

Le Rituximab : une biothérapie originale dans les maladies auto-immunes

Auteurs : Pr Jean Sibilia¹ et Dr Christelle Sordet

Date de création : avril 2004

¹Service de Rhumatologie. CHU Strasbourg, Avenue Molière F - 67098 STRASBOURG Cedex.
Jean.Sibilia@wanadoo.fr

Résumé

Mots clés

Rôle des lymphocytes B dans les maladies auto-immunes

Le CD 20 : une cible thérapeutique bien adaptée

Mécanismes d'action du Rituximab

Mécanismes de résistance au Rituximab

Explications sur l'efficacité du Rituximab dans les maladies auto-immunes

Utilisation du Rituximab dans les maladies auto-immunes

Effets indésirables du Rituximab

Conclusion

Résumé

Le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique spécifique pour le CD20 humain. Jusqu'à présent il a été principalement utilisé dans le traitement des lymphomes B où son efficacité et sa bonne tolérance ont constitué un vrai tournant dans la prise en charge de ces maladies. Depuis peu émerge l'idée d'utiliser des thérapeutiques anti-lymphocytaires B, en particulier Rituximab dans les maladies auto-immunes. Cette revue, après un rappel du rôle des lymphocytes B (LB) et la possibilité d'utiliser le CD 20 comme cible thérapeutique dans les maladies auto-immunes, se focalise sur les perspectives thérapeutiques que pourrait offrir Rituximab dans le traitement de nombreuses maladies auto-immunes, qu'elles soient ou non associées à des auto-anticorps pathogènes. Les principaux mécanismes d'action du Rituximab permettant de détruire les LB tumoraux (i.e : l'apoptose, la cytotoxicité complément-dépendante ou CDC (complement-dependent cytotoxicity) et la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante ou ADCC) sont détaillés. L'ensemble des données suggère que le Rituximab est capable d'induire une profonde déplétion en LB périphériques, mais doit agir aussi potentiellement sur d'autres sous-populations de LB, en particulier des LB mémoires et des LB auto-réactifs. Les mécanismes de résistance ainsi que les effets secondaires de ce médicament sont également étudiés.

Mots clés

Rituximab, maladies autoimmunes, Lymphocytes B, CD 20, antilymphocytes

Les maladies auto-immunes sont définies par une perte de la tolérance physiologique aux composants du soi. Le soi est reconnu comme étranger par le système immunitaire et plus spécifiquement par des lymphocytes T considérés comme auto-réactifs qui vont proliférer et exercer différentes fonctions.

Après plusieurs décennies d'hégémonie du lymphocyte T (LT), des travaux récents ont suggéré l'importance du lymphocyte B (LB). C'est pour cette raison qu'émerge depuis peu l'idée d'utiliser des thérapeutiques anti-lymphocytaires B, en particulier Rituximab qui est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20.

Rôle des lymphocytes B dans les maladies auto-immunes

Les lymphocytes B (LB) sont présents dans l'infiltrat lymphoïde observé dans de nombreuses maladies auto-immunes. A titre d'exemple, dans la synoviale de la polyarthrite rhumatoïde (PR), ces LB participent à l'organisation de véritables follicules lymphoïdes traduisant l'existence d'une réaction immunitaire très structurée (1-3)

Dans la plupart des maladies auto-immunes, il existe des auto-anticorps dont certains ont un rôle pathogène comme les anti-récepteurs acétylcholine dans la [myasthénie](#) et les anti-récepteurs de la TSH dans la maladie de Basedow. La transmission passive de ces auto-anticorps permet d'induire une maladie auto-

immune. L'un des meilleurs exemples est certainement le lupus néonatal parfois compliqué d'un bloc auriculo-ventriculaire congénital lié au passage transplacentaire d'IgG anti-SSA et SSB.

