



UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2023

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Impact du rituximab sur le système immunitaire des patients
atteints de maladies auto-immunes : étude prospective**

Présentée et soutenue publiquement le 23/06/2023 à 18h

au Pôle Recherche

par Aurélien CHEPY

JURY

Président :

Monsieur le Professeur *Eric HACHULLA*

Assesseurs :

Monsieur le Professeur *David LAUNAY*

Monsieur le Docteur *Guillaume LEFEVRE*

Madame le Docteur *Sarah STABLER*

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur *Vincent SOBANSKI*

Travail du Service de Médecine interne

INTRODUCTION GENERALE

La déplétion en lymphocytes B (DLB) par anticorps monoclonaux anti-CD20 (AcM anti-CD20) fait partie de l'arsenal thérapeutique des maladies auto-immunes (MAI). Les trois AcM anti-CD20 actuellement commercialisés sont le rituximab (RTX), l'ocrelizumab et l'ofatumumab. Ceux-ci ont été initialement développés pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens exprimant le CD20. Le RTX dispose d'une autorisation de mise sur le marché dans la polyarthrite rhumatoïde (PR) et les vascularites systémiques associées aux anticorps ciblant le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (vascularites associées aux ANCA, VAA). Le RTX est également utilisé hors autorisation de mise sur le marché dans de nombreuses MAI systémiques comme le lupus systémique (LS), la vascularite cryoglobulinémique, le syndrome de Goujerot-Sjögren ou des MAI spécifiques d'organes comme les cytopénies auto-immunes, le pemphigus et la glomérulonéphrite membranoproliférative idiopathique (1,2). Deux schémas d'administration du RTX sont généralement utilisés pour le traitement d'induction des MAI : le protocole dit "rhumatologique" (injection de 1000 mg de RTX au jour 1 et au jour 15) et le protocole dit "hématologique" (375 mg/m² par semaine pendant 4 semaines). Le traitement d'entretien est variable mais consiste généralement en une injection de 500 mg tous les 6 mois. Un cycle de RTX est défini comme un traitement d'induction et d'entretien complet (1).

En dehors des VAA, les AcM anti-CD20 constituent la plupart du temps une thérapeutique de seconde ligne, initiée après ou de manière concomitante aux glucocorticoïdes (GC) et/ou aux immunosuppresseurs (IS). L'évaluation du risque infectieux chez ces patients immunodéprimés et les moyens de prophylaxie sont donc des questions importantes pour le clinicien prescrivant des AcM anti-CD20. Nous avons récemment publié un travail rétrospectif visant à évaluer l'incidence des effets indésirables sévères (EIS) et leurs facteurs de risques chez les patients traités par RTX pour MAI. Dans cette étude, l'incidence d'EIS à 1 et 2 ans était respectivement de 17,3 et de 11,3 pour 100 personnes-années. Nous avons identifié comme facteurs de risque de survenue d'EIS à l'initiation du traitement par RTX les antécédents de diabète sucré et de cancer, la prise concomitante de GC et un taux faible de

lymphocytes T (LT) CD4+. Cette étude présentait certaines limites, en particulier la conception rétrospective et le manque de suivi des paramètres biologiques immunologiques. En effet, la cinétique de l'hypogammaglobulinémie (HG), la reconstitution immunitaire et leur relation avec les EIS restent peu décrites (3).

Mécanisme d'action des AcM anti-CD20

Le CD20 est exprimé par les LB circulants, depuis le stade pré-B jusqu'aux cellules B mémoires circulantes et n'est pas exprimé par les plasmocytes de longue durée de vie et les cellules souches localisées dans la moelle osseuse. Les différents AcM anti-CD20 partagent des propriétés pharmacologiques similaires, leur demi-vie d'élimination est d'environ 20 jours. Ainsi, les AcM anti-CD20 induisent une déplétion lymphocytaire B en fonction de l'expression du CD20, qui est elle-même liée au stade de maturation du LB et du compartiment tissulaire (4).

Les trois principaux mécanismes de DLB induits par les AcM anti-CD20 sont les suivants :

- la cytotoxicité dépendante du complément où la voie classique du complément est activée et conduit à une lyse cellulaire (5) ;
- la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps : une cellule immunitaire (cellules NK, macrophages) détruit le LB par l'intermédiaire de l' AcM anti-CD20 fixé sur le CD20 (5) ;
- apoptose : les AcM anti-CD20 sont capables d'induire une augmentation de l'expression du CD95 (Apo 1 Fas) responsable de l'induction d'apoptose classique ou d'autres voies de mort cellulaire (6) (**Figure 1**).

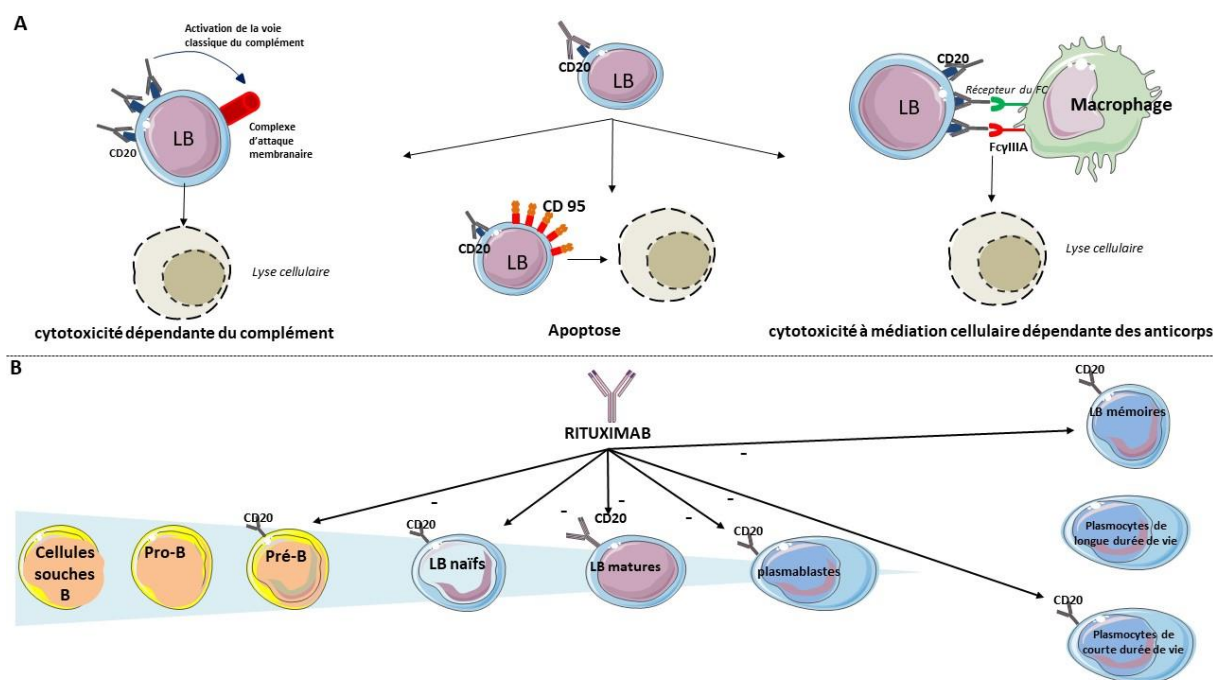


Figure 1 : A. Mécanismes d'action du rituximab : Cytotoxicité dépendante du complément (CDC) : la voie classique du complément est activée et conduit à la lyse cellulaire; Apoptose : les AcM anti-CD20 seraient capables d'induire une augmentation de l'expression du CD95 (Apo 1 Fas) responsable de l'induction de l'apoptose ou de l'induction d'une autre voie de mort cellulaire ne correspondant pas à l'apoptose "classique" ; Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) : une cellule immunitaire (monocytes et macrophages) lyse une autre cellule marquée par des anticorps liés à des antigènes membranaires (ici les AcM anti-CD20 et le CD20). **B. Effet de la DLB sur les précurseurs et populations de LB**. Le CD20 est exprimé par les cellules B circulantes depuis le stade pré-B jusqu'aux cellules B mémoires circulantes, mais il n'est pas exprimé par les plasmocytes de longue durée de vie et les cellules souches de la moelle osseuse. Ainsi, les cellules pro-B et les plasmocytes de longue durée de vie sont préservées de la DLB. LB : lymphocytes B ; DLB : déplétion en lymphocytes B.

Impact sur le système immunitaire

Reconstitution immunitaire du compartiment B

La reconstitution du compartiment B circulant après un traitement par AcM anti-CD20 est variable selon les patients et les pathologies. Dans le cas des lymphomes, un nombre de LB comparable au prétraitement a été atteint en 12 mois et varie en fonction de la chimiothérapie associée qui est utilisée (7). Dans les MAI, elle varie en fonction de la pathologie sous-jacente. Thiel et al. ont montré que la reconstitution du compartiment B prend 8 mois dans les connectivites, 9 mois dans la PR, 21 mois dans la granulomatose éosinophile avec polyangéite et 25 mois dans d'autres VAA (8). De plus, la DLB peut parfois persister et Cassia et al., ont montré chez 147 patients atteints d'un LS que les LB CD19+ étaient indétectables chez 76%

des patients au moment de la deuxième injection de RTX et que cela restaient stable au cours du suivi (9).

Hypogammaglobulinémie

Bien que l'HG corresponde à la diminution d'un ou plusieurs isotypes d'Ig circulantes, la plupart des études la définissent comme un taux d'IgG sérique inférieur à 6g/l et l'HG persistante comme une HG durant plus de 6 mois après le traitement (10). L'incidence survenue d'une HG varie entre 13 et 30 % chez les patients atteints de MAI traités par AcM anti-CD20 (10,11).

L'HG serait liée à une diminution de la différenciation des LB naïfs en LB mémoires (12,13). Elle prédomine sur les IgM par rapport aux IgG et IgA (9,14), ceci s'expliquant par la pharmacodynamie du RTX et le fait que les IgM migrent dans la zone des gammaglobulines sur l'électrophorèse des protéines sériques. Les IgG sont sécrétées par des plasmocytes de longue durée de vie qui n'expriment pas le CD20 résidant dans la moelle osseuse après une maturation d'affinité T-dépendante dans le centre germinatif (15,16).

Plusieurs facteurs de risque d'HG ont été décrits :

- l'âge au début du traitement (17) ;
- l'utilisation concomitante d'un traitement IS : cyclophosphamide (CYC) (18,19), GC (11) et mycophénolate mofetil (2) ;
- le taux d'immunoglobulines à initiation du RTX : faible taux d'IgG et d'IgM (11,18) ;
- une inversion du rapport lymphocytes T CD4/CD8 à l'initiation (20) ;
- la pathologie sous-jacente : les VAA exposeraient à un risque plus important d'HG (21).

Le lien entre l'HG pendant le traitement et la survenue d'une infection n'est pas complètement établi. Dans notre précédente étude rétrospective de patients atteints de MAI traités par RTX, nous n'avons pas observé d'association en analyse multivariée entre HG et EIS (3).

