

UNIVERSITÉ DE LILLE  
**FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG**  
Année : 2022

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Impact de la déplétion lymphocytaire B sur le contrôle anti-inflammatoire et le  
risque infectieux dans une cohorte de patients ayant une SEP et traités par  
anti-CD20.**

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre à 14  
au Pôle Recherche  
par **Sean A. FREEMAN**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Sylvain DUBUCQUOI**

**Assesseurs :**

**Madame le Professeur Catherine LUBETZKI**

**Monsieur le Professeur Bertrand AUDOIN**

**Monsieur le Docteur Didier FERRIBY**

**Directeur de thèse :**

**Madame le Professeur Hélène ZEPHIR**

---

**Avertissement :**

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à l'auteurs.

# Table des matières

Liste d'abréviations .....	4
Résumé : .....	6
Introduction : .....	8
Le diagnostic de la SEP : .....	11
Physiopathologie de la SEP : S'agit-il exclusivement d'une maladie médiée par les lymphocytes T ?.....	12
Les lymphocytes B et leur rôle dans la pathologie de la SEP :.....	14
Les traitements de fond et leur évaluation dans la SEP : .....	20
Les anticorps monoclonaux anti-CD20 .....	23
Les traitements anti-CD20 dans la sclérose en plaques :.....	26
Rituximab: .....	27
Ocrélizumab .....	29
Ofatumumab.....	31
Les effets immunologiques des thérapies anti-CD20 dans la sclérose en plaques : .....	33
Déplétion, reconstitution et répertoire des cellules B/T après un traitement anti-CD20 : .....	36
Tolérance du traitement anti-CD20 : .....	40
L'adaptation des traitements anti-CD20 par voie IV :.....	42
Problématique et objectifs : .....	45
Thèse : <b>Assessing B-cell depletion and disease activity in a French Multiple Sclerosis cohort treated by long-term intravenous anti-CD20 antibody therapy ..</b>	<b>47</b>
Discussion .....	83
Limites : .....	88
Conclusion : .....	89
Bibliographie : .....	91

### Liste d'abréviations

**ADCC** : toxicité cellulaire dépendante des anticorps

**AG** : l'acétate de glatiramère

**AMM** : l'autorisation de mise sur le marché

**APRIL** : *a ligand for B-cell survival factors a proliferation-inducing ligand*

**ARR** : *annual relapse rate*

**BAFF** : *B-cell activating factor*

**BHE** : barrière hémato-encéphalique

**BOC** : bandes oligoclonales

**CD** : *cluster of differentiation*

**CDC** : cytotoxicité dépendante du complément

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CPA** : cellules présentatrices d'antigènes

**DAFS** : *disease activity free status*

**EAE** : encéphalite auto-immune expérimentale

**EIG** : évènement indésirable grave

**ECR** : essais cliniques randomisés

**EDSS** : *Expanded Disability Status Scale*

**EMA** : Agence européenne des médicaments

**GM-CSF** : *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

**HACA** : anticorps anti-humains anti-souris

**IFN $\gamma$**  : interféron-gamma

**IL** : interleukine

**IRM** : imagerie par résonance magnétique

**IV** : intraveineux

**LCR** : liquide céphalo-rachidien

**LEMP** : leucoencéphalopathie multifocale progressive

**MBP** : *myelin basic protein*

**MEDA** : *minimal evidence of disease activity*

**MOG** : *myelin oligodendrocyte glycoprotein*

**NEDA** : *no evident disease activity*

**CDP** : cumul de progression du handicap

**PR** : polyarthrite rhumatoïde

**RIS** : syndrome radiologiquement isolé

**S1P** : sphingosine-1 phosphate

**SCI** : syndrome clinique isolé

**SEP** : sclérose en plaques

**SEP-PP** : sclérose en plaques progressive primaire

**SEP-R** : sclérose en plaques récurrente

**SEP-SP** : sclérose en plaques secondairement progressive

**SNC** : système nerveux central

**TACI** : *transmembrane activator and CAML interactor*

**TNF $\alpha$**  : *tumor necrosis factor alpha*

**VLA4** : intégrine alpha4b $\beta$ 1

## **Résumé :**

### **Contexte :**

Les traitements anti-CD20 par voie intraveineuse (IV) qui permettent de dépléter des lymphocytes B reposent sur un schéma fixe dans la SEP avec une perfusion tous les six mois. Bien que ces traitements soient hautement efficaces, ils s'accompagnent d'un risque infectieux et d'hypogammaglobulinémie (Ig) secondaire à long terme. Peu d'études ont étudié la déplétion des lymphocytes B après de multiples cycles d'anti-CD20 et leur influence sur l'activité inflammatoire dans la SEP. Nous avons donc étudié si la déplétion des lymphocytes B après au moins un an de traitement par anti-CD20 IV pouvait avoir un impact sur le contrôle radio-clinique, telle que définie par NEDA-3 et MEDA, chez les patients SEP à 12 et 18 mois.

### **Méthode :**

Nous avons réalisé une étude observationnelle rétrospective dans une cohorte de 192 patients SEP sous anti-CD20 en IV entre janvier 2014 et septembre 2021. Nous avons recueilli la numération des sous-populations lymphocytaires, le taux d'Ig tous les 6 mois avant un nouveau cycle d'anti-CD20 ainsi que les événements indésirables graves (EIG). Nous avons également étudié l'impact des traitements lymphopéniant antérieur sur les paramètres biologiques avant et au cours du traitement.

### **Résultats :**

Au total, 60,6% et 84,2% des patients était NEDA-3 à 12 et 18 mois, et MEDA dans 84,6% et 96,9% à 12 et 18 mois, respectivement. À 12 et 18 mois, 81,3% et 85,8 % des patients présentaient une déplétion lymphocytaire CD19<sup>+</sup>, respectivement. Les patients plus âgés et ceux ayant une lymphopénie CD3<sup>+</sup> ont été associés à un meilleur contrôle de la

maladie à 12 et 18 mois. Le taux d'Ig étaient significativement inférieurs aux taux initiaux à partir de 6 mois pour les IgM ( $p < 0,0001$ ) et 30 mois pour les IgG ( $p = 0,0031$ ). Les patients ayant reçu un traitement lymphopéniant avant l'initiation de l'anti-CD20 ont présenté une diminution des lymphocytes CD3<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> ainsi que des taux d'IgG par rapport aux patients n'ayant en jamais reçu. Les EIG de grade 3 ou plus étaient rares.

### **Conclusions :**

La déplétion des lymphocytes B ne semble pas suffisante pour prédire le contrôle de l'activité inflammatoire selon les critères NEDA-3 et MEDA à 12 et 18 mois chez les patients SEP qui bénéficient d'un traitement IV par anti-CD20. Cependant, ce contrôle anti-inflammatoire est obtenu pour la grande majorité des patients dès 18 mois nous proposons ainsi d'adapter la stratégie de l'anti-CD20 IV à partir de ce délai.

## **Introduction :**

### **Sclérose en plaques (SEP) : épidémiologie, présentation clinique et facteurs de risque :**

En 1822, à l'âge de 28 ans, Augustus D'Este, petit-fils du roi George III de Grande-Bretagne, a rapporté dans son journal une série de symptômes neurologiques qui ont débuté par la présence d'un flou visuel, suivi plusieurs années plus tard de paresthésies à type d'engourdissement, des troubles sphinctériens et d'une paraparésie<sup>1</sup>. En 1868, le neurologue français Jean-Marie Charcot (1825-1893), lors de son célèbre cours de neurologie à la Pitié-Salpêtrière, a décrit l'aspect clinico-pathologique des symptômes comme la sclérose en plaques (SEP)<sup>2</sup>, pourtant, c'est à Jean Cruveilhier (1791-1874) en France et à Robert Carswell (1793-1857) en Angleterre que revient le mérite d'avoir découvert indépendamment les lésions anatomiques qui définissent la maladie<sup>2</sup>. Cependant, depuis ces premières observations franco-britanniques, notre compréhension de la SEP a largement évolué grâce aux progrès des neurosciences et l'immunologie fondamentales, ainsi qu'à la disponibilité et la puissance et résolution de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui nous offre la possibilité de mieux approcher le système nerveux central (SNC) et les dégâts tissulaires *in vivo*.

En effet, la SEP est considérée comme une maladie chronique inflammatoire, démyélinisante et neurodégénérative du SNC, caractérisée par des lésions de la substance blanche et de la substance grise, qui endommagent la gaine de myéline et les axones, et entraînent des déficits et un handicap neurologiques<sup>3</sup>. En tant que première cause de handicap neurologique non traumatique chez le jeune adulte, la SEP touche près de 2,5 millions de personnes dans le monde<sup>4</sup>. En général, les patients présentent



des symptômes neurologiques, tels qu'un flou visuel, une diplopie, des paresthésies, une ataxie et des vertiges, mais les patients peuvent également être asymptomatiques ou présenter d'autres symptômes moins focaux tels que la fatigue et le déclin cognitif<sup>5</sup>. La SEP est donc suspectée lorsqu'un patient jeune présente pour la première fois des symptômes neurologiques classiquement visuels, médullaires ou de fosse cérébrale postérieure, ce qui est défini comme un "syndrome clinique isolé" (SCI).

Environ 85 à 90 % des patients atteints de SEP présentent un phénotype de SEP récurrente (SEP-R) qui se caractérise par des poussées avec des symptômes neurologiques qui se manifestent en quelques heures ou quelques jours, durent plusieurs semaines parfois et sont accompagnées d'une guérison complète ou incomplète<sup>3</sup>. La transition d'un phénotype SEP-R vers un phénotype de SEP secondairement progressive (SEP-SP) peut se manifester après 10 à 20 ans, et peut être accompagnée ou non de poussées concomitantes. Un faible pourcentage (10-15%) de patients présentera une forme progressive primaire (SEP-PP) avec une progression de la maladie sans rechute dans au moins un système fonctionnel<sup>5</sup>. Par ailleurs, une population de patients subira une IRM cérébrale pour des raisons sans rapport avec une symptomatologie évocatrice de SEP (céphalées, traumatisme crânien, etc..) et il peut être trouvé des lésions à l'IRM typiques de la SEP [dénommé « syndrome radiologiquement isolé » ou (RIS)<sup>5</sup>]. Il est intéressant de noter que les patients atteints de RIS, qui sont asymptomatiques par définition, présentent un profil cognitif similaire à ceux atteints d'une SEP cliniquement définie<sup>6</sup>. Dans l'ensemble, le point de vue traditionnel qui consistait à classer la SEP en phénotypes distincts est en train d'évoluer, étant donné que l'on pense maintenant que

la SEP est plutôt un spectre où l'inflammation et la neurodégénérescence est sur un continuum.

La prévalence de la SEP est plus fréquente chez les femmes, avec un sex-ratio de 3:1, et il semblerait que plusieurs facteurs environnementaux soient associés à la SEP. Le gradient Pôle-Equateur, la carence en vitamine D, le tabagisme et l'obésité ont été associés comme facteurs de risque environnementaux potentiels pour la SEP<sup>7</sup>. Il faut souligner les nombreuses études montrant que l'exposition au virus d'Epstein-Barr est une condition préalable (mais non suffisante) au développement de la SEP<sup>8-10</sup>. La figure 1 présente un résumé des facteurs de risque de la SEP liés au mode de vie et à des facteurs environnementaux qui ont été publiés<sup>7</sup>.

Factor	OR	HLA gene interaction	Combined OR (nongenetic factor + HLA allele)	Effect during adolescence	Immune system implied	Level of evidence
Smoking	~1.6	Yes	14	No	Yes	+++
EBV infection (seropositivity)	~3.6	Yes	~15	Yes	Yes	+++
Vitamin D level <50 nM	~1.4	No	NA	Probably	Yes	+++
Adolescent obesity (BMI >27 at age 20 years)	~2	Yes	~15	Yes	Yes	+++
CMV infection (seropositivity)	0.7	No	NA	Unknown	Yes	++
Night work	~1.7	No	NA	Yes	Yes	++
Low sun exposure	~2	No	NA	Probably	Yes	++
Infectious mononucleosis	~2	Yes	7	Yes	Yes	++
Passive smoking	~1.3	Yes	6	No	Yes	+
Organic solvent exposure	~1.5	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	+
Oral tobacco/nicotine	0.5	No	NA	Unknown	Yes	+
Alcohol	~0.6	No	NA	Unknown	Yes	+
Coffee	~0.7	No	NA	Unknown	Yes	+

**Figure 1** : Résumé des facteurs de risque de la SEP liée au mode de vie et à des facteurs environnementaux. EBV : *Ebstein-Barr Virus*, BMI : *Body Mass Index*. D'après Olsson *et al.*, 2017

La SEP ne suit pas un modèle Mendélien d'hérédité génétique, mais il a été démontré que les individus hétérozygotes et homozygotes avec l'allèle HLA-DRB1\*15:01 ont un risque plus élevé de développer une SEP<sup>5</sup>. Par ailleurs, les études d'association pangénomique ont mis en avant 200 polymorphismes d'intérêt dans la population SEP, avec certaines variantes intéressant des gènes régulateurs de l'immunité innée ou adaptative<sup>11</sup>. Pris dans son ensemble, ces données mettent en évidence la difficulté de définir une cause exacte de la SEP.

### **Le diagnostic de la SEP :**

Le diagnostic de la SEP a évolué au cours des décennies, en commençant par les critères de Schumacher pour en arriver aux critères de McDonald 2017 ; cependant, les principes qui guident le diagnostic de la SEP restent inchangés : (1) la présentation d'un syndrome clinique neurologique typique de la SEP, (2) une preuve d'une atteinte du SNC, (3 et 4) une dissémination dans le temps et dans l'espace, et (5) l'absence d'une « meilleure explication » autre que la SEP<sup>5</sup>.

Les syndromes neurologiques typiques de la SEP comprennent la névrite optique, la myélite transverse et les syndromes de la fosse postérieure qui sont confirmés par une IRM cérébrale et/ou médullaire. La dissémination dans le temps et dans l'espace peut être établie cliniquement par une deuxième poussée typique de la SEP qui se situe dans une localisation différente de la poussée précédente. En outre, la dissémination dans le temps peut être mise en évidence à l'IRM par des lésions en hypersignal avec une pondération en T2, notamment des régions de la substance blanche périventriculaire, des lésions corticales et juxtacorticales, des régions sous-tentorielles et de la moelle

épineière, tandis que la dissémination dans l'espace à l'IRM peut être appréciée par un rehaussement par du gadolinium qui témoigne une lésion active associée à des lésions non rehaussées, ou par une IRM de suivi montrant des nouvelles lésions en T2<sup>3</sup>. La ponction lombaire avec la présence de bandes oligoclonales (BOC) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) peut également se substituer à la dissémination dans l'espace. Le tableau 1 résume les critères de McDonald 2017 pour la SEP-R<sup>12</sup>.

Number of Clinical Attacks	Number of Lesions With Objective Clinical Evidence	Additional Data Needed for a Diagnosis of Multiple Sclerosis
≥2	≥2	None <sup>c</sup>
≥2	1 (as well as clear-cut historical evidence of a previous attack involving a lesion in a distinct anatomic location <sup>d</sup> )	None <sup>c</sup>
≥2	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different central nervous system site or by MRI
1	≥2	Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI or demonstration of CSF-specific oligoclonal bands <sup>e</sup>
1	1	Dissemination in space demonstrated by an additional clinical attack implicating a different central nervous system site or by MRI  <i>And</i> Dissemination in time demonstrated by an additional clinical attack or by MRI or demonstration of CSF-specific oligoclonal bands <sup>e</sup>

**Tableau 1** : Critères McDonald 2017 pour le diagnostic de sclérose en plaques chez les patients présentant avec une poussée initiale. MRI : *magnetic resonance imaging*. CSF : *cerebral spinal fluid*. D'après Solomon (2019).

### **Physiopathologie de la SEP : S'agit-il exclusivement d'une maladie médiée par les lymphocytes T ?**

Les lymphocytes dépendant du thymus, ou lymphocytes T, sont issus des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et migrent du sang vers le thymus pour se développer<sup>13</sup>. Les lymphocytes T dans le thymus, appelées thymocytes, se

transforment en lymphocytes T matures grâce à des étapes micro-environnementales de régulation positive et négative des précurseurs de lymphocytes T. Elles expriment le *cluster of differentiation-3* (CD3) à la surface de la membrane cellulaire, ainsi que la co-expression de CD4 ou CD8, qui définissent ensuite les capacités fonctionnelles du sous type de lymphocyte T effecteurs. Après leur maturation dans le thymus, les lymphocytes T migrent vers les organes lymphoïdes périphériques où elles rencontrent des antigènes étrangers, prolifèrent et se défendent contre les agents pathogènes<sup>13</sup>.

Dans la SEP, il est suggéré que la maladie est médiée par des cellules T autoréactives qui ciblent les antigènes de la gaine de myéline, tels que la *myelin basic protein* (MBP), la *proteolipid protein* et la *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)<sup>13</sup>. Les autopsies des cerveaux atteints de la SEP ont montré une infiltration périvasculaire de cellules T, principalement CD8<sup>+</sup>, dans les lésions, en parallèle à des infiltrats de macrophages<sup>14-16</sup>. Ces résultats sont également corroborés par le modèle animal d'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) dans lequel la destruction de la gaine de myéline et des neurones est médiée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, bien que ce modèle animal simplifie vraisemblablement la physiopathologie de la SEP et ne soit pas tout à fait transposable aux études chez l'homme<sup>17</sup>. La rupture de la barrière hémato-encéphalique et la perméabilité vasculaire, qui s'observent par un rehaussement par le gadolinium sur l'IRM, permettent l'infiltration de lymphocytes T auxiliaires pro-inflammatoires, plus spécifiquement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs T<sub>h</sub>1 et T<sub>h</sub>17, par l'expression à la surface des cellules de l'intégrine alpha4bêta1 (VLA4)<sup>13</sup>. La présence de ces cellules T effectrices aggrave à son tour l'inflammation par la sécrétion d'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ) et de l'interleukine-17 (IL-17)<sup>13</sup>. Il a été démontré que les patients SEP ont

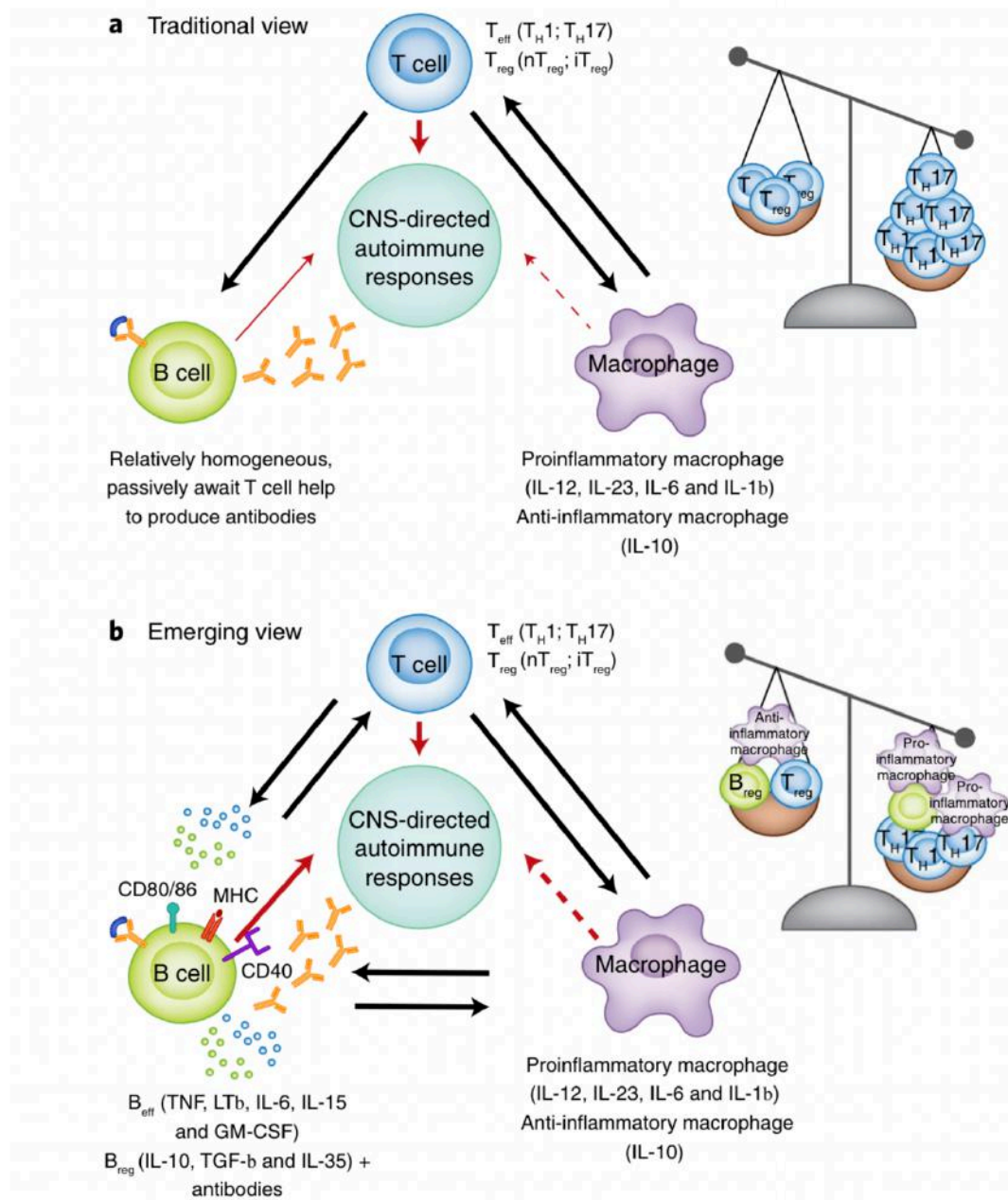
des cellules T circulantes qui réagissent à la myéline et sécrètent davantage de l'IL-17 que les témoins sains<sup>18</sup>.

Bien qu'il ait été démontré que les lymphocytes T sont impliqués dans la maladie, les traitements de fond ciblant spécifiquement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les sous-populations de lymphocytes T effecteurs n'ont pas démontré d'action thérapeutique pertinente<sup>18-20</sup>. Toutefois, cela peut être associé à un taux de déplétion relativement faibles des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> avec ces traitements, étant donné que l'anticorps monoclonal anti-CD52, l'alemtuzumab, qui déplete 70 à 95 % des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, s'est révélé très efficace<sup>19,20</sup>.

En résumé, les lymphocytes T jouent un rôle clé dans la SEP, mais il est très probable que l'interaction entre plusieurs cellules immunitaires, telles que les lymphocytes B et les cellules myéloïdes, soit responsable de la physiopathologie de la SEP (Figure 2).