Il existe peu de modèles expérimentaux de maladies auto-immunes, démontrant le rôle prépondérant des LB. Récemment, il a été décrit une polyarthrite destructrice spontanée chez la souris appelée KRN/NOD ou K-BxN. Cette souris est issue du croisement de la souris NOD génétiquement prédisposée à faire des maladies auto-immunes et d'une souris transgénique pour un récepteur T reconnaissant une molécule HLA de classe II présentant un peptide auto-antigénique. Contrairement à ce qui a été spéculé, cet auto-antigène n'est pas un constituant synovial ou ostéo-cartilagineux, mais la glucose-6-phosphate-isomérase (GPI) qui est présente dans toutes les cellules de l'organisme (4). Ces souris (K-BxN) développent une polyarthrite destructrice assez proche de la polyarthrite rhumatoïde humaine qui est transférable à d'autres souris (même si elles ne sont pas de la même ligne génétique) simplement par l'injection d'anticorps anti-GPI (5). L'atteinte spécifiquement articulaire s'explique par le fait que la réaction GPI-anti-GPI entraîne une activation du complément qui n'est pas inhibé à la surface du cartilage car cette structure n'exprime pas de protéines inhibitrices physiologiques. En fait, la souris K-BxN n'est qu'un modèle car chez l'homme la prévalence (de l'ordre de 15%) de ces anticorps est comparable dans la PR et dans d'autres maladies auto-immunes (6). Néanmoins, il existe de nombreux arguments en faveur du rôle des LB dans la PR (7)

De nouveaux activateurs des LB ont été mis en évidence dans les maladies auto-immunes, en particulier le système BAFF (ou BlyS). Cette cytokine de la famille des TNF (Tumour necrosis factor) est présente et corrélée à l'activité de maladies auto-immunes comme le [lupus](#), le [Gougerot-Sjögren](#) ou la polyarthrite rhumatoïde (8, 9). BAFF, présent sur les monocytes et les cellules dendritiques, va se fixer sur un récepteur appelé BAFF-R présent à la surface des LB, ce qui va entraîner un signal de survie et participer à la communication isotypique (10). Dans le [Gougerot-Sjögren](#), BAFF pourrait être aussi exprimé par des lymphocytes T (LT) qui pourraient contrôler la survie des LB auto-réactifs. Un travail récent suggère que BAFF pourrait avoir d'autres actions, notamment en régulant l'expression de CD21/35 et CD23 à la surface des LB (11). L'importance de BAFF est suggérée également par l'observation que les souris transgéniques BAFF/BAFF développent des manifestations évoquant un [lupus](#), un

Sjögren et une polyarthrite rhumatoïde. Récemment, les premiers résultats d'un anticorps monoclonal anti-BlyS humain évalué chez le singe ont été publiés (12). Son utilisation chez l'homme a débuté.

Les LB sont de bons présentateurs d'auto-antigènes, capables d'activer des LT auto-réactifs. Chan *et al.* (13-18) l'ont démontré dans une expérience élégante chez la souris MRL/Lpr qui est caractérisée par l'apparition de différentes manifestations auto-immunes, en particulier d'arthrites, de néphropathies ou de syndromes secs. Si les LB de ces souris sont incapables de produire des IgG membranaires et sériques, il n'y a pas d'infiltration T. En revanche, si elles produisent des immunoglobulines de membranes (même sans anticorps sériques), l'infiltrat tissulaire lymphocytaire T et différentes manifestations auto-immunes apparaissent.

Les LB sont capables de sécréter différentes cytokines (TNF α , lymphotoxines, IL10, IL4) et chémokines. Certaines d'entre elles, comme les lymphotoxines, exercent un rôle physiologique en favorisant le développement de follicules lymphoïdes (19). D'autres, comme le TNF α , peuvent exercer un rôle dans la réponse immunitaire innée, et d'autres, comme l'IL10, peuvent exercer un rôle immunorégulateur en induisant l'activation de LT régulateurs capables de contrôler les manifestations auto-immunes (20-24). Les LB sont capables d'induire la différenciation des cellules dendritiques indispensables au développement d'une réponse immunitaire adaptée.