Lymphocytes T

Besada et al. ont montré dans une cohorte de patients atteints de granulomatose avec polyangéite que le nombre de LT CD4+ diminuait de 42 % entre l'initiation du traitement et 3 mois et de 18 % après 24 mois (20). Les mécanismes sous-jacents à cette lymphopénie T ne sont que peu décrits. Les facteurs de risque de développer une lymphopénie T CD4+ sont la dose cumulée de CYC et l'âge à l'initiation du traitement (10). Une faible numération des LT CD4+ semble être associée à la survenue EIS (3). L'évolution des LT CD8+ est peu connue.

Des cas de neutropénies ont été initialement décrits chez des patients traités par RTX pour un lymphome et surviennent en règle générale de manière retardée par rapport à l'injection de RTX (après au moins 4 semaines) et sont décrites comme tardives (neutropénie tardive, NT) (22,23). La NT est également décrite dans les MAI traitées par RTX, son incidence varierait entre 6,5% et 23% (24,25). Le délai médian d'apparition de la NT est de 102 jours et peut survenir jusqu'à 5 mois après la dernière perfusion de RTX. L'incidence de la NT semble plus élevée chez les patients atteints de LS et de VAA que chez les patients atteints de PR (20 %, 23 % et 3 % respectivement) (25) (**Figure 2**).

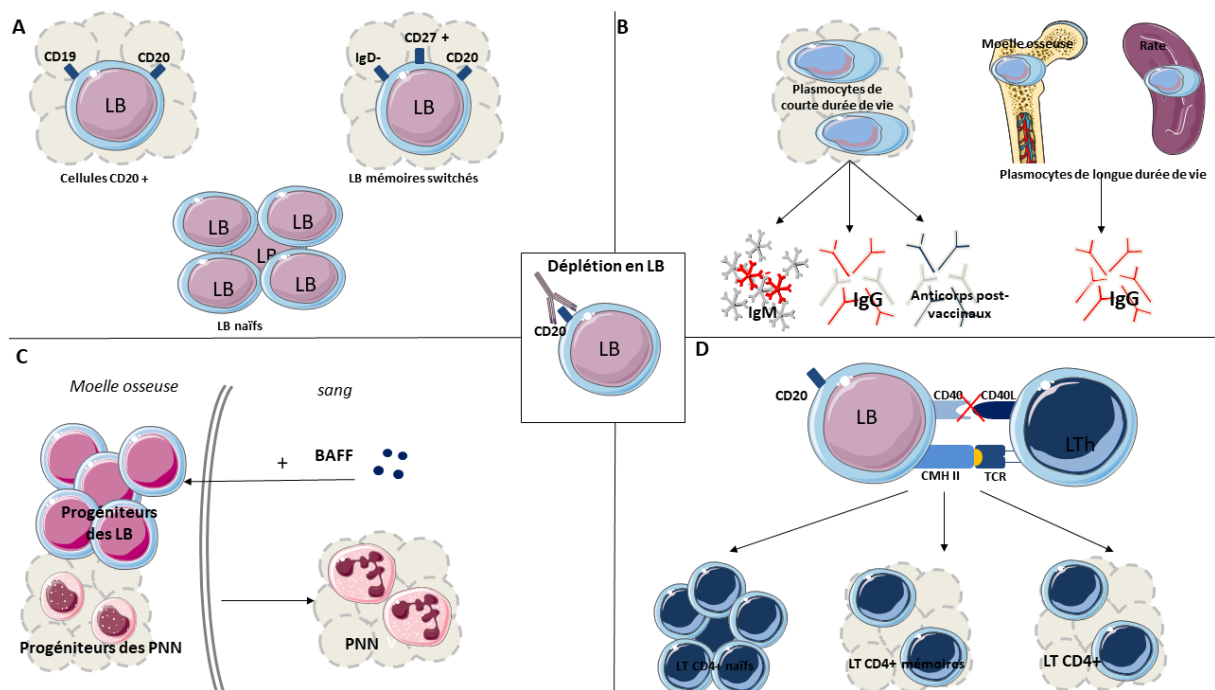


Figure 2 : Impact du rituximab sur le système immunitaire. **A :** La DLB induit une diminution drastique du nombre de LB CD20+ circulants, y compris les cellules B mémoires switchées. La conséquence est une augmentation des LB naïfs et des LB régulateurs. **B :** La diminution du nombre de plasmocytes à durée de vie courte et de plasmablastes induit une diminution marquée des taux d'IgM et une diminution plus faible des taux d'IgG. Il en résulte également une diminution de la réponse post-vaccinale. Les lymphocytes B mémoires et les

plasmocytes à longue durée de vie CD20- résidant dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires ne sont pas affectés. Ceci explique la persistance de la sécrétion d'IgG. **C** : La DLB induit un déficit voire une inhibition de la granulopoïèse en raison d'une promotion importante de la reconstitution des LB dans la moelle osseuse en réponse à l'augmentation du facteur d'activation des lymphocytes B. **D** : La déplétion en lymphocyte B par le RTX altère l'activation des LT CD4+ et leur expansion clonale en réponse à challenge par antigène protéique. Ceci induit une diminution des molécules de costimulations des LB (CD40 et CD80) et des LT (CD40L). Ainsi il existe une inhibition de la différenciation des LT (diminution des LT CD4+ mémoires et augmentation des LT CD4+ naïfs) liée à une perte d'interaction entre LB et LT. LB : lymphocytes B ; DLB : déplétion en lymphocytes B ; LT : Lymphocytes T ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; LTh : lymphocytes T helper ; BAFF : B-cell activating factor

Déplétion des lymphocytes B et risque d'infections

Infections bactériennes

Les EIS sont définis comme des infections nécessitant un traitement anti-infectieux parentéral et/ou conduisant à une hospitalisation et/ou au décès du patient (3). Dans une étude de registre portant sur 1303 patients atteints de PR et traités par RTX, Gottenberg et al. ont rapporté 5 EIS par année-personne (26). Dans les essais cliniques de VAA, RAVE et RITUXVAS, le taux d'EIS était respectivement de 12 % et de 18 % (27,28) et variait entre 20 et 40 % dans les études observationnelles (11,29,30). Dans le LS, Reddy et al. n'ont rapporté aucun EIS dans une étude rétrospective (31), tandis que Cassia et al. ont récemment décrit 64 EIS dans une étude portant sur 147 patients (9). Dans des cohortes de diverses MAI, leur survenu varie entre 9,8 et 17,3 années-personnes (3,32).

Dans les VAA, le risque d'EIS semble être plus élevé pendant le traitement d'induction (2,9 pour 10 années-patients) que pendant le traitement d'entretien (0,9 pour 10 années-patients) (14). Le délai médian de survenue d'un EIS est d'environ 4 mois et diminue avec le temps (14,19).

Les EIS les plus fréquents sont les infections des voies respiratoires inférieures de cause bactérienne. Les infections cutanées, urinaires, digestives et ostéo-articulaires sont moins fréquemment décrites (26). Une bactériémie peut survenir (3). L'EIS peut également se présenter sous la forme d'infection opportuniste (32).

Facteurs de risque d'EIS à l'initiation du traitement

Les comorbidités du patient tels que l'âge élevé, les antécédents de cancer, de maladies pulmonaires chroniques, le diabète sucré, l'insuffisance cardiaque et l'insuffisance rénale chronique semblent être des facteurs de risque d'EIS dans plusieurs études observationnelles (2,3,32,33). L'utilisation antérieure d'un traitement IS est également en cause : les doses cumulées de GC et CYC chez les patients atteints de VAA et LS augmentent le risque d'EIS (10). Au niveau biologique un faible taux d'IgG à l'initiation du traitement a été identifié comme un facteur de risque d'EIS dans la PR et autre MAI (11,26). Il a été montré dans diverses études de cohortes de MAI que le taux de LT CD4+ semblait être un facteur de risque (2,3,11). Heusele et al. ont également identifié un faible taux de LB CD19+ comme étant un facteur de risque d'EIS dans une cohorte de MAI excluant la PR (33).

Risque d'EIS pendant le traitement et le cycle de retraitement

Yusuf et al. ont étudié les paramètres clinico-biologiques des patients traités par RTX entre le deuxième et le quatrième cycle. Les données de base associées à l'EIS étaient les comorbidités et l'utilisation plus importante de GC. La neutropénie, un délai plus long avant le retraitement par RTX et un taux d'IgM plus élevé précédant chaque cycle de perfusion de RTX étaient associées à la survenue d'un EIS. Un taux élevé d'IgG avant le retraitement par RTX était associé à un risque plus faible d'EIS (32).

Stratégie préventive d'EIS chez les patients traités par RTX pour MAI

Face au risque d'infection potentiellement induite, des mesures prophylactiques appropriées sont primordiales pour une bonne prise en charge des patients.

Immunoglobulines polyvalentes substitutives

La nécessité d'utiliser des immunoglobulines polyvalentes substitutives (IPS) varie d'une étude à l'autre, allant de 1 à 10 % pour les patients atteints de MAI (3,32) et leur indication est variable (3,11).

Les premières recommandations pour la prise en charge de l'HG secondaire due à la DLB ont été publiées récemment à la suite d'un exercice Delphi modifié. Les auteurs ont proposé que la décision de commencer un traitement par IPS soit prise en fonction du degré d'HG (sans qu'un seuil soit proposé), des infections (décrites comme graves, persistantes, inhabituelles ou récurrentes), de la démonstration d'une altération de la réponse des anticorps aux antigènes polysaccharidiques et d'une mauvaise réponse à l'antibioprophylaxie. Cette décision est également basée sur les autres risques du patient de développer un EIS (âge, comorbidités, faibles taux d'IgG au départ, utilisation concomitante de GC ou d'agents immunosuppresseurs). Si un traitement par IPS est instauré, la posologie doit être de 0,4 g/kg/mois et réévaluée chaque année en fonction des paramètres cliniques et biologiques (34).

Pneumocystose et cotrimoxazole

Compte tenu du grand nombre de cas de pneumocystose rapportés chez les patients traités pour VAA, le groupe français d'étude des vascularites s'est prononcé en faveur d'une antibioprophylaxie systématique pour tous les patients avec du Triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP/SLX) à doses préventives (400mg/80mg par jour) (35). Kronbichler et al. ont observé que l'utilisation du TMP/SLX permet de prévenir les infections graves/menaçant le pronostic vital (36).

Vaccination

La prédisposition aux infections, notamment par des germes encapsulés, nécessite une politique vaccinale adaptée. Cependant, la réponse vaccinale semble être altérée après DLB (37).

Pecovitz et al. ont étudié la réponse immunitaire par production d'anticorps *in vivo* après injection de néoantigènes (phiX174, un bactériophage de la famille des *Microviridae*) chez des patients recevant du RTX ou un placebo. Deux doses de phiX174 ont été injectées juste après traitement par RTX et deux autres doses après un an de traitement. La réponse aux deux premières doses était réduite dans le groupe RTX. Après les troisième et quatrième injections

de néoantigènes, les sujets ont répondu avec des niveaux équivalents à ceux observés après les deux premières doses du groupe ne recevant pas de RTX. De même, les titres d'anticorps après le vaccin contre le tétanos/diphtérie et le vaccin contre l'hépatite A administrés 12 mois après l'injection de RTX étaient plus faibles dans le groupe RTX que dans le groupe placebo (38).