### **Les lymphocytes B et leur rôle dans la pathologie de la SEP :**

Décrites pour la première fois en 1965 par Cooper et collaborateurs dans la bourse de Fabricius chez le poulet<sup>21</sup>, les lymphocytes B sont des cellules qui jouent un rôle clé dans la production d'anticorps qui sont fondamentaux pour la défense de l'hôte dans la lutte contre les pathogènes ; cependant, notre appréciation de ces cellules a évolué compte tenu de la diversité de leurs rôles, tels que la sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires et la régulation des lymphocytes B autoréactifs et aussi le possibilité d'être présentatrice d'antigène. Les lymphocytes B dérivent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse qui progressent par plusieurs stades de développement, du stade pro-B et pré-B, et se différencient à leur tour en lymphocytes B immatures en exprimant l'IgM à la surface de la membrane cellulaire<sup>22</sup>. Lorsque les



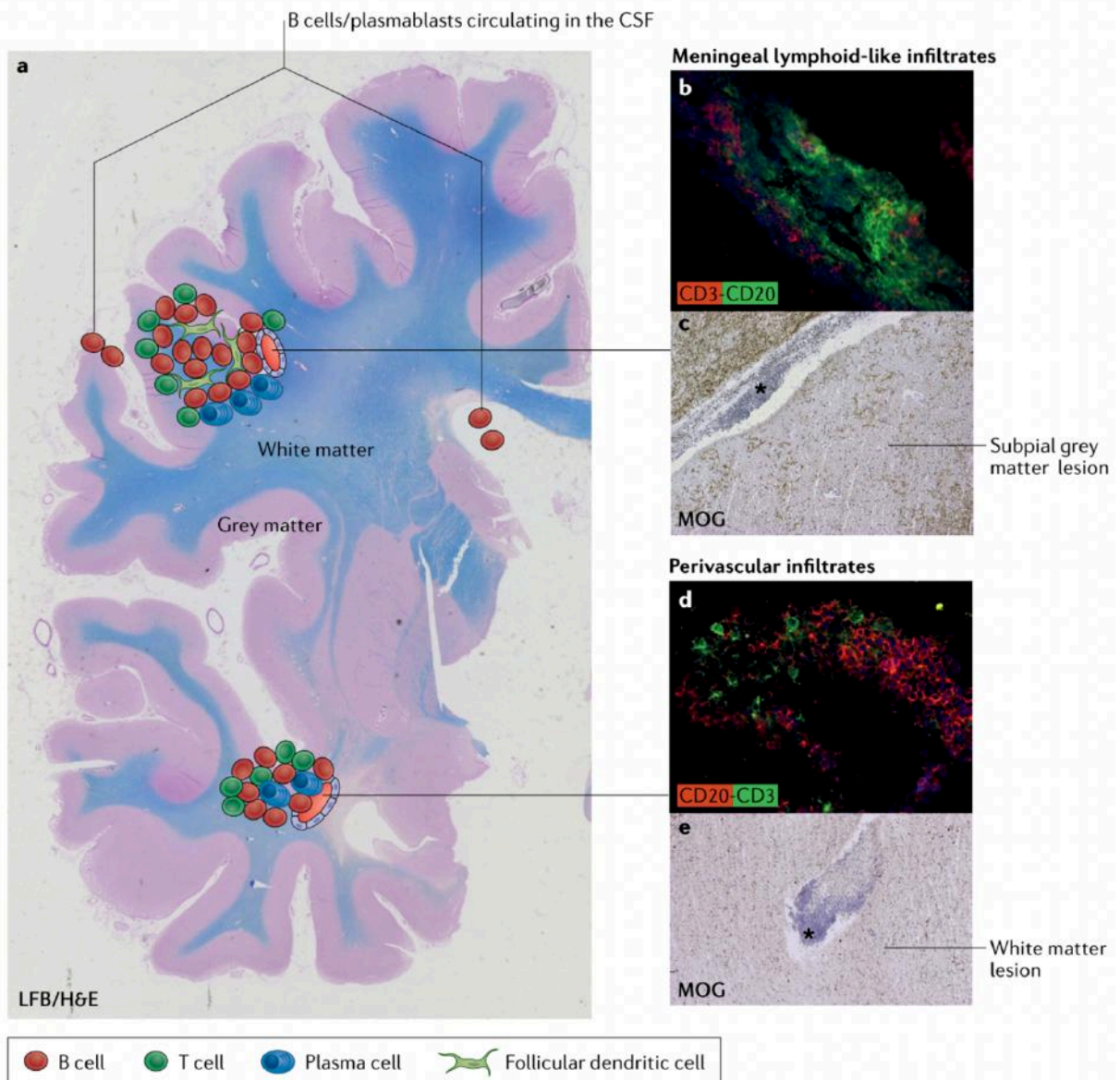
**Figure 2 :** L'évolution des mécanismes physiopathologiques des lymphocytes T et B dans la sclérose en plaques. (a) Modèle conventionnel avec un rôle central des lymphocytes T par déséquilibre entre les lymphocytes  $T_H1$  et  $T_H17$  effecteurs et les lymphocytes T régulateurs dans la physiopathologie de la SEP. (b) Modèle émergent avec un rôle clé des lymphocytes B lors d'une poussée médiée par les effets indépendents des anticorps (rélargage des cytokines et co-stimulation des lymphocytes T effecteurs).  $T_H$  : T-helper;  $B_{eff}$  : B effecteur;  $B_{reg}$  :B régulateur; IL : interleukine. D'après Li *et al.* (2018).

lymphocytes B immatures sortent dans le sang périphérique après une sélection négative initiale pour l'auto-réactivité dans le microenvironnement spécialisé de la moelle osseuse, elles migrent vers des organes lymphoïdes secondaires, tels que la rate et les ganglions lymphatiques, et se développent en lymphocytes B matures avec la co-expression d'IgD<sup>23</sup>. Les cellules dendritiques folliculaires sécrètent des cytokines, comme le *B-cell activating factor* (BAFF), pour attirer les lymphocytes B circulants vers les follicules et qui présentent des antigènes pour la reconnaissance du récepteur des lymphocytes B (BCR). Cependant, si l'antigène n'est pas rencontré, des fortes concentrations de sphingosine-1 phosphate (S1P) circulant attirent les lymphocytes B hors de l'organe lymphoïde secondaire dans d'autres tissus lymphoïdes afin de poursuivre une surveillance immunitaire<sup>22</sup>. Une fois que l'antigène du BCR est rencontré, les lymphocytes B sont activés et interagissent avec les cellules T auxiliaires CD4<sup>+</sup> qui les poussent soit à se différencier en plasmablastes et plasmocytes extra-folliculaires à courte durée de vie sécrétant des anticorps IgM, soit à se diriger vers les centres germinaux<sup>22</sup>. Ces centres germinaux peuvent soit conduire les cellules B, avec l'aide des cellules auxiliaires T-folliculaires, vers des plasmocytes à longue durée de vie, des lymphocytes B mémoire ou des lymphocytes B mémoire T-bet<sup>+</sup> qui sont capables de se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps une fois que l'antigène est à nouveau rencontré<sup>23</sup>.

En ce qui concerne la maladie, il est possible qu'un déséquilibre des lymphocytes B se manifeste par la déviation de divers contrôles du système immunitaire, conduisant ainsi à l'auto-immunité. Dans la SEP, le rôle des lymphocytes B dans la pathologie de la maladie est approché de plus en plus. En effet, la biopsie de lésions périvasculaires chez les patients SEP a permis de constater la présence d'immunoglobulines avec une



réactivité contre la MOG et la MBP au sein des macrophages et les débris de myéline<sup>24</sup>. Outre la présence d'une réactivité des Ig dirigée contre les antigènes de la myéline, la forte présence d'une augmentation de l'indice d'Ig et des BOC dans le LCR des patients atteints de SEP a apporté des éléments supplémentaires d'une synthèse intrathécale anormale des Ig à partir de l'expansion des clones de lymphocytes B et des plasmocytes<sup>25</sup>. L'isolement des BOC afin de caractériser les auto-anticorps pathogènes et leurs antigènes s'est avéré jusqu'à présent infructueux<sup>26</sup>. Cependant, certaines études ont démontré que les antigènes de ces BOC ciblent des protéines du soi intracellulaires ubiquitaires, et peuvent donc suggérer que les BOC pourraient plutôt être le résultat de débris cellulaires plutôt que de jouer un rôle directement pathogène<sup>27</sup>. De plus, il est établi que ces BOC et la faible population des lymphocytes B clonaux persistent tout au long de l'évolution de la SEP, mais la production des BOC et des lymphocytes B clonaux est hétérogène au sein de la population SEP<sup>27-29</sup>. Il a été démontré que les clones de lymphocytes B sont présents dans le sang circulant et se multiplient au niveau des ganglions cervicaux profonds<sup>27,30,31</sup>, remettant ainsi en question l'idée d'un « SNC site privilégié », devant des données suggérant que certaines sous-populations de lymphocytes B peuvent franchir la barrière des cellules endothéliales méningées chez les patients atteints de SEP<sup>32</sup>. La localisation des lymphocytes B chez les patients SEP notamment progressifs, est décrite principalement dans les méninges et les espaces périvasculaires, mais ils sont également décrits à l'intérieur du parenchyme<sup>33</sup> (Figure 3). Des follicules méningés ectopiques riches en lymphocytes B ont été observés lors de l'autopsie de patients atteints d'une SEP, ce qui suggère une atteinte corticale subpiaie des oligodendrocytes et des neurones, possiblement à l'origine de la progression de la



**Figure 3 :** Les infiltrats inflammatoires des espaces périvasculaires et des méninges chez les patients atteints d'une sclérose en plaques. (a) L'accumulation des infiltrats immunitaires dans les méninges (haut) et les espaces périvasculaires (bas), ainsi que la présence des lymphocytes B et plasmocytes circulants dans le LCR. (b) Infiltrate de lymphocytes T CD3<sup>+</sup> et lymphocytes B CD20<sup>+</sup> localisés dans les méninges sur une coupe histologique en post mortem d'un patient SEP. (c) Diminution du marquage MOG dans les régions subpiales suggérant que les infiltrats cellulaire au niveau des méninges sont responsables d'une démyélinisation corticale. (d) Infiltrat périvasculaire de cellules CD3<sup>+</sup> et CD20<sup>+</sup> associé à une démyélinisation de la substance blanche (e). MOG : *myelin oligodendrocyte glycoprotein*. CD : *cluster of differentiation*. D'après Cencioni *et al.*, 2021.

maladie<sup>34,35</sup>. Les lymphocytes B mémoire, définies comme des lymphocytes B CD27<sup>+</sup>, sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) très efficaces et qui possèdent des molécules co-stimulatrices à la surface des lymphocytes T ainsi que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II qui peut présenter les antigènes de la myéline aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup><sup>19,25,36</sup>. Les cellules B sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que le *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ), la lymphotoxine alpha, le *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) et l'IL-6, et il a été démontré que les patients atteints d'une SEP sécrètent de plus grandes quantités de ces cytokines pro-inflammatoires et moins de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10<sup>25,37,38</sup>, ce qui a des implications dans les phases précoces de l'évolution de la SEP<sup>39</sup>.

Des preuves indirectes d'un rôle pathogène des lymphocytes B mémoires proviennent de l'utilisation de la protéine de fusion recombinante atacicept dans les essais ATAMS et ATON, qui ciblaient le récepteur pour *transmembrane activator and CAML interactor* (TACI), *a ligand for B-cell survival factors a proliferation-inducing ligand* (APRIL) et BAFF<sup>40,41</sup>. L'essai ATAMS a révélé que les patients SEP s'aggravait sous atacicept<sup>40</sup>, tandis qu'une proportion plus élevée de patients présentant un SCI se transformait en SEP cliniquement définie sous atacicept par rapport au placebo<sup>41</sup>. Le mécanisme proposé pour expliquer l'aggravation clinique est que l'atacicept augmente la population de lymphocytes B mémoires tout en réduisant la survie des lymphocytes naïfs et des plasmocytes. De plus, il a été démontré que la réduction des taux de BAFF a un impact sur la fonction des lymphocytes B appelés régulateurs<sup>19,40,42</sup>.

Les traitements conçus pour cibler les lymphocytes T, jouent également un rôle en touchant la population de lymphocytes B mémoires<sup>19</sup>. Les anticorps monoclonaux

natalizumab et alemtuzumab, ainsi que les traitements oraux tels que la cladribine et le fingolimod, montrent des actions sur les lymphocytes B mémoires, ce qui peut suggérer un effet pléiotrope de ces traitements " hautement efficaces "19.

### **Les traitements de fond et leur évaluation dans la SEP :**

L'arsenal des traitements de fond dans le but de prévenir le handicap à long terme a évolué au cours des 20 dernières années avec un nombre croissant de traitements avec des efficacités et formes galéniques variables<sup>5</sup>. Les thérapies peuvent être divisées en thérapies immunomodulatrices, immunosuppressives et d'induction. Ces traitements peuvent être ensuite répartis selon leur « efficacité », avec les traitements considérés « hautement efficaces » comme les anticorps monoclonaux inhibant le VLA-4 (natalizumab), les modulateurs des récepteurs S1P (fingolimod, siponimod, ozanimod et ponésimod), les traitements qui déplètent les lymphocytes tels que les anticorps monoclonaux anti-CD52 (alemtuzumab), les anticorps monoclonaux anti-CD20 (ocrelizumab, rituximab, ofatumumab) et le traitement lymphotoxique, cladribine<sup>3</sup>.

Différentes stratégies de traitement ont été proposées au fil des années, notamment le concept de thérapie par "escalade", qui privilégie une approche par étapes avec une thérapie appelée de première intention et utilisant des traitement d'efficacité modérée et le recours à une thérapie hautement efficace plus tard après l'échec du premier traitement; l'approche de « maintenance » qui consiste à initier précocement un traitement dit hautement efficace ; ou même à utiliser initialement un traitement d'induction suivi d'un traitement de maintien<sup>3</sup>. Deux essais cliniques, TREAT-MS et

DELIVER-MS, sont en cours et visent à évaluer si un traitement précoce avec un traitement de fond hautement efficace est préférable à un traitement d'escalade<sup>43</sup>.

Il est important de souligner l'évolution de l'évaluation des traitements pour la SEP. Dans la SEP-R, les premiers essais cliniques ont évalué les traitements de fond sur la base de leur taux annualisé de poussées (« *annual relapse rate* » ou ARR), avec une baisse de l'ARR observée au cours des décennies suivantes. Pour déterminer si cet effet clinique sur les poussées impacte le contrôle du cumul du handicap au long cours, il faudrait une observation plus longue et avec une plus grande puissance pour montrer une efficacité, ce qui représente une contrainte dans les essais cliniques randomisés (ECR)<sup>44</sup>. C'est pourquoi une nouvelle mesure composite des résultats a été proposée, le « *disease activity free status* » (DAFS), qui intègre la progression clinique de la maladie et l'activité de l'IRM<sup>44</sup>. La formulation du DAFS a ensuite évolué vers celle de « *no evident disease activity* » (NEDA-3), qui se définit par l'absence de poussées, de progression clinique définie et d'activité sur l'IRM. Plus en détail, selon Giovannoni et collègues<sup>45</sup> :

- Les **poussées** sont définies comme " des nouveaux symptômes neurologiques ou une aggravation de ceux-ci persistant  $\geq 24$  heures en l'absence de fièvre ou d'infection ".
- La **progression** est définie comme « une augmentation du score de l'*Expanded Disability Status Scale* (EDSS) de  $\geq 1$  point pour les scores compris entre 0,5 et 5,0,  $\geq 1,5$  point si l'EDSS est 0 et  $\geq 0,5$  si l'EDSS  $\geq 5,5$  ».
- **L'activité par IRM** est définie comme « toute nouvelle lésion T2 ou élargissement de lésions T2 ou de lésions rehaussées par le gadolinium ».

Il convient de préciser que cette évaluation favorise l'inflammation focale et est fortement influencée par l'activité de l'IRM, et qu'elle ne tient pas en compte le déclin cognitif ou l'atrophie cérébrale<sup>45</sup>. D'autres marqueurs cliniques/radiologiques/biologiques ont été proposés, notamment l'évaluation cognitive, l'atrophie cérébrale, les taux de chaînes légères des neurofilaments et les mesures des couches neurologiques de la rétine par tomographie par cohérence optique, dans l'évaluation de NEDA <sup>44,46-48</sup>.

Seules les études post-hoc analysent le statut NEDA et montrent un pourcentage modeste de patients SEP atteignant un NEDA-3 entre 1 et 2 ans de traitement<sup>44</sup>. En outre, il existe plusieurs divergences dans la définition du statut NEDA dans ces ECR<sup>45</sup>. Cependant, il faut souligner les différences dans le délai de l'examen IRM de référence (« *rebaseline* »), qui peut être effectué trop tôt et avant le début de l'efficacité du traitement<sup>44</sup>. Des données récentes provenant des essais OPERA I et II ont montré qu'avant le *rebaseline* de l'IRM, 47,7 % des patients étaient NEDA, alors qu'après le *rebaseline*, 72,2 % des patients étaient NEDA à la semaine 24<sup>49</sup>. L'étude CASTING a également démontré que 74,8 % des patients SEP-R traités par l'ocrelizumab ont obtenu le statut NEDA à la semaine 96, avec un *rebaseline* de l'IRM à la semaine 8<sup>50</sup>.

Il est intéressant de noter que le NEDA semble insuffisant pour prédire la stabilité à long terme. Cree et collaborateurs ont observé que les patients SEP qui atteignaient un NEDA-3 à 2 ans présentaient une progression similaire en termes d'EDSS par rapport aux patients non NEDA-3<sup>51</sup>. Une majorité de patients SEP qui ont obtenu le statut NEDA-3 à 2 ans ont également démontré un déclin cognitif significatif sur la *Brief Repeatable Battery*<sup>48</sup>, et de plus, le statut NEDA est binaire et ne prend pas en compte et ne différencie pas une progression clinique significative ou un cumul de lésions IRM de petite

taille et isolées<sup>44</sup>. Par conséquent, étant donné le poids de l'activité de l'IRM dans le résultat composite de NEDA, des évaluations moins strictes de l'efficacité d'un traitement ont également été proposées avec le terme « *minimal evidence of disease activity* » (MEDA) chez les patients SEP-R, et est défini comme l'absence de poussées et une faible activité sur l'IRM<sup>52</sup>. Ici, une faible activité sur l'IRM est définie par < 3 nouvelles lésions en T2 et l'absence de lésions rehaussées par le gadolinium (à noter que les lésions augmentant de volume n'ont pas été incluses)<sup>52</sup>. Chez les patients SEP-R traités par l'acétate de glatiramère (AG), il a été constaté que ceux qui étaient MEDA présentaient un risque minime de développer une invalidité à long terme ; bien que le critère de jugement principal fût un EDSS  $\geq 6,0$ <sup>52</sup>.

Les thérapies hautement efficaces ont montré des résultats prometteurs dans de nombreux essais contrôlés randomisés pour contrôler la SEP et retarder la progression vers un handicap neurologique, même si ce paramètre est demeuré un objectif secondaire.

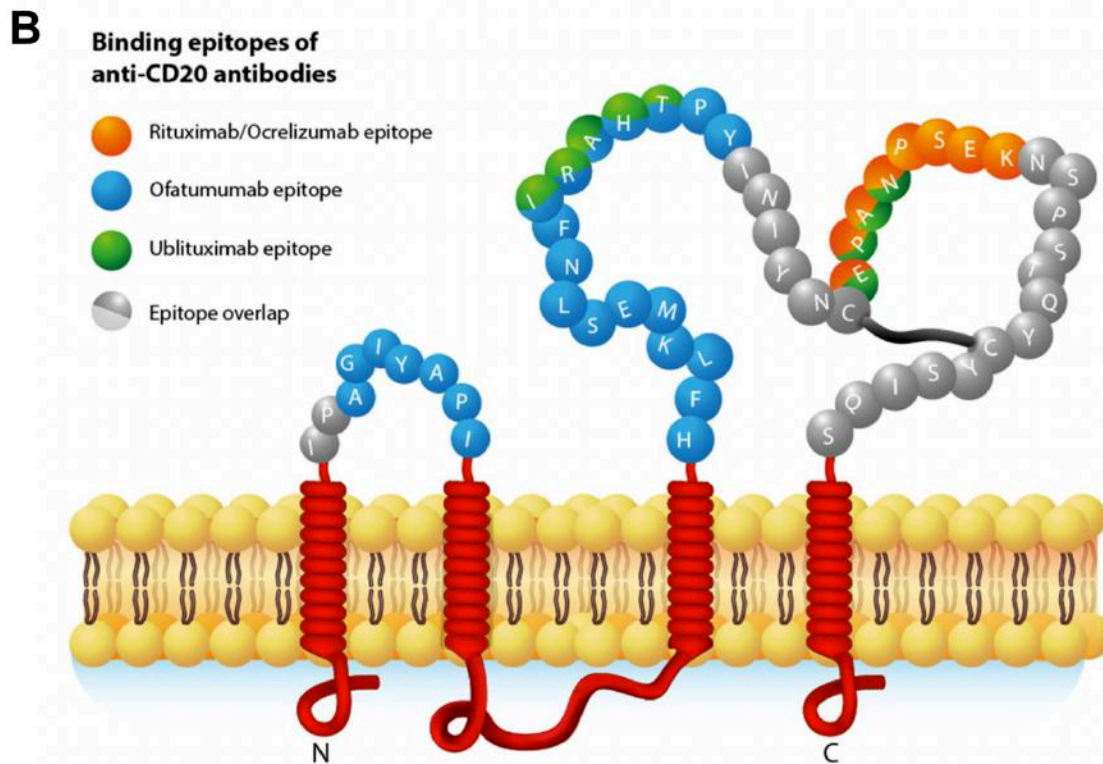
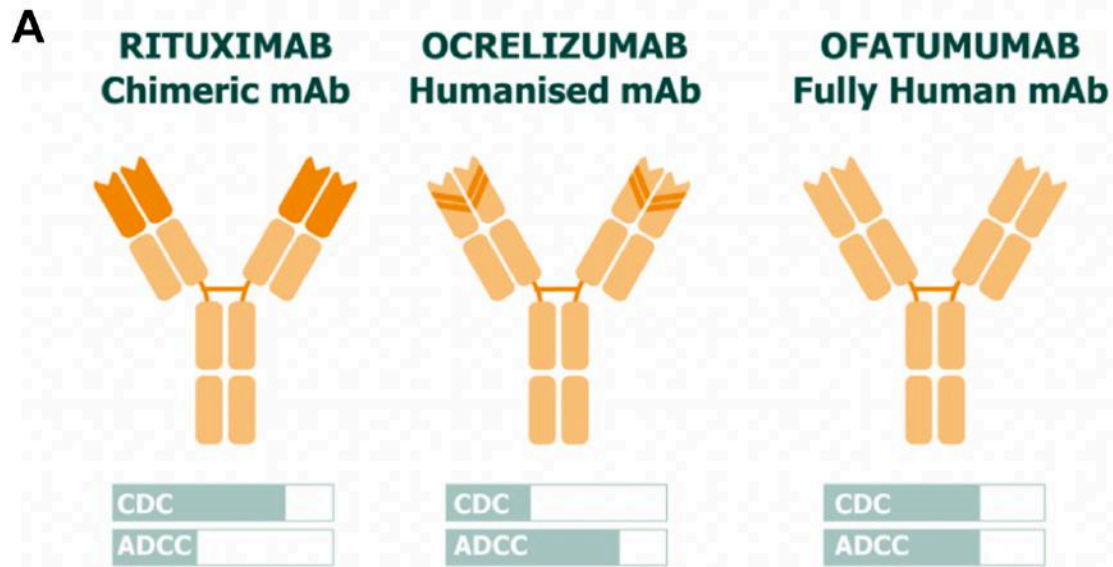
### **Les anticorps monoclonaux anti-CD20**

Les traitements à base d'anticorps monoclonaux anti-CD20 ciblent le CD20, qui est une phosphoprotéine transmembranaire de 35 kDa localisée à la surface de la membrane cellulaire de 95 % des lymphocytes B, ainsi que d'une faible sous-population des lymphocytes T<sup>53</sup>. Toutes les lymphocytes B ne sont pas ciblés car le traitement épargne les cellules souches, les plasmablastes et les plasmocytes à courte et longue durée de vie<sup>54</sup>. Ces anticorps monoclonaux déplètent leurs cellules cibles par plusieurs mécanismes différents : toxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), cytotoxicité

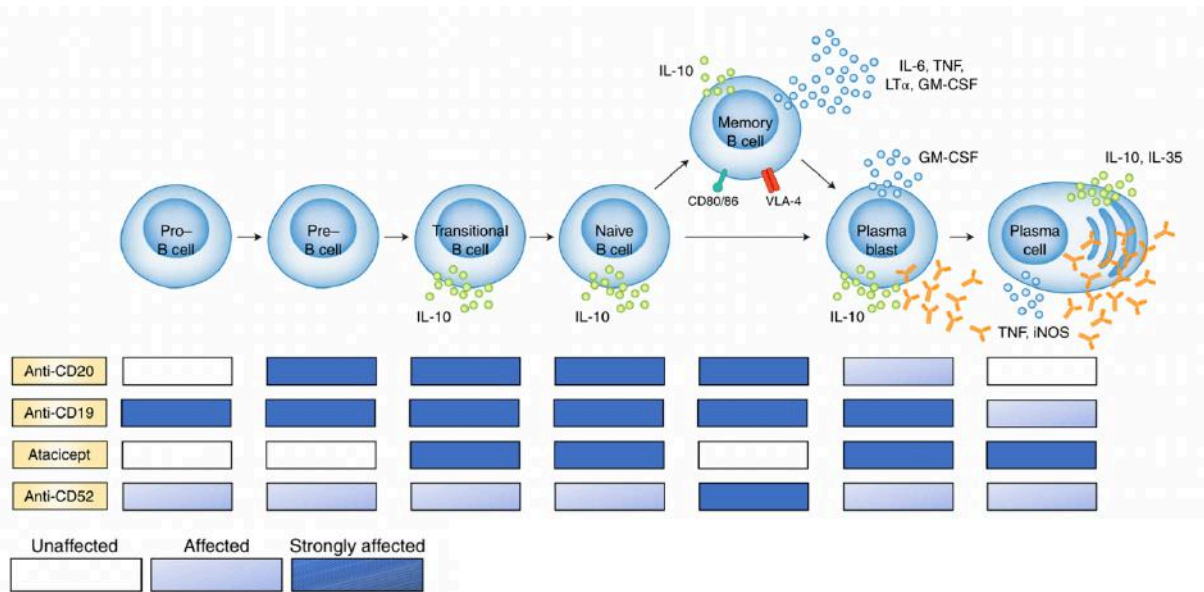
dépendante du complément (CDC), promotion de la mort cellulaire programmée par l'apoptose et la phagocytose cellulaire médiée par les récepteurs Fc-gamma<sup>55</sup>. Alors que les traitements anti-CD20 disponibles ciblent les CD20, il est à noter qu'ils exercent leur effet avec des degrés variables d'ADCC et de CDC<sup>54</sup> (Figure 4). En effet, les traitements anti-CD20 disponibles actuellement utilisés dans la SEP (ocrélizumab, ofatumumab et rituximab) sont décrits comme des anticorps anti-CD20 de type 1 puisqu'ils sont capables de transloquer le CD20 dans les radeaux lipidiques, ce qui favorise le recrutement et l'activation des protéines du complément<sup>56</sup>. Avec le rituximab, la plus grande activité CDC entraîne un risque plus élevé de déclencher des réactions systémiques liées à la perfusion<sup>57</sup>. De plus, en raison de l'action différentielle des mécanismes de déplétion, il est donc possible que ces thérapies aient des effets non similaires en termes de déplétion cellulaire.

Alors que les traitements par anticorps anti-CD20 entraînent une diminution du taux des lymphocytes B CD20<sup>+</sup> circulants, il faut savoir que leur action dans le tissu lymphoïde secondaire et le SNC est différente (Figure 5). Une étude de Reff *et al.* a montré que des doses variables de traitement par anticorps anti-CD20 n'entraînaient qu'une diminution de 40 à 70 % des lymphocytes B dans les ganglions lymphatiques des singes cynomolgus<sup>58</sup>. De plus, la diffusion des anticorps anti-CD20 franchit faiblement la barrière hémato-encéphalique (BHE), seulement 0,1 % du rituximab IV atteint le SNC dans le cas d'une BHE intacte<sup>59</sup> ; cependant, il a été démontré que la





**Figure 4** : Structure des anticorps anti-CD20 utilisé dans la SEP et leurs épitopes sur la molécule CD20. (A) La région variable du rituximab est dérivée de la souris, alors que la région variable est humanisée pour l'ocrelizumab et humaine pour l'ofatumumab. (B) Les différents épitopes des molécules anti-CD20. CDC : cytotoxicité dépendante du complément. ADCC : toxicité cellulaire dépendante des anticorps. D'après Comi *et al.* (2021) et Bar-Or *et al.* (2021).



**Figure 5 :** Cibles distinctes des anti-CD20, atacicept et alemtuzumab sur les lymphocytes B circulants. Les anti-CD20 touche les lymphocytes B de manière différentielle du fait de l'absence de CD20 sur la membrane cellulaire des lymphocytes pro-B et les plasmocytes. D'après Li. *et al* (2018).

que la perfusion IV rituximab peut entraîner une diminution significative du nombre de lymphocytes B dans le LCR<sup>60</sup>. Malgré ces différences de diffusion dans les différents tissus, l'impact des thérapies anti-CD20 est sans précédent dans le traitement des maladies auto-immunes ainsi que dans la SEP.

