* févr 2005;44(2):176-182.
37. Lloyd A. HIV infection and AIDS. *P N G Med J.* sept 1996;39(3):174-180.

TABLES ET FIGURES

Table 1 : Caractéristiques des sujets de l'étude

	PR (n = 64)	non-PR (n = 11)
Age, ans	60 [35-84]	63 [26-75]
Genre, femmes	53 (83)	11 (100)
Durée de la maladie, ans	16 [2-36]	7 [2-30]
Antécédents d'anti-TNF α	51 (80)	3 (27)
Méthotrexate	31 (48.5)	2 (18)
Prednisone	49 (76.5)	4 (36)
DAS28	5.4 [2.1-8.4]	-
Nombre d'articulations gonflées	4 [0-22]	-
Nombre d'articulations douloureuses	11 [0-27]	-
VS, mm/heure	27 [2-111]	10 [2-91]
CRP, mg/L	17.0 [1.0-166.0]	4.3 [1.0-42.9]
FR+	44 (69)	1 (9)
Anti-CCP+	53 (83)	0 (0)
Erosion radiologique +	48 (75)	3 (27)

Résultats présentés en nombre, (%) ou médiane [minimum-maximum].

PR : polyarthrite rhumatoïde ; DAS28 : disease activity score on 28 joints ; VS : vitesse de sédimentation ; CRP : protéine C réactive ; FR : facteur rhumatoïde ; anti-CCP : anticorps anti-peptides cycliques citrullinés.

Table 2 : Evolution au cours du temps des populations lymphocytaires chez les patients atteints de PR et traités par un premier cycle de rituximab.

	S0 (n=63)	S2 (n=63)	S12 (n=38)	S24 (n=42)	S36/48 (n=30)
CD19+ / μ L	208 [25-706]	1[0-11] [§]	0 [0-24] [§]	2 [0-139] [§]	20 [0-320] [§]
CD19+ %	9.6	0.1 [§]	0.0 [§]	0.1 [§]	1.6 [§]
CD3+ μ L	1749 [323-3378]	1658 [143-3438]	1022 [163-2925] [§]	1189 [142-2481] [#]	1421 [371-2664] *
CD3+ %	80.3	89.1 [§]	82.0	83.3	85.1 *
CD4+ / μ L	1232 [233-2882]	1251[126-2941]	734 [144-2123] [§]	878 [132-1922] [#]	1056 [248-2221] *
CD4+ %	58.8	65.4 [#]	58.6	59.4	59.9
CD8+ / μ L	470 [120-1123]	374 [62-1218]	365 [68-894]*	373 [42-1061]	399 [96-949]
CD8+ %	20.9	23.2	24.5 **	24.3 *	22.4
CD8+/CD4+	2.5 [0.4-7.4]	2.7 [0.4-9.0]	2.4 [0.7-10.6]	2.2 [0.4-8.5]	2.5 [0.7-7.7]
CD3-56+ / μ L	128 [32-441]	104 [21-456]	143 [25-362]	145 [27-470]	138 [45-479]
CD3-56+ %	6.0	5.6	13.0 [#]	11.8 [#]	8.8 *

Les phénotypes lymphocytaires ont été collectés avant traitement et à S2, S12, S24 et S36/48 (une fois avant retraitement) après un premier cycle. Les cellules CD19+, CD3+, CD4+, CD8+, and CD3-56+ sont présentées en médiane [minimum - maximum] et médiane du % par rapport au nombre total de lymphocytes. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, # : $p < 0.001$, § = $p < 0.00001$.

Table 3 supplémentaire : Evolution au cours du temps des populations lymphocytaires chez les patients non PR et traités par un premier cycle de rituximab.