Dans la PR et les VAA, la réponse à la vaccination pneumococcique polysaccharidique pendant la DLB est diminuée (39,40). Dans le lymphome, on observe une meilleure réponse avec le vaccin conjugué qu'avec le vaccin polysidique 12 mois après le RTX (41). La réponse au vaccin antigrippal après la DLB est diminuée, et ce d'autant plus que le délai entre la vaccination et l'injection de RTX est réduit (42). Une revue systématique a rapporté que les réponses humorales au vaccin antipneumococcique étaient altérées pendant 28 semaines après un traitement par RTX et pendant 1 à 3 mois pour le vaccin antigrippal (42). L'immunisation contre *Haemophilus influenzae* est également altérée (32). Néanmoins, les réponses de rappel à l'antigène protéique dépendant des cellules T (par exemple l'anatoxine tétanique) ainsi que les réponses d'hypersensibilité retardée semblent être préservées après la DLB (39).

La société savante EULAR (*European Alliance of Associations for Rheumatology*) et le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) en France recommandent d'éviter les vaccins vivants atténués et indiquent que les vaccins inertes doivent être administrés au moins 4 semaines avant l'initiation de la DLB. Si un AcM anti-CD20 doit être débuté en urgence, les vaccinations doivent être réalisées même si elles sont moins efficaces. Pour les patients naïfs de toute vaccination anti-pneumococcique, la vaccination selon un schéma dit "Prime Boost" est recommandée : une injection du vaccin conjugué anti-pneumococcique 13-valent (PCV13) suivie d'une injection du vaccin non conjugué polysaccharidique 23-valent (PPV23) 8 semaines plus tard. L'étude PNEUMOVAS est en cours pour évaluer deux stratégies vaccinales anti-pneumococciques renforcées (2 injections ou 4 injections de PCV13) par

rapport à la stratégie vaccinale standard pour l'induction de la rémission par RTX au cours des VAA (35,43).

Ainsi, la fréquence de survenue des EIS et de l'HG et leurs facteurs de risque chez les patients atteints de MAI sont décrits de manière variable dans la littérature scientifique soulignant l'importance d'études prospectives. De même, l'évolution des paramètres immunitaires après traitement par RTX n'est que peu décrite.

L'objectif principal de ce travail était donc d'explorer l'influence du RTX sur le système immunitaire et sa reconstitution dans les MAI. Les objectifs secondaires étaient d'estimer l'incidence d'EIS, d'HG et d'IPS après la première injection de RTX chez les patients atteints de MAI.

Article original

Impact of Rituximab on the Immune System in Autoimmune Diseases: a Prospective Study

Authorship:

Aurélien Chepy, Michaël Génin, Louis Terriou, Cécile Chenivresse, Delphine Staumont-Sallé, Hélène Zéphir, Peggy Philippe, Guillaume Lefèvre, Sarah Stabler, Eric Hachulla, David Launay, Vincent Sobanski

Affiliations:

1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286—INFINITE—Institute for Translational Research in Inflammation, Lille, France
2. CHU Lille, Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre de Référence des Maladies Auto-immunes Systémiques Rares du Nord et Nord-Ouest de France (CeRAINO), Lille, France
3. CHU Lille, Institut d'Immunologie, Lille, France
4. Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

Corresponding author: Vincent Sobanski, vincent.sobanski@univ-lille.fr

Key words: rituximab, severe infection events, autoimmune diseases, immune reconstitution

Words count (abstract): 313

Words count (manuscript): 3024

Tables number: 3

Figures number: 5

Supplemental figure: 1

ABSTRACT

Background

Rituximab (RTX) is used in patients with autoimmune diseases (AID) and is associated with severe infectious events (SIE). Frequency of SIE and immune reconstitution (B cells, T cells, and immunoglobulins) after RTX has not yet been assessed in a prospective study in patients with AID.

Methods

We designed a prospective study with clinical and biological monitoring to explore the impact of RTX on immune system in patients with AID including kinetic evolution of biological parameters, estimation of severe infectious events (SIE) and immunoglobulins replacement therapy (IgRT). Patients were assessed every three months for 1 year. Clinical and biological parameters were recorded at each visit. The influence of baseline characteristics on immune reconstitution was assessed using mixed models.

Findings

Seventy-two patients were included. There were mostly women (45/72, 62%) presenting with autoimmune cytopenia, connective tissue diseases, organ-specific AID, systemic vasculitis, acquired hemophilia, and other diagnoses. We observed that the decrease in CD4+ and CD8+ T cells after RTX was influenced by the history or concomitant use of immunosuppressant agents (IS). All patients experienced deep B cells depletion and decreased neutrophils count; both were not influenced by baseline characteristics in the mixed models. Immunoglobulins (IgG and IgA) levels outcome was influenced by history or concomitant use of glucocorticoids (GC) and IS. We observed 9 SIE in 8 patients, including two early agranulocytosis (within 3 months after RTX infusion) in 2 patients receiving RTX for acquired hemophilia. Three patients received IgRT, including 2 during the first 3 months of follow-up.

Interpretation

Our study provides several insights into immune reconstitution in patients treated with RTX for AID. CD4+ and CD8+ T cells evolution appeared to be more related to IS and immunoglobulins evolution to be more related to GC rather than RTX itself. In contrast, B cell depletion and decreased neutrophils count appeared to be RTX-related. We also highlighted early neutropenia responsible for SIE in patients with acquired hemophilia.

Funding

This study was funded by Grifols and FHU PRECISE. Grifols had no role in collection, analysis, interpretation of data, preparation of the manuscript and decision to submit.

INTRODUCTION

Rituximab (RTX), a monoclonal antibody targeting the CD20 antigen expressed on the surface of B lymphocytes, has market authorization in rheumatoid arthritis (RA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibody vasculitis (AAV), which is also used off-label in many other autoimmune diseases (AID) such as systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), cryoglobulinemic vasculitis, autoimmune cytopenia, pemphigus, immune thrombocytopenia, and Sjogren's syndrome. Retrospective studies described immune reconstitution, severe infectious events (SIE), and SIE risk factors in patients with AID receiving RTX. RTX induces deep depletion of peripheral B cells and may be accompanied by varying degrees of hypogammaglobulinemia (HG), neutropenia, and lymphocyte T (LT) lymphopenia (2,44). Limited studies have shown that SIE occurred in 6 to 20 % of patients receiving RTX for AID, but the risk factors for SIE have not been clearly established (32). Age, history of diabetes and cancer, concomitant glucocorticosteroids (GC) treatment, and a low CD4+ T cells count at RTX initiation may increase the risk of SIE in patients with AID (3). To our knowledge, immune reconstitution (B cells, T cells, and immunoglobulins), baseline characteristics influencing immune reconstitution, and their impact on SIE occurrence have not been yet described in a prospective study in AID treated by RTX. We designed a prospective study with clinical and biological monitoring to explore the influence of RTX on the immune system and immune reconstitution after RTX treatment for AID. We also estimated the one-year incidence of SIE, HG and immunoglobulins replacement therapy (IgRT) following first RTX therapy in patients with AID.

MATERIALS AND METHODS

Study design and patients

This prospective study was conducted at the University Hospital of Lille from May 2019 to May 2022. Patients who received RTX in the departments of internal medicine, pneumology, dermatology, neurology, and rheumatology for AID were prospectively included for two years. Each patient was followed every three months for 1 year after RTX infusion (M3, M6, M9, and M12). Exclusion criteria were a prescription for a malignant hematological disease and age < 18 years. Clinical characteristics and variables were collected at the inclusion visit (V0) and follow-up visit: M3, M6, M9, and M12 (**Figure 1**). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice guidelines. The protocol and patients' informed consent received independent ethics committee approval (comité de protection des personnes, CPP number: 2018-A00188-47) and was declared to clinical trial.org before initiation of the study (NCT03778840). The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic which started in Europe in March 2020 had major impacts on this study: the several lockdowns have seriously limited patient access to hospital facilities, resulting in a significant decrease in the number of new patient inclusions and follow-up visits ; since RTX has been associated with severe forms of covid, prescribers have significantly reduced their choice of this treatment in favor of alternatives ; barrier measures such as wearing a mask, home confinement with limitation of the number of contacts, updating of vaccinations (COVID-19 but also other vaccine strains) could very probably contribute to a significant reduction in the number of expected SIE which had been used to estimate the number of subjects needed to be included in the study design.

Definition

SIE was defined as an infection that required parenteral anti-infective therapy and/or led to hospitalization and/or patient death. HG was defined as hypogammaglobulinemia with IgG of < 6 g/L. Lymphocyte populations were assessed using flow cytometry (FC). CD4+ T cells were

defined as CD3+/CD4+/CD8-/CD19- cells, CD8+ T cells as CD3+/CD8+/CD4-/CD19- cells, B cells as CD3-/CD4-/CD8-/CD19+ cells, and natural killer (NK) cells as CD3- /CD4-/CD8-/CD19- /CD16/56 + cells.

Data collection

Clinical data were collected at the inclusion visit (M0): sex, age, underlying disease, RTX regimen (375 mg/m² every week for 4 weeks or 1 g/day J1-J15 or 500 mg J1 or other regimen), comorbidities (history of autoimmune diseases, diabetes, neoplasia, hepatopathy, chronic renal failure, splenectomy, solid organ or stem cell transplantation), vaccine history prior to RTX (pneumococcal, flu, *Haemophilus influenzae*, tetanus), history of treatment prior to RTX (GC and IS use), concomitant treatment with RTX (GC < or ≥ 10 mg per day and IS), and history of SIE. Hemoglobin level, platelet count, white blood cell (WBC) count, neutrophils count, lymphocytes count, FC lymphocytes count (including CD4+ T cells, CD8+ T cells, B cells, and NK cells), immunoglobulins levels (IgG, IgA, IgM), IgG subtypes (IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4), component (CH50, C3, C4), β-2-microglobulin, rheumatoid factor, and pneumococcal serology were collected.

At each follow-up visit (M3, M6, M9, and M12), the following variables were gathered: SIE occurrence in the past 3 months, RTX reinjection, HG occurrence in the past 3 months, and IgRT in the past 3 months. WBC, neutrophils count, FC lymphocytes count (CD4 + T cells, CD8+ T cells, B cells, and NK cells), and immunoglobulins levels (IgG, IgG, and IgA) were collected at each follow-up visit (M3, M6, M9, and M12). IgG subtypes (IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4) and pneumococcal serology samples were collected at M3 and M9. Sera for biobanking was collected at M0 and M6 and stored at -80°C (**Figure 1**).

Statistical analysis

Baseline characteristics were described using median (interquartile range [IQR] with first and third quartiles [Q1, Q3]) for quantitative variables and number (percentages) for qualitative variables. Evolution of the biological parameters over time (M3, M6, M9 and M12) were

described in mean $\pm$ standard deviation and by mixed models according to the clinical variables at inclusion. Demographic data (age and sex), underlying disease, RTX indication and regimen, personal history (autoimmune diseases cardio-vascular, neoplasia solid organ transplantation, stem cells transplantation, diabetes, chronic renal, chronic hepatopathy and splenectomy splenectomy), GC and IS use prior to RTX injection, concomitant use of GC ($<$ or ≥ 10 mg per days) and IS were included for mixed models analysis (45).