### **Les traitements anti-CD20 dans la sclérose en plaques :**

Le succès des essais cliniques de phase II et III utilisant les traitements anti-CD20 a fait évoluer la prise en charge non seulement des patients SEP-R<sup>61-65</sup>, mais également les patients SEP-PP<sup>66</sup>. Comme susmentionné, les anti-CD20 disponibles actuellement dans le traitement de la SEP sont l'ocrelizumab et l'ofatumumab [tous les deux avec l'autorisation de mise sur le marché (AMM)], ainsi que le rituximab utilisé hors AMM en France, mais autorisé en Suède et Norvège. Ci-dessous, le traitement par anticorps

anti-CD20 concerné sera détaillé ainsi que les données cliniques appuyant son efficacité thérapeutique.

### **Rituximab:**

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique génétiquement modifié de 145 kDa et de sous-classe IgG<sub>1</sub>, avec une région variable dérivées de la souris et d'une région constante humaine<sup>55</sup>. Comme mentionné ci-dessus, le rituximab entraîne une activité d'ADCC et de CDC sur les cellules CD20<sup>+</sup>, avec une préférence pour la CDC (Figure 4A). En général, les patients bénéficient d'une dose d'induction de 1000 mg de rituximab en intraveineux (IV) avec deux perfusions espacées de 15 jours, ce qui est comparable aux schémas thérapeutiques appliqués dans la polyarthrite rhumatoïde, suivie d'une injection d'entretien de 1000 mg tous les 6 mois<sup>67</sup>.

Les premiers essais publiés sur le rituximab dans la SEP sont celles réalisées en 2008 par Hauser *et al.* et Bar-Or *et al.*<sup>61,62</sup>. L'étude de phase II, HERMES, a randomisé 104 patients SEP-R pour leur administrer soit un placebo soit du rituximab par voie IV<sup>62</sup>. Elle a observé une réduction significative du nombre de lésions rehaussées par le gadolinium sur l'IRM cérébrale entre 12 et 48 semaines, ainsi qu'une diminution significative de l'ARR à 24 semaines<sup>62</sup>. Dans l'essai ouvert de phase I de Bar-Or *et al.*, qui a évalué des patients SEP-R recevant deux cures de rituximab en intraveineux, les auteurs ont observé une réduction persistante des poussées et des nouvelles lésions/lésions rehaussées par le gadolinium sur l'IRM jusqu'à 72 semaines<sup>61</sup>. Bien que cette étude ne comportât pas de groupe témoin, il est important de mentionner les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques recueillies dans cette étude, à

savoir que la demi-vie d'élimination terminale moyenne du rituximab était de 22,0 jours et que des anticorps anti-humains anti-souris (HACA) ont été observés chez 24,1% des patients à la semaine 48<sup>61</sup>. Étonnamment, aucune poussée n'a été observée chez les patients ayant développé des HACA<sup>61</sup>. Dans ces deux études, l'événement indésirable le plus fréquent était lié à la perfusion, généralement dans les 24 heures suivant la première perfusion, et qui diminuait progressivement après les cures suivantes (à savoir que les corticoïdes n'étaient pas pré-administrés dans les deux études)<sup>61,62</sup>.

Le rituximab a été également évalué chez les patients SEP-PP dans l'essai de phase II/III en double aveugle, OLYMPUS, dans lequel les patients ont reçu soit 4 cures de placebo, soit du rituximab par voie IV. Bien que l'essai se soit avéré négatif en ce qui concerne l'objectif principal de progression confirmée de la maladie (PDC), des analyses de sous-groupes ont suggéré un effet chez les patients qui étaient plus jeunes (<51 ans) et actifs (lésions rehaussées par le gadolinium sur l'IRM de *baseline*)<sup>68</sup>.

Les résultats à long terme du rituximab ont également été évalués par d'autres ECRs. Dans l'étude monocentrique en double aveugle de Honce *et al.*, les patients ont été affectés soit par une monothérapie par l'acétate de glatiramère (AG), soit par une induction avec le rituximab suivie d'un traitement d'entretien par l'AG. L'objectif principal était le NEDA-3<sup>69</sup>. Les patients SEP-R traités initialement par rituximab en induction suivi d'un traitement d'entretien par AG a montré une proportion plus importante de NEDA-3 par rapport à l'AG seul au début de l'étude ; cependant, cela ne s'est pas maintenu après 30 mois<sup>69</sup>. L'étude RIFUND-MS, qui a randomisé les patients SEP-R ou CIS soit au diméthylfumarate soit au rituximab avec une dose d'induction initiale de 1000 mg à 15 jours d'intervalle et une dose d'entretien de 500 mg tous les six mois, a montré une

réduction significative du pourcentage de patients présentant au moins une poussée sous traitement dans le groupe rituximab <sup>70</sup>.

L'injection intrathécale de rituximab à faible dose a fait l'objet d'une étude de phase Ib dans le SEP-SP et a permis d'observer une déplétion des lymphocytes B circulants<sup>71</sup>, tandis que l'essai RIVITALISE, qui a utilisé à la fois le rituximab en intrathécal et en intraveineux à faible dose en comparaison avec un placebo, a observé une aggravation clinique dans les deux bras ainsi qu'une déplétion incomplète des lymphocytes B dans le compartiment du SNC<sup>72</sup>. De plus, des données rétrospectives suggèrent que le rituximab chez les patients SEP-SP présente une diminution CDP (cumul de progression) par rapport aux patients atteints de SEP-SP qui n'ont jamais été traités par le rituximab<sup>73</sup>.

### **Ocrélizumab**

L'ocrelizumab est un anticorps monoclonal humanisé anti-CD20 de 145 kDa, génétiquement modifié, de la sous-classe IgG1, dont l'épitope est semblable à celui du rituximab (Figure 4B)<sup>57</sup>. L'action de l'ADCC semble être plus active dans l'ocrelizumab par rapport au rituximab (Figure 4A)<sup>74</sup>. Compte tenu de la plus faible activité de l'ADCC de l'ocrelizumab, il est supposé que cela explique la diminution des réactions systémiques liées à la perfusion<sup>56</sup>. Approuvé par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en janvier 2017, l'ocrelizumab est administré à une dose de 600 mg tous les six mois, où la première cure est divisée en deux injections de 300 mg à 15 jours d'intervalle<sup>75</sup>. Cette posologie a été établie sur la base de l'ECR de phase II portant sur des patients SEP-R traités par de l'ocrelizumab à faible dose (600 mg) ou à forte dose (2000 mg), et qui n'a pas observé de différence significative dans la réduction de l'ARR

entre les deux posologies<sup>76</sup>. Les données pharmacocinétiques suggèrent que la demi-vie terminale de l'ocrelizumab est de 26,0 jours<sup>77</sup> et que le développement d'anticorps anti-humains est rare<sup>76</sup>.

L'efficacité de l'ocrelizumab dans le SEP-R a été observée dans les ECRs de phase III, OPERA I et II, où l'ocrelizumab toutes les 24 semaines a été comparé à l'interféron bêta-1a par voie sous-cutanée chez des patients SEP-R, avec comme critère de jugement principal l'ARR à 96 semaines<sup>63</sup>. Dans cette étude, il a été démontré que l'ARR ainsi que l'accumulation des lésions en IRM étaient significativement plus faible chez les patients traités par l'ocrelizumab à 96 semaines, <sup>63</sup>. L'extension en ouvert des études OPERA I et II a observé un CDP (cumul de progression du handicap) plus faible et moins de perte de volume cortical chez les patients SEP-R qui avaient démarré plus précocement l'ocrelizumab après 5 ans <sup>78</sup>. Une analyse post-hoc supplémentaire des études OPERA I et II a détaillé l'efficacité du traitement à long terme par l'ocrelizumab chez les patients SEP-R, avec 72,2 % des patients atteignant un statut NEDA-3 après une IRM dite « *rebaselined* » entre 24 et 96 semaines après l'administration de l'ocrelizumab<sup>49</sup>. Enfin, l'étude CASTING a observé l'obtention du statut NEDA chez 74,8% des patients atteints de SEP-R<sup>50</sup>. Ces résultats suggèrent que l'ocrelizumab est un traitement hautement efficace dans le SEP-R avec une efficacité durable après un traitement au long cours.

L'évaluation de l'ocrelizumab dans la SEP-PP fût effectuée dans l'étude de phase III, ORATORIO, dans laquelle les patients SEP-PP ont été randomisés pour recevoir soit un placebo, soit 600 mg d'ocrelizumab toutes les 24 semaines pendant au moins 120 semaines<sup>66</sup>. L'étude a montré que le traitement par l'ocrelizumab était associé à un

pourcentage plus faible de CDP à 12 semaines par rapport au placebo, et a suggéré par une analyse de sous-groupe que, comme pour le rituximab dans la SEP-PP, des bénéfices pourraient être obtenus chez les patients ayant une activité inflammatoire sur l'IRM de *baseline* et ceux âgés de moins de 45 ans<sup>66</sup>. De plus, l'atrophie sur l'IRM était plus lente et le volume des hypersignaux en T2 entre le début de l'étude et la 120e semaine était diminué sous ocrélizumab<sup>66</sup>. L'analyse des données intermédiaires de l'extension en ouverte de l'étude ORATORIO a montré que les patients qui avaient été initialement traités par l'ocrélizumab présentaient un CDP plus faible à 24 semaines que ceux qui étaient passés du placebo à l'ocrélizumab<sup>79</sup>. Les résultats de l'IRM étaient également favorables dans l'analyse de l'extension, avec un volume cumulé des hypersignaux en T2 et hyposignaux en T1 significativement inférieurs à 144 semaines chez les patients traités en continu par l'ocrélizumab<sup>79</sup>.

Bien que les essais OPERA I et II aient inclus un faible pourcentage de patients SEP-SP<sup>63</sup>, aucun essai contrôlé randomisé avec l'ocrelizumab n'a été réalisé spécifiquement pour les patients SEP-SP. Les données probantes du monde réel suggèrent que l'ocrélizumab chez cette population de patients présente une amélioration clinique durable après 24 semaines de traitement<sup>80</sup>.

### **Ofatumumab**

L'ofatumumab est un anticorps monoclonal anti-CD20, de sous-classe IgG<sub>1</sub>, entièrement humanisé qui se lie à une courte boucle extracellulaire de CD20, qui diffère de l'épitope du rituximab et de l'ocrélizumab<sup>74</sup> (Figure 4B). Cet anticorps monoclonal est capable d'induire à la fois l'ADCC et le CDC (avec toutefois une prédominance de CDC)

même dans les cas où l'expression de CD20 est faible (Figure 4A)<sup>55</sup>. Les essais cliniques de phase II relatifs à l'ofatumumab ont initialement évalué des formulations IV, dont la posologie variait de 100 à 700 mg<sup>81</sup> ; cependant, l'approbation du médicament par l'EMA chez les patients SEP-R se fait actuellement avec un schéma d'administration mensuel de 20 mg par voie sous-cutanée.

L'essai de phase II évaluant la sécurité et l'efficacité de l'ofatumumab par voie IV avec des doses différentes à deux semaines d'intervalle dans le SEP-R a observé une réduction significative du nombre de lésions T2 et de lésions rehaussées par le gadolinium de 8 à 24 semaines par rapport au placebo<sup>81</sup>. L'étude MIRROR, une étude de phase IIb en double aveugle, a évalué la déplétion incomplète des lymphocytes B circulants périphériques en utilisant des formulations sous-cutanées croissantes d'ofatumumab (3 mg à 60 mg) toutes les 12 semaines ou 4 semaines chez les patients atteints de SEP-R par rapport au placebo, avec pour critère de jugement principal le nombre cumulé de nouvelles lésions rehaussées par le gadolinium à 12 semaines<sup>64</sup>. Il a été observé que les formulations  $\geq 30$  mg/12 semaines étaient suffisantes pour réduire jusqu'à 90 % des nouvelles lésions rehaussées par le gadolinium par rapport au placebo<sup>64</sup>. En outre, très peu d'anticorps anti-humains se développent avec l'ofatumumab par voie sous-cutanée<sup>64,82</sup>.

Une évaluation plus détaillée de l'ofatumumab par voie sous-cutanée dans la SEP-R a été réalisée dans le cadre des essais de phase III ASCLEPIOS I et II<sup>65</sup>. Ici, l'ofatumumab par voie sous-cutanée à raison de 20 mg toutes les 4 semaines (des doses de charge de 20 mg ont été administrées aux jours 1, 7 et 14) a été comparé au tériflunomide par voie orale pendant une période allant jusqu'à 30 mois, avec comme



critère de jugement principal l'ARR<sup>65</sup>. Cette dernière a observé des ARR plus faibles et une réduction significative de l'activité inflammatoire sur l'IRM (nouvelles lésions ou agrandissement des lésions en T2 et des lésions rehaussées par le gadolinium) chez les patients recevant de l'ofatumumab par rapport au tériflunomide<sup>65</sup>. Le suivi jusqu'à 3,5 ans dans une analyse groupée des essais ASCLEPIOS I et II, ALITHIOS et APLIOS montre que ce traitement est relativement bien toléré, avec peu d'effets indésirables graves<sup>83</sup> (voir ci-dessous la section « Tolérance du traitement anti-CD20 »).

### **Les effets immunologiques des thérapies anti-CD20 dans la sclérose en plaques :**

Étant donné la synthèse intrathécale d'Ig dans la SEP, il a été postulé que les thérapies visant à supprimer les lymphocytes B pourraient atténuer l'inflammation et contrôler la maladie en ciblant les lymphocytes B mémoire du SNC qui se différencient finalement en plasmocytes producteurs d'Ig. En fait, il a été observé que, même si les lymphocytes B périphériques sont considérablement réduits après un traitement anti-CD20, l'index de synthèse d'Ig intrathécale et le nombre de BOC dans le LCR se maintiennent à des valeurs similaires à celles d'avant traitement<sup>27,60,84</sup>. Alors que les effets immunologiques des traitements anti-CD20 dans la SEP ne sont pas encore connus, les effets sont probablement pléiotropes avec plusieurs mécanismes qui pourraient entrer en jeu (Figure 6).



**Figure 6** : Les effets des anticorps anti-CD20 sur les (sous)-populations T/B lymphocytaires et les marqueurs solubles des lymphocytes B dans le LCR ainsi que dans le sang. OCB : *oligoclonal bands*; BAFF : *B-cell activating factor*, CXCL13 : *chemokine ligand 13*. D'après Cencioni *et al.* (2021)

L'une des hypothèses concernant l'effet immunologique des traitements anti-CD20 dans la SEP est que les lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> sont des cellules présentatrices d'antigènes dépendantes du CMH-II très efficaces, capables de reconnaître des épitopes conformationnels tridimensionnels et de présenter les antigènes de la myéline aux lymphocyte T, et il a été démontré que le rituximab réduit considérablement cette population de lymphocytes B après une seule injection<sup>27,53</sup>. De plus, ces cellules B mémoires favorisent la prolifération des lymphocytes T auto-réactives T<sub>h</sub>1 du SNC<sup>36</sup>. Ainsi, la déplétion de ces sous-populations de lymphocytes B peut atténuer l'activation des lymphocytes T effecteurs<sup>27</sup>. Il a également été démontré que les lymphocytes B mémoire sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF $\alpha$ , la lymphotoxine $\alpha$ , l'IL-6 et le GM-CSF, qui ont été considérés comme des éléments contribuant à générer des lymphocytes T<sub>h</sub>17 dans la SEP<sup>38</sup>. La déplétion des lymphocytes B avec une diminution de la sécrétion de cytokines diminue donc les réponses inflammatoires des lymphocytes T et des cellules myéloïdes<sup>27</sup> (Figure 6).

En plus des lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup>, une sous-population de lymphocytes T CD20<sup>+</sup> a été observée pour être différentiellement exprimée chez les patients SEP par rapport aux contrôles, et ils sont également reconnus comme étant pro-inflammatoires en produisant de manière constitutive du TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-17<sup>53,85-87</sup>. Cette population représente près de 5% de la population totale des lymphocytes T circulants et sont caractérisés comme des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD20<sup>dim</sup> en cytométrie en flux<sup>53</sup>. Le traitement par anticorps anti-CD20 élimine efficacement ces lymphocytes T circulants<sup>53,85-87</sup>; cependant, il reste à démontrer si cela a une signification biologique et clinique. Étant donné que les traitements anti-CD19 ont été relativement efficaces dans le contrôle de la

SEP, et qu'ils ne ciblent donc pas les cellules CD20<sup>+</sup>, il semblerait que la déplétion de cette population de lymphocytes T ne soit pas le seul effet du traitement anti-CD20<sup>25</sup>.

### **Déplétion, reconstitution et répertoire des cellules B/T après un traitement anti-**

#### **CD20 :**

À la suite d'un traitement par un anti-CD20, le marqueur CD19 est utilisé afin de repérer la repopulation des lymphocytes B circulants, puisque cette protéine de surface est épargnée par l'anticorps anti-CD20. La définition de la déplétion des lymphocytes B est classiquement définie par le taux de lymphocytes CD19<sup>+</sup> inférieur à 1% de la numération lymphocytaire totale (CD45<sup>+</sup>) ; cependant, d'autres études ont utilisé d'autres définitions telles que le taux de < 2% de la numération lymphocytaire totale ainsi que des taux absolus de CD19<sup>+</sup> compris entre 0 et 10 cellules/ $\mu$ L<sup>8</sup>. De plus, il est important de noter que la déplétion des lymphocytes B fait référence aux lymphocytes B CD19<sup>+</sup> circulants dans le sang périphérique sur la cytométrie en flux. Ces différences dans la détermination de la « déplétion » peuvent avoir un impact sur la généralisation de la comparaison des études utilisant différents seuils pour la déplétion des cellules B.

La cinétique de la déplétion et de la repopulation des lymphocytes B a été étudiés chez des patients atteints de maladies auto-immunes et également dans la sclérose en plaques. En ce qui concerne la SEP, dans les études princeps du traitement anti-CD20 dans la SEP avec le rituximab par voie intraveineuse<sup>62</sup>, les lymphocytes B étaient déplétés (définis ici comme une réduction de plus de 95 % des lymphocytes CD19<sup>+</sup> par rapport au *baseline*) après deux semaines, et un autre groupe a constaté que 99,8 % des patients étaient déplétés à la deuxième semaine du traitement<sup>61</sup>, bien que la définition de

la « déplétion » n'ait jamais été précisée, mais on suppose qu'il s'agit très probablement de l'absence de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> dans le sang périphérique. Cette déplétion semble se maintenir jusqu'à plusieurs mois après une cure<sup>61</sup>. Néanmoins, après un traitement par le rituximab dans le SEP-R et le SEP-PP, une reconstitution notable a été observée chez 30-34,5% des patients SEP-R à la semaine 48 post-rituximab<sup>61,62</sup>, et 35% avec des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> supérieures à 80 cellules/mm<sup>3</sup> chez les patients SEP-PP à la semaine 50 post-rituximab<sup>68</sup>.

Dans les essais OPERA I et II, l'ocrelizumab a permis une déplétion presque complète à la semaine 2, et cette déplétion s'est maintenue jusqu'à 96 semaines après des perfusions toutes les 24 semaines<sup>63</sup>. Des résultats similaires ont été observés dans l'essai ORATORIO, où le nombre de lymphocytes CD19<sup>+</sup> était presque inexistant entre la semaine 2 et 120<sup>66</sup>. Une repopulation aux valeurs de base ou à la limite inférieure de la normale a été observée dans un délai médian de 72 semaines après l'administration d'ocrelizumab chez 90 % des patients atteints de SEP-R<sup>67</sup>.

Notons que la déplétion des lymphocytes B avec l'ofatumumab semble être proportionnelle à la posologie, et que la déplétion des lymphocytes B (définie ici comme < 10 cellules/mm<sup>3</sup>) n'a été observée que chez 82 à 85 % des patients à la semaine 2<sup>64,65</sup>. En revanche, après la semaine 12, 98,2 % des patients présentaient une déplétion des lymphocytes B<sup>82</sup>. Compte tenu de l'administration sous-cutanée de la molécule et du fait que cette voie peut permettre un accès plus direct aux ganglions lymphatiques par le réseau lymphatique, il peut y avoir des différences dans l'effet des thérapies anti-CD20 en fonction de leur mode d'administration<sup>82</sup>. La reconstitution des lymphocytes B a été observée 24 à 36 semaines après la dernière injection sous-cutanée d'ofatumumab chez

50 % des patients<sup>67</sup>, tandis que tous les patients de l'étude ayant reçu l'ofatumumab intraveineux ont présenté une reconstitution des lymphocytes B circulants à 104 semaines<sup>81</sup>.

La repopulation des lymphocytes B suit des tendances hétérogènes, mais plusieurs facteurs peuvent influencer la cinétique de la repopulation des lymphocytes B chez les patients SEP. Il a été observé que la repopulation des lymphocytes B était plus rapide chez les patients SEP ayant un indice de masse corporelle plus élevé<sup>89</sup>. Il a également été démontré que les patients SEP dont le taux absolu de lymphocytes CD19<sup>+</sup> était plus important avant le début du traitement par anti-CD20 présentaient une repopulation plus rapide des lymphocytes B, et que ceux-ci présentaient également une activité inflammatoire plus importante sur l'IRM à 12 mois<sup>90</sup>. Une repopulation précoce des lymphocytes B a également été observée chez les patients dont les sous-populations de lymphocytes B en *baseline* étaient plus naïves, transitionnelles et comportait des plasmablastes<sup>88</sup>. Néanmoins, aucun consensus n'a été publié pour tenir compte de ces données en vue d'adapter les stratégies de posologie des traitements anti-CD20.

L'étude de la repopulation des lymphocytes B chez les patients SEP après un traitement anti-CD20 est un champ d'intérêt croissant depuis 10 ans. Les phénotypes de cellules B à 25 semaines post-rituximab chez les patients SEP sont principalement des lymphocytes B naïfs et transitionnels IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, avec une repopulation supplémentaire de plasmocytes/plasmablastes CD19<sup>+</sup>CD27<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> au cours de cette même période<sup>53</sup>. Il est intéressant de noter que les lymphocytes B qui se repeuplent chez les patients SEP 8 à 24 mois après l'administration du rituximab expriment davantage de marqueurs d'activation de surface, tels que le CD95, ainsi que les molécules co-stimulatrices des

lymphocytes T, le CD40 et le CD86, et augmentent la sécrétion basale d'IL-6<sup>91</sup>. Quant aux lymphocytes B mémoires, la repopulation de cette sous-population chez les patients SEP apparaît beaucoup plus tardivement, même après 12 mois post-traitement par rituximab<sup>53,91</sup>. Enfin, une étude a relevé une proportion croissante de lymphocytes B « double-négatifs » après plusieurs cures de rituximab chez des patients SEP qui avaient présenté une repopulation précoce des lymphocytes B<sup>88</sup> ; toutefois, le rôle de cette population de lymphocytes B dans la SEP reste à définir.

Une étude menée par Palanichamy et collaborateurs a démontré qu'une cure de rituximab semblait dépléter de manière efficace les lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD20<sup>dim</sup> dans le sang périphérique chez les patients SEP. Après une première administration de 300 mg d'ocrelizumab, les lymphocytes T exprimant le CD20 étaient également déplétées après 2 semaines<sup>92</sup>. En outre, il a été constaté que l'ocrelizumab induisait une réduction plus forte du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> circulants que le rituximab à 1, 3 et 6 mois<sup>93</sup>. Le rituximab, quant à lui, a permis de diminuer un plus grand pourcentage de sous-populations de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD20<sup>dim</sup> que de sous-populations CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD20<sup>dim</sup> <sup>53</sup>. La repopulation du compartiment sanguin périphérique de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD20<sup>dim</sup> après l'administration de rituximab s'est avérée lente, avec 2,8 % de ces lymphocytes apparaissant après 52 semaines<sup>53</sup>. Nissimov a analysé le stade de différenciation des lymphocytes T au moment de la reconstitution des lymphocytes B après le rituximab et s'est aperçu qu'il y avait une augmentation des lymphocytes T mémoire, naïfs et mémoire effecteurs<sup>91</sup>.

### **Tolérance du traitement anti-CD20 :**

Le principal événement indésirable du traitement par anti-CD20 sont les réactions liées à l'injection, mais elles semblent diminuer avec les administrations ultérieures<sup>67</sup>. La bibliographie sur le traitement par anti-CD20 au long cours dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde suggère que ce traitement est bien toléré, avec un risque global d'événements indésirables graves qui reste faible (3,76/100 patients-années après 11 ans de traitement par rituximab)<sup>94</sup>. En ce qui concerne la sclérose en plaques, plusieurs études ont montré que ce traitement est relativement bien toléré, mais la littérature suggère qu'il existe un risque d'hypogammaglobulinémie secondaire et d'infections.

Des études portant sur le rituximab ou l'ocrelizumab chez des patients SEP ont démontré que la réduction des taux d'Ig apparaît d'abord avec les IgM, puis avec un impact moins important sur les IgG et les IgA 2,5 ans après le traitement<sup>62,66-68,81</sup>. Après 5 ans de traitement par anti-CD20, entre 10 % et 12 % des patients SEP présentaient une hypolIgM<sup>95,96</sup>, alors que, après 6 à 8 ans de traitement par anti-CD20, entre 28 % et 39 % des patients présentaient une hypolIgM<sup>97,98</sup>. Quant à l'hypolIgG, après 5 ans de traitement par anti-CD20 chez les patients SEP, les taux varient entre 8% et 23,4%<sup>95,97</sup>. Les différences peuvent être attribuées à des valeurs de laboratoire divergentes en ce qui concerne l'hypogammaglobulinémie. Enfin, le traitement par ofatumumab a permis d'observer dans les essais ASCLEPIOS, après 2,5 ans de traitement, qu'aucun patient ne présentait des taux moyens d'IgG et d'IgM inférieurs à la limite inférieure de la normale ; or, le traitement à long terme après 3,5 ans avec ofatumumab en continu chez des patients SEP observe 25,1% et 1,7% d'hypolIgM et d'hypolIgG, respectivement<sup>83</sup>.