	S0 (n=11)	S2 (n=10)	S12 (n=7)	S24 (n=6)	S36/48 (5)
CD19+ / μ L	166 [21-489]	2 [0-13] [#]	0 [0-11] [#]	4 [0-67] ^{**}	28 [0-522]
CD19+ %	9.9	0.1 [#]	0.1 ^{**}	0.4 [*]	1.9
CD3+ / μ L	1501 [464-1854]	1340 [363-1818]	821 [514-1474]	719 [459-1127] [*]	1053 [561-2239]
CD3+ %	77.8	88.7 [*]	85.6 [*]	82.5	78.6
CD4+ / μ L	917 [286-1149]	824 [204-1367]	583 [363-1106]	453 [276-565] [*]	691 [319-1056]
CD4+ %	46.7	57.5 ^{**}	53.5	47.8	45.3
CD8+ / μ L	496 [199-1038]	511 [156-930]	406 [158-519]	358 [156-573]	509 [223-1188]
CD8+ %	28.9	31.3	34.5	38.4 [#]	39.6
CD4+/CD8+	1.5 [0.8-2.7]	1.6 [0.9-2.7]	2.2 [0.8-2.7]	1.4 [0.8-2.1]	1 [0.9-2.0]
CD3-56+ / μ L	89 [8-254]	71 [6-157]	116 [21-251]	58 [14-216]	39 [14-216]
CD3-56+ %	6.3	5.5	11.6	7.0	2.1

Les phénotypes lymphocytaires ont été collectés avant traitement et à S2, S12, S24 et S36/48 (une fois avant retraitement) après un premier cycle. Les cellules CD19+, CD3+, CD4+, CD8+, and CD3-56+ sont présentées en médiane [minimum - maximum] et médiane du % par rapport au nombre total de lymphocytes. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, # : $p < 0.001$.

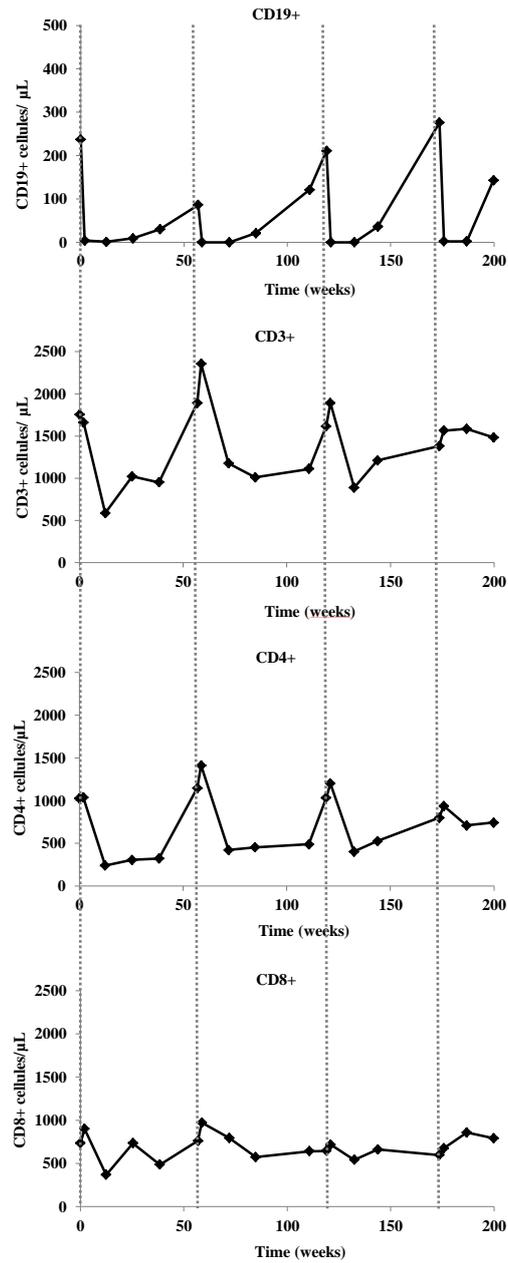


Figure 1: Evolution du phénotypage lymphocytaire au cours du temps d'un patient traité par 4 cycles de rituximab pour une PR. Les lignes en pointillés correspondent à chaque cycle de rituximab. Le temps est exprimé en mois et en cellules/ μL .