RESULTS

Population characteristics at baseline

73 patients were screened as eligible: one patient refused to participate, and 72 were finally included in the study (58 in internal medicine, 6 in pneumology, 4 in dermatology, 2 in neurology, and 1 in the rheumatology department) (**Table 1**). Sixty-one of them completed the one-year follow-up, 6 were lost to follow-up, 4 died and one patient left the study at his request (**Figure 2**). There were mostly women (45/72, 62%), presenting with autoimmune cytopenia (including immune thrombocytopenia and autoimmune hemolytic anemia), connective tissue diseases (CTD) (including SLE, Sjogren's syndrome, systemic sclerosis and dermatomyositis), organ-specific AID (including interstitial pneumonitis, bullous autoimmune disease, neuromyelitis optica, Susac's syndrome and RA), systemic vasculitis, acquired hemophilia and others diagnoses (including IgG4 related diseases, retroperitoneal fibrosis and acquired angioedema).

Patients received RTX as second therapeutic line after a first IS (n=35, 49 %), first line (n=27, 38%), or for disease relapse (n=10, 14%). Administration regimen was mostly 375 mg/m², every week for 4 weeks (n=61, 85%). Twenty-five patients had a history of cardiovascular events (35%), 15 had a history of neoplasia (21%), eight had a history of diabetes (11%) and 7 had a history of chronic renal failure (9.7%). Most patients received IS (n=44, 66%) and GC (n=44, 66%) before RTX infusion. Ten patients had experienced SIE before RTX therapy (14%).

Fifty-two patients were simultaneously treated with GC (72%), of which 44 received GC $\geq$ 10 mg/day (n=44, 85%). Twenty-eight patients were simultaneously treated with IS (39%). Thirty patients were reinjected with RTX during follow-up, corresponding to 32 RTX courses (24 received RTX at M6, four received RTX at M9, and two received RTX at M6 and M9).

Influence of rituximab on immune cells and immunoglobulins

We observed after RTX a depletion of WBC, neutrophils count and total lymphocytes which was maximal at M6. The total lymphocytes count varied over time, with a more pronounced decrease at M3 and M12 (**Figures 3A, B and A**). The mixed models revealed that the total lymphocytes count decrease was influenced by concomitant use of IS (p-value: 0.011) (**Figure 3D**). We observed a deep depletion of B cells and progressive increase in NK cells over time. We did not observe complete B cells compartment reconstitution (**Figure 4A and B**). In mixed models B cells, NK cells and neutrophils count were not influenced by baseline characteristics. CD4+ and CD8+ T cells count varied over time, with a more profound depletion at M3 and M9 (**Figures 4C and E**). Mixed model revealed that the use of IS prior to RTX was associated with a more pronounced decrease in CD8+ T cells (p-value: 0.022) and concomitant use of IS at baseline was associated with a more pronounced decrease in CD4+ T cells (p-value: 0.003) (**Figures 4D and F**).

We observed a progressive depletion of IgG, IgM, and IgA over time between baseline and M9 (**Figures 5A, C and E**). HG occurred in nine patients at M3, six at M6, nine at M9, and five at V4 (**Table 2**). The mixed model revealed that concomitant use of GC ≥ 10 mg/day was associated with a more pronounced decrease in IgG rate in the first 6 months (p-value: 0.036). Concomitant use of IS influenced IgM evolution with no constant downward or upward profile over time (p-value: 0.013). History of GC ≥ 10 mg/day was associated with a more pronounced decrease of IgA rate during follow-up (p-value: 0.023) and IS use prior to RTX injection influenced the evolution of IgA rate with no constant downward or upward profile over time (p-value: 0.037 respectively) (**Figures 5B, D and F**). We observed a significant decrease in the pneumococcal serology as well as a decrease in all IgG subtypes between baseline and M6 (**Supplemental Figure**).

SIE and Immunoglobulins replacement therapy rate

A total of 9 SIE corresponding to 8 individual patients occurred during the follow-up, of which 6 arose within the first 3 months after RTX initiation (**Table 2**). Six patients were receiving concomitant GC and/or IS at the time of SIE, and 2 of them experienced neutropenia that

occurred in the 3 first months following RTX infusion. We observed 3 septic shock, 3 lower respiratory tract infection, 2 indetermined sepsis and 1 endocarditis. When microorganism was identified, SIE was mostly due to bacterial infection (*Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*). One patient presented with a SARS-CoV2 infection, and another patient had a *Pneumocystis pneumonia*. One patient had an undetermined sepsis in the context of agranulocytosis and another one had a septic shock in the context of agranulocytosis. Both were treated by RTX for acquired hemophilia. RTX was discontinued after SIE in 5 patients, and we observed 1 death related to SIE (**Table 3**). None of the patients underwent IgRT after the SIE. Among the 29 HG during follow-up, 3 patients received IgRT, including 2 during the first 3 months of follow-up (**Table 2**).

DISCUSSION

This prospective study of patients with AID patients treated with RTX described kinetic of biological parameters evolution and the influence of baseline characteristics, estimated SIE and IgRT incidence.

We observed 9 SIE during follow-up corresponding to 8 patients, mostly occurred during the 3 months after RTX injection. In a retrospective study of our group, early infection in the first 3 months after RTX infusion occurrence represented half of the SIE observed (3). When documented, microorganism where mostly bacterial and we observed 1 fungal (*Pneumocystis jirovecii* infection) and 1 viral infection (SARS-CoV2 infection). In the literature, the most frequent SIE are lower respiratory tract infections and when it is identified bacteria is the most frequent microorganism observed. Soft tissue, urinary, gastrointestinal tract, osteoarticular infection and bacteremia are less frequent (3,26). Opportunist infection in patients treated with RTX including *Pneumocystis* pneumonia are described in AAV (32,36). RTX appears to be a risk of severe COVID-19 (45,46).

The effects of RTX on the immune system are poorly documented prospectively. In our study, we observed a deep and prolonged B cells depletion as well as a depletion of WBC and neutrophils cells that was maximal at M6. In AID, B cells depletion varies according to the underlying disease. Thiel et al. have shown that B-compartment reconstitution lasts 8 months in connective tissue diseases, 9 months in RA, 21 months in eosinophilic granulomatosis with polyangiitis and 25 months in other AAV (8). We observed 2 agranulocytosis responsible for SIE in the first 3 months after RTX infusion in patients treated both for acquired hemophilia. Neutropenia has been initially described in patients treated with RTX for lymphoma and is best defined as late-onset neutropenia (LON) corresponding to neutrophils count inferior to 1500/mm³ appearing 4 weeks after injection. In AID, the median time to LON onset is 102 days and can be breastfed up to 5 months after the last RTX infusion (22,23). Early neutropenia is rarely reported in AID (49). The incidence of LON also appears to be higher in patients with

SLE and AAV compared to RA patients and seems to be associated with SIE (25,32). Finally, using mixed models, we did not find any association between neutrophils count evolution and baseline characteristics which appeared to be RTX related.

The factors influencing kinetic variations in the various components of the immune system have not, to our knowledge, been described prospectively. In the present study, concomitant use of IS with RTX at baseline was associated with a more pronounced decrease in CD4+ T cells and history of IS was associated with a more pronounced decrease of CD8+ T cells. CD4+ T cells decrease during RTX therapy has been observed in AID. In a retrospective study of RA patients treated with RTX, Mélet et al. found that CD4+ T cells count decreased by a mean of 33% as compared to baseline at week 12, reaching <200 cells/ μ l in 3 patients. Forty of them received GC (77%) and 30 (58%) methotrexate (50). After repeat cycle of RTX, CD4+ T cells count returned to above normal before dropping again after a novel RTX infusion (51). In granulomatosis with polyangiitis, CD4+ T cells count decreased by 42% at baseline and 18% at 24 months and was associated at an inversion of the CD4/CD8 ratio (20). Low CD4+ T cells count at baseline appears to be a risk factor of SIE in AID cohort (2,3,11). To our knowledge, the relationship between CD4+ T cells and SIE during treatment course and repeat cycle of RTX is not established. Interestingly, we observed an increase of NK cells during follow-up, which was not dependent of baseline characteristic in mixed models. NK cells are essential for RTX action via Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (52). An increase of NK cells during RTX course was observed in RA (53).

We observed 29 HG during follow-up. Several risk factors for HG have been described: age at treatment initiation, concomitant use of IS and GC, low IgG and IgM levels at baseline and inverted CD4/CD8 T cells count at baseline might predict low IgG levels after 18-24 months and patients receiving RTX for AAV (11,18–20). Our study revealed that concomitant use of GC $\geq$ 10 mg per days influences the evolution of IgG, concomitant use of IS influences the evolution of IgM and history of GC $\geq$ 10 mg per days or IS prior to RTX injection influence the evolution of IgA rate. We did not observe a return to normal of IgG, IgM, or IgA levels after one

year of follow-up. In retrospective studies, decrease in IgG and IgM levels over time is mainly dependent of the induction treatment (14,54). Persistence of lower immunoglobulins after induction and maintenance therapy has been described (14). In MAI treated by RTX, polysaccharide pneumococcal vaccination response is decreased (19,39). We observed a decreased in pneumococcal serology reflecting pneumococcal vaccination in all patients included in this study while most patients included (92%) had received a complete vaccination regimen prior to RTX infection.

In a retrospective study of our group, 22 patients (8%) received IgRT during treatment with RTX (3). The first recommendations for the management of secondary hypogammaglobulinemia due to B cells depletion in AID have been published in 2019 following a modified Delphi exercise. The authors proposed that the decision to start IgRT should be informed by the degree of hypogammaglobulinemia (without a threshold being proposed), by SPUR (serious, persistent, unusual, or recurrent) infections, demonstration of impaired antibody responses to polysaccharide antigens, and a poor response to antibiotic prophylaxis (37). In the present study, only 3 patients received IgRT during the one-year follow-up which is in line with the low rate of infectious events observed.

We also observed a decrease in neutrophils count over time, which was not explained by baseline characteristics, notably GC or IS. We also highlighted an early neutropenia responsible for SIE in patients with acquired hemophilia.

The strength of our study lies in its prospective nature, making it possible to monitor the evolution of various biological parameters and estimate SIE and IgRT. It also has its weaknesses. We observed an overall lower number of SIE and SIE per patient compared to the literature. These results should be interpreted considering that most patients were included during the COVID-19 pandemic. Indeed, as RTX exposes patients to a risk of severe COVID (46,47), its prescription was restricted during this period, and the number of subjects required to estimate the incidence of SIE (200) was not reached. Finally, improved observance of barrier

measures during the pandemic may have reduced both COVID-related and non-related SIE (48).

CONCLUSION

Our study described biological parameters and estimate SIE and IgRT rate in patients treated with RTX for AID. CD4+ and CD8+ T cells evolution appeared to be more related to IS and immunoglobulins evolution to be more related to GC rather than RTX itself. In contrast, B cell depletion and decreased neutrophils count appeared to be RTX-related. We observed only 9 SIE in 6 patients and 3 IgRT, possibly due to barrier protection against COVID-19. We also highlighted early neutropenia responsible for SIE in patients with acquired hemophilia.