Il a été suggéré que l'impact à long terme de l'hypogammaglobulinémie induite par un traitement secondaire pourrait être associé à un risque plus élevé d'infection chez les patients SEP, mais les résultats sont discordants. L'hypogammaglobulinémie due à un traitement au long cours par rituximab chez les patients SEP a été suggérée associée à une augmentation du nombre d'infections<sup>97</sup>. Oksbjerg et ses collaborateurs observent que les infections graves chez les patients SEP sous traitement par anti-CD20 n'étaient pas associées aux taux d'Ig<sup>98</sup> ; mais chez les patients SEP après 7 ans de traitement par ocrélizumab, l'association entre la baisse des taux d'IgG et les infections graves a été observée<sup>99</sup>. L'essai ASCLEPIOS I et II n'a pas observé de lien entre la diminution des taux d'Ig et les infections graves<sup>65</sup>.

Les infections opportunistes sont extrêmement rares lors d'un traitement par anti-CD20 et seuls des cas rapportés de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) ont été publiés, dont la plupart avaient déjà reçu des traitements connus pour être associés à la LEMP, comme le natalizumab<sup>100</sup>. Le risque d'hépatite fulminante est connu sous rituximab chez les patients atteints de maladies du sang ou auto-immunes, et par conséquent, le dépistage d'une infection antérieure par l'hépatite B est primordial avant de commencer un traitement anti-CD20<sup>57</sup>. Finalement, le risque de cancer est faible sous ces traitements, même s'il y a eu une augmentation non significative de la proportion de patients présentant un cancer dans les essais portant sur l'ocrélizumab chez les patients atteints de SEP-R et de SEP-PP<sup>63,66</sup>.

Au sujet de la pandémie COVID-19, des observations ont démontré que les patients SEP sous traitement par anti-CD20 sont plus à risque de subir une infection COVID-19 grave ou d'être hospitalisés. Louapre et collègues ont observé dans la cohorte

française de SEP qu'il n'y avait pas d'association entre l'exposition et un traitement de fond en particulier et la sévérité de la COVID-19<sup>101</sup>, alors que des données plus récentes suggèrent que les thérapies anti-CD20 sont associées à une sévérité plus élevée de la COVID-19 et à des hospitalisations liées à la COVID-19<sup>102-105</sup>. De plus, en raison de l'altération de la réponse immunitaire humorale due à la déplétion des cellules B, il a été observé que les patients SEP sous traitement anti-CD20 ont une réduction marquée de l'immunité humorale, bien que des réponses satisfaisantes par les cellules T CD8<sup>+</sup> aient été observées<sup>106-108</sup>. Conformément à ces études, les recommandations actuelles préconisent de vacciner les patients SEP sous traitement anti-CD20 contre la COVID-19 plutôt que d'effectuer une nouvelle cure<sup>109</sup>.

#### **L'adaptation des traitements anti-CD20 par voie IV :**

Comme mentionné précédemment, les traitements anti-CD20 dans le cadre du traitement de la SEP sont administrés tous les six mois, et pourtant la repopulation des lymphocytes B est observée après une durée médiane de 72 semaines<sup>67</sup>. En outre, les recommandations de plusieurs sociétés internationales savants de la SEP ont encouragé le report d'une nouvelle cure d'anti-CD20 au profit de la vaccination anti-COVID<sup>109</sup>. Par conséquent, plusieurs groupes ont adopté une stratégie visant à différer une cure en privilégiant l'adaptation individuelle du traitement.

Des données relatives à l'interruption du traitement par le rituximab chez des patients SEP-R jusqu'à 12 mois ont montré qu'il y avait rarement des poussées ou de nouvelles lésions sur l'IRM<sup>110</sup>. Le rituximab à faible dose a également été appliqué chez des patients atteints de SEP avec des signes minimes de l'activité de la maladie<sup>111</sup>. En comparant une cohorte de patients SEP-R sous ocrélizumab avec des intervalles de

dosage standard ou prolongés ( $\geq 4$  semaines), il n'y avait pas de différence entre le taux de patients atteignant le statut NEDA-3<sup>112</sup>. Cette étude a également observé qu'il n'y avait pas d'association entre le taux absolu de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> circulants et l'activité de la maladie<sup>112</sup>. Maarouf *et al.* ont observé que les patients SEP-R sous rituximab ne présentaient pas de signes d'activité de la maladie pendant une période de 8 à 31 mois après l'arrêt du traitement malgré une repopulation des lymphocytes B dans cette cohorte de patients SEP-R<sup>113</sup>.

Dans l'ensemble, ces études suggèrent que la médecine personnalisée avec les traitements anti-CD20 serait possible dans la SEP et avec un contrôle relativement favorable de l'activité inflammatoire de la maladie. Néanmoins, l'approche « *wait and see* » dans le traitement des patients SEP avec ces traitements reste un défi compte tenu de la possibilité de poussées et du handicap neurologique potentiel, et par conséquent, les marqueurs permettant d'initier une nouvelle cure doivent être évalués. En effet, dans certaines maladies neurologiques auto-immunes, l'adaptation des anti-CD20 est basée sur la repopulation des cellules B mémoires. Kim et collaborateurs ont utilisé un schéma de traitement individualisé par rituximab chez des patients atteints d'une neuromyéélite optique, avec une nouvelle cure lorsque la population périphérique circulante de lymphocytes B mémoire CD27<sup>+</sup> excédait 0,05% des cellules mononuclées du sang périphérique, et ont observé que la plupart des patients étaient stables en utilisant cet intervalle de traitement<sup>114</sup>. Chez les patients myasthéniques sous rituximab, il a été démontré que l'augmentation du pourcentage de lymphocytes B mémoire CD27<sup>+</sup> circulants était un facteur prédictif de rechute, et il a donc été suggéré d'adapter les nouveaux cycles de rituximab en fonction du nombre de cellules CD27<sup>+</sup> circulantes<sup>115,116</sup>.

Dans la SEP, peu de groupes ont adapté un traitement anti-CD20 selon le taux des lymphocytes B ou des sous-populations de lymphocytes B circulants. Novi et collègues ont proposé une nouvelle cure de rituximab en fonction de la repopulation des lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> et ont observé une activité inflammatoire de la maladie minime, voire nulle, sur 2 ans en utilisant ce protocole avec un intervalle moyen de perfusion de 367 jours<sup>117</sup>. L'ocrelizumab a été adapté de manière similaire chez des patients SEP, où le retraitement était guidé par un nombre de CD19<sup>+</sup> > 10 cellules/mm<sup>3</sup>, et aucune poussée a été décrite et des niveaux de chaîne légère de neurofilament restaient stables<sup>118</sup>.

### **Problématique et objectifs :**

Comme détaillé dans l'introduction, les anticorps monoclonaux anti-CD20 sont des traitements hautement efficaces permettant une déplétion des lymphocytes B qui semblent jouer un rôle pathogène dans l'évolution de la SEP ; toutefois, les conséquences des anticorps monoclonaux anti-CD20 au long cours s'accompagnent d'un risque d'infection et d'hypogammaglobulinémie secondaire. Les stratégies d'adaptation des traitements anti-CD20 pendant la pandémie COVID ont permis d'observer que l'allongement des intervalles d'administration maintenaient une stabilité de l'activité inflammatoire de la maladie, mais les paramètres guidant les stratégies de retraitement restent insuffisants. Nous avons donc souhaité étudier si la déplétion des lymphocytes B était un paramètre indicatif du contrôle de la maladie de la SEP défini par des mesures composites objectives (NEDA-3 et MEDA).

### **Objectif primaire :**

Comparer l'atteinte du statut NEDA-3 et MEDA à 12 et 18 mois en fonction de la déplétion des cellules B.

### **Objectifs secondaires :**

- Évaluer le nombre d'événements indésirables graves de grade 3 chez les patients SEP traités par anti-CD20.
- Étudier l'évolution du nombre de sous-populations lymphocytaires et des taux d'Ig après un traitement anti-CD20 au long cours chez des patients SEP.

- Déterminer si les traitements antérieurs induisant une lymphopénie avaient un impact sur les paramètres biologiques tels que les sous-populations lymphocytaires et les taux d'Ig chez les patients SEP au *baseline* et après un traitement anti-CD20 au long cours.

**Title: Assessing B-cell depletion and disease activity in a French Multiple Sclerosis cohort treated by long-term intravenous anti-CD20 antibody therapy**

**Authors:** Sean A. Freeman, MD, PhD<sup>1</sup>, Bruno Lemarchant, MD<sup>1,4</sup>, Tifanie Alberto, MD<sup>1</sup>, Julie Boucher, MD<sup>1</sup>, Olivier Outteryck, MD, PhD<sup>2</sup>, Myriam Labalette, MD, PhD<sup>3</sup>, Stephanie Rogeau, MD<sup>3</sup>, Sylvain Dubucquoi MD, PhD<sup>3</sup>, Hélène Z  phir, MD, PhD<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, CRC-SEP, CHU of Lille, Lille, France.

<sup>2</sup>Department of Neuroradiology, CHU Lille, Roger Salengro Hospital, Lille, INSERM U1171, France.

<sup>3</sup>Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research in Inflammation, F-59000 Lille.

<sup>4</sup>Univ. Lille, INSERM U1172, CHU of Lille, Lille, France.

## **Abstract:**

**Importance:** No study to date has investigated B-cell repopulation kinetics after long-term intravenous (IV) anti-CD20 B-cell depleting therapy (BCDT) in multiple sclerosis (MS) with respect to strict and/or minimal disease activity defined by objective measures.

**Objective:** To investigate how B-cell depletion after at least one year of IV BCDT influences clinical and radiological stability as defined by “no evidence of disease activity” (NEDA-3) and “minimal evidence of disease activity” (MEDA) status in MS patients at 12 and 18 months.

**Design:** Retrospective, cohort study between January 2014 and September 2021.

**Setting:** Monocentric study in an MS referral center.

**Participants:** 192 MS patients of all clinical MS phenotypes.

**Interventions:** IV BCDT treatment every 6 months with lymphocyte subset counts and immunoglobulin levels collected every six months prior to a new cycle of BCDT.

**Main outcomes and measures:** NEDA-3 and MEDA status, disability (Expanded Disability Status Scale score), MRI activity, lymphocyte counts, immunoglobulin levels, and SAE.

## **Results:**

Overall, 60.6% and 84.2% of patients attained NEDA-3 status at 12 and 18 months, while MEDA was attained in 84.6% and 96.9% at 12 and 18 months, respectively. CD19<sup>+</sup> depletion was observed in 81.3% of patients at 12 months and 85.8% at 18 months. No significant difference was observed when comparing patients achieving either NEDA-3 or MEDA status at 12 or 18 months and being CD19<sup>+</sup> depleted; only, older age and CD3<sup>+</sup>



lymphocytopenia were associated with better disease control. Immunoglobulin levels were significantly lower than baseline starting at six months for IgM ( $p < 0.0001$ ) and 30 months for IgG ( $p = 0.0031$ ). Patients receiving a lymphocytopenia-inducing treatment (LIT) prior to BCDT showed significantly lower CD4<sup>+</sup> counts compared to non-LIT patients at baseline and up to 24 months of BCDT ( $p = 0.0004$ ). Significantly lower IgG levels were observed when comparing LIT and non-LIT groups from 24 to 42 months ( $p = 0.0054$  at 42 months). Grade 3 or above SAEs were rare.

**Conclusions and Relevance:**

B-cell depletion seems to be an insufficient correlate for disease control at 12 and 18 months in MS patients receiving IV BCDT. We suggest tailoring IV BCDT after 18 months of initiation given the risk of lymphocytopenia, hypogammaglobulinemia and SAE after long-term BCDT.

## **Introduction:**

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory demyelinating and neurodegenerative disease that affects the central nervous system and leads to variable degrees of physical and cognitive handicap. The known impact of early high-efficacy treatment on disease progression and the success of phase II and III clinical trials using selective intravenous (IV) B-cell depleting therapies (BCDT) targeting B-lymphocyte CD20 antigen has changed the landscape of treating not only relapsing MS (RMS)<sup>1-6</sup>, but also active progressive MS (PMS)<sup>7</sup>.

BCDT in MS has shown persistent B-cell depletion over time from several months to over one year<sup>1,2,8</sup>. Yet, in contrast with other autoimmune diseases that are treated by IV BCDT, such as rituximab in rheumatoid arthritis using a “treat-to-target” approach<sup>9</sup>, treatment of MS patients is based on a fixed-schedule dosing regimen every six months. Several groups have looked into spaced BCDT dosing intervals or lowering BCDT dosing, with few relapses and minimal MRI activity<sup>10-14</sup>, despite the reemergence of a significant proportion of CD19<sup>+</sup> B-cells<sup>10</sup>. Other studies have also tailored BCDT infusions in MS patients to either CD19<sup>+</sup> B-cell or CD27<sup>+</sup> memory B-cell repopulation<sup>11,15</sup>. However, it is unknown whether reappearance of B-cells or B-cell subsets in MS is predictive of disease activity, similar to other neurological autoimmune disorders<sup>16-18</sup>.

Long-term IV BCDT comes at a cost of increasing risk of severe infection<sup>19-22</sup>. Indeed, the duration of anti-CD20 therapy has been independently associated with a higher risk of infections requiring hospitalizations in MS<sup>22,23</sup>, and therefore risks and benefits need to be weighed regarding long-term B-cell suppression.

To date, only few studies have studied B-cell repopulation kinetics after multiple cycles of IV BCDT in MS<sup>24-26</sup> and no study to date has compared these repopulation kinetics to strict and/or minimal disease activity defined by objective measures used in prospective studies<sup>27-29</sup>.

Here, we aimed to investigate which parameters related to strict B-cell depletion in MS patients (relapsing, primary and secondary progressive phenotypes) treated with IV anti-CD20 BCDT (rituximab and ocrelizumab) over at least one year could influence disease activity as defined by NEDA-3 and MEDA criteria and also the risk of developing serious adverse events.

## **Methods:**

### **Study design and population:**

We designed a monocentric, retrospective study based on data collected prospectively in the MS expert center of the University Hospital in Lille, France. The study was declared in accordance with the recommendations of the French commission for data protection (CNIL) on November 30th, 2021. None of the patients were opposed to data collection.

In this study, we included MS patients who started an anti-CD20 therapy (either ocrelizumab or off-label rituximab) between January 2014 and September 2021 and with at least three cycles of BCDT. We excluded patients who did not undertake brain or spine MRI in the year prior to initiating BCDT. We collected demographic information as well as MS clinical history, all clinical relapses (defined below), corticosteroid use for relapses, all prior disease modifying therapies (DMT), DMTs of which were highly-effective (natalizumab, mitoxantrone, fingolimod or alemtuzumab) or lymphocytopenia-inducing therapy (LIT) (mitoxantrone, fingolimod, siponimod, dimethyl fumarate, mycophenolate mofetil, methotrexate, cyclophosphamide, azathioprine and alemtuzumab), wash out time prior to BCDT, and date of introduction of BCDT. Data collected while on BCDT included baseline and follow-up EDSS score (every six months), annual brain and/or spinal MRI activity or radiological stability compared to the previous year's MRI.

Intravenous anti-CD20 was administered based on fixed-scheduled dosing every six-months after an initial induction dose of 600 mg divided into two injections spaced two weeks apart or 1000 mg divided into two injections spaced two weeks apart, respectively.

### **Primary outcome and secondary objectives:**

The primary objective of this study was to compare NEDA-3 and MEDA status attainment (defined below) at 12 and 18 months with respect to B-cell depletion.

Achieving NEDA-3 status was defined as the absence of clinical relapse (defined as new or recurrent neurological symptoms lasting more than 24 hours without signs of fever or infection), absence of clinical progression (which was defined as an increase in EDSS by  $\geq 1.5$  if baseline EDSS = 0,  $\geq 1.0$  if baseline EDSS between 0 and 5.0, and  $\geq 0.5$  if initial EDSS  $\geq 5.5$ ), and absence of activity on either annual brain or spinal MRI (with activity defined as an increase in T2 lesion size or number, or T1 gadolinium contrast-enhancement compared to the previous year's MRI)<sup>27</sup>. NEDA-3 activity was calculated at 12 months and at 18 months, with MRI at 18 months compared to the reference MRI (or "re-baselining" MRI) according to *Observatoire Français de la Sclérose en Plaques* (OFSEP) recommendations, i.e., at least 6 months after treatment introduction.

MEDA achievement was defined by the absence of clinical activity and absence of focal MRI activity according to criteria by Prosperini and colleagues<sup>29</sup>. Focal MRI activity corresponded to contrast-enhancing lesions or new T2-lesions ( $\geq 3$  new lesions) when compared to baseline MRI scans for calculating MEDA at 12 months, and comparing to reference MRI (rebaselined) when calculating MEDA at 18 months.

Secondary objectives were to investigate lymphocyte subsets and NK cell depletion, to detail IgM, IgG and IgA levels, and to report serious adverse events under BCDT. Further secondary objectives looked to evaluate the number of grade-3 serious adverse events (SAE) according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.03 as needing IV therapy or hospitalization while on BCDT. We collected data, when

available, clinical outcome and whether anti-CD20 therapy was continued or not, last total IgG, last IgM and IgM, and last CD19<sup>+</sup> counts prior to infection.

### **Collection of biological data:**

We collected biological data, when possible, prior to the introduction of BCDT and every six-months prior to each new infusion, which included total absolute lymphocyte counts by immunophenotyping using multi-color flow cytometry labeling for CD45<sup>+</sup>, and lymphocyte sub-populations defined by CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> for T-cells, CD19<sup>+</sup> for B-cells (surrogate marker for CD20<sup>+</sup> depletion) and CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> for NK cells. Lymphocytopenia was defined as total lymphocyte and lymphocyte subsets at values inferior than the lower limit of normal (CD45<sup>+</sup> < 1100 cells/mm<sup>3</sup>, CD3<sup>+</sup> < 700 cells/mm<sup>3</sup>, CD4<sup>+</sup> < 400 cells/mm<sup>3</sup>, CD8<sup>+</sup> < 200 cells/mm<sup>3</sup>, CD19<sup>+</sup> < 100 cells/mm<sup>3</sup> and CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> < 100 cells/mm<sup>3</sup>). B cell depletion was defined as ≤ 1% of CD19<sup>+</sup> cells of total CD45<sup>+</sup> lymphocyte count. Total IgA, IgG and IgM isotype levels were also collected, with hypogammaglobulinemia defined as hypolIgA < 0.7 g/L, hypolIgM < 0.4 g/L and hypolIgG < 7.0 g/L.

### **Statistical analysis:**

Baseline demographic characteristics (baseline disease, MRI and biological data), follow-up clinical data after BCDT, absolute lymphocytes, lymphocyte subsets, IgA, IgM and IgG counts, lymphocytopenia and hypogammaglobulinemia of the study population were presented as mean ± SD for continuous data or numbers (percentages) for categorical data. Continuous data were analyzed for differences among groups using the

Mann-Whitney *U* test for two groups or Kruskal-Wallis test for multiple groups, and categorical data were analyzed using the Fisher exact test.

NEDA-3 or MEDA status achievement at 12 and 18 months were expressed as numbers (percentages) and analyzed using the Fisher exact test. Characteristics of patients achieving NEDA-3 or MEDA at 12 or 18 months were reported as either mean  $\pm$  SD or numbers (percentages) where appropriate, with corresponding Mann-Whitney *U* or Fisher exact test, respectively, for statistical analysis between groups. Multiple logistic regression analysis was performed for predictors of NEDA-3 activity at 12 months, which included B-cell depletion status, age, MS phenotype and hypolgM (variables with  $p < 0.2$  on univariate analysis). Odds ratios (OR) and 95% CI were calculated for the aforementioned variables.

Statistical significance was defined as two-tailed  $p < 0.05$ . Analysis of data and graph production were performed using GraphPad Prism® software version 8 (San Diego, CA, USA).

## **Results:**

### **Demographic, Disease, MRI and Biological Characteristics of the Patients at Baseline**

A total of 192 MS patients received BCDT in our MS expert center for more than three cycles, of which 120 (62.5%) had RMS, 38 (19.8%) SPMS and 34 (17.7%) PPMS. Demographic data are summarized in Table 1. RMS patients presented a more clinically active disease at baseline. EDSS scores were lower in RMS patients compared with PMS patients. The majority of MRI scans prior BCDT were active.

We observed no significant differences between MS phenotype and mean total lymphocyte or lymphocyte subsets. Lymphocytopenia was observed in 17.7% of patients, with regards to CD4<sup>+</sup> T cells in RMS patients. There was no difference in mean Ig isotype levels between the MS phenotypes. Hypogammaglobulinemia was present for all isotypes, although this represented a small percentage of patients (1.8% IgA, 4.2% IgM and 4.8% IgG).

### **Clinical Follow up of the Patients after Receiving BCDT**

The mean overall BCDT duration was 2.75±1.30 years, with a mean number of 5.23±2.14 perfusions. The mean overall perfusion interval was 196.2±91.5 days and was significantly different ( $p<0.0001$ ), before and after March 2020 (beginning of COVID-19 pandemic in France).

Further clinical follow up data is summarized in Table 1. The ARR at 12 months was 0.05±0.24, which was significantly lower than prior to BCDT initiation ( $p<0.0001$ ). Overall, 60.6% of patients attained NEDA-3 status at 12 months and 84.2% achieved NEDA-3 status at 18 months. MEDA status at 12 months was reached in 84.6% and 96.9% at 18 months.

Taken together, these results suggest that a larger proportion of patients achieve strict disease control with ensuing cycles of BCDT, and that a higher proportion of patients at similar time points achieve disease control on BCDT when tolerating less stringent clinical and radiological thresholds.



## **B-cell depletion does not influence NEDA-3 and MEDA status at 12 or 18 months**

Patients who attained NEDA-3 status at 12 months were significantly older than patients who did not ( $p=0.019$ ). Similar results were observed in patients who attained MEDA status at 12 months ( $p=0.002$ ). We observed no difference in univariate analysis between attaining NEDA-3 or MEDA status at 12 and 18 months when comparing disease duration, EDSS at baseline, MS phenotype, previous highly-effective treatment or naive to treatment.

We further explored the relationship between clinical and radiological control of disease activity defined by either NEDA-3 or MEDA criteria and depletion of circulating CD19<sup>+</sup> lymphocytes after BCDT. These results are also summarized in Table 2. We observed no differences in comparing B-cell depletion or repopulation and NEDA-3 status at 12 months or 18 months. Multivariate analysis of NEDA-3 at 12 months when taking into account age, phenotype, CD19<sup>+</sup> depletion status or hypogM was only significant for age (OR = 1.034; 95% CI 1.001 to 1.070). There were no differences in comparing B-cell depletion and MEDA status at 12 and 18 months. We found no difference in total CD45<sup>+</sup> lymphocytes, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> or CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> (mean absolute values) and NEDA-3 or MEDA status at 12 and 18 months. However, we observed a significant difference in CD3<sup>+</sup> lymphocytopenia in patients achieving or not achieving MEDA status at 12 months ( $p=0.046$ ). No differences were observed when comparing immunoglobulin levels or hypogammaglobulinemia status in Ig subclasses and NEDA-3 or MEDA status at 12 or 18 months.

These results suggest that B-cell depletion or repopulation status does not predict achievement of clinical and radiological stability at 12 and 18 months using accepted scores for disease control, but CD3<sup>+</sup> lymphocytopenia may be indicative.

### **Lymphocytopenia and Hypogammaglobulinemia after BCDT**

Follow up of patients receiving BCDT showed a significant decrease in the mean total lymphocyte count at 6, 12 and 24 months when compared to baseline total lymphocyte counts (Figure 1 A;  $p=0.004$ ,  $p=0.001$  and  $p=0.04$ , respectively). In line with this observation, we did observe an increase in the percentage of patients presenting with CD45<sup>+</sup> lymphocytopenia at six months (31.9%), which remained stable after subsequent injections up to 42 months. There was no significant difference in mean CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> or CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells when compared to baseline (Figure 1 B-E). The percentage of patients with lymphocytopenia in these lymphocyte subsets remained stable throughout the observation period (Supplemental Figure 1A).

As expected, we observed a significant depletion of CD19<sup>+</sup> cells from 6 months to 66 months when compared to baseline ( $p<0.0001$ ) (Supplemental Figure 1A). With the cumulative effect of BCDT over time, the percentage of B-cell depleted patients progressively increased over the ensuing perfusion cycles (73.2% at six months, 96.7% at 42 months).

In our cohort, IgM levels were significantly lower at all time points compared to baseline starting at 6 months of treatment ( $p=0.0001$ ), except at 60 and 66 months (Figure 1I). Furthermore, we observed significantly lower IgG levels starting at 30 months of BCDT when compared to baseline ( $p=0.003$ ), (Figure 1H). IgA levels were significantly reduced at 42 and 48 months ( $p=0.008$  and  $p=0.012$ , respectively) when compared to

baseline (Figure 1G). The percentage of patients with hypogammaglobulinemia increased gradually in all isotypes with an increasing number of perfusions (Supplemental Figure 1B).

These results support previous studies showing that long-term BCDT lead to hypogammaglobulinemia of all isotypes with about one third of patients having hypolIgG between 42 and 48 months of BCDT, and that subsequent cycles of BCDT does not lead to significant differences in T-cell lymphocyte subsets when compared to baseline.

### **Previous lymphocytopenia inducing treatments (LIT) prior to BCDT influences T-cell subsets and Ig isotype dynamics**

At baseline, we observed a significantly lower mean absolute CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocyte counts when comparing patients with and without prior LIT ( $p < 0.0001$  for total lymphocytes, CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> subsets) (Figure 2 A-C). The differences remained statistically significant between the two groups until 24 months with significant difference for CD8<sup>+</sup> lymphocytes appearing at 6 and 12 months (Figure 2D). No differences were shown in mean absolute CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> or CD19<sup>+</sup> counts between the two groups (Figure 2 E-F). Furthermore, there was a statistically significant higher percentage of patients with CD45<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocytopenia in the LIT group at baseline ( $p = 0.04$  and  $p = 0.009$ , respectively), and remained until 24 months of BCDT for CD45<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocytopenia ( $p = 0.036$  and  $p = 0.033$ , respectively) (Supplemental Figure 2 A, C). The percentage of patients with CD3<sup>+</sup> lymphocytopenia was statistically different from six to 18 months ( $p = 0.007$ ) between the two groups (Supplemental Figure 2B).