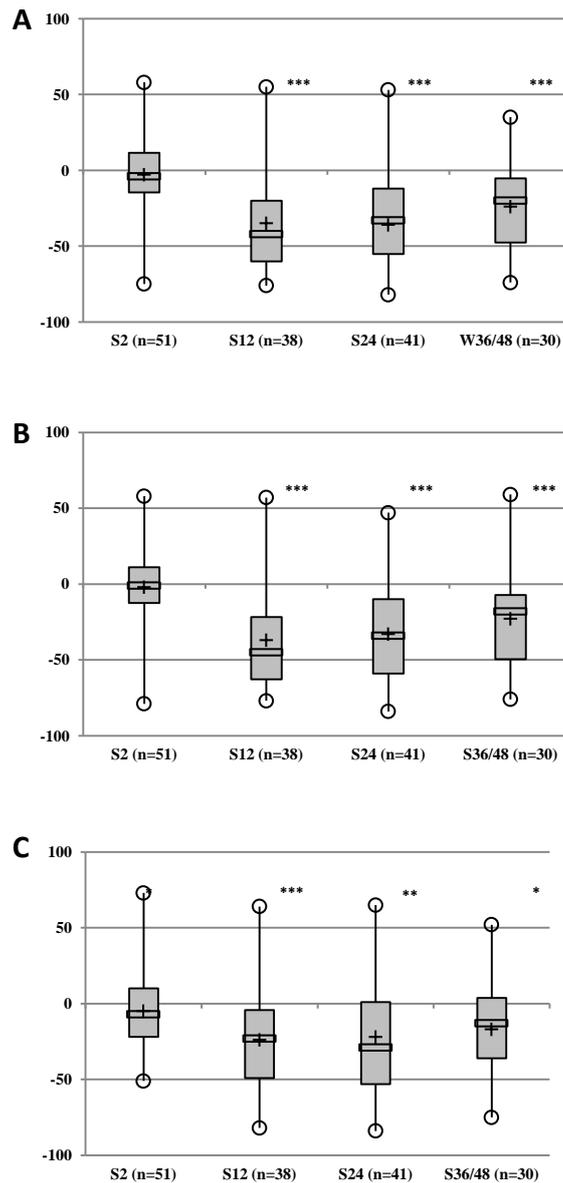


Figure 2: Evolution des populations lymphocytaires (exprimées en pourcentage de variation en rapport à la valeur avant traitement) CD3+ (A), CD4+ (B) and CD8+ (C) au cours du temps des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et traités par un premier cycle de rituximab. Nous avons utilisé les données des patients pour lesquels la cytométrie en flux avant traitement et au moins une fois au décours du premier cycle de rituximab étaient disponibles. Les phénotypages lymphocytaires ont été réalisés à S2, S12, S24 et S36/48 chez 51, 38, 41 et 30 patients respectivement. Les minimum, maximum, médianes (□), moyennes (+), premiers et troisièmes quartiles sont représentés sur les boîtes à moustaches.* = $p < 0.02$, ** = $p < 0.0001$, *** = $p < 0.00001$.