TABLES and FIGURES

Characteristics	Available data	No. (%) ^a
Sex	72	
Women		45 (62)
Age	71	
Median [25%; 75%]		54 [43; 69]
Underlying disease	72	
Vasculitis		13 (18.1)
Sjogren syndrome		5 (6.8)
Immune thrombocytopenia		13 (18.1)
Autoimmune hemolytic anemia		3 (4.2)
Systemic lupus erythematosus		6 (8.3)
Systemic sclerosis		4 (5.5)
Acquired hemophilia		7 (9.7)
Dermatomyositis		1 (1.4)
Neuromyelitis optica		3 (4.2)
Interstitial pneumonitis		6 (8.3)
IgG4 related disease		2 (2.8)
Retroperitoneal fibrosis		1 (1.4)
Acquired angioedema		1 (1.4)
Susac's syndrome		1 (1.4)
Bullous autoimmune diseases		5 (6.9)
Rheumatoid arthritis		1 (1.4)
Disease duration (years)	70	1.2 [0.31; 7.28]
Rituximab introduction indication	72	
First line		27 (38)
Second line		35 (49)
Relapse		10 (14)
Rituximab regimen	72	
375 mg/m ² , every week for 4 weeks		9 (12)
1 gramme J1-J15		61 (85)
500 mg J1		1 (1.4)
Other		1 (1.4)
Personal history	72	
History of overlapping autoimmune diseases		15 (21)
History of cardio-vascular event		25 (35)
History of neoplasia		15 (21)
History of solid organ transplantation		1 (1.4)
History of stem cells transplantation		2 (2.8)
History of diabetes		8 (11)
Chronic renal failure		7 (9.7)
History of chronic hepatopathy		5 (6.9)
History of splenectomy		1 (1.4)
Vaccine history		
Pneumococcal vaccine prior to Rituximab	72	66 (92)
Hemophilus influenzae prior to Rituximab	71	29 (41)
Flu vaccine prior to Rituximab	71	25 (35)
Tetanus vaccine prior to Rituximab	70	27 (39)
Immunosuppressant drugs	72	
Corticosteroids use prior to Rituximab		44 (61)
Simultaneous use of corticosteroids		52 (72)
Simultaneous use of corticosteroids ≥ 10 mg per days	52	44 (85)
Immunosuppressant drugs use prior to Rituximab		44 (61)
Simultaneous use of immunosuppressant drugs		28 (39)
SIE prior to Rituximab introduction		10 (14)
Biology		
Hemoglobin (g/dL)	72	12.12 [10.95; 13.75]
White blood count (elements/mm ³)	71	7,440 [5,060; 12,335]
Neutrophils count (elements/mm ³)	71	4,600 [2,900; 8,400]
Lymphocytes count (elements/mm ³)	71	1,400 [1,050; 2,250]
Platelet count (Giga/L)	71	286 [199; 338]
Lymphocytes count (CMF, elements/mm ³)	72	1,350 [894; 1,800]
TCD4 + cells count (elements/mm ³)	72	644 [405; 930]
TCD8+ cells count (elements/mm ³)	72	320 [187; 529]
B cells count (CD19+) (elements/mm ³)	72	167 [78; 271]
Natural killer cells count (elements/mm ³)	72	113 [66; 175]
IgG level (g/L)	69	10 [8; 14]
IgA level (g/L)	69	2.14 [1.48; 2.96]
IgM level (g/L)	69	0.83 [0.60; 1.26]
IgG1 level (g/L)	72	5.1 [4.2; 7.8]
IgG2 level (g/L)	72	2.74 [2.19; 3.79]
IgG3 level (g/L)	72	0.54 [0.35; 0.83]
IgG4 level (g/L)	72	0.31 [0.11; 0.57]
CH50 (%)	68	55 [47; 63]

Characteristics	Available data	No. (%) ^a
C3 (g/L)	68	1,058 [826; 1,264]
C4 (g/L)	67	216 [141; 290]
Beta2microglobulin (mg/L)	68	2.23 [1.65; 2.94]
Rheumatoid factor	56	2 [1; 7]
Pneumococcal serology test	58	105 [36; 166]
Hypogammaglobulinemia	69	5 (7.2)

Table 1: Population characteristics at baseline. ^a Quantitative variables are expressed as median [first quartile, third quartile]. Qualitative variables are expressed as No. (%).

	M3	M6	M9	M12
HG	9/56 (16%)	6/52 (12%)	9/48 (19%)	5/46 (11%)
SIE	6/67 (9.0%)	2/65 (3.1%)	1/59 (1.7%)	0/57 (0%)
IgRT	2/67 (3.0%)	0/65 (0%)	0/58 (0%)	1/57 (1.8%)
	¹ no./total no. (%)			

Table 2: Hypogammaglobulinemia (HG), severe infectious event (SIE) and immunoglobulins replacement therapy (IgRT) occurrence recorded per visit. M3: visit 1 at 3 months, M6: visit 2 at 6 months, M9: visit 3 at 9 months, M12: visit at 12 months.

Patient no	Sex	Age	Time since RTX injection (months)	Underlying disease	Medical history	Prior use of GC and/or IS	Concomitant use of GC and/or IS	Concomitant use of GC and/or IS (at the time of SIE)	Biological abnormalities (visit before SIE)	Biological abnormalities (at the time of SIE)	Infection site	Microorganism	Anti-infectious therapy	RTX discontinuation	IgRT introduction	Death related to SIE
5	M	84	1.3	Autoimmune anemia	Colorectal cancer Type 2 diabetes	No	GC ≥ 10 mg per days	GC ≥ 10 mg per days	CD8+ T cells and lymphopenia	Lymphopenia (300/mm ³)	Septic shock, Bacteremia	<i>Enterobacter cloacae</i>	Piperacillin/tazobactam) and Amikacin followed by Cefotaxime	Yes	No	No
5	M	84	3	Autoimmune anemia	Colorectal cancer Type 2 diabetes		GC ≥ 10 mg per days	GC < 10 mg per days	CD8+ T cells and lymphopenia		Septic shock, Undetermined	NA	Piperacillin/tazobactam	Yes	No	No
20	M	69	1	Acquired hemophilia	Type 2 diabetes Chronic heart failure	No	GC ≥ 10 mg per days	GC ≥ 10 mg per days		Neutropenia Global Lymphopenia	Septic shock, Urinary	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Piperacillin/tazobactam followed by Cefotaxime	Yes	No	No
22	F			Immune thrombopenia	Hypothyroidism	CT ≥ 10 mg per days	No	No			Undetermined sepsis	NA				
49	F	64	8.3	Immune thrombopenia	SIE Sjogren's syndrome High blood pressure	No	No	No		None	Infective endocarditis	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomycin followed by Cloxacillin	Yes	No	Yes
50	M	71	1.7	Acquired hemophilia	Type diabetes Chronic heart failure High blood pressure Polymyalgia rheumatica	GC and Methotrexate	GC ≥ 10 mg per days	GC ≥ 10 mg per days		Lymphopenia Neutropenia	Undetermined	Undetermined sepsis	Piperacillin/tazobactam	Yes	No	No
57	F	28	3.7	SLE		GC ≥ 10mg per days Mycophenolate mofetil	Mycophenolate acid GC ≥ 10 mg per days	Mycophenolate acid GC ≥ 10 mg per days		No	Pulmonary	SRAS-COV-2 and <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Amoxicillin/clavulanic acid	No	No	No
03-03	F	49	4.9	Interstitial pneumonitis		Mycophenolate mofetil Azathioprine GC ≥ 10 mg per days	Mycophenolate mofetil GC ≥ 10 mg per days	Mycophenolate mofetil GC ≥ 10 mg per days		No	Pulmonary	NA	Cefotaxime And Spiramycin	No	No	No

04-005	M	83	0.6	Bullous autoimmune disease	Chronic renal failure	None				Lymphopenia (0.3 Giga/L)	Pulmonary	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Amoxicillin/clavulanic acid followed by Trimethoprim/sulfamethoxazole	No	No	No
--------	---	----	-----	----------------------------	-----------------------	------	--	--	--	--------------------------	-----------	-------------------------------	---	----	----	----

Table 3: Severe infection event description. No: patient study number; RTX: rituximab; SIE: severe infectious event; GC: glucocorticosteroids; IS: immunosuppressant agent; IgRT: immunoglobulins replacement therapy.

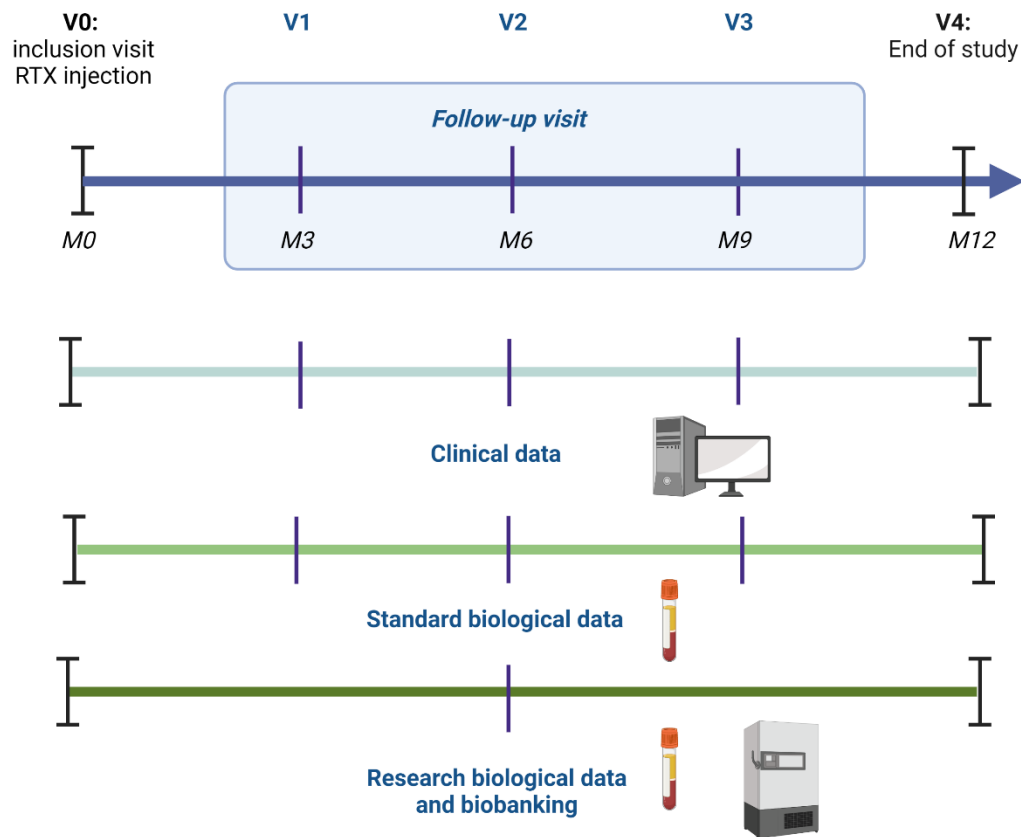


Figure 1: Study design. Patients were included at V0 (M0) after rituximab injection. Each patient was prospectively following up every 3 months for 1 year (M3, M6, M9 and M12). Clinical data and standard biological data were collected at M0 and at each follow-up visit. Research biological data and biobanking was performed at M0 and M6.