There was a significant difference in mean IgA levels at baseline, 6 and 12 months between these two groups ( $p=0.010$ ,  $p=0.008$  and  $p=0.012$ , respectively) (Figure 2G, I). Additionally, mean IgG levels were significantly different at baseline, and from 24 to 42 months between the two groups (Figure 2H). No differences were observed with respect to mean IgM levels throughout the study period. We only observed a statistically significant difference in the percentage of patients with IgG hypogammaglobulinemia at 30 and 48 months ( $p=0.007$  and  $p=0.044$ , respectively) (Supplemental Figure 2I).

Taken together, these results suggest that prior LIT preceding BCDT seems to play a role in initial T-lymphocytopenia from baseline until 24 months, while previous LIT appears to significantly induce IgG hypogammaglobulinemia after 4 cycles of BCDT.

#### **Risk of Serious Adverse Events are Rare on BCDT**

We observed 21 grade-3 or above SAEs. The overall SAE rate was 4.04/100 patient-years. SAE were mainly infections, essentially urinary tract infections (42.8%) (Supplemental table 1). The population of patients who presented with SAE had a mean age of  $44.5\pm 8.4$  years, mean EDSS of  $4.3\pm 2.7$  and disease duration of  $13.4\pm 9.6$  years. The mean number of prior immunosuppressants prior to BCDT was  $1.13\pm 1.09$ . Patients had received a mean of  $4.45\pm 2.24$  perfusions. Only one patient discontinued BCDT permanently and no patients deceased on BCDT during the study period.

Prior to SAE, 84.6% of patients were B-cell depleted and one-third of patients presented hypo IgG + hypo IgM.

## Discussion

The results in this present study suggest that (i) the majority of MS patients on BCDT show disease control at 18 months, (ii) no clinical, MRI or biological parameter is sufficient to predict strict disease control, except age and CD3<sup>+</sup> lymphocytopenia, (iii) Ig levels are significantly reduced compared to baseline and one-third of patients presented hypolgG after 42 months, (iv) prior LIT is associated with CD4<sup>+</sup> lymphocytopenia, lower absolute IgG levels and hypolgG in patients on long-term BCDT, and (v) the majority of SAE on BCDT were infections, but remained infrequent.

This study has several limitations, of which the retrospective and observational design, thereby limiting the possibility for collecting all adverse events throughout the study period. However, we focused on grade-3 or above SAEs, and ultimately reduced the likelihood of missing safety data. Furthermore, the monocentric design of our study most likely led to a limited sample size; nevertheless, our clinic is an MS expert center with exhaustive and documented clinical, biological and MRI activity. Although we observed limited variations in perfusion intervals, most notably during the COVID-19 pandemic, we observed a statistically significantly longer perfusion interval in comparing before and after March 2020 but the difference is not clinically relevant and we concluded that we were able to maintain the clinic's activity during this time as we could use the space temporarily stopped by surgeons in our outpatient clinic. Lastly, with a nationwide booster vaccination campaign for immunosuppressed patients in France peaked in spring/summer 2021, and combined with a more stringent policy regarding vaccination and BCDT infusions, it is possible that we did not capture a BCDT dosing interval extension after the end of the study period in September 2021.

Our study supports previous results regarding the efficaciousness of BCDT with a reduction in ARR at 12 months<sup>21,30–32</sup>. We observed an increase in the proportion of patients who were both NEDA-3 and MEDA at 12 and 18 months. Few studies have analyzed NEDA-3 outcomes in BCDT, and to our knowledge, this is the first time that MEDA outcomes have been reported for patients on BCDT. Post-hoc analysis of OPERA I and II showed 72.2% of patients were NEDA-3 after MRI rebaseline between 24-96 weeks post-BCDT<sup>33</sup>, and the CASTING study reported NEDA-3 achievement in 74.8% of RMS patients at Week 96 post-BCDT<sup>34</sup>. Our results were in line with these two studies with 82.8% of RMS patients in our study attaining NEDA-3 at 18 months. Of note, the fact that we compared MRI imaging at this time-point to the rebaselined MRI provides a strength to our study, since an early rebaselined MRI may reflect persistent inflammatory activity prior to BCDT efficaciousness and thereby negatively impact NEDA-3 status achievement<sup>33,35</sup>. Moreover, we observed a 24% increase in the proportion of patients achieving MEDA vs. NEDA at 12 months, which corroborates the statement that BCDT has yet to reach its full efficacy during the first six month. MEDA has been shown to be associated with minimal risk for increased long-term disability in RMS patients on interferon beta or glatiramer acetate<sup>29</sup>; nevertheless, future studies will need to address if achieving MEDA status is sufficient to prevent long-term disability in patients on BCDT.

Age was observed to be a negative predictor for disease control, with no other clinical or radiological parameter being sufficient to predict NEDA-3 and MEDA status at 12 and 18 months. A study by Cellerino *et al.* observed improved disease control in younger RMS patients with regards to NEDA-3 status at 24 months post-BCDT<sup>36</sup>. Although these results are discordant, we suggest that, with respect to our study, the

negative contribution of age can be attributed to the fact that younger patients are more inflammatory and thus prone to more inflammatory activity<sup>37</sup>.

Our results support a growing body of literature that following absolute CD19<sup>+</sup> B-cell counts post-BCDT is not sufficient, *per se*, to predict disease control<sup>10,26,38</sup>. While our study did not perform B-cell subset analyses, it has been shown that B-cell subsets post-BCDT tend to be more naive and transitional, and less towards a memory-B phenotype, which is thought to be implicated in MS pathogenesis<sup>26,38–40</sup>. Repopulation of CD27<sup>+</sup> memory B-cells after rituximab remains low even at Week 52 post-infusion<sup>39</sup>. The slower repopulation kinetics of memory-B cells may also explain as to why early CD19<sup>+</sup> B-cell repopulation in patient cohorts with either extended BCDT dosing intervals above the standard 6-month reinfusion or interruption do not show significant clinical worsening or new MRI lesions<sup>10,14,41,42</sup>. BCDT reinfusion based on CD27<sup>+</sup> memory B-cells has been adopted by certain groups treating patients with neuromyelitis optica spectrum disorder, myasthenia gravis, as well as patients with MS<sup>11,15–18</sup>. Nevertheless, randomized control trials and defined memory B-cell reconstitution cutoffs need to be properly established in MS in order to guide dosing intervals.

Given that NEDA-3 and MEDA criteria were not achieved in patients that were B-cell depleted, we also looked at other biological markers that could be predictive of MS disease control. Indeed, given that BCDT acts on small subset of CD20<sup>+</sup> T-lymphocytes<sup>39,43,44</sup>, we further studied these lymphocyte subpopulations and observed that only CD3<sup>+</sup> lymphocytopenia influenced MEDA status at 12 months. At this time period, we observed a trend in reduced absolute CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocytes in MEDA patients. CD3<sup>+</sup>CD20<sup>dim</sup> lymphocytes display a proinflammatory cytokine profile and

represent <10% of CD3<sup>+</sup> cells in peripheral blood in MS patients<sup>39,45</sup>. CD20<sup>+</sup> T-cell depletion has been observed in MS patients treated with BCDT, and targeted depletion of CD20<sup>+</sup> T lymphocytes in a MOG<sub>35-55</sub> induced EAE mouse model reduces demyelination and CD3<sup>+</sup> infiltration to the spinal cord<sup>39,43,45</sup>. Further studies need to be performed in order to follow this lymphocyte population longitudinally with respect to MS disease control. Furthermore, it has been previously observed that disease control in patients treated by rituximab for rheumatoid arthritis (RA) was better in patients with IgM hypogammaglobulinemia<sup>9</sup>; however, we did not observe any Ig isotype as a predictor for disease control.

Over 50% of patients in our cohort were hypolIgM at 30 months, while only 15% of patients had hypolIgG at this time point, similarly to a previous study investigating long-term rituximab treatment in MS and its effects on gammaglobulin levels<sup>46</sup>. Observational studies suggest that treatment-induced hypogammaglobulinemia in MS is associated with an increased risk of infection, although increased risk of SAE is debated<sup>22,46,47</sup>. In our study, SAEs while on long-term BCDT were infrequent, and our results are consistent with previous studies in autoimmune neurological and rheumatological diseases<sup>19,47-49</sup>. Predictors of SAE, such as hypogammaglobulinemia, were not possible considering the low number of events over the study period.

Few studies have investigated the cumulative effect of previous DMTs prior to BCDT induction and their influence on biological parameters. DMTs such as fingolimod and dimethyl fumarate are known to induce lymphocytopenia, and have been shown to impact T-lymphocyte subsets and increase the risk of T-lymphocytopenia at baseline and up to 12 months after BCDT induction<sup>50</sup>. Our study confirms and extends the results of



this former work, as we observed a significant decrease in the absolute CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> counts and CD4<sup>+</sup> lymphocytopenia until 24 months in patients having received prior LIT. It is interesting to note that patients with no prior LIT ultimately converge with patients with their prior LIT counterparts with regards to their absolute lymphocyte count and percentage of lymphocytopenia after 24 months post-BCDT, reflecting the delay of concurrent remaining impact of LIT on T-lymphocytes.

In addition to differences in T-lymphocyte subsets, we also describe for the first time a significant decrease of IgG levels at baseline and after 24 months of BCDT inpatients having received prior LIT. A higher proportion of patients with hypoglg was also observed at 30 months in this population. It has been shown that cyclophosphamide treatment prior to rituximab in anti-neutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis was associated with decreased serum IgG concentrations<sup>51,52</sup>, yet concomitant use of methotrexate and rituximab in rheumatoid arthritis patients was observed to be a protective factor in the risk of developing hypogammaglobulinemia<sup>53</sup>. With regard to MS, prior fingolimod treatment has been shown to influence hypogammaglobulinemia<sup>54</sup>, while Ig levels remain relatively stable in patients over at least 96 weeks of dimethyl fumarate<sup>55</sup>. In our study, it could be possible that prior LIT in BCDT treated patients exerts a synergistic effect on decreasing IgG levels at later BCDT cycles by accelerating the depletion of IgG producing mature B-cells in the peripheral blood. Nonetheless, the ultimate consequences of prior LIT exposure in relation to BCDT is not clear, considering we did not observe an increase in serious opportunistic infections or malignancies in our cohort. Further studies are needed in order to uncouple the role of prior LIT with respect to BCDT.

The global COVID-19 pandemic and risk of hospitalization in MS patients on BCDT has allowed neurologists to shift the way immunosuppressive treatments are administered, with either extended dosing intervals, decreased dosing or even BCDT cessation<sup>10,12,14,42</sup>. While these strategies are heterogeneous in their conception, clinical outcomes are reassuring in that there are few relapses and minimal MRI activity. Nevertheless, our results suggest that, given the high proportion of patients with MS disease control at 18 months post-BCDT using NEDA-3 and MEDA criteria, the risk of developing significant treatment-induced hypogammaglobulinemia and the non-negligible risk of SAE occurring just after this timepoint, the risk-benefit analysis of long-term BCDT should be in favor of extending dosing intervals after initial BCDT induction of 18 months. Figure 3 outlines that risk of developing hypolIgM and hypolIgG, and the mean time interval of SAE in our cohort of patients undergoing continuous cycles of BCDT. Unfortunately, our data do not suggest a biological or clinical parameter in order to tailor BCDT reinfusion, but these data do highlight other variables that may need to be considered, such as age, T-lymphocyte counts and prior LIT. A randomized controlled trial would be useful in order to investigate a potential induction strategy followed by maintenance therapy, similar to other autoimmune diseases treated with BCDT<sup>56</sup>.

**Table 1. Demographic, Disease, MRI and Biological Characteristics of the Patients at Baseline and Follow up**

Baseline	Overall (N = 192)	Relapsing (N = 120)	Secondary Progressive (N = 34)	Primary Progressive (N = 38)	P-value
Age at disease onset—years	31.97±10.53	28.82±8.87	31.59±10.72	42.26±9.94	
Sex Ratio Female—number (%)	121 (62.37)	78 (65.00)	23 (67.64)	21 (55.26)	
Disease duration—years	13.46±8.75	11.06±7.58	22.17±9.31	13.25±6.68	
Age at BCDT start—years	42.57±11.69	37.19±9.79	50.71±8.04	52.29±9.39	
Wash Out from prior treatment—days	253.03±508.33	128.39±345.26	484.78±630.87	461.71±695.24	
Median number of prior DMTs (range)	1 (0-7)	1 (0-5)	2 (0-7)	1 (0-3)	
Treatment Prior to BCDT (%)					
Treatment Naive	44 (22.92)	23 (19.17)	3 (8.82)	18 (47.37)	
Any beta interferon	12 (6.25)	7 (5.83)	3 (8.82)	2 (5.26)	
Glatiramer acetate	8 (4.17)	6 (5.00)	1 (2.94)	1 (2.63)	
Teriflunomide	29 (15.10)	21 (17.50)	6 (17.65)	2 (5.26)	
Dimethyl fumarate	20 (10.42)	17 (14.17)	2 (5.88)	1 (2.63)	
Biotin	2 (1.04)	0	2 (5.88)	0	
Azathioprine	1 (0.52)	0	1 (2.94)	0	
Mycophenolate Mofetil	11 (5.73)	1 (0.83)	3 (8.82)	7 (18.42)	
Methotrexate	2 (1.04)	1 (0.83)	1 (2.94)	0	
Siponimod	1 (0.52)	0	1 (2.94)	0	
Fingolimod	37 (19.27)	29 (24.17)	5 (14.71)	3 (7.89)	
Natalizumab	17 (8.85)	13 (6.77)	4 (11.76)	0	
Alemtuzumab	1 (0.52)	1 (0.83)	0	0	
Mitoxantrone	1 (0.52)	1 (0.83)	0	0	
Cyclophosphamide	6 (3.13)	0	2 (5.88)	4 (10.53)	
ARR previous year	0.47 (0.73)	0.63 (0.81)	0.31 (0.53)	0.06 (0.23)	<b>&lt;0.000</b>
Median Baseline EDSS (range)*	3.5 (0.0-8.0)	2.5 (0.0-6.5)	6.0 (2.0-6.5)	5.5 (2.0-8.0)	
Number of Patients with MRI Gadolinium Enhancement (%)	117 (60.9)	78 (65.5)	22 (66.7)	17 (44.7)	
New MRI T2-lesions (n)	39 (20.3)	20 (16.8)	5 (15.1)	14 (36.8)	
Stable MRI at Baseline (n)	34 (17.8)	21 (17.6)	6 (18.2)	7 (18.4)	
Total initial CD45 <sup>+</sup> Lymphocyte count—mm <sup>3</sup> †	1721±728.3	1711.9±769.2	1635.9±608.7	1841.5±686.2	0.436
CD3 <sup>+</sup> †	1310.3±739.0	1263.6±588.5	1188.0±521.3	1396.2±550.1	0.236
CD4 <sup>+</sup> ‡	827.7±397.9	796.4±394.3	799.1±341.4	976.8±441.0	0.137
CD8 <sup>+</sup> †	483.5±242.6	495.0±247.2	441.3±236.0	475.4±236.6	0.452
CD19 <sup>+</sup> ¶	243.8±188.7	252.3±218.7	233.7±109.8	224.0±116.7	0.862
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> —mm <sup>3</sup> §	181.0±92.0	176.2±94.4	177.2±79.0	192±99.81	0.662
Number of patients with lymphocytopenia (%)					
CD45 <sup>+</sup> ‡	29 (17.7)	23 (21.9)	2 (7.14)	4 (12.9)	0.141
CD3 <sup>+</sup> †	21 (12.8)	17 (16.2)	2 (7.14)	2 (6.4)	0.223
CD4 <sup>+</sup> ‡	17 (10.3)	16 (15.1)	0 (0.0)	1 (3.2)	<b>0.023</b>
CD8 <sup>+</sup> †	17 (10.3)	10 (9.4)	2 (7.4)	5 (16.1)	0.481
CD19 <sup>+</sup> ¶	19 (11.7)	13 (12.4)	4 (14.8)	2 (6.7)	0.596
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> — mm <sup>3</sup> §	28 (17.4)	17 (16.3)	6 (22.2)	5 (16.6)	0.767
Total initial I—g/L <sup>^</sup>					
IgA#	2.07±0.75	2.04±0.69	1.90±0.83	2.35±0.83	0.078
IgG <sup>^</sup>	10.33±2.69	10.53±2.67	9.36±2.73	10.62±2.63	0.071
IgM#	1.17±0.77	1.21±0.60	1.16±1.33	1.04±0.47	0.603
Number of patients with hypogammaglobulinemia (%)					
IgA#	3 (1.81)	2 (1.9)	1 (3.3)	0 (0.0)	0.62
IgG <sup>^</sup>	8 (4.7)	3 (2.8)	3 (10.0)	2 (6.7)	0.229
IgM#	7 (4.2)	6 (5.6)	1 (3.3)	0 (0.0)	0.382

Follow-up	Overall (N = 192)	Relapsing (N = 120)	Secondary Progressive (N = 34)	Primary Progressive (N = 38)	P-value
Treatment duration— years	2.75±1.30	2.71±1.44	2.95±1.28	3.10±1.00	<b>0.022</b>
Mean number of perfusions	5.23±2.14	5.00±2.25	5.39±1.93	5.78±1.84	<b>0.019</b>
ARR at 12 months	0.05±0.24	0.06±0.28	0.03±0.17	0.02±1.6	0.62
ARR at 18 months	0.02±0.16	0.04±0.20	0.00±0.00	0.00±0.00	0.239
Number of Pregnancies (%)	10	10 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Perfusion Interval— days					
Overall	196.2±91.5	190±28.9	194.9±40.7	196.1±42.2	0.074
Before March 2020	196.7±44.7	191.5±38.8	204.1±60.7	199.3±49.4	0.119
After March 2020	189.7±24.7	189±20.9	188.7±14.5	192.7±32.9	0.662
<b>P value Before vs After March 2020</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.246	<b>0.013</b>	<b>0.002</b>	
Attained NEDA-3 status at 12	100 (60.6)	60 (56.6)	19 (67.8)	21 (67.7)	0.369
Attained MEDA status at 12 months	154 (84.6)	94 (81.0)	28 (87.5)	32 (94.1)	0.156
Attained NEDA-3 status at 18	96 (84.2)	58 (82.8)	14 (82.3)	24 (88.8)	0.746
Attained MEDA status at 18 months <sup>π</sup> —number	129 (96.9)	76 (95.0)	22 (100.0)	31 (100.0)	0.1505

\* A total number of 176 patients had recorded initial EDSS scores, of which 112 relapsing, 30 secondary progressive and 34 primary progressive.

† Total number of patients with CD45+, CD3+ and CD8+ flow cytometry counts for overall, relapsing, secondary progressive and primary progressive is 165, 106, 31 and 28, respectively.

‡ Total number of CD4+ flow cytometry counts for overall, relapsing, secondary progressive and primary progressive is 152, 97, 29 and 26, respectively.

¶ Total number of CD19+ flow cytometry counts for overall, relapsing, secondary progressive and primary progressive is 162, 95, 28 and 27, respectively.

§ Total number of CD16+CD56+ flow cytometry counts for overall, relapsing, secondary progressive and primary progressive is 148, 105, 30 and 25, respectively.

# Total number of IgA and IgM counts for overall, relapsing, secondary progressive and primary progressive is 156, 99, 29 and 28, respectively.

^ Total number of IgG and total Ig counts for overall, relapsing, secondary progressive and primary progressive is 157, 100, 29 and 28, respectively.

ˆ A total of 165 patients had available data to analyze NEDA-3 status at 12 months, of which 106 were relapsing, 28 were secondary progressive and 31 were primary progressive.

˜ A total of 182 patients had available data to analyze MEDA status at 12 months, of which 116 were relapsing, 32 were secondary progressive and 34 were primary progressive.

° A total of 114 patients had available data to analyze NEDA-3 status at 18 months, of which 70 were relapsing, 17 were secondary progressive and 27 were primary progressive

π A total of 133 patients had available data to analyze MEDA status at 18 months, of which 80 were relapsing, 22 were secondary progressive and 31 were primary progressive

**Table 2. Comparison of demographic, clinical and biological characteristics between patients who did or did not achieve NEDA-3 or MEDA status at 12 and 18 months.**