Les LB auto-réactifs ont des propriétés particulières. Il a été démontré récemment que des LB auto-réactifs producteurs de facteurs rhumatoïdes sont activés par des immuns complexes (chromatine - IgG2A) qui sont capables de stimuler de manière synergique le récepteur à l'antigène (BCR) et un *toll like receptor* (TLR) de type TLR9 habituellement activé par des motifs CPG de l'ADN bactérien. Le LB est donc bien au carrefour de l'immunité innée et adaptative. (25)

Un dernier argument pourrait être déduit de l'observation de fréquentes manifestations auto-immunes dans les déficits immunitaires primitifs, surtout quand ils impliquent le LB (déficits de type commun variable, déficits avec hyper IgM...). Ceci suggère que des dérèglements intrinsèques des LB favorisent l'auto-immunité.

Le CD 20 : une cible thérapeutique bien adaptée

Le CD20 est un marqueur très spécifique des LB, exprimé en grande quantité à la surface des lymphocytes pré-B et des LB matures. En revanche, il n'est pas exprimé à la surface des

souches hématopoïétiques, des cellules pro-B ni des plasmocytes sauf pour un petit contingent ou dans des circonstances pathologiques (comme pour certains plasmocytes myélomateux). En effet, près de 20% des plasmocytes de donneurs sains peuvent exprimer des quantités variables de CD20. Cette population pourrait correspondre à des plasmocytes moins matures de type plasmoblastes qui ont la particularité de produire des IgM (26). Chez l'homme, son expression à la surface des LB mémoire reste un sujet controversé mais il est possible qu'au moins une partie d'entre eux exprime le CD20 (27, 28). De façon beaucoup plus marginal, le CD 20 est exprimé pour une faible quantité (<5%) de LT (29)

Malgré de nombreuses études, le rôle physiologique de CD20 est assez mal connu. En particulier, les souris déficientes en CD20 (CD20 knock-out) n'ont pas d'anomalie immunophénotypique particulière (30). Le CD20 est une phosphoprotéine transmembranaire de 33 à 37 kDa qui pourrait participer à la régulation des flux calciques. Son activation par des anticorps (dont le Rituximab) dirigés contre sa portion extramembranaire (capables d'induire un « cross link ») permet la transduction d'un signal aboutissant à l'activation et la différenciation du LB. Il a été démontré que la portion intracellulaire de CD20 comprend de multiples séquences de phosphorylation, elle est associée à différentes protéines kinases de la famille de src (Lyn, Fyn, Lck) (31-33). Cette activation va induire via la PLC- γ l'activation de la PIP3 (qui génère l'inositol-triphosphate) la voie des Mitogen-Activated Protein MAP-kinases et la voie de la protéine-kinase C (PKC).

Cette activation est dépendante de la répartition et de la densité membranaire en CD20. Cette répartition membranaire (clustering) semble fondamentale car il a été montré qu'après la fixation du CD20, on observe une « diffusion » rapide du CD20 au sein des « radeaux lipidiques » (lipid raft). Cette redistribution au sein de cette véritable synapse immunologique se fait de façon assez similaire aux récepteurs à l'antigène du LB (BCR) suggérant une coordination entre les signaux intracellulaires induits par ces deux structures. Il est intéressant d'observer que ces modifications membranaires peuvent être durables, ce qui pourrait être l'une des explications à l'effet persistant de la réponse au Rituximab (34, 35).

Néanmoins, ces données concernant l'activation via CD20 doivent être analysées prudemment car d'une part les cellules étudiées sont soit des lignées cellulaires, soit des cellules tumorales lymphoïdes et très rarement des LB « normaux ». D'autre part, le ligand naturel du

CD20 n'étant pas connu, son activation est toujours obtenue avec des systèmes artificiels utilisant des anticorps capables de fixer (ou « cross-linker ») le CD20 (34)

En résumé, le CD20 est une « bonne » cible thérapeutique pour les raisons suivantes :

- c'est un marqueur présent sur les LB, mais absent sur les cellules souches et la grande majorité des plasmocytes, ce qui permet de maintenir un taux d'immunoglobulines relativement stable et d'éviter potentiellement certaines infections ;
- le CD20 est exprimé en assez grande quantité à la surface cellulaire et ne semble pas sécrété ou libéré dans la circulation par protéolyse membranaire. Après fixation avec un anti-CD20, le complexe CD20/anti-CD20 peut être internalisé, mais ce phénomène est assez marginal n'entraînant pas sa disparition durable. Néanmoins, dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), il a été démontré récemment que la fixation du Rituximab peut entraîner une disparition transitoire du CD20 membranaire (36, 37) Cependant, ce phénomène n'a été observé qu'*in vitro*. Reste à savoir s'il y a une pertinence *in vivo* notamment dans d'autres modèles que la LLC.