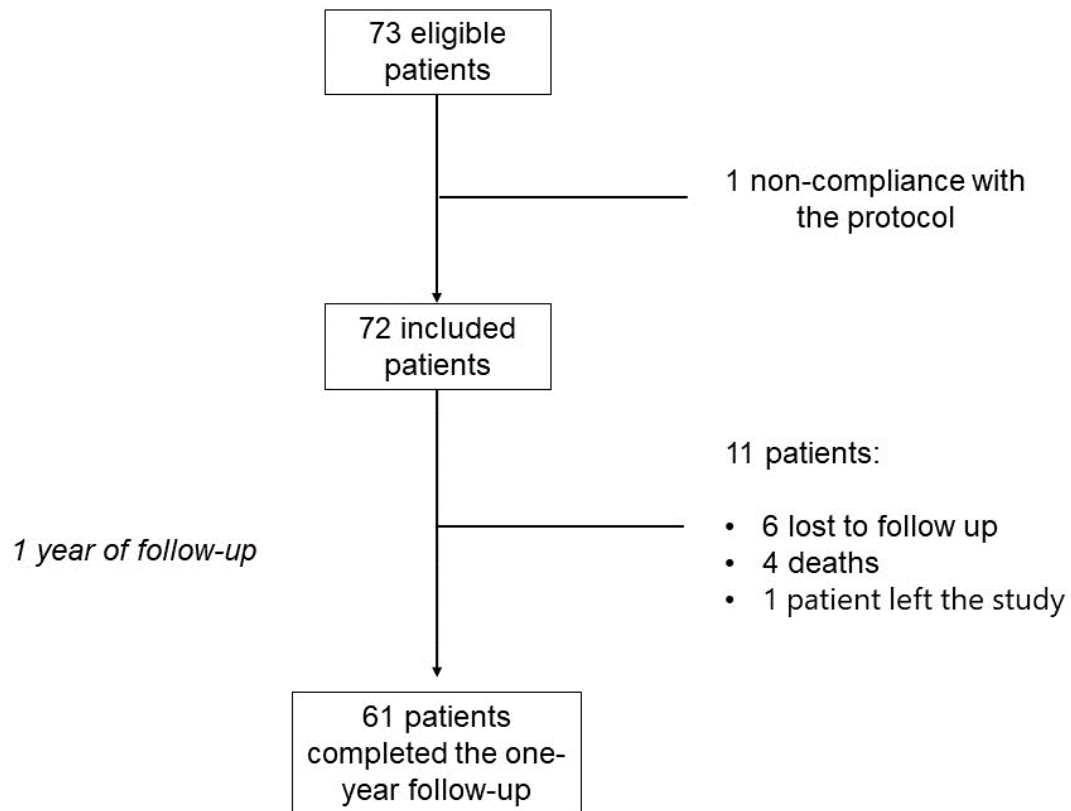


Figure 2: Study flow-chart.

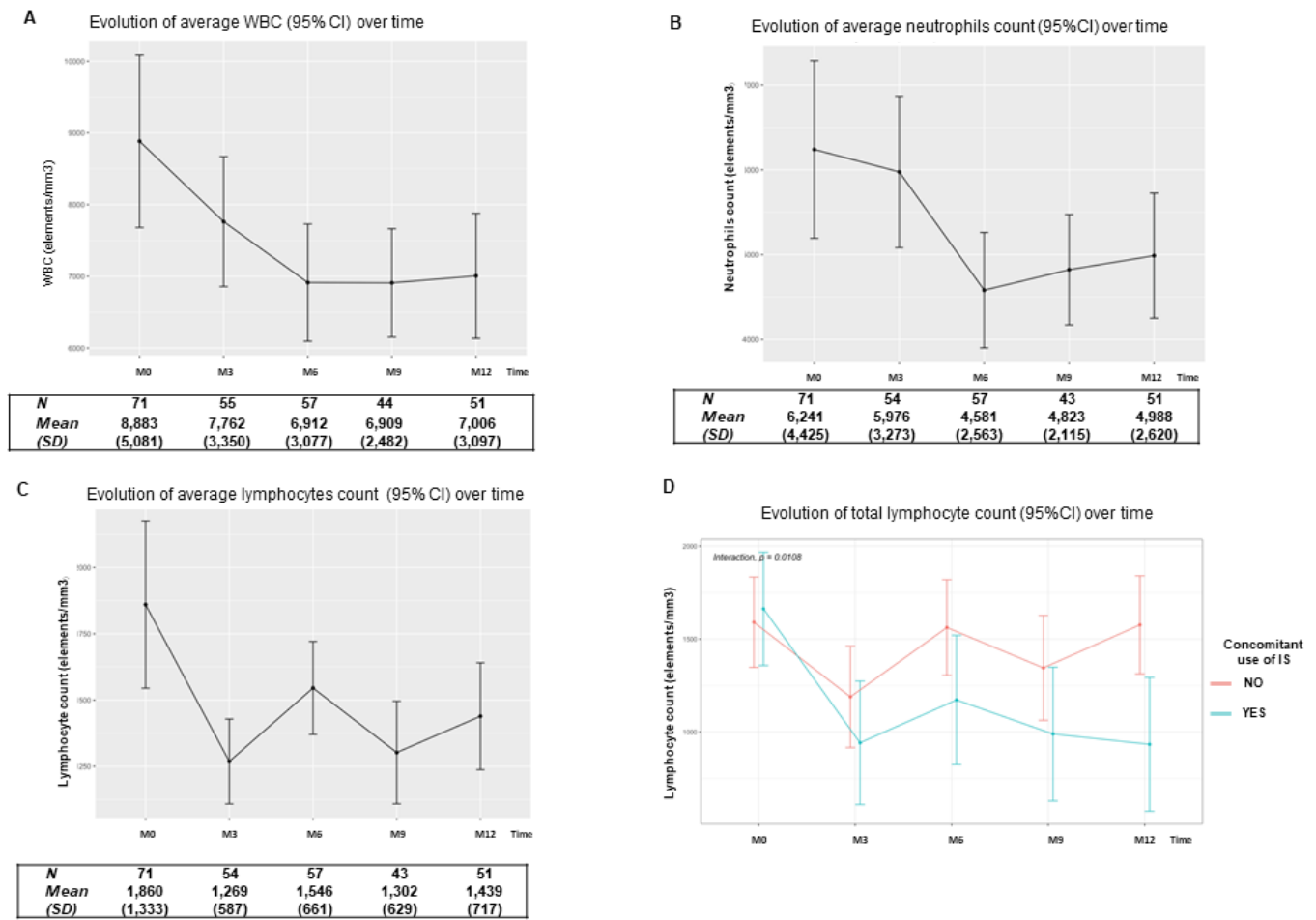


Figure 3: Evolution of: white blood count (WBC) (A), neutrophils count (B), lymphocytes count (C) over time and mixed model for lymphocytes evolution (D). RTX: rituximab; IS:

immunosuppressant agent; M: month. Cells count is expressed in elements/mm³. Kinetic of evolution are represented in mean and standard deviation (SD).

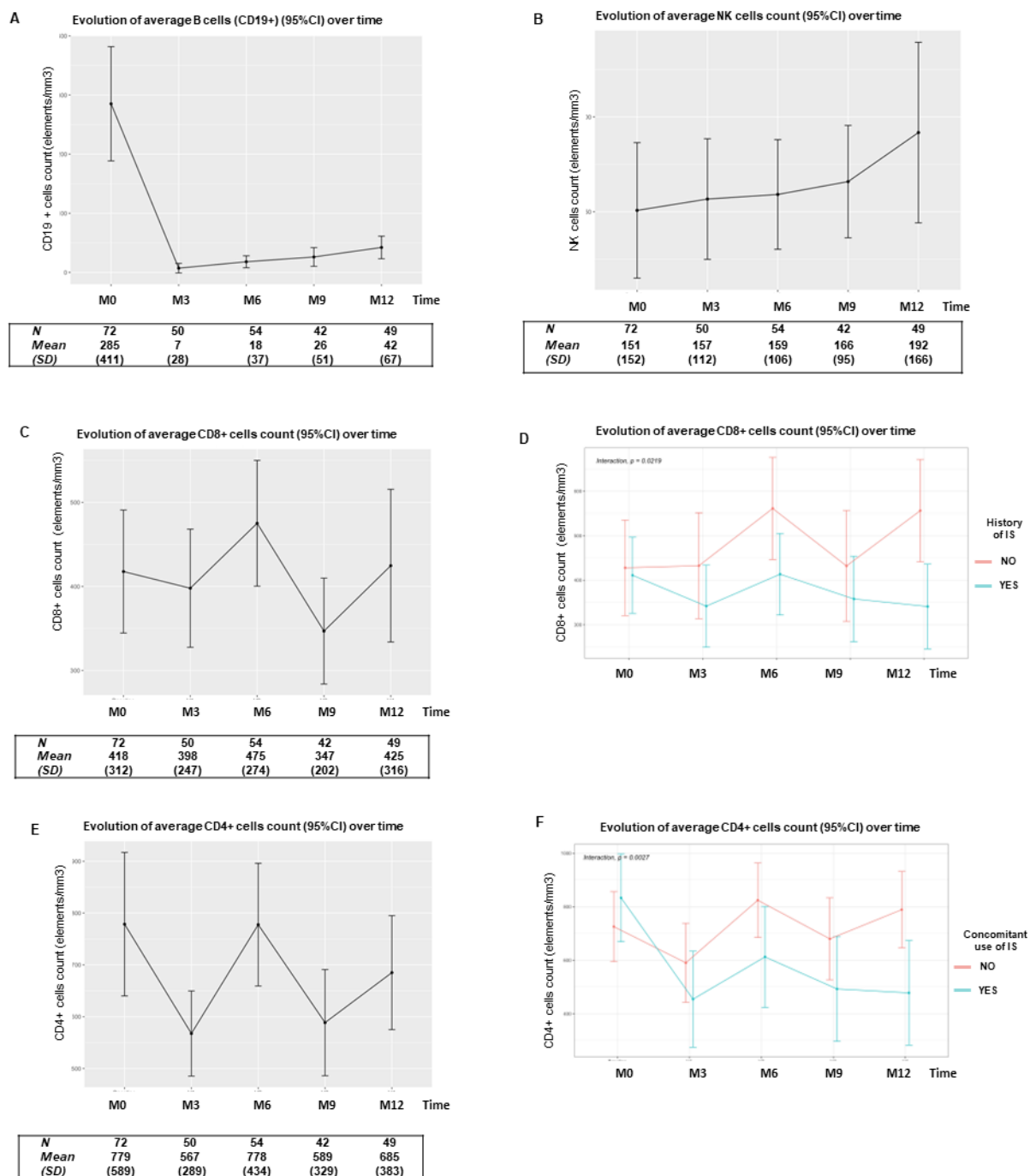


Figure 4: Evolution of lymphocytes population count over time: B cells (CD19+ cells) count (A), NK cells (B), CD8+ T cells (C), mixed model for CD8+ T cells (D), CD4+ cells (E) and mixed model for CD8+ T cells (F). RTX: rituximab; NK: natural killer cells; IS:

immunosuppressant agent; M: months. Cells count is expressed in elements/mm³. Kinetic of evolution are represented in mean and standard deviation (SD).