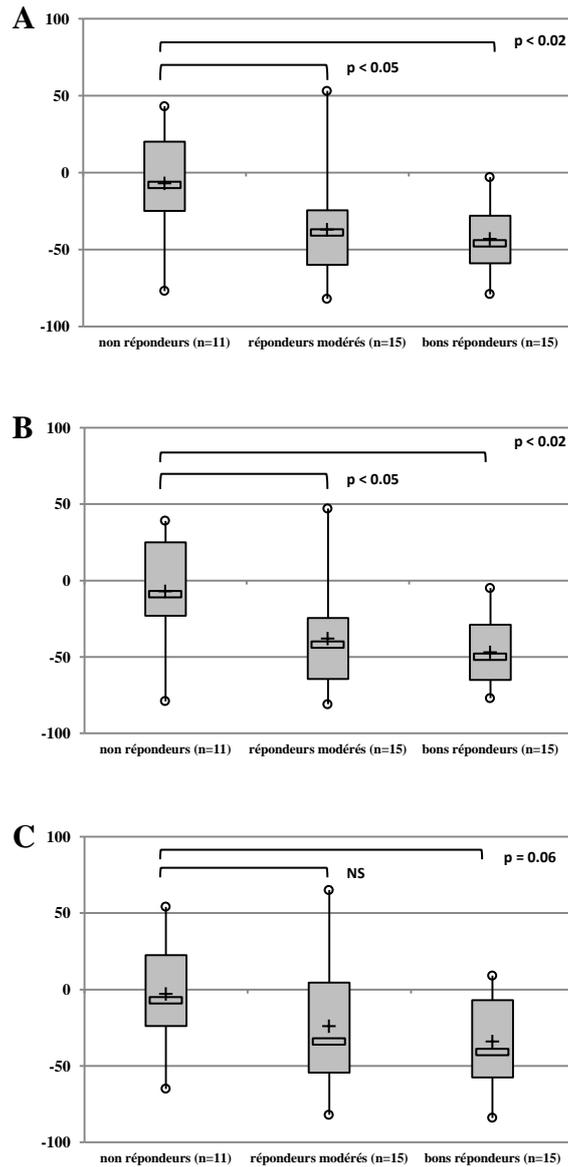


Figure 3: Association entre la réponse au traitement par rituximab à la 24^{ème} semaine et l'évolution des cellules T : CD3+(A), CD4+ (B) and CD8+ (C). Les données de 41 patients pour lesquels la cytométrie en flux et la réponse au traitement à S24 étaient disponibles. Les patients ont été divisés en 3 groupes en fonction de leur réponse : non répondeurs (n=11), répondeurs modérés (n=15) et bons répondeurs (n=15). Les minimum, maximum, médianes (□), moyennes (+), premiers et troisièmes quartiles de dépletions des populations CD3+, CD4+ et CD8 + sont représentés chaque boîte à moustaches. NS = non significatif.

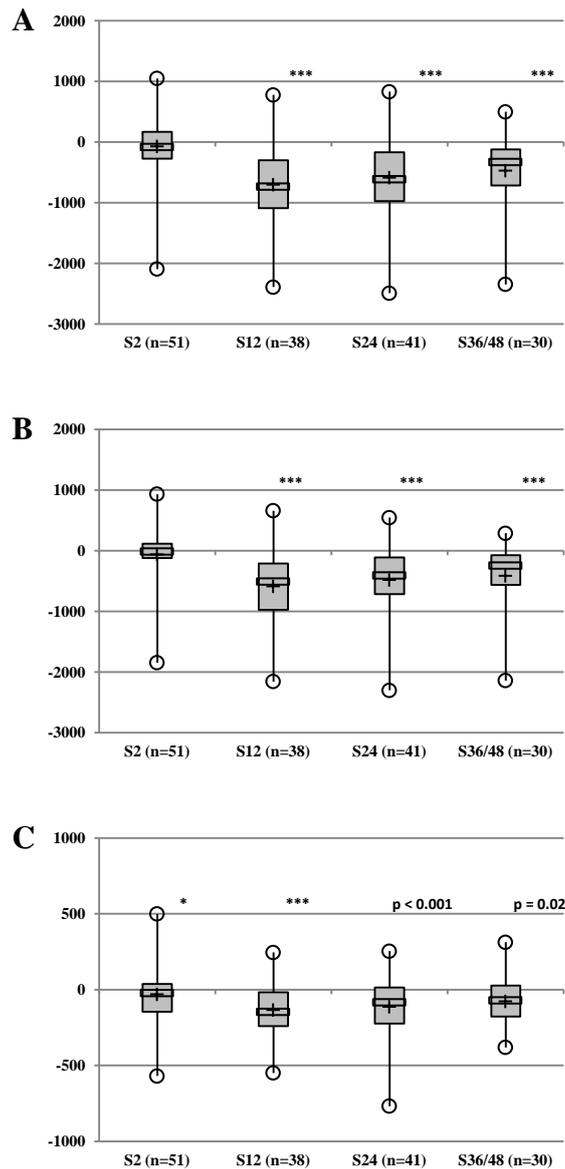


Figure 4 supplémentaire : Evolution des populations lymphocytaires (exprimées en valeur absolue de la variation relative à la valeur initiale) CD3+ (A), CD4+ (B) and CD8+ (C) au cours du temps des patients atteints de PR et traités par un premier cycle de rituximab. Nous avons utilisé les données des patients pour lesquels les données de cytométrie en flux avant traitement et au moins une fois au décours du premier cycle de rituximab étaient disponibles. Les phénotypages lymphocytaires ont été réalisés à S2, S12, S24 et S36/48 chez 51, 38, 41 et 30 patients respectivement. Les minimum, maximum, médianes (□), moyennes (+), premiers et troisièmes quartiles sont représentés sur les boîtes à moustaches. * = $p < 0.02$, ** = $p < 0.0001$, *** = $p < 0.00001$.