Mécanismes d'action du Rituximab

Le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique spécifique pour le CD20 humain. Cet anticorps est formé des régions variables d'un anticorps murin anti-CD20 fusionné avec des fragments constants d'une chaîne lourde humaine IgG-1 associé à, une chaîne légère kappa. La portion Fc de l'IgG humaine a été sélectionnée pour sa capacité à fixer le complément et entraîner une cytotoxicité de type ADCC (Antibody Dependant Cell Mediated Cytotoxicity). En 1997, le Rituximab a été le premier anticorps monoclonal approuvé par la FDA (l'administration américaine de la sécurité alimentaire et pharmaceutique) pour le traitement des lymphomes. Actuellement, plus de 300.000 lymphomes B non hodgkiniens de type folliculaire ou des lymphomes plus agressifs (lymphome B à grandes cellules) ont été traités. L'efficacité et la bonne tolérance de cet anticorps ont été un vrai tournant dans la prise en charge des lymphomes.

Les principaux mécanismes d'action du Rituximab ont été étudiés dans les lymphoproliférations (38-41). Schématiquement, il existe trois mécanismes permettant de détruire les LB tumoraux :

l'apoptose,

la cytotoxicité complément-dépendante ou CDC (complement-dependent cytotoxicity)
la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante ou ADCC

L'apoptose (figure 1)

Le Rituximab est capable d'induire l'apoptose en particulier dans la LLC (42-45). Cette apoptose ne semble pas dépendante de la voie du TNF (TNF R1) et de la voie Fas/Fas L, mais plutôt de la voie mitochondriale (cytochrome C) aboutissant à l'activation de la caspase 3. Dans un modèle cellulaire très particulier (lignée lymphoïde 2 F7 dérivée d'un lymphome de Burkitt lié au VIH), il a été démontré que le Rituximab était capable de réduire l'expression de Bcl-2 par la synthèse autocrine d'IL-10 (31, 46). D'autres études ont démontré que le Rituximab était aussi capable de réduire l'expression d'autres molécules anti-apoptotiques (XIAP, Mcl-1) (47). Au total, l'importance de l'apoptose comme mécanisme effecteur du Rituximab reste encore hypothétique, dépendant probablement de la cellule cible et du type d'anticorps monoclonal anti-CD20 utilisé. Ainsi, le tositumomab (IgG2a anti CD20) n'a pas les mêmes propriétés effectrices que le Rituximab (34, 48).

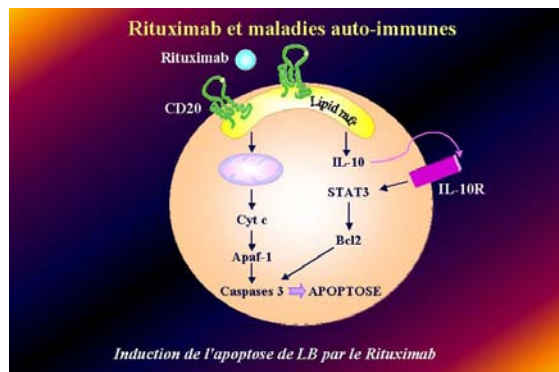


Figure 1 : Apoptose induite par le Rituximab (Anti-CD20) : L'activation de l'apoptose est liée essentiellement à la voie mitochondriale (Cytochrome C). Le rituximab est aussi capable de réduire l'expression de molécule antiapoptotique (Bcl2, XIAP, Mcl-1). Cette réduction d'expression de Bcl2 est liée à l'induction de la synthèse autocrine d'Il 10.