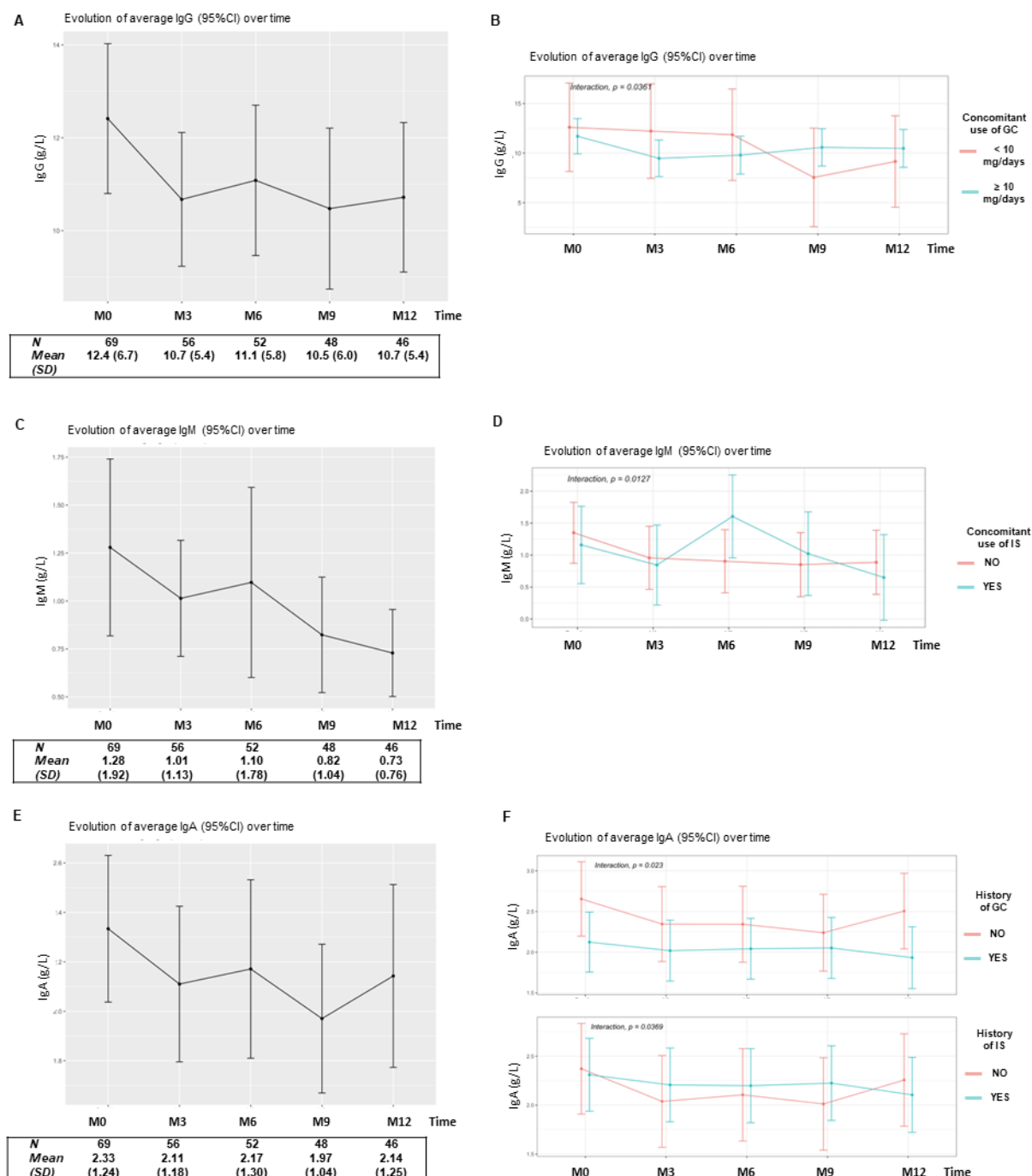
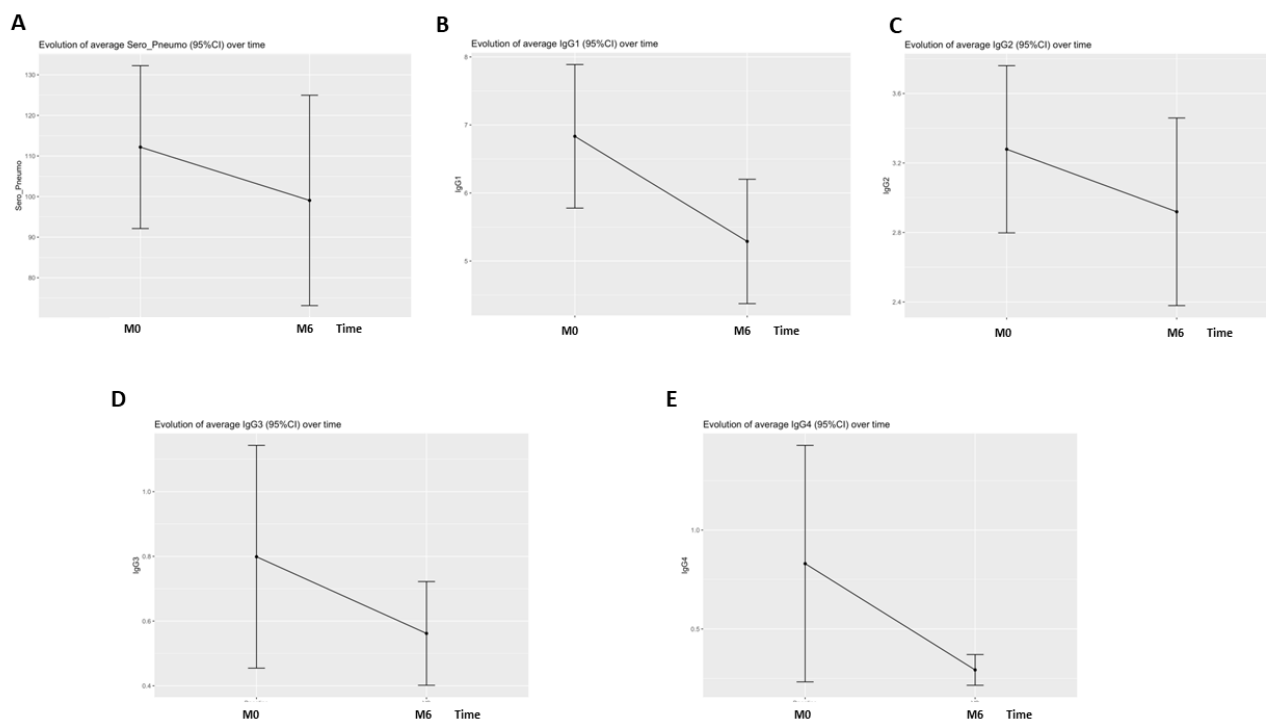


Figure 5: Evolution of immunoglobulins over time: immunoglobulins G (IgG) (A), mixed model for IgG (B), Immunoglobulins M (IgM) (C), mixed model for IgM (D), immunoglobulins A (IgA) (E) and mixed model for IgA (F). RTX: rituximab; IS: immunosuppressant agent; GC:

glucocorticosteroids; M: month. Immunoglobulins counts are expressed in gramme/litter (g/L). Kinetic of evolution are represented in mean and standard deviation (SD).



Supplemental Figure: Evolution of pneumococcal serology (A); immunoglobulins G1 (IgG1) (B); IgG2 (C); IgG3 (D) and IgG4 (E) over time. Immunoglobulins counts are expressed in gramme/litter (g/L).

REFERENCES

1. Lee DSW, Rojas OL, Gommerman JL. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2021;20(3):179-99.
2. Christou EAA, Giardino G, Worth A, Ladomenou F. Risk factors predisposing to the development of hypogammaglobulinemia and infections post-Rituximab. *Int Rev Immunol.* 2 nov 2017;36(6):352-9.
3. Stabler S, Giovannelli J, Launay D, Cotteau-Leroy A, Heusele M, Lefèvre G, et al. Serious Infectious Events and Immunoglobulin Replacement Therapy in Patients With Autoimmune Disease Receiving Rituximab: A Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 mars 2021;72(5):727-37.
4. Sacco KA, Abraham RS. Consequences of B-cell-depleting therapy: hypogammaglobulinemia and impaired B-cell reconstitution. *Immunotherapy.* juin 2018;10(8):713-28.
5. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, Liang Y, Bradney A, Oliver JA, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol.* janv 2004;16(1):119-29.
6. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood.* 1 févr 2002;99(3):1038-43.
7. Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B, Barnard J, Owen T, Cushing E, et al. B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin Immunol Orlando Fla.* févr 2007;122(2):139-45.
8. Thiel J, Rizzi M, Engesser M, Dufner AK, Troilo A, Lorenzetti R, et al. B cell repopulation kinetics after rituximab treatment in ANCA-associated vasculitides compared to rheumatoid arthritis, and connective tissue diseases: a longitudinal observational study on 120 patients. *Arthritis Res Ther.* 18 mai 2017;19(1):101.
9. Cassia MA, Alberici F, Jones RB, Smith RM, Casazza G, Urban ML, et al. Rituximab as Maintenance Treatment for Systemic Lupus Erythematosus: A Multicenter Observational Study of 147 Patients. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* oct 2019;71(10):1670-80.
10. Besada E. Risk Factors and Adverse Events Poorly Predict Infections and Hypogammaglobulinemia in Granulomatosis with Polyangiitis Patients Receiving Rituximab. *Autoimmune Dis.* 2016;2016:8095695.
11. Marco H, Smith RM, Jones RB, Guerry MJ, Catapano F, Burns S, et al. The effect of rituximab therapy on immunoglobulin levels in patients with multisystem autoimmune disease. *BMC Musculoskelet Disord.* 25 mai 2014;15:178.
12. Irie E, Shirota Y, Suzuki C, Tajima Y, Ishizawa K, Kameoka J, et al. Severe hypogammaglobulinemia persisting for 6 years after treatment with rituximab combined chemotherapy due to arrest of B lymphocyte differentiation together with alteration of T lymphocyte homeostasis. *Int J Hematol.* avr 2010;91(3):501-8.
13. Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, et al. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatol Oxf Engl.* févr 2005;44(2):176-82.