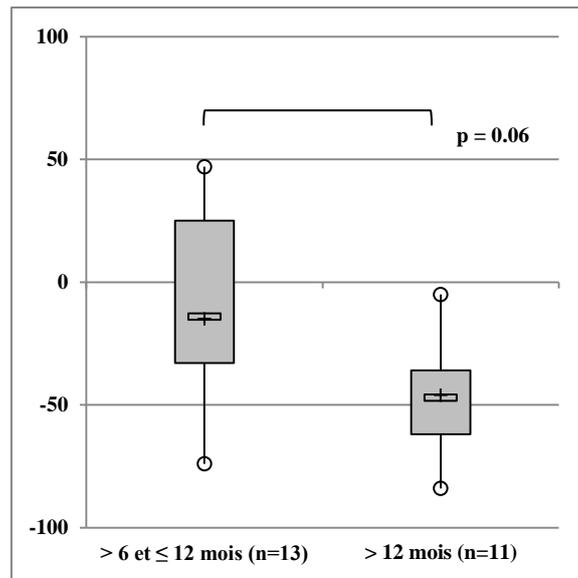


Figure 5 supplémentaire : Association entre la variation en CD4+ observée à la 24^{ème} semaine et le délai entre le premier cycle et le second cycle de rituximab. L'indication d'un 2nd cycle de rituximab a été retenue pour 32 patients. L'analyse a été réalisée avec les données de 24 patients pour lesquels l'analyse des phénotypes lymphocytaires par cytométrie en flux était disponible à S24. Les minimum, maximum, médianes (≡), moyennes (+), premiers et troisièmes quartiles de déplétion sont représentés sur les boîtes à moustaches.

Vu, le Directeur de Thèse

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized loop followed by a horizontal line extending to the right.

**Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS**

30 pages – 3 tableaux – 5 figures

Résumé :

Introduction : Le rituximab, un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le CD20, induit la déplétion des lymphocytes B et a démontré son efficacité dans la polyarthrite rhumatoïde (PR). Notre objectif était d'étudier si la surveillance en routine des sous-populations lymphocytaires, et spécifiquement des cellules T, pouvait être utile chez les patients atteints de PR.

Méthodes : Toutes les données des patients traités par rituximab entre Juillet 2007 et Novembre 2012 ont été analysées dans cette étude. Les nombres de lymphocytes CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD56+ et CD19+ circulants dans le sang périphérique de ces patients ont été mesurés par cytométrie en flux avant et au décours du premier cycle de traitement. Le test statistique non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les valeurs des sous-populations lymphocytaires avant et après le premier cycle de traitement.

Résultats : Les données de 75 patients (64 atteints de PR, 11 atteints d'autres maladies inflammatoires) ont été analysées dans cette étude. Le rituximab a induit une déplétion inattendue et substantielle des cellules T affectant principalement les cellules CD4+ chez la majorité des patients. La profondeur de déplétion atteignait jusqu'à 80 % de la valeur initiale conduisant à des valeurs de cellules CD4+ inférieures à 200/ μ L. L'absence de déplétion en cellules CD4+ était associée à l'absence de réponse clinique chez les patients atteints de PR ce qui suggère que le mécanisme d'action du rituximab dépend au moins en partie des cellules T.

Conclusion : Le rituximab induit une substantielle déplétion des cellules T, cette dernière étant associée à la réponse clinique. La surveillance en routine des cellules T peut être utile au suivi de la réponse clinique et de la tolérance au traitement par rituximab chez les patients atteints de PR.

Mots clés :

- Rituximab
- cellules T
- Polyarthrite rhumatoïde
- Réponse clinique
- Surveillance thérapeutique

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Philippe GOUPILLE
Membres : Monsieur le Professeur Gilles THIBAUT
Monsieur le Professeur Denis MULLEMAN
Monsieur le Docteur Michal HAHNE
Monsieur le Docteur David TERNANT

Date de la soutenance : 8 Février 2013.