La cytotoxicité dépendante du complément ou CDC (complement-dependent cytotoxicity) (figure 2)

La CDC permet d'expliquer la lyse cellulaire par une activation du complément via la portion Fc de Rituximab. Ce phénomène, démontré *in vitro*, a certainement une pertinence *in vivo*, même si sa corrélation avec l'efficacité clinique est discutable (49-51). De plus l'activation du complément pourrait aussi expliquer certains effets indésirables (52)

La régulation de ce phénomène est liée aux protéines inhibitrices du complément, en particulier CD35 ou CR1 (complement receptor type 1), CD46 ou MCP (membrane cofactor

protein), CD55 ou DAF (decay accelerating factor) et CD59 ou MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis). L'étude de l'expression de ces protéines inhibitrices du complément peut prédire *in vitro* l'efficacité de la CDC induite par le Rituximab, mais la corrélation avec l'efficacité clinique est discutée (49, 53-55). La sensibilité à la CDC semble également liée à d'autres phénomènes, notamment à la mobilité de la molécule CD20 dans les radeaux lipidiques (« lipid raft ») et à certaines protéines-kinases (PKC, PKA) (34, 56).

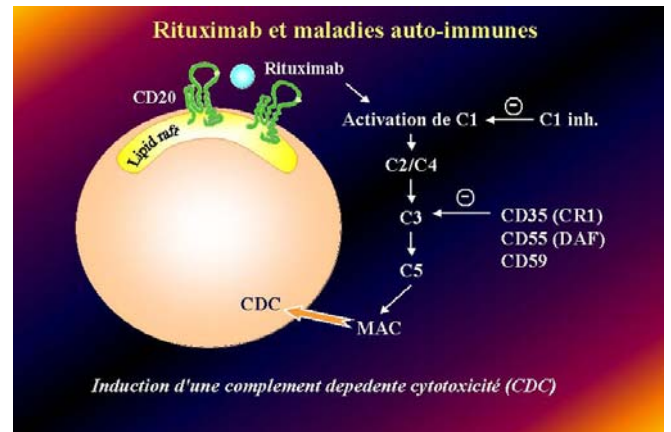


Figure 2 : Cytotoxicité dépendante du complément (CDC ou Complement dependant cytotoxicity) induite par le rituximab (Anti CD20) :

Le rituximab qui est une IgG1 active le complément par son fragment Fc. Le complément activé est régulé par des protéines inhibitrices (CD35 ou CR1, C46, CD55 ou DAF, CD59 ou MIRL).

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody-dependent-cellular-cytotoxicity) (Figure 3).

Cette cytotoxicité s'effectue par différentes cellules (monocytes, macrophages, cellules NK et aussi polynucléaires) capables de fixer la portion Fc du Rituximab. Cette fixation s'effectue par les récepteurs des portions Fc (Fc γ -receptor) dont il existe 3 formes : des récepteurs activateurs de haute affinité (Fc γ - RI ou CD64) et de faible affinité (Fc γ -RIIIA ou CD16) et des récepteurs inhibiteurs (Fc γ -RIIB ou CD32). Ces récepteurs ont un rôle majeur comme l'illustre le fait que les souris déficientes en Fc γ -RIIB sont hypersensibles au mécanisme d'ADCC (57-59). Ainsi, le polymorphisme de ces Fc γ récepteurs est susceptible de moduler l'efficacité du Rituximab, ce qui est l'un des premiers exemples de pharmacogénomique prédictive :

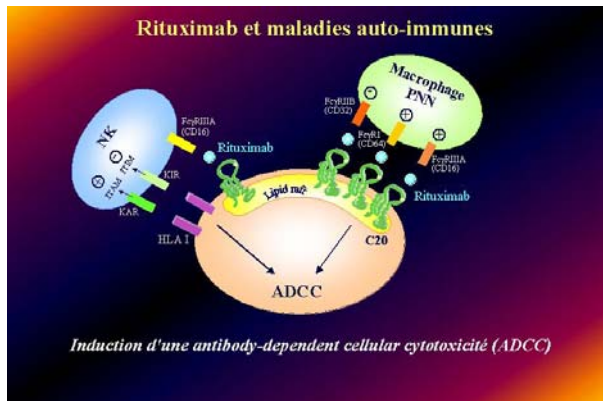


Figure 3 : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC ou antibody-dependant cellular cytotoxicity) induit par le rituximab :