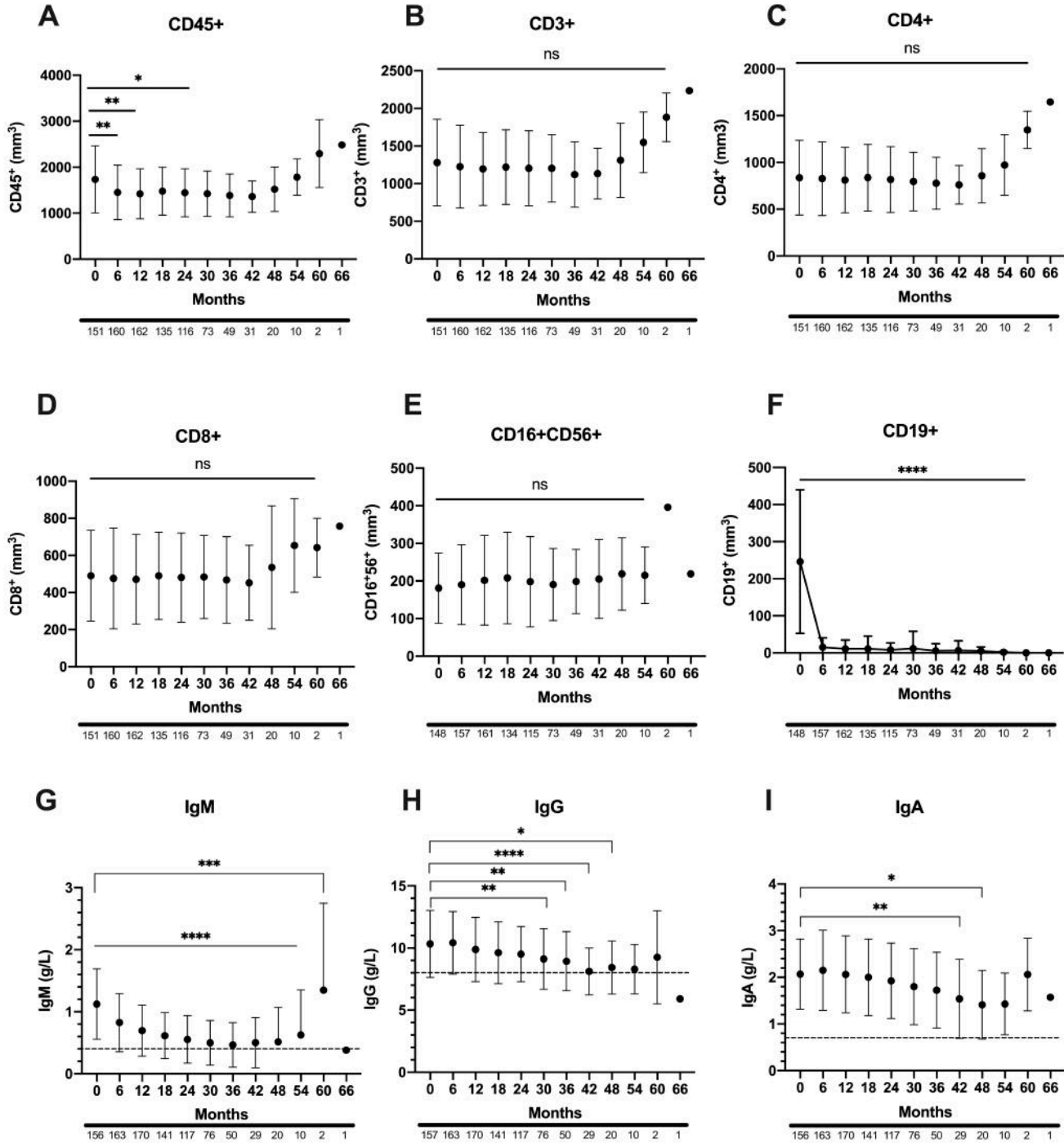
	NEDA-3 12 Months			NEDA-3 18 Months			MEDA 12 Months			MEDA 18 Months		
	NEDA-3 (n = 100)	Non NEDA-3 (n = 65)	P-value	NEDA-3 (n = 96)	Non NEDA-3 (n = 18)	P-value	MEDA (n = 154)	Non MEDA (n = 28)	P-value	MEDA (n = 129)	Non MEDA (n = 4)	P-value
Age—years	44.10±12.22	39.45±11.00	<b>0.019</b>	44.36±11.75	39.06±9.72	0.054	43.81±11.75	36.50±9.08	<b>0.002</b>	43.7±11.3	35.75±9.53	0.178
Disease Duration—years	12.92±8.58	12.85±8.06	0.886	13.02±8.24	11.52±5.75	0.715	13.82±8.75	11.23±7.66	0.152	13.7±8.36	8.44±6.64	0.174
EDSS at Baseline	3.52±1.97	3.50±2.00	0.856	3.80±1.91	4.13±1.97	0.531	3.62±1.96	2.98±2.00	0.08	3.78±1.87	4.167±1.60	0.71
Female Sex—number	61 (61.0)	39 (60.0)	0.999	54 (56.2)	13 (72.2)	0.297	95 (61.7)	19 (67.8)	0.672	77 (59.7)	3 (75)	>0.999
Phenotype—number												
Relapsing	60 (60.0)	46 (70.7)	0.185	58 (60.4)	12 (66.7)	0.793	94 (61.0)	22 (78.6)	0.089	76 (58.9)	4 (100)	0.1505
Progressive	40 (40.0)	19 (29.2)		38 (39.6)	6 (33.3)		60 (39.0)	6 (21.4)		53 (41.0)	0 (0.0)	
Previous highly efficacious	38 (38.0)	29 (44.6)	0.42	21 (21.88)	3 (16.7)	0.76	38 (38.0)	29 (44.6)	0.42	52 (40.3)	1 (25.0)	>0.999
Naive to all treatment—number	25 (25)	13 (20.0)	0.57	36 (37.5)	8 (44.4)	0.605	34 (22.1)	6 (21.43)	0.999	29 (22.5)	1 (25.0)	>0.999
Mean flow cytometry counts at 12 months (n)	<b>NEDA-3 (n = 92) †</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 55)</b>		<b>NEDA-3 (n = 88)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 15)</b>		<b>MEDA (n = 134) §</b>	<b>Non MEDA (n = 22)</b>		<b>MEDA (n = 113) ¶</b>	<b>Non MEDA (n = 2)</b>	
CD45*	1504±993.0	1390±592.9	0.639	1441±483.5	1390±592.9	0.29	1465±900.1	1520±445.8	0.217	1435±500.3	1222±82.0	0.63
CD3*	1180±490.4	1184±511.9	0.999	1182±471.7	1049±395.93	0.269	1171±504.5	1320±419.6	0.075	1181±488.2	1069±122.3	0.908
CD4*	806.6±350.8	802.4±385.3	0.827	824.2±319.4	802.4±385.3	0.167	792.3±360.7	922.0±326.2	0.054	809±329.7	648±118.1	0.563
CD8*	461.8±234.6	464.3±257.4	0.822	472.2±244.9	441.1±189.8	0.628	470.5±254.2	456.3±167.6	0.619	476±238.6	445±69.3	0.954
CD16*/CD56*	205.0±130.9	191.1±101.4	0.554	203.3±128.2	197.7±85.0	0.536	209.7±124.4	164.7±79.9	0.096	200±121.8	134±33.9	0.372
CD19*	9.2±22.8	15.04±27.5	0.189	8.38±17.9	27.47±89.44	0.511	9.9±22.2	17.6±33.1	0.257	11.4±36.9	2.5±2.1	0.946
Lymphopenia—mm3	<b>NEDA-3 (n = 92) †</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 59)</b>		<b>NEDA-3 (n = 88)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 15)</b>		<b>MEDA (n = 134) §</b>	<b>Non MEDA (n = 22)</b>		<b>MEDA (n = 113) ¶</b>	<b>Non MEDA (n = 2)</b>	
CD45*	30 (31.5)	23 (38.9)	0.385	21 (23.8)	5 (31.2)	0.539	44 (32.8)	4 (18.2)	0.216	29 (25.6)	0 (0.0)	>0.999
CD3*	15 (15.7)	11 (18.6)	0.663	15 (17.0)	3 (18.7)	0.663	21 (15.7)	0 (0.0)	<b>0.046</b>	19 (16.8)	0 (0.0)	>0.999
CD4*	10 (10.5)	10 (16.9)	0.324	4 (4.5)	2 (12.5)	0.229	14 (10.4)	1 (4.55)	0.696	7 (6.2)	0 (0.0)	>0.999
CD8*	9 (9.4)	8 (13.5)	0.44	8 (9.0)	1 (6.2)	0.999	9 (6.6)	2 (9.1)	0.654	8 (7.1)	0 (0.0)	>0.999
CD16*/CD56*	21 (22.3)	9 (15.2)	0.305	12 (13.6)	3 (18.7)	0.698	21 (15.7)	3 (14.2)	0.999	16 (14.3)	0 (0.0)	>0.999
CD19* depleted	<b>NEDA-3 (n = 90)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 54)</b>	0.135	<b>NEDA-3 (n = 88)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 15)</b>	0.277	<b>MEDA (n = 130)</b>	<b>Non MEDA (n = 22)</b>	0.055	<b>MEDA (n = 107)</b>	<b>Non MEDA (n = 2)</b>	>0.999
Mean immunoglobulin levels—g/L	<b>NEDA-3 (n = 96)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 58)</b>		<b>NEDA-3 (n = 92)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 15)</b>		<b>MEDA (n = 138)</b>	<b>Non MEDA (n = 24)</b>		<b>MEDA (n = 117)</b>	<b>Non MEDA (n = 3)</b>	
IgA	1.98±0.81	2.21±0.85	0.194	1.94±0.79	2.02±0.89	0.846	2.03±0.82	2.23±0.81	0.309	1.96±0.83	2.37±0.61	0.327
IgM	0.83±1.33	0.72±0.48	0.447	0.72±0.97	0.59±0.35	0.909	0.80±1.13	0.61±0.40	0.111	0.69±0.87	0.90±0.33	0.138
IgG	9.62±2.61	10.26±2.46	0.158	9.66±2.68	8.97±1.91	0.232	9.82±2.57	10.2±2.53	0.602	9.52±2.45	12.2±1.98	<b>0.044</b>
Hypogammaglobulinemia—number (%)	<b>NEDA-3 (n = 58)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 58)</b>		<b>NEDA-3 (n = 92)</b>	<b>Non NEDA-3 (n = 15)</b>		<b>MEDA (n = 138)</b>	<b>Non MEDA (n = 24)</b>		<b>MEDA (n = 117)</b>	<b>Non MEDA (n = 3)</b>	
IgA	4 (6.90)	5 (5.21)	0.729	6 (6.52)	0 (0.00)	0.591	5 (3.6)	0 (0.0)	0.999	4 (3.4)	0 (0.0)	>0.999
IgM	18 (18.75)	15 (25.86)	0.316	28 (30.43)	5 (33.33)	0.773	25 (18.1)	7 (29.1)	0.264	33 (28.4)	0 (0.0)	0.559
IgG	10 (10.42)	4 (6.90)	0.57	9 (9.78)	1 (6.25)	0.999	14 (10.1)	1 (4.1)	0.7	11 (9.2)	0 (0.0)	>0.999

† Total number of available data for CD45+, CD3+, CD4+ and CD8+ cell counts are 92, and available data for CD16+/CD56+ and CD19+ cell counts are 91.

§ Total number of available data for CD45+ and CD3+ are 133, CD4+ and CD8+ cell counts are 134, CD16+/CD56+ cell counts are 132, and CD19+ cell counts are 131.

¶ Total number of available data for CD45+, CD3+, CD4+ and CD8+ cell counts are 113, and available data for CD16+/CD56+ and CD19+ cell counts are 112.

Figure 1. Mean total lymphocyte subset counts and immunoglobulin levels in the patient cohort



**Figure 2. Prior Lymphocytopenia-inducing treatment (LIT) and mean lymphocyte subset counts and IgG levels of the cohort treated by BCDT**

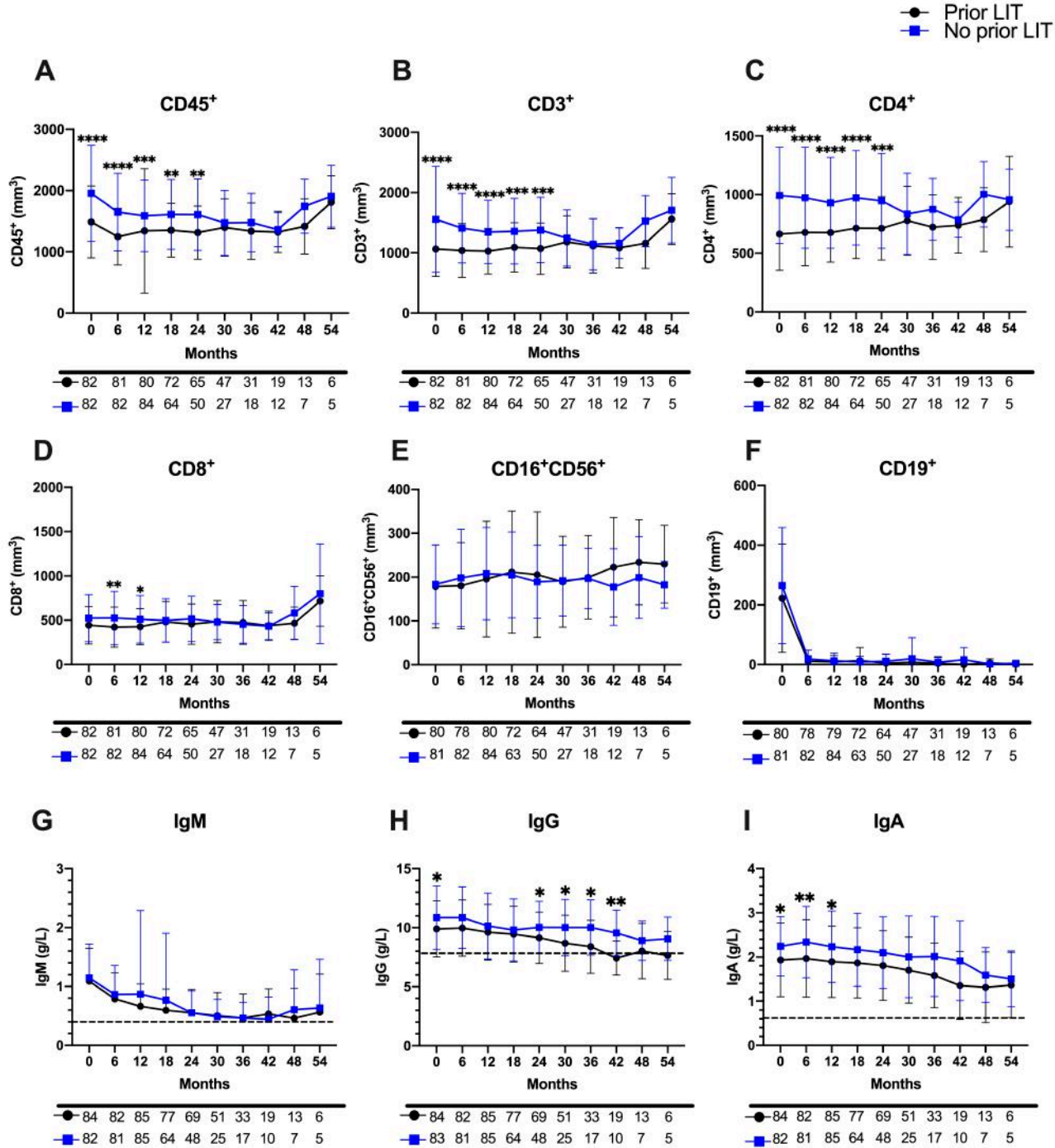
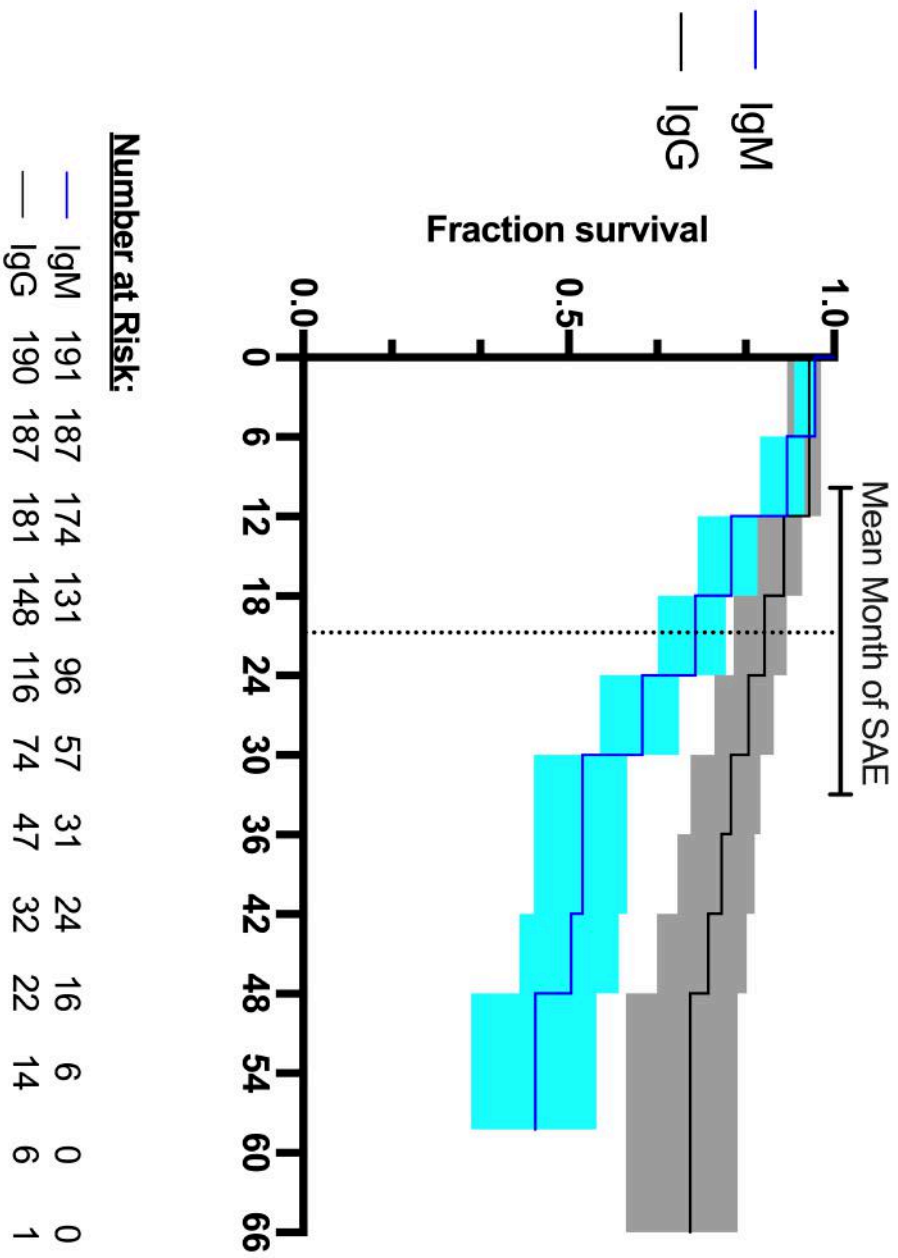
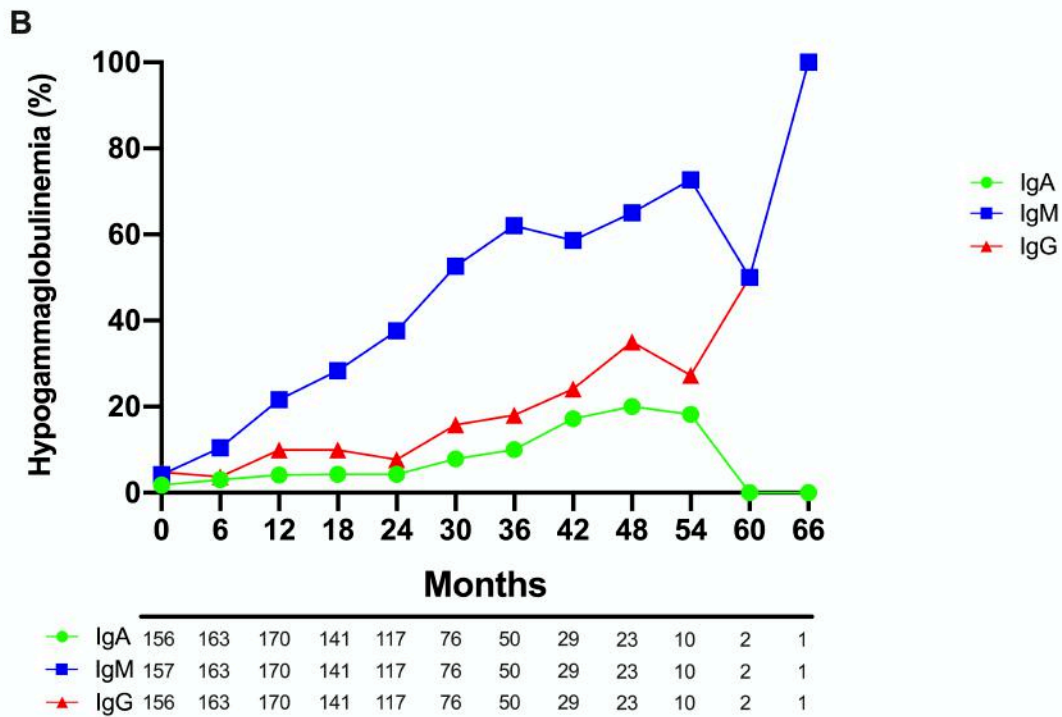
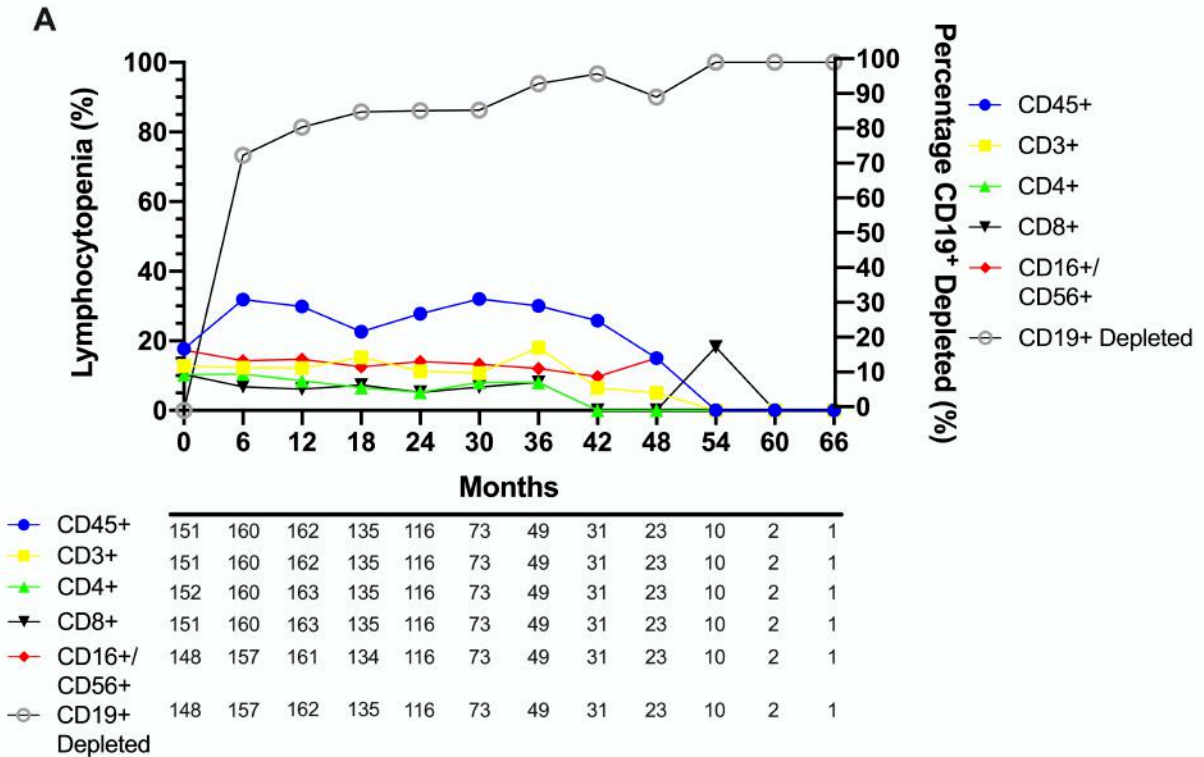


Figure 3. Kaplan-Meier survival curve of hypolIgG and hypolIgM associated with mean month of SAE of the cohort.

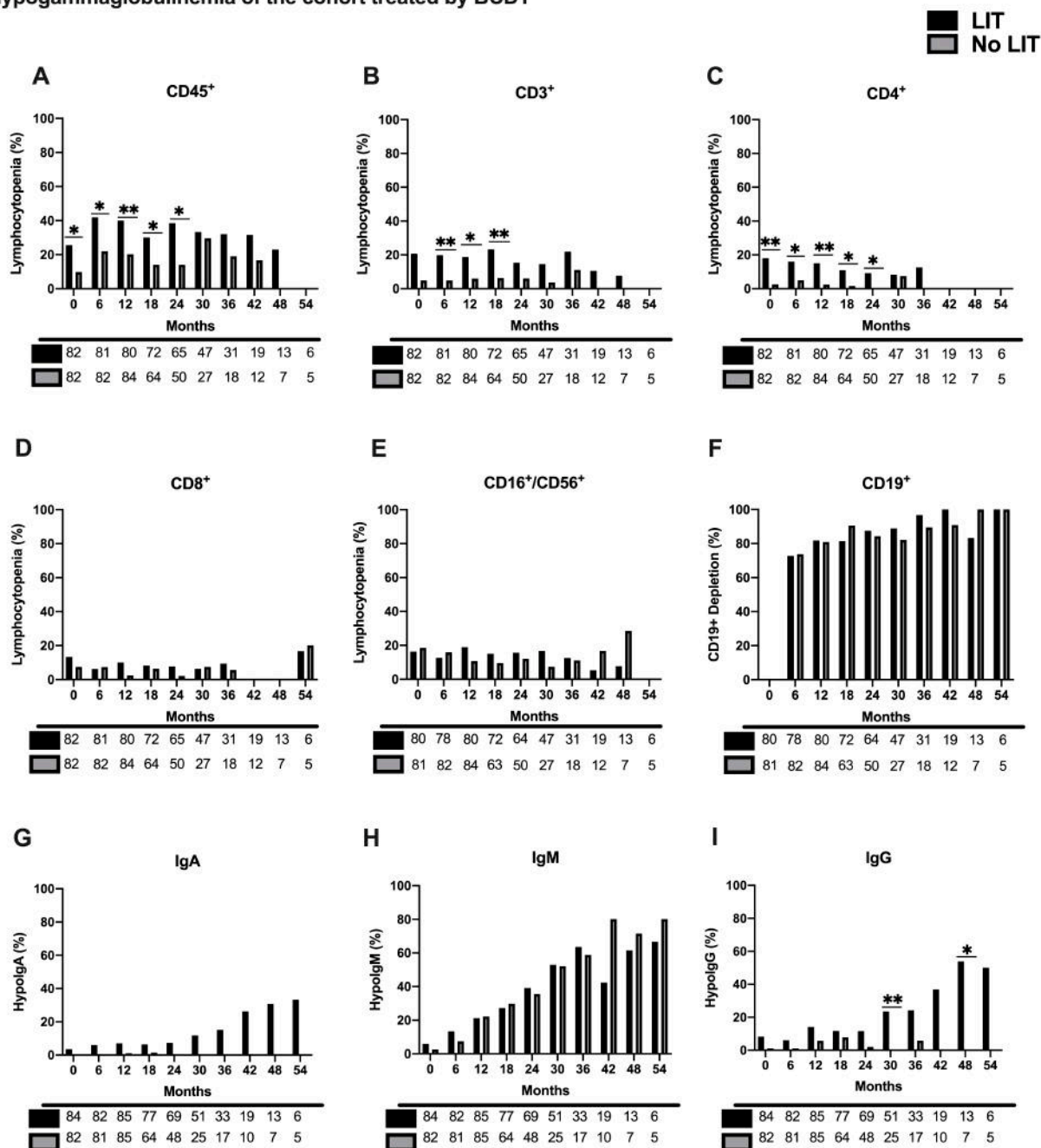




**Supplemental Figure 1. Percentage Lymphocytopenia and Hypogammaglobulinemia in the Patient Cohort**



Supplemental Figure 2. Prior Lymphocytopenia-inducing treatment (LIT) and percentage lymphocytopenia and hypogammaglobulinemia of the cohort treated by BCDT



**Supplemental Table 1. Serious adverse events and population characteristics prior to SAE**

	Overall	Relapsing	Secondary Progressive	Primary Progressive
<b>Grade-3 or above SAE—number (percentage)</b>	21	11 (52.4)	5 (23.8)	5 (23.8)
<b>Patients with at least one SAE—number</b>	16	9 (56.2)	3 (18.8)	4 (25.0)
<b>Patients with ≥ 2 SAE—number (percentage)</b>	4	2 (50.0)	1 (25.0)	1 (25.0)
<b>Type of SAE—number (percentage)</b>				
<b>Muco-cutaneous</b>	2 (9.5)	1 (9.09)	0 (0.0)	1 (25.0)
<b>COVID-19</b>	4 (19.0)	3 (27.2)	0 (0.0)	1 (25.0)
<b>Pneumonia</b>	3 (14.3)	3 (27.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Hemoptysis</b>	1 (4.8)	1 (9.09)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Urinary tract infection</b>	9 (42.8)	1 (9.09)	5 (100.0)	3 (60.0)
<b>Acute coronary syndrome</b>	1 (4.8)	1 (9.09)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Pharyngitis</b>	1 (4.8)	1 (9.09)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Mean number of injections prior to SAE†</b>	4.45±2.24	5.30±2.20	3.20±2.59	3.75±0.96
<b>Mean IgG count prior to SAE</b>	9.37±2.75	9.25±3.49	8.73±1.72	10.13±0.64
<b>HypogIgG—number (percentage)</b>	6 (33.3)	5 (50.0)	1 (33.3)	0 (0.0)
<b>Mean IgM count prior to SAE †</b>	0.72±0.46	0.60±0.41	0.66±0.38	1.05±0.55
<b>HypogIgM—number (percentage)</b>	5 (29.4)	5 (50.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Mean CD19<sup>+</sup> count prior to SAE ‡</b>	9.62±20.35	5.6±12.33	1.00±0.00	34.00±46.67
<b>Depleted prior to SAE (%)</b>	11 (84.6)	9 (90.0)	1 (33.3)	1 (50.0)
<b>Mean EDSS prior to SAE</b>	4.32±2.76	3.20±2.30	6.80±0.40	8.50±0.00
<b>Mean number of immunosuppressants prior to BCDT</b>	1.13±1.09	0.89±0.78	2.67±1.15	0.50±0.58
<b>Sex Female (%)</b>	50	66.67	0	50
<b>Disease duration—years</b>	13.45±9.60	11.71±10.08	24.39±5.12	9.19±4.40
<b>Age—years</b>	44.59±8.42	40.61±7.40	47.62±7.64	51.28±7.28
<b>Discontinued BCDT (percentage)</b>	1 (6.25)	0	1 (33.33)	0

† Immunoglobulin IgG and IgM levels available for 17 events, of which 10 in relapsing category, 3 in secondary progressive and 4 in primary progressive category.