14. Cortazar FB, Pendergraft WF, Wenger J, Owens CT, Laliberte K, Niles JL. Effect of Continuous B Cell Depletion With Rituximab on Pathogenic Autoantibodies and Total IgG Levels in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol* Hoboken NJ. mai 2017;69(5):1045-53.
15. Yu YH, Lin KI. Factors That Regulate the Generation of Antibody-Secreting Plasma Cells. *Adv Immunol*. 2016;131:61-99.
16. De La Torre I, Leandro MJ, Valor L, Becerra E, Edwards JCW, Cambridge G. Total serum immunoglobulin levels in patients with RA after multiple B-cell depletion cycles based on rituximab: relationship with B-cell kinetics. *Rheumatol Oxf Engl*. mai 2012;51(5):833-40.
17. Besada E, Koldingsnes W, Nossent JC. Serum immunoglobulin levels and risk factors for hypogammaglobulinaemia during long-term maintenance therapy with rituximab in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Rheumatol Oxf Engl*. oct 2014;53(10):1818-24.
18. Roberts DM, Jones RB, Smith RM, Alberici F, Kumaratne DS, Burns S, et al. Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *J Autoimmun*. févr 2015;57:60-5.
19. Venhoff N, Effelsberg NM, Salzer U, Warnatz K, Peter HH, Lebrecht D, et al. Impact of rituximab on immunoglobulin concentrations and B cell numbers after cyclophosphamide treatment in patients with ANCA-associated vasculitides. *PloS One*. 2012;7(5):e37626.
20. Besada E, Nossent JC. CD4 cell count and CD4/CD8 ratio increase during rituximab maintenance in granulomatosis with polyangiitis patients. *PeerJ*. 20 sept 2016;4:e2487.
21. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM, et al. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med*. 21 juin 2004;199(12):1659-69.
22. Wolach O, Shpilberg O, Lahav M. Neutropenia after rituximab treatment: new insights on a late complication. *Curr Opin Hematol*. janv 2012;19(1):32-8.
23. Grant NN, Deeb ZE, Chia SH. Clinical experience with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *Otolaryngol Neck Surg*. 1 déc 2007;137(6):931-5.
24. Monaco WE, Jones JD, Rigby WFC. Rituximab associated late-onset neutropenia-a rheumatology case series and review of the literature. *Clin Rheumatol*. oct 2016;35(10):2457-62.
25. Tesfa D, Ajeganova S, Häggglund H, Sander B, Fadeel B, Hafström I, et al. Late-onset neutropenia following rituximab therapy in rheumatic diseases: association with B lymphocyte depletion and infections. *Arthritis Rheum*. août 2011;63(8):2209-14.
26. Gottenberg JE, Ravaud P, Bardin T, Cacoub P, Cantagrel A, Combe B, et al. Risk factors for severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in the autoimmunity and rituximab registry. *Arthritis Rheum*. sept 2010;62(9):2625-32.
27. Jones RB, Cohen Tervaert JW, Hauser T, Luqmani R, Morgan MD, Peh CA, et al. Rituximab versus Cyclophosphamide in ANCA-Associated Renal Vasculitis. *N Engl J Med*. 15 juill 2010;363(3):211-20.

28. Rituximab versus Cyclophosphamide for ANCA-Associated Vasculitis | NEJM [Internet]. [cité 19 mai 2023]. Disponible sur: <https://www-nejm-org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/doi/full/10.1056/nejmoa0909905>
29. Charlier C, Henegar C, Launay O, Pagnoux C, Berezné A, Bienvenu B, et al. Risk factors for major infections in Wegener granulomatosis: analysis of 113 patients. *Ann Rheum Dis.* mai 2009;68(5):658-63.
30. Holle JU, Dubrau C, Herlyn K, Heller M, Ambrosch P, Noelle B, et al. Rituximab for refractory granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis): comparison of efficacy in granulomatous versus vasculitic manifestations. *Ann Rheum Dis.* mars 2012;71(3):327-33.
31. Pragmatic Treatment of Patients With Systemic Lupus Erythematosus With Rituximab: Long-Term Effects on Serum Immunoglobulins - PubMed [Internet]. [cité 19 mai 2023]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/27428176/>
32. Md Yusof MY, Vital EM, McElvenny DM, Hensor EMA, Das S, Dass S, et al. Predicting Severe Infection and Effects of Hypogammaglobulinemia During Therapy With Rituximab in Rheumatic and Musculoskeletal Diseases. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* nov 2019;71(11):1812-23.
33. Heusele M, Clerson P, Guery B, Lambert M, Launay D, Lefevre G, et al. Risk factors for severe bacterial infections in patients with systemic autoimmune diseases receiving rituximab. *Clin Rheumatol.* 2014;33(6):799-805.
34. Wijetilleka S, Jayne DR, Mukhtyar C, Ala A, Bright PD, Chinoy H, et al. Recommendations for the management of secondary hypogammaglobulinaemia due to B cell targeted therapies in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatol Oxf Engl.* 1 mai 2019;58(5):889-96.
35. Charles P, Bienvenu B, Bonnotte B, Gobert P, Godmer P, Hachulla É, et al. Rituximab: Recommendations of the French Vasculitis Study Group (FVSG) for induction and maintenance treatments of adult, antineutrophil cytoplasm antibody-associated necrotizing vasculitides. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. oct 2013;42(10):1317-30.
36. Kronbichler A, Kerschbaum J, Gopaluni S, Tieu J, Alberici F, Jones RB, et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis prevents severe/life-threatening infections following rituximab in antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* oct 2018;77(10):1440-7.
37. Wijetilleka S, Mukhtyar C, Jayne D, Ala A, Bright P, Chinoy H, et al. Immunoglobulin replacement for secondary immunodeficiency after B-cell targeted therapies in autoimmune rheumatic disease: Systematic literature review. *Autoimmun Rev.* mai 2019;18(5):535-41.
38. Pescovitz MD, Torgerson TR, Ochs HD, Ocheltree E, McGee P, Krause-Steinrauf H, et al. Effect of rituximab on human in vivo antibody immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2011;128(6):1295-1302.e5.
39. Bingham CO, Looney RJ, Deodhar A, Halsey N, Greenwald M, Coddig C, et al. Immunization responses in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab: results from a controlled clinical trial. *Arthritis Rheum.* janv 2010;62(1):64-74.
40. Crnkic Kapetanovic M, Saxne T, Jönsson G, Truedsson L, Geborek P. Rituximab and abatacept but not tocilizumab impair antibody response to pneumococcal conjugate vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 30 oct 2013;15(5):R171.

41. Svensson M, Dahlin U, Kimby E. Better response with conjugate vaccine than with polysaccharide vaccine 12 months after rituximab treatment in lymphoma patients. *Br J Haematol.* févr 2012;156(3):407-9.
42. van Assen S, Holvast A, Benne CA, Posthumus MD, van Leeuwen MA, Voskuyl AE, et al. Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Arthritis Rheum.* janv 2010;62(1):75-81.
43. Furer V, Rondaan C, Heijstek MW, Agmon-Levin N, Assen S van, Bijl M, et al. 2019 update of EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 1 janv 2020;79(1):39-52.
44. Lee DSW, Rojas OL, Gommerman JL. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat Rev Drug Discov.* mars 2021;20(3):179-99.
45. Harrison XA, Donaldson L, Correa-Cano ME, Evans J, Fisher DN, Goodwin CED, et al. A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ.* 23 mai 2018;6:e4794.
46. Avouac J, Airó P, Carlier N, Matucci-Cerinic M, Allanore Y. Severe COVID-19-associated pneumonia in 3 patients with systemic sclerosis treated with rituximab. *Ann Rheum Dis.* 1 mars 2021;80(3):e37-e37.
47. Singh N, Madhira V, Hu C, Olex AL, Bergquist T, Fitzgerald KC, et al. Rituximab is associated with worse COVID-19 outcomes in patients with rheumatoid arthritis: A retrospective, nationally sampled cohort study from the U.S. National COVID Cohort Collaborative (N3C). *Semin Arthritis Rheum.* févr 2023;58:152149.
48. Wee LEI, Conceicao EP, Tan JY, Magesparan KD, Amin IBM, Ismail BBS, et al. Unintended consequences of infection prevention and control measures during COVID-19 pandemic. *Am J Infect Control.* avr 2021;49(4):469-77.
49. Arroyo-Ávila M, Fred-Jiménez RM, Vilá LM. Early-Onset Neutropenia Induced by Rituximab in a Patient with Lupus Nephritis and Hemolytic Anemia. *Case Rep Rheumatol.* 2015;2015:616787.
50. Mélet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G. Rituximab-Induced T Cell Depletion in Patients With Rheumatoid Arthritis: Association With Clinical Response. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2783-90.
51. Lavielle M, Mulleman D, Goupille P, Bahuaud C, Sung HC, Watier H, et al. Repeated decrease of CD4+ T-cell counts in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *Arthritis Res Ther.* 28 oct 2016;18(1):253.
52. Wang SY, Racila E, Taylor RP, Weiner GJ. NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood.* 1 févr 2008;111(3):1456-63.
53. Giollo A, Viapiana O, Carletto A, Ortolani R, Biasi D, Gatti D, et al. Rituximab increases peripheral natural killer cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2017;35(2):241-6.
54. Henry J, Gottenberg JE, Rouanet S, Pavy S, Sellam J, Tubach F, et al. Doses of rituximab for retreatment in rheumatoid arthritis: influence on maintenance and risk of serious infection. *Rheumatol Oxf Engl.* 1 mars 2018;57(3):538-47.

AUTEUR : Nom : Chepy

Prénom : Aurélien

Date de soutenance : 23/06/2023

Titre de la thèse : Impact du rituximab sur le système immunitaire des patients atteints de maladies auto-immunes : étude prospective

Thèse - Médecine - Lille « 2023 »

Cadre de classement : médecine interne

DES : médecine interne

Mots-clés : rituximab ; maladie auto-immune ; reconstitution immunitaire ; infections

Résumé :

Contexte scientifique

Le rituximab (RTX) est largement administré chez les patients atteints de maladies auto-immunes (MAI). L'évolution des paramètres biologiques immunologiques, les facteurs associés à leur évolution et l'impact sur la fréquence des événements infectieux sévères (EIS) n'ont pas été décrits de manière prospective dans cette population.

Méthodes

Nous avons conduit une étude prospective de l'influence du RTX sur l'évolution des paramètres biologiques immunitaires, la survenue d'EIS après un traitement par RTX pour une MAI. Les patients ont été suivis tous les trois mois pendant un an. L'influence des caractéristiques à l'administration du RTX sur la reconstitution immunitaire a été évaluée à l'aide de modèles mixtes.

Résultats

Soixante-douze patients ont été inclus. Il s'agissait principalement de femmes (45/72, 62 %) présentant une cytopénie auto-immune, MAI systémique, MAI spécifique d'organe, vascularite systémique, hémophilie acquise et d'autres diagnostics. Nous avons observé que la diminution du taux de lymphocytes (LT) CD4+ et CD8+ était influencée par un antécédent ou l'utilisation concomitante d'immunosuppresseurs (IS). Tous les patients ont présenté une déplétion profonde en lymphocytes B (LB) et une diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) non influencées par les caractéristiques de base dans le modèle mixte. L'évolution des immunoglobulines (IgG et IgA) était influencée par les antécédents ou l'utilisation concomitante de glucocorticoïdes (GC) et d'IS. Nous avons observé neuf EIS chez huit patients, dont deux présentant une agranulocytose précoce (dans les 3 mois suivant la perfusion de RTX) et recevant tous deux du RTX pour une hémophilie acquise. Trois thérapeutiques par immunoglobulines polyvalentes substitutives ont été initiées au cours du suivi dont deux dans les trois premiers mois après l'initiation du RTX.

Conclusion

Notre étude fournit plusieurs informations sur la reconstitution immunitaire chez les patients traités par RTX pour une AID. L'évolution des lymphocytes T CD4+ et CD8+ semble être imputable aux IS et l'évolution des immunoglobulines imputable à l'utilisation de GC plutôt qu'au RTX lui-même. En revanche, la déplétion en LB et la diminution du nombre de PNN semblent être liées au RTX. Nous avons également mis en évidence une neutropénie précoce responsable d'EIS chez deux patients atteints d'hémophilie acquise.

Composition du Jury :

Président : Eric Hachulla

Assesseeurs : David Launay, Guillaume Lefèvre, Sarah Stabler

Directeur de thèse : Vincent Sobanski