‡ CD19 counts available for 13 events, of which 10 in relapsing category, 3 in secondary progressive category and 2 in primary progressive category.

## Figure Legends:

### **Figure 1. Mean total lymphocyte subset counts and immunoglobulin levels in the patient cohort.**

Mean total lymphocyte (A) and lymphocyte subsets (B-F), as well as mean immunoglobulin levels (G-I) were analyzed from baseline (0 months) until 66 months. Compared to baseline, a significant reduction in the absolute CD45<sup>+</sup> lymphocyte count was observed at 6, 12, and 24 months (A); however, no significant reduction was observed for T-lymphocyte subsets or NK cells (B-E). An expected significant decrease in the mean CD19<sup>+</sup> population was observed post-BCDT (F). Lower IgA levels were observed at 42 and 48 months compared to baseline (G), while lower IgG levels were observed between 30 and 48 months post-BCDT (H). Lower IgM levels were observed starting at 6 months post-BCDT and persisted until 60 months post-BCDT (I). Dotted line denotes hypogammaglobulinemia threshold. Number of patients analyzed is detailed below each month. Error bars represent standard error of the mean. Statistical analysis by Kruskal-Wallis tests with significant *p* values denoted by \* for *p* < 0.05, \*\* for *p* < 0.01, and \*\*\* for *p* < 0.001.

### **Figure 2. Prior lymphocytopenia-inducing treatment (LIT) and mean subset lymphocyte counts and IgG levels of the cohort treated by BCDT.**

Mean total lymphocyte (A) and lymphocyte subsets (B-F), as well as mean immunoglobulin levels (G-I) were analyzed from baseline (0 months) until 54 months in patients having received (black line and black circles) or not received prior LIT (blue line and blue squares). Initial mean CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocyte counts are

significantly decreased in patients having received prior LIT compared to those not having received prior LIT, which also persists until 24 months post-BCDT (A-C). Mean CD8<sup>+</sup> counts are significantly different only at 6 and 12 months post-BCDT when comparing these two populations (D). No differences were observed for NK cells or CD19<sup>+</sup> depletion (E and F). No differences were observed in IgM levels when comparing prior LIT and no prior LIT (G). Mean IgG levels were significantly different at baseline and from 24 to 42 months when comparing these two groups (G), and additionally, mean IgA levels were significantly different between the two groups for the first 12 months (I). Dotted line denotes hypogammaglobulinemia. Number of patients analyzed is detailed below each month. Error bars represent standard error of the mean. Statistical analysis by Mann Whitney *U* tests with significant *p* values denoted by \* for *p* < 0.05, \*\* for *p* < 0.01, and \*\*\* for *p* < 0.001.

**Figure 3. Kaplan-Meier survival curve of hypolIgG and hypolIgM associated with mean month of SAE of the patients.**

Fraction survival of hypolIgM and hypolIgG from baseline to 66 months after BCDT. Vertical dotted line demarcates the mean month of SAE ± SD. Number of patients at risk below each month for IgM and IgG numbers.

**Supplemental figure 1. Percentage lymphocytopenia and hypogammaglobulinemia in the patient cohort.**

Percentage of lymphocytopenic patients and percentage of patients presenting with CD19<sup>+</sup> depletion (A), as well as hypogammaglobulinemia (B), from baseline to 66 months

post-BCDT. (B) Shows the percentage of patients with IgA, IgM and IgG hypogammaglobulinemia. Number of patients analyzed is detailed below each month.

**Supplemental figure 2. Prior lymphocytopenia-inducing treatment (LIT) and percentage lymphocytopenia and hypogammaglobulinemia in the patient cohort treated by BCDT.**

Comparison in the percentage of patients lymphocytopenic and percentage of patients presenting with CD19<sup>+</sup> depletion (A-F), as well as hypogammaglobulinemia (G-I), from baseline to 54 months in patients having received or not received prior LIT. A significant increase in the percentage of CD45<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocytopenia was observed from baseline to 24 months in LIT patients post-BCDT (A, C), while there was an increase in the percentage of CD3<sup>+</sup> lymphocytopenia in LIT patients from 6 to 18 months (B). No significant differences were observed for CD8<sup>+</sup> lymphocytes, CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK cells or CD19<sup>+</sup> depletion (D-F). No differences in the percentage of IgA or IgM hypogammaglobulinemia was observed between the two groups, but hypolIgG was significantly increased at 30 and 48 months between prior LIT and no prior LIT patients. Number of patients analyzed is detailed below each month. Statistical analysis by Fisher exact tests with significant  $p$  values denoted by \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , and \*\*\* for  $p < 0.001$ .

## **References:**

1. Bar-Or, A. *et al.* Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A 72-week, open-label, phase I trial. *Ann. Neurol.* **63**, 395–400 (2008).
2. Hauser, S. L., Arnold, D. L., Fox, R. J., Sarkar, N. & Smith, C. H. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* **13** (2008).
3. Hauser, S. L. *et al.* Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 221–234 (2017).
4. Bar-Or, A. *et al.* Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: The MIRROR study. *Neurology* **90**, e1805–e1814 (2018).
5. Hauser, S. L. *et al.* Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **383**, 546–557 (2020).
6. Giovannoni, G. *et al.* Risk of requiring a walking aid after 6.5 years of ocrelizumab treatment in patients with relapsing multiple sclerosis: Data from the OPERA I and OPERA II trials. *Eur. J. Neurol.* **29**, 1238–1242 (2022).
7. Montalban, X. *et al.* Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 209–220 (2017).
8. Bar-Or, A. *et al.* Rapid and sustained B-cell depletion with subcutaneous ofatumumab in relapsing multiple sclerosis: APLIOS, a randomized phase-2 study. *Mult. Scler. J.* **28**, 910–924 (2022).
9. Evangelatos, G. *et al.* Hypogammaglobulinemia after rituximab for rheumatoid arthritis is not rare and is related with good response: 13 years real-life experience. *Rheumatology* **60**, 2375–2382 (2021).
10. Maarouf, A. *et al.* Extending rituximab dosing intervals in patients with MS during the COVID-19 pandemic and beyond? *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **7**, e825 (2020).
11. Novi, G. *et al.* Tailoring B cell depletion therapy in MS according to memory B cell monitoring. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **7**, e845 (2020).
12. Boremalm, M., Sundström, P. & Salzer, J. Discontinuation and dose reduction of rituximab in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J. Neurol.* **268**, 2161–2168 (2021).
13. DiSano, K. D., Gilli, F. & Pachner, A. R. Memory B Cells in Multiple Sclerosis: Emerging Players in Disease Pathogenesis. *Front. Immunol.* **12**, 676686 (2021).
14. Rolfes, L. *et al.* Ocrelizumab Extended Interval Dosing in Multiple Sclerosis in Times of COVID-19. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **8**, e1035 (2021).
15. Zecca, C. *et al.* Treatment of multiple sclerosis with rituximab: A multicentric Italian–Swiss experience. *Mult. Scler. J.* **26**, 1519–1531 (2020).
16. Kim, S.-H., Huh, S.-Y., Lee, S. J., Joung, A. & Kim, H. J. A 5-Year Follow-up of Rituximab Treatment in Patients With Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *JAMA Neurol.* **70**, 1110 (2013).
17. Ruetsch-Chelli, C. *et al.* Memory B Cells Predict Relapse in Rituximab-Treated Myasthenia Gravis. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **18**, 938–948 (2021).
18. Lebrun, C. *et al.* Therapeutic target of memory B cells depletion helps to tailor administration frequency of rituximab in myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* **298**, 79–81 (2016).

19. Luna, G. *et al.* Infection Risks Among Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod, Natalizumab, Rituximab, and Injectable Therapies. *JAMA Neurol.* **77**, 184 (2020).
20. Seery, N. *et al.* Predicting Infection Risk in Multiple Sclerosis Patients Treated with Ocrelizumab: A Retrospective Cohort Study. *CNS Drugs* **35**, 907–918 (2021).
21. Smoot, K. *et al.* Clinical outcomes of patients with multiple sclerosis treated with ocrelizumab in a US community MS center: an observational study. *BMJ Neurol. Open* **3**, e000108 (2021).
22. Oksbjerg, N. R., Nielsen, S. D., Blinkenberg, M., Magyari, M. & Sellebjerg, F. Anti-CD20 antibody therapy and risk of infection in patients with demyelinating diseases. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **52**, 102988 (2021).
23. Simpson-Yap, S. *et al.* Updated Results of the COVID-19 in MS Global Data Sharing Initiative: Anti-CD20 and Other Risk Factors Associated With COVID-19 Severity. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, (2022).
24. Ellwardt, E., Ellwardt, L., Bittner, S. & Zipp, F. Monitoring B-cell repopulation after depletion therapy in neurologic patients. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **5**, (2018).
25. Abbadessa, G. *et al.* CD19 Cell Count at Baseline Predicts B Cell Repopulation at 6 and 12 Months in Multiple Sclerosis Patients Treated with Ocrelizumab. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 8163 (2021).
26. Dorcet, G. *et al.* Early B cells repopulation in multiple sclerosis patients treated with rituximab is not predictive of a risk of relapse or clinical progression. *J. Neurol.* 1–11 (2022) doi:10.1007/s00415-022-11197-6.
27. Giovannoni, G., Tomic, D., Bright, J. R. & Havrdová, E. “No evident disease activity”: The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **23**, 1179–1187 (2017).
28. Gasperini, C. *et al.* Unraveling treatment response in multiple sclerosis: A clinical and MRI challenge. *Neurology* **92**, 180–192 (2019).
29. Prosperini, L. *et al.* Minimal evidence of disease activity (MEDA) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **91**, 271–277 (2020).
30. Salzer, J. *et al.* Rituximab in multiple sclerosis: A retrospective observational study on safety and efficacy. *Neurology* **87**, 2074–2081 (2016).
31. Alcalá, C. *et al.* Efficacy and safety of rituximab in relapsing and progressive multiple sclerosis: a hospital-based study. *J. Neurol.* **265**, 1690–1697 (2018).
32. Durozard, P. *et al.* Efficacy of rituximab in refractory RRMS. *Mult. Scler. J.* **25**, 828–836 (2019).
33. Havrdová, E. *et al.* No evidence of disease activity (NEDA) analysis by epochs in patients with relapsing multiple sclerosis treated with ocrelizumab vs interferon beta-1a. *Mult. Scler. J. - Exp. Transl. Clin.* **4**, 2055217318760642 (2018).
34. Vermersch, P. *et al.* Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis with suboptimal response to prior disease-modifying therapies: A primary analysis from the phase 3b CASTING single-arm, open-label trial. *Eur. J. Neurol.* **29**, 790–801 (2022).
35. Weinstock-Guttman, B. *et al.* Ocrelizumab treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis after a suboptimal response to previous disease-modifying therapy: A



- nonrandomized controlled trial. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **28**, 790–800 (2022).
36. Cellerino, M. *et al.* Predictors of Ocrelizumab Effectiveness in Patients with Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **18**, 2579–2588 (2021).
  37. Mirmosayyeb, O. *et al.* Clinical Characteristics and Disability Progression of Early- and Late-Onset Multiple Sclerosis Compared to Adult-Onset Multiple Sclerosis. *J. Clin. Med.* **9**, 1326 (2020).
  38. Nissimov, N. *et al.* B cells reappear less mature and more activated after their anti-CD20-mediated depletion in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 25690–25699 (2020).
  39. Palanichamy, A. *et al.* Rituximab Efficiently Depletes Increased CD20-Expressing T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *J. Immunol.* **193**, 580–586 (2014).
  40. Baker, D., Marta, M., Pryce, G., Giovannoni, G. & Schmierer, K. Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. *EBioMedicine* **16**, 41–50 (2017).
  41. Baker, D., Pryce, G., James, L. K., Marta, M. & Schmierer, K. The ocrelizumab phase II extension trial suggests the potential to improve the risk: Benefit balance in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **44**, 102279 (2020).
  42. van Lierop, Z. Y. *et al.* Personalized B-cell tailored dosing of ocrelizumab in patients with multiple sclerosis during the COVID-19 pandemic. *Mult. Scler. J.* **28**, 1121–1125 (2022).
  43. Gingele, S. *et al.* Ocrelizumab Depletes CD20+ T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Cells* **8**, 12 (2018).
  44. Capasso, N. *et al.* Ocrelizumab depletes T-lymphocytes more than rituximab in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **49**, 102802 (2021).
  45. Ochs, J. *et al.* Proinflammatory CD20<sup>+</sup> T cells contribute to CNS-directed autoimmunity. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabi4632 (2022).
  46. Perriguet, M. *et al.* Hypogammaglobulinemia and Infections in Patients With Multiple Sclerosis Treated With Rituximab. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, e1115 (2022).
  47. Vollmer, B. L. *et al.* Serious safety events in rituximab-treated multiple sclerosis and related disorders. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **7**, 1477–1487 (2020).
  48. van Vollenhoven, R. F., Fleischmann, R. M., Furst, D. E., Lacey, S. & Lehane, P. B. Longterm Safety of Rituximab: Final Report of the Rheumatoid Arthritis Global Clinical Trial Program over 11 Years. *J. Rheumatol.* **42**, 1761–1766 (2015).
  49. Kim, S.-H., Park, N. Y., Kim, K. H., Hyun, J.-W. & Kim, H. J. Rituximab-Induced Hypogammaglobulinemia and Risk of Infection in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: A 14-Year Real-Life Experience. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, (2022).
  50. Landi, D. *et al.* Influence of Previous Disease-Modifying Drug Exposure on T-Lymphocyte Dynamic in Patients With Multiple Sclerosis Treated With Ocrelizumab. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, (2022).
  51. Venhoff, N. *et al.* Impact of Rituximab on Immunoglobulin Concentrations and B Cell Numbers after Cyclophosphamide Treatment in Patients with ANCA-Associated Vasculitides. *PLoS ONE* **7**, e37626 (2012).

52. Roberts, D. M. *et al.* Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: Incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *J. Autoimmun.* **57**, 60–65 (2015).
53. Boleto, G., Kanagaratnam, L., Dramé, M. & Salmon, J.-H. Safety of combination therapy with two bDMARDs in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Semin. Arthritis Rheum.* **49**, 35–42 (2019).
54. Zoehner, G. *et al.* Reduced serum immunoglobulin G concentrations in multiple sclerosis: prevalence and association with disease-modifying therapy and disease course. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **12**, 1756286419878340 (2019).
55. Longbrake, E. E. *et al.* Dimethyl fumarate treatment shifts the immune environment toward an anti-inflammatory cell profile while maintaining protective humoral immunity. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **27**, 883–894 (2021).
56. Roubaud-Baudron, C. *et al.* Rituximab Maintenance Therapy for Granulomatosis with Polyangiitis and Microscopic Polyangiitis. *J. Rheumatol.* **39**, 125–130 (2012).

## **Discussion**

Les résultats de notre étude rétrospective avec recueil de données prospectifs suggèrent que :

- (i) la majorité des patients SEP sous anti-CD20 IV montre un contrôle de l'activité inflammatoire à 18 mois
- (ii) aucun paramètre clinique, IRM ou biologique n'est suffisant pour prédire un contrôle strict de la maladie, à l'exception de l'âge et une lymphopénie CD3<sup>+</sup>
- (iii) les taux d'Ig sont diminués de manière significative après plusieurs cycles de l'anti-CD20 IV et un tiers des patients présente une hypolIgG après 42 mois
- (iv) un traitement lymphopéniant antérieur est associé à une lymphopénie CD4<sup>+</sup>, une baisse des taux absolus d'IgG et une hypolIgG chez les patients sous anti-CD20 à long terme
- (v) la majorité des évènements indésirables graves (EIG) sous anti-CD20 IV étaient des infections, mais restaient peu fréquents.

Tout d'abord, notre étude confirme les résultats antérieurs concernant l'efficacité des traitements anti-CD20 dans la SEP. Nous avons constaté une élévation de la proportion de patients qui étaient à la fois NEDA-3 et MEDA à 12 et 18 mois. Quelques études ont analysé les résultats NEDA-3 après un traitement anti-CD20 dans la SEP, mais à notre connaissance, c'est la première fois que des résultats MEDA ont été rapportés pour les patients SEP sous traitement anti-CD20. L'analyse post-hoc des études OPERA I et II a démontré que 72,2 % des patients étaient NEDA-3 entre 24 et 96 semaines après une IRM de *rebaseline*<sup>49</sup>, et l'étude CASTING a rapporté que 74,8 % des patients SEP-R étaient NEDA-3 à la semaine 96<sup>50</sup>. Nos résultats sont en accord avec ces

deux études, étant donné que 82,8 % des patients SEP-R étaient NEDA-3 à 18 mois. Il est intéressant de souligner que nous avons comparé l'imagerie IRM à l'IRM de *rebaseline* après 6 mois, ce qui constitue un point fort de notre étude car une IRM de *rebaseline trop* précoce peut sous-estimer ce contrôle anti-inflammatoire<sup>49,119</sup>. De plus, nous avons constaté une augmentation de 24 % de la proportion de patients ayant atteint le statut MEDA par rapport au statut NEDA à 12 mois, ce qui renforce l'idée que le traitement anti-CD20 n'a pas encore atteint son efficacité maximale au cours des 6 premiers mois. Le MEDA s'est avéré être lié à un risque faible de majoration du handicap à long terme chez les patients SEP-R sous interféron bêta ou acétate de glatiramère<sup>52</sup> ; cependant, les études à venir sur les anti-CD20 doivent évaluer si le statut MEDA est suffisant pour signifier le contrôle du CDP à long terme chez les patients.

Selon les données de notre étude, l'âge jeune est un facteur prédictif négatif du contrôle de la maladie, et aucun autre paramètre clinique ou radiologique ne permettait de prédire le statut NEDA-3 ou MEDA à 12 et 18 mois. Une étude de Cellerino *et al.* a constaté un meilleur contrôle de l'activité inflammatoire chez les jeunes patients SEP-R en termes de statut NEDA-3 à 24 mois après un traitement anti-CD20<sup>120</sup>. Bien que ces résultats soient divergents, nous suggérons que dans le cadre de notre étude, la corrélation négative de l'âge peut être imputée au fait que les patients plus jeunes sont davantage sujets à l'inflammation et donc à une activité inflammatoire plus marquée<sup>121</sup>.

Nos résultats confortent plusieurs publications selon lesquelles le suivi du taux absolu de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> après un traitement anti-CD20 n'est pas suffisant, en lui-même, pour prédire le contrôle de l'activité inflammatoire des patients SEP<sup>88,91,113</sup>. Bien que notre étude n'ait pas réalisé d'analyses supplémentaires des sous-populations de

lymphocytes B, il a été démontré que les sous-populations de lymphocytes B après traitement anti-CD20 sont plus naïfs et transitoires, et moins orientées vers un phénotype de lymphocytes B mémoire, dont on pense que cette dernière joue un rôle important dans la physiopathologie de la SEP<sup>19,53,88,91</sup>. La repopulation des lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> après le rituximab reste faible même la 52<sup>ème</sup> semaine après la perfusion<sup>53</sup>. Une repopulation plus lente des lymphocytes B mémoires peut également expliquer pourquoi une repopulation précoce des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> dans les cohortes de patients ayant reçu des intervalles de traitement au-delà du standard de 6 mois ne montre pas d'aggravation clinique significative ou de nouvelles lésions à l'IRM<sup>112,113,118,122</sup>. Un nouveau cycle d'anti-CD20 adapté en fonction d'une repopulation des lymphocytes B mémoires CD27<sup>+</sup> circulants a été réalisé par certains groupes qui traitent des patients atteints de la neuromyéélite optique, la myasthénie, ainsi que des patients atteints de SEP<sup>114–117,123</sup>. Néanmoins, des ECRs et des seuils de repopulation des lymphocytes B mémoires doivent être établis dans la SEP afin de guider les nouvelles cures d'anti-CD20.

Nous n'avons pas observé un lien entre la déplétion des lymphocytes B circulants et le statut NEDA-3/MEDA, donc nous nous sommes intéressés à d'autres marqueurs biologiques qui pourraient être prédictifs du contrôle de l'activité. En effet, étant donné que l'anti-CD20 IV agit sur une sous-population de lymphocytes T qui sont CD20<sup>+</sup><sup>53,92,93</sup>, nous avons étudié plus en détail ces sous-populations lymphocytaires T et observé que seule la lymphopénie CD3<sup>+</sup> influençait le statut MEDA à 12 mois. À 12 mois, nous avons observé une tendance à la diminution du taux absolu de lymphocytes CD3<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> chez les patients MEDA. Les lymphocytes CD3<sup>+</sup>CD20<sup>dim</sup> possèdent un profil cytokinique pro-

inflammatoire et représentent <10% des lymphocytes CD3<sup>+</sup> dans le sang périphérique des patients SEP<sup>53,87</sup>. La déplétion des lymphocytes T CD20<sup>+</sup> a été observée chez les patients SEP sous anti-CD20, et la déplétion des lymphocytes T CD20<sup>+</sup> dans un modèle de souris EAE induit par MOG<sub>35-55</sub> diminue la démyélinisation et l'infiltration des lymphocytes T CD3<sup>+</sup> dans la moelle épinière<sup>53,87,92</sup>. D'autres études sont nécessaires afin de suivre cette population de lymphocytes de manière longitudinale par rapport au contrôle de l'activité inflammatoire de la SEP. Enfin, il a été observé que le contrôle anti-inflammatoire chez les patients traités par rituximab pour la polyarthrite rhumatoïde (PR) était meilleur chez les patients présentant une hypogammaglobulinémie IgM<sup>124</sup> ; cependant, nous n'avons pas observé d'isotype d'Ig comme facteur prédictif du contrôle de l'activité inflammatoire.

Plus de 50 % des patients dans notre cohorte étaient hypolgM à 30 mois, tandis que seulement 15 % des patients présentaient une hypolgG à ce moment, comme dans une étude portant sur le traitement à long terme par le rituximab dans la SEP et ses conséquences sur les taux de gammaglobuline<sup>97</sup>. Des études suggèrent que l'hypogammaglobulinémie secondaire dans la SEP est associée à un risque accru d'infection, bien que le risque accru d'EIG soit controversé<sup>95,97,98</sup>. Dans notre étude, les EIG après un traitement de longue durée par les anti-CD20 étaient peu fréquents, et nos résultats sont concordants avec les études précédentes sur les maladies neurologiques et rhumatologiques d'origine auto-immune<sup>94,95,100,125</sup>. Les facteurs prédictifs des EIG, tels que l'hypogammaglobulinémie, n'ont pas été analysables dans notre étude compte tenu du faible nombre d'événements sur la période étudiée.

Peu d'études ont examiné l'effet cumulé des traitements de fond avant l'introduction du traitement anti-CD20 et leur impact sur les paramètres biologiques au long cours. Le fingolimod et le diméthylefumurate sont connus pour induire une lymphopénie, et il a été démontré qu'ils impactent les sous-populations de lymphocytes T et augmentent le risque de lymphopénie T avant et jusqu'à 12 mois après l'induction par l'anti-CD20 <sup>126</sup>. Notre étude confirme et approfondit les résultats de ces travaux précédents, car nous observons une diminution significative des taux absolus de lymphocytes CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>, ainsi qu'une lymphopénie CD4<sup>+</sup> jusqu'à 24 mois chez les patients ayant reçu un traitement lymphopéniant antérieur. Notons que dans cette sous population de patients, la lymphopénie rejoint à 24 mois (en valeur absolue comme en pourcentage), celle des patients n'ayant pas reçu auparavant de traitement lymphopéniant. Ceci reflète probablement le délai de l'impact résiduel du traitement lymphopéniant antérieur sur les lymphocytes T sous anti-CD20 IV.

Au-delà des différences observées concernant les sous-populations de lymphocytes T, nous observons une baisse significative des taux d'IgG avant et après 24 mois du traitement anti-CD20 chez les patients ayant déjà reçu un traitement lymphopéniant antérieur. Une proportion plus importante de malades présentant une hypolIgG a aussi été observée à 30 mois dans cette population. Il a été démontré que le traitement par cyclophosphamide avant le rituximab dans la vascularite associée aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles était associé à une baisse des taux sériques d'IgG<sup>127,128</sup>, mais il a été démontré que le traitement concomitant par méthotrexate (moins lymphopéniant que le cyclophosphamide) et rituximab chez les patients atteints de PR était un facteur de protection contre le risque de développer une

hypogammaglobulinémie<sup>129</sup>. En ce qui concerne la SEP, il a été observé qu'un traitement antérieur par fingolimod avait une influence sur l'hypogammaglobulinémie<sup>96</sup>, tandis que les taux d'Ig restent relativement stables chez les patients ayant reçu du diméthylfumarate pendant au moins 96 semaines<sup>130</sup>. Dans notre étude, il est possible que l'administration préalable d'un traitement lymphopéniant à des patients traités par anti-CD20 exerce un effet synergique sur la baisse des taux d'IgG lors des cycles subséquents d'anti-CD20 en accélérant la déplétion des lymphocytes B matures producteurs d'IgG dans le sang périphérique. Néanmoins, les conséquences définitives d'une exposition antérieure au traitements lymphopéniant en relation avec le traitement anti-CD20 ne sont pas encore évidentes, étant donné que nous n'avons pas observé une augmentation des infections opportunistes graves ou des tumeurs malignes dans notre cohorte limitée. D'autres études sont nécessaires afin de découpler le rôle de l'exposition antérieure au traitements lymphopéniant par rapport aux anti-CD20.

### **Limites :**

Nous devrions toutefois souligner les limites de cette étude notamment la nature rétrospective de l'étude, limitant ainsi la possibilité de recueillir tous les événements indésirables pendant toute la durée de l'étude. Cependant, nous nous sommes concentrés sur les EIG de grade 3 ou plus, ce qui a réduit la probabilité de données manquantes relatives à la sécurité du traitement. Par ailleurs, la conception monocentrique de notre étude a très probablement abouti à un faible effectif de l'ensemble de l'échantillon. Cela dit, notre clinique est un centre de ressource et de compétence sur la SEP dont l'activité clinique, biologique et IRM est exhaustive et bien



documentée. Même si nous avons observé des variations concernant les intervalles de perfusion du traitement anti-CD20, notamment pendant la pandémie de COVID-19, nous avons observé un intervalle de perfusion plus long en comparaison avec la période avant et après mars 2020, mais cette différence n'est pas cliniquement pertinente et nous avons conclu que nous avons pu maintenir notre activité clinique pendant cette période puisque nous avons eu la possibilité d'utiliser l'espace temporairement arrêté par les chirurgiens dans notre clinique pour la chirurgie ambulatoire. Enfin, avec le lancement de la campagne de rappel vaccinal pour les patients immunodéprimés en France pendant le printemps/été 2021, et avec une politique plus stricte dans notre service concernant la vaccination et les perfusions d'anti-CD20, il est possible que nous n'ayons pas pu détecter un allongement de l'intervalle entre les administrations d'anti-CD20 après la clôture de la période d'étude en septembre 2021.

### **Conclusion :**

Nos résultats suggèrent que, compte tenu de la proportion considérable de patients dont l'activité inflammatoire est contrôlée à 18 mois après traitement anti-CD20 selon les critères NEDA-3 et MEDA, le risque de développer une hypogammaglobulinémie induite par le traitement et le risque faible mais potentiel d'EIG survenant juste après ce point de repère, la balance bénéfice-risque du traitement anti-CD20 à long terme devrait être en faveur d'une prolongation des intervalles du traitement anti-CD20 à partir de 18 mois. Malheureusement, nos données ne permettent pas de suggérer un paramètre biologique ou clinique afin d'adapter un nouveau cycle du traitement anti-CD20, mais elles mettent en évidence d'autres variables qui devraient être

prises en compte, telles que l'âge, le taux de lymphocytes T et les TTM antérieurs. Un ECR serait utile pour explorer une stratégie d'induction potentielle suivie d'un traitement d'entretien, similaire à celui d'autres maladies auto-immunes traitées par les anti-CD20<sup>131</sup>.

## **Bibliographie :**

1. Landtblom, A.-M., Fazio, P., Fredrikson, S. & Granieri, E. The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Esté (1794–1848). *Neurol. Sci.* **31**, 29–33 (2010).
2. Pearce, J. M. S. Historical Descriptions of Multiple Sclerosis. *Eur. Neurol.* **54**, 49–53 (2005).
3. Dobson, R. & Giovannoni, G. Multiple sclerosis – a review. *Eur. J. Neurol.* **26**, 27–40 (2019).
4. Feigin, V. L. *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* **16**, 877–897 (2017).
5. Reich, D. S., Lucchinetti, C. F. & Calabresi, P. A. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **378**, 169–180 (2018).
6. Amato, M. P. *et al.* Association of MRI metrics and cognitive impairment in radiologically isolated syndromes. **8** (2012).
7. Olsson, T., Barcellos, L. F. & Alfredsson, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 25–36 (2017).
8. Soldan, S. S. & Lieberman, P. M. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–14 (2022) doi:10.1038/s41579-022-00770-5.
9. Lanz, T. V. *et al.* *Clonally Expanded B Cells in Multiple Sclerosis Bind EBV EBNA1 and GlialCAM.* <https://www.researchsquare.com/article/rs-1239863/v1> (2022) doi:10.21203/rs.3.rs-1239863/v1.
10. Bjornevik, K. *et al.* Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* **375**, 296–301 (2022).
11. Nourbakhsh, B. & Mowry, E. M. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis: *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **25**, 596–610 (2019).
12. Solomon, A. J. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis: *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **25**, 611–635 (2019).
13. Van Kaer, L., Postoak, J. L., Wang, C., Yang, G. & Wu, L. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 531–539 (2019).
14. Hauser, S. L. *et al.* Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* **19**, 578–587 (1986).
15. Booss, J., Esiri, M. M., Tourtellotte, W. W. & Mason, D. Y. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **62**, 219–232 (1983).
16. Babbe, H. *et al.* Clonal Expansions of Cd8+ T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction. *J. Exp. Med.* **192**, 393–404 (2000).
17. Martin, R., Sospedra, M., Rosito, M. & Engelhardt, B. Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2078–2090 (2016).
18. Cao, Y. *et al.* Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **7**, 287ra74–287ra74 (2015).
19. Baker, D., Marta, M., Pryce, G., Giovannoni, G. & Schmierer, K. Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis. *EBioMedicine* **16**, 41–50 (2017).
20. Cohen, J. A. *et al.* Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet* **380**, 1819–1828 (2012).
21. Cooper, M. D., Peterson, R. D. A. & Good, R. A. Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken. *Nature* **205**, 143–146 (1965).
22. *B Cells in Immunity and Tolerance.* vol. 1254 (Springer Singapore, 2020).
23. Cyster, J. G. & Allen, C. D. C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* **177**, 524–540 (2019).

24. Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L. & Raine, C. S. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.* **5**, 170–175 (1999).
25. Bar-Or, A. & Li, R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. *Lancet Neurol.* **20**, 470–483 (2021).
26. Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E. & Wekerle, H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *Lancet Neurol.* **15**, 317–331 (2016).
27. Li, R., Patterson, K. R. & Bar-Or, A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* **19**, 696–707 (2018).
28. Colombo, M. *et al.* Maintenance of B lymphocyte-related clones in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3433–3438 (2003).
29. Colombo, M. *et al.* Accumulation of Clonally Related B Lymphocytes in the Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *J. Immunol.* **164**, 2782–2789 (2000).
30. Stern, J. N. H. *et al.* B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci. Transl. Med.* **6**, 248ra107 (2014).
31. Palanichamy, A. *et al.* Immunoglobulin class-switched B cells provide an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **6**, 248ra106 (2014).
32. Michel, L. *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw0475 (2019).
33. Jain, R. W. & Yong, V. W. B cells in central nervous system disease: diversity, locations and pathophysiology. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 513–524 (2022).
34. Magliozzi, R. *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* **130**, 1089–1104 (2007).
35. Lucchinetti, C. F. *et al.* Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2188–2197 (2011).
36. Jelcic, I. *et al.* Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell* **175**, 85-100.e23 (2018).
37. Duddy, M. *et al.* Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **178**, 6092–6099 (2007).
38. Li, R. *et al.* Proinflammatory GM-CSF–producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, 310ra166-310ra166 (2015).
39. Guerrier, T. *et al.* Proinflammatory B-cell profile in the early phases of MS predicts an active disease. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **5**, (2018).
40. Kappos, L. *et al.* Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* **13**, 353–363 (2014).
41. Sergott, R. C. *et al.* ATON: Results from a Phase II randomized trial of the B-cell-targeting agent atacicept in patients with optic neuritis. *J. Neurol. Sci.* **351**, 174–178 (2015).
42. Krumbholz, M. *et al.* Interferon- $\beta$  increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain* **131**, 1455–1463 (2008).
43. Ontaneda, D., Tallantyre, E., Kalincik, T., Planchon, S. M. & Evangelou, N. Early highly effective versus escalation treatment approaches in relapsing multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **18**, 973–980 (2019).
44. Parks, N. E., Flanagan, E. P., Lucchinetti, C. F. & Wingerchuk, D. M. NEDA treatment target? No evident disease activity as an actionable outcome in practice. *J. Neurol. Sci.* **383**, 31–34 (2017).
45. Giovannoni, G., Tomic, D., Bright, J. R. & Havrdová, E. “No evident disease activity”: The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **23**, 1179–1187 (2017).

46. Lin, T.-Y. *et al.* Increased Serum Neurofilament Light and Thin Ganglion Cell–Inner Plexiform Layer Are Additive Risk Factors for Disease Activity in Early Multiple Sclerosis. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **8**, (2021).
47. Kappos, L. *et al.* Inclusion of brain volume loss in a revised measure of ‘no evidence of disease activity’ (NEDA-4) in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **22**, 1297–1305 (2016).
48. Damasceno, A., Pimentel-Silva, L. R., Damasceno, B. P. & Cendes, F. Exploring the performance of outcome measures in MS for predicting cognitive and clinical progression in the following years. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **46**, 102513 (2020).
49. Havrdová, E. *et al.* No evidence of disease activity (NEDA) analysis by epochs in patients with relapsing multiple sclerosis treated with ocrelizumab vs interferon beta-1a. *Mult. Scler. J. - Exp. Transl. Clin.* **4**, 2055217318760642 (2018).
50. Vermersch, P. *et al.* Efficacy and safety of ocrelizumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis with suboptimal response to prior disease-modifying therapies: A primary analysis from the phase 3b CASTING single-arm, open-label trial. *Eur. J. Neurol.* **29**, 790–801 (2022).
51. University of California, S. F. M.-E. T. *et al.* Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann. Neurol.* **80**, 499–510 (2016).
52. Prosperini, L. *et al.* Minimal evidence of disease activity (MEDA) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **91**, 271–277 (2020).
53. Palanichamy, A. *et al.* Rituximab Efficiently Depletes Increased CD20-Expressing T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *J. Immunol.* **193**, 580–586 (2014).
54. Comi, G. *et al.* Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann. Neurol.* **89**, 13–23 (2021).
55. Cencioni, M. T., Mattosio, M., Magliozzi, R., Bar-Or, A. & Muraro, P. A. B cells in multiple sclerosis — from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat. Rev. Neurol.* **17**, 399–414 (2021).
56. Cotchett, K. R. Comparison of the Efficacy and Safety of Anti-CD20 B Cells Depleting Drugs in Multiple Sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **12** (2021).
57. Gelfand, J. M., Cree, B. A. C. & Hauser, S. L. Ocrelizumab and Other CD20+ B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **14**, 835–841 (2017).
58. Reff, M. E. *et al.* Depletion of B Cells In Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20. *Blood* **83**, 435–445 (1994).
59. Rubenstein, J. L. *et al.* Rituximab therapy for CNS lymphomas: targeting the leptomeningeal compartment. *Blood* **101**, 466–468 (2003).
60. Cross, A. H., Stark, J. L., Lauber, J., Ramsbottom, M. J. & Lyons, J.-A. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **180**, 63–70 (2006).
61. Bar-Or, A. *et al.* Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A 72-week, open-label, phase I trial. *Ann. Neurol.* **63**, 395–400 (2008).
62. Hauser, S. L., Arnold, D. L., Fox, R. J., Sarkar, N. & Smith, C. H. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* **13** (2008).
63. Hauser, S. L. *et al.* Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 221–234 (2017).
64. Bar-Or, A. *et al.* Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: The MIRROR study. *Neurology* **90**, e1805–e1814 (2018).
65. Hauser, S. L. *et al.* Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **383**, 546–557 (2020).
66. Montalban, X. *et al.* Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 209–220 (2017).

67. Bar-Or, A., O'Brien, S. M., Sweeney, M. L., Fox, E. J. & Cohen, J. A. Clinical Perspectives on the Molecular and Pharmacological Attributes of Anti-CD20 Therapies for Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **35**, 985–997 (2021).
68. Hawker, K. *et al.* Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann. Neurol.* **66**, 460–471 (2009).
69. Honce, J. M. *et al.* Rituximab vs placebo induction prior to glatiramer acetate monotherapy in multiple sclerosis. *Neurology* **92**, e723–e732 (2019).
70. Svenningsson, A. *et al.* Safety and efficacy of rituximab versus dimethyl fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis or clinically isolated syndrome in Sweden: a rater-blinded, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* **21**, 693–703 (2022).
71. Svenningsson, A. *et al.* Rapid depletion of B lymphocytes by ultra-low-dose rituximab delivered intrathecally. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **2**, (2015).
72. Komori, M. *et al.* Insufficient disease inhibition by intrathecal rituximab in progressive multiple sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **3**, 166–179 (2016).
73. Naegelin, Y. *et al.* Association of Rituximab Treatment With Disability Progression Among Patients With Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* **76**, 274–281 (2019).
74. Klein, C. *et al.* Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. *mAbs* **5**, 22–33 (2013).
75. Margoni, M., Preziosa, P., Filippi, M. & Rocca, M. A. Anti-CD20 therapies for multiple sclerosis: current status and future perspectives. *J. Neurol.* (2021) doi:10.1007/s00415-021-10744-x.
76. Kappos, L. *et al.* Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet* **378**, 1779–1787 (2011).
77. Gibiansky, E. *et al.* Ocrelizumab in relapsing and primary progressive multiple sclerosis: Pharmacokinetic and pharmacodynamic analyses of OPERA I, OPERA II and ORATORIO. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **87**, 2511–2520 (2021).
78. Hauser, S. L. *et al.* Five years of ocrelizumab in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* **95**, e1854–e1867 (2020).
79. Wolinsky, J. S. *et al.* Long-term follow-up from the ORATORIO trial of ocrelizumab for primary progressive multiple sclerosis: a post-hoc analysis from the ongoing open-label extension of the randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* **19**, 998–1009 (2020).
80. Pontieri, L. *et al.* Ocrelizumab treatment in multiple sclerosis: A Danish population-based cohort study. *Eur. J. Neurol.* **29**, 496–504 (2022).
81. Sorensen, P. S. *et al.* Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2 study. *Neurology* **82**, 573–581 (2014).
82. Bar-Or, A. *et al.* Rapid and sustained B-cell depletion with subcutaneous ofatumumab in relapsing multiple sclerosis: APLIOS, a randomized phase-2 study. *Mult. Scler. J.* **28**, 910–924 (2022).
83. Hauser, S. L. *et al.* Safety experience with continued exposure to ofatumumab in patients with relapsing forms of multiple sclerosis for up to 3.5 years. *Mult. Scler. J.* 13524585221079732 (2022) doi:10.1177/13524585221079731.
84. Monson, N. L., Cravens, P. D., Frohman, E. M., Hawker, K. & Racke, M. K. Effect of Rituximab on the Peripheral Blood and Cerebrospinal Fluid B Cells in Patients With Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Arch. Neurol.* **62**, 258 (2005).
85. von Essen, M. R. *et al.* Proinflammatory CD20+ T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain* **142**, 120–132 (2019).
86. Sabatino, J. J. *et al.* Anti-CD20 therapy depletes activated myelin-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 25800–25807 (2019).
87. Ochs, J. *et al.* Proinflammatory CD20<sup>+</sup> T cells contribute to CNS-directed autoimmunity. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabi4632 (2022).

88. Dorcet, G. *et al.* Early B cells repopulation in multiple sclerosis patients treated with rituximab is not predictive of a risk of relapse or clinical progression. *J. Neurol.* 1–11 (2022) doi:10.1007/s00415-022-11197-6.
89. Signoriello, E. *et al.* BMI influences CD20 kinetics in multiple sclerosis patients treated with ocrelizumab. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **43**, 102186 (2020).
90. Abbadessa, G. *et al.* CD19 Cell Count at Baseline Predicts B Cell Repopulation at 6 and 12 Months in Multiple Sclerosis Patients Treated with Ocrelizumab. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 8163 (2021).
91. Nissimov, N. *et al.* B cells reappear less mature and more activated after their anti-CD20-mediated depletion in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 25690–25699 (2020).
92. Gingele, S. *et al.* Ocrelizumab Depletes CD20+ T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *Cells* **8**, 12 (2018).
93. Capasso, N. *et al.* Ocrelizumab depletes T-lymphocytes more than rituximab in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **49**, 102802 (2021).
94. van Vollenhoven, R. F., Fleischmann, R. M., Furst, D. E., Lacey, S. & Lehane, P. B. Longterm Safety of Rituximab: Final Report of the Rheumatoid Arthritis Global Clinical Trial Program over 11 Years. *J. Rheumatol.* **42**, 1761–1766 (2015).
95. Vollmer, B. L. *et al.* Serious safety events in rituximab-treated multiple sclerosis and related disorders. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **7**, 1477–1487 (2020).
96. Zoehner, G. *et al.* Reduced serum immunoglobulin G concentrations in multiple sclerosis: prevalence and association with disease-modifying therapy and disease course. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **12**, 1756286419878340 (2019).
97. Perriguet, M. *et al.* Hypogammaglobulinemia and Infections in Patients With Multiple Sclerosis Treated With Rituximab. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, e1115 (2022).
98. Oksbjerg, N. R., Nielsen, S. D., Blinkenberg, M., Magyari, M. & Sellebjerg, F. Anti-CD20 antibody therapy and risk of infection in patients with demyelinating diseases. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **52**, 102988 (2021).
99. Hauser, S. L. *et al.* Safety of Ocrelizumab in Patients With Relapsing and Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Neurology* **97**, e1546–e1559 (2021).
100. Luna, G. *et al.* Infection Risks Among Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod, Natalizumab, Rituximab, and Injectable Therapies. *JAMA Neurol.* **77**, 184 (2020).
101. Louapre, C. *et al.* Clinical Characteristics and Outcomes in Patients With Coronavirus Disease 2019 and Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* **77**, 1–10 (2020).
102. Sormani, M. P. *et al.* Disease-Modifying Therapies and Coronavirus Disease 2019 Severity in Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **89**, 780–789 (2021).
103. Simpson-Yap, S. *et al.* Associations of Disease-Modifying Therapies With COVID-19 Severity in Multiple Sclerosis. *Neurology* **97**, e1870–e1885 (2021).
104. Simpson-Yap, S. *et al.* Updated Results of the COVID-19 in MS Global Data Sharing Initiative: Anti-CD20 and Other Risk Factors Associated With COVID-19 Severity. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, (2022).
105. Salter, A. *et al.* Outcomes and Risk Factors Associated With SARS-CoV-2 Infection in a North American Registry of Patients With Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* **78**, 699–708 (2021).
106. Alfonso-Dunn, R. *et al.* Strong T-cell activation in response to COVID-19 vaccination in multiple sclerosis patients receiving B-cell depleting therapies. *Front. Immunol.* **13**, 926318 (2022).
107. Apostolidis, S. A. *et al.* Cellular and humoral immune responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination in patients with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. *Nat. Med.* **27**, 1990–2001 (2021).

108. Brill, L. *et al.* Humoral and T-Cell Response to SARS-CoV-2 Vaccination in Patients With Multiple Sclerosis Treated With Ocrelizumab. *JAMA Neurol.* **78**, 1510–1514 (2021).
109. Coyle, P. K., Gocke, A., Vignos, M. & Newsome, S. D. Vaccine Considerations for Multiple Sclerosis in the COVID-19 Era. *Adv. Ther.* **38**, 3550–3588 (2021).
110. Juto, A., Fink, K., Al Nimer, F. & Piehl, F. Interrupting rituximab treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis; no evidence of rebound disease activity. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **37**, 101468 (2020).
111. Boremalm, M., Sundström, P. & Salzer, J. Discontinuation and dose reduction of rituximab in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J. Neurol.* **268**, 2161–2168 (2021).
112. Rolfes, L. *et al.* Ocrelizumab Extended Interval Dosing in Multiple Sclerosis in Times of COVID-19. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **8**, e1035 (2021).
113. Maarouf, A. *et al.* Extending rituximab dosing intervals in patients with MS during the COVID-19 pandemic and beyond? *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **7**, e825 (2020).
114. Kim, S.-H., Huh, S.-Y., Lee, S. J., Joung, A. & Kim, H. J. A 5-Year Follow-up of Rituximab Treatment in Patients With Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *JAMA Neurol.* **70**, 1110 (2013).
115. Ruetsch-Chelli, C. *et al.* Memory B Cells Predict Relapse in Rituximab-Treated Myasthenia Gravis. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **18**, 938–948 (2021).
116. Lebrun, C. *et al.* Therapeutic target of memory B cells depletion helps to tailor administration frequency of rituximab in myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* **298**, 79–81 (2016).
117. Novi, G. *et al.* Tailoring B cell depletion therapy in MS according to memory B cell monitoring. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **7**, e845 (2020).
118. van Lierop, Z. Y. *et al.* Personalized B-cell tailored dosing of ocrelizumab in patients with multiple sclerosis during the COVID-19 pandemic. *Mult. Scler. J.* **28**, 1121–1125 (2022).
119. Weinstock-Guttman, B. *et al.* Ocrelizumab treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis after a suboptimal response to previous disease-modifying therapy: A nonrandomized controlled trial. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **28**, 790–800 (2022).
120. Cellerino, M. *et al.* Predictors of Ocrelizumab Effectiveness in Patients with Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **18**, 2579–2588 (2021).
121. Mirmosayyeb, O. *et al.* Clinical Characteristics and Disability Progression of Early- and Late-Onset Multiple Sclerosis Compared to Adult-Onset Multiple Sclerosis. *J. Clin. Med.* **9**, 1326 (2020).
122. Baker, D., Pryce, G., James, L. K., Marta, M. & Schmierer, K. The ocrelizumab phase II extension trial suggests the potential to improve the risk: Benefit balance in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **44**, 102279 (2020).
123. Zecca, C. *et al.* Treatment of multiple sclerosis with rituximab: A multicentric Italian–Swiss experience. *Mult. Scler. J.* **26**, 1519–1531 (2020).
124. Evangelatos, G. *et al.* Hypogammaglobulinemia after rituximab for rheumatoid arthritis is not rare and is related with good response: 13 years real-life experience. *Rheumatology* **60**, 2375–2382 (2021).
125. Kim, S.-H., Park, N. Y., Kim, K. H., Hyun, J.-W. & Kim, H. J. Rituximab-Induced Hypogammaglobulinemia and Risk of Infection in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: A 14-Year Real-Life Experience. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, (2022).
126. Landi, D. *et al.* Influence of Previous Disease-Modifying Drug Exposure on T-Lymphocyte Dynamic in Patients With Multiple Sclerosis Treated With Ocrelizumab. *Neurol. - Neuroimmunol. Neuroinflammation* **9**, (2022).
127. Venhoff, N. *et al.* Impact of Rituximab on Immunoglobulin Concentrations and B Cell Numbers after Cyclophosphamide Treatment in Patients with ANCA-Associated Vasculitides. *PLoS ONE* **7**, e37626 (2012).



128. Roberts, D. M. *et al.* Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: Incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *J. Autoimmun.* **57**, 60–65 (2015).
129. Boleto, G., Kanagaratnam, L., Dramé, M. & Salmon, J.-H. Safety of combination therapy with two bDMARDs in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Semin. Arthritis Rheum.* **49**, 35–42 (2019).
130. Longbrake, E. E. *et al.* Dimethyl fumarate treatment shifts the immune environment toward an anti-inflammatory cell profile while maintaining protective humoral immunity. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **27**, 883–894 (2021).
131. Roubaud-Baudron, C. *et al.* Rituximab Maintenance Therapy for Granulomatosis with Polyangiitis and Microscopic Polyangiitis. *J. Rheumatol.* **39**, 125–130 (2012).

**AUTEUR(E) : Nom : FREEMAN**

**Prénom : Sean**

**Date de soutenance :**

**Titre de la thèse : Impact de la déplétion lymphocytaire B sur le contrôle anti-inflammatoire et le risque infectieux dans une cohorte de patients ayant une SEP et traités par anti-CD20.**

**Thèse - Médecine - Lille 2022**

**Cadre de classement :** Neurologie

**DES + FST/option :** DES Neurologie

**Mots-clés :** Sclérose en plaques, anti-CD20, NEDA, MEDA, lymphopénie, hypogammaglobulinémie.

### **Résumé**

#### **Contexte :**

Les traitements anti-CD20 par voie intraveineuse (IV) qui permettent de dépléter des lymphocytes B reposent sur un schéma fixe dans la SEP avec une perfusion tous les six mois. Bien que ces traitements soient hautement efficaces, ils s'accompagnent d'un risque infectieux et d'hypogammaglobulinémie (Ig) secondaire à long terme. Peu d'études ont étudié la déplétion des lymphocytes B après de multiples cycles d'anti-CD20 et leur influence sur l'activité inflammatoire dans la SEP. Nous avons donc étudié si la déplétion des lymphocytes B après au moins un an de traitement par anti-CD20 IV pouvait avoir un impact sur le contrôle radio-clinique, telle que définie par NEDA-3 et MEDA, chez les patients SEP à 12 et 18 mois.

#### **Méthode :**

Nous avons réalisé une étude observationnelle rétrospective dans une cohorte de 192 patients SEP sous anti-CD20 en IV entre janvier 2014 et septembre 2021. Nous avons recueilli la numération des sous-populations lymphocytaires, le taux d'Ig tous les 6 mois avant un nouveau cycle d'anti-CD20 ainsi que les événements indésirables graves (EIG). Nous avons également étudié l'impact des traitements lymphopéniant antérieur sur les paramètres biologiques avant et au cours du traitement.

#### **Résultats :**

Au total, 60,6% et 84,2% des patients était NEDA-3 à 12 et 18 mois, et MEDA dans 84,6% et 96,9% à 12 et 18 mois, respectivement. À 12 et 18 mois, 81,3% et 85,8 % des patients présentaient une déplétion lymphocytaire CD19<sup>+</sup>, respectivement. Les patients plus âgés et ceux ayant une lymphopénie CD3<sup>+</sup> ont été associés à un meilleur contrôle de la maladie à 12 et 18 mois. Le taux d'Ig étaient significativement inférieurs aux taux initiaux à partir de 6 mois pour les IgM (p=<0,0001) et 30 mois pour les IgG (p=0,0031). Les patients ayant reçu un traitement lymphopéniant avant l'initiation de l'anti-CD20 ont présenté une diminution des lymphocytes CD3<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> ainsi que des taux d'IgG par rapport aux patients n'ayant en jamais reçu. Les EIG de grade 3 ou plus étaient rares.

#### **Conclusions :**

La déplétion des lymphocytes B ne semble pas suffisante pour prédire le contrôle de l'activité inflammatoire selon les critères NEDA-3 et MEDA à 12 et 18 mois chez les patients SEP qui bénéficient d'un traitement IV par anti-CD20. Cependant, ce contrôle anti-inflammatoire est obtenu pour la grande majorité des patients dès 18 mois nous proposons ainsi d'adapter la stratégie de l'anti-CD20 IV à partir de ce délai.

### **Composition du Jury :**

**Président : Monsieur le Professeur Sylvain DUBUCQUOI**

**Assesseurs :**

**Madame le Professeur Catherine LUBETZKI, Monsieur le Professeur Bertrand AUDOIN, Monsieur le Docteur Didier FERRIBY**

**Directeur de thèse : Madame le Professeur Hélène ZEPHIR**