Le rituximab active la cytotoxicité cellulaire en reliant les cellules cytotoxiques qui porte des récepteurs avec portion Fc (FcγR) capable de fixer le Fc du rituximab et les lymphocytes CD20 sur lesquels le rituximab est fixé par son Fab. Cette cytotoxicité est régulée par la nature et l'affinité de ces FcγR

- dans un groupe de lymphomes folliculaires, une rémission complète induite par le Rituximab est observée plus souvent chez les patients dont le polymorphisme du Fcγ-R111A est caractérisé par une valine en position 158 (V158). Ce résidu valine, contrairement à une phénylalanine (F158), confère une affinité plus grande (x10) du Fcγ-R111A pour les IgG1, comme le Rituximab (60). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude (61). Dans cette étude, il a également été démontré que le polymorphisme d'un autre récepteur Fcγ (Fcγ-R11A) peut également influencer la réponse au Rituximab. En effet, la présence en position 131 d'une histidine (H131) en remplacement d'une arginine (R131) augmente l'affinité et, de ce fait, l'efficacité du Rituximab dans les lymphomes folliculaires. En revanche, dans les leucémies lymphoïdes chroniques, le polymorphisme du Fcγ-R111A et Fcγ-R11B ne permet pas de prédire la réponse au Rituximab (62). Cette constatation démontre que le Rituximab n'a probablement pas le même mode d'action en fonction du type cellulaire ;

- dans les maladies auto-immunes, un travail publié récemment a démontré que le polymorphisme du Fcγ-R111A (158 V/158 V) pourrait moduler la déplétion en lymphocytes B. En revanche, il n'a pas été observé de corrélation avec le polymorphisme de Fcγ-R11A (63).

Cette ADCC semble aussi dépendante du complément (64). En effet, le Rituximab n'est pas capable de détruire des cellules T murines transfectées avec le CD20 humain si ces souris sont déficientes en C1q (C1q -/-) (65, 66). D'autres facteurs, en particulier certaines cytokines (IL-2, IL-12, IL-15) pourraient augmenter cette activité cytotoxique (67). De

plus, les facteurs de croissance myéloïde (G-CSF et GM-CSF) agissent aussi en régulant l'expression des Fcγ-R (68).

Les autres mécanismes

D'autres mécanismes ont été évoqués pour expliquer l'efficacité du Rituximab dans les cytopénies auto-immunes. Il s'agit d'une fixation non spécifique du Rituximab sur les Fc récepteurs (Fc-R) des cellules effectrices, ce qui bloque leur fonction. L'inhibition de ces cellules cytotoxiques explique qu'elles ne peuvent plus détruire les plaquettes ou les globules rouges (41, 55). Ce mécanisme a aussi été évoqué pour expliquer l'efficacité des immunoglobulines intraveineuses polyvalentes.

Mécanismes de résistance au Rituximab

Les facteurs liés au Rituximab

La pharmacocinétique et la biodisponibilité des anticorps monoclonaux est déterminée d'une part par les caractéristiques de la molécule (en particulier sa nature chimérique et les spécificités de sa portion Fc), mais d'autre part par les caractéristiques de sa cible antigénique (CD20).

Il a été observé des anticorps anti-chimériques qui pourraient, en théorie, réduire l'efficacité du Rituximab. Dans l'état actuel des connaissances, dans les syndromes lymphoprolifératifs, leur prévalence est rare (<10% des cas) et ils n'ont pas de signification clinique, mais c'est un point qui devra être particulièrement analysé au cours des maladies auto-immunes traitées par Rituximab.

Un anticorps monoclonal peut diffuser dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes, mais la diffusion dans des sites, comme le cerveau, est moins bien connu. Dans l'état actuel des connaissances, un seul travail a été consacré à ce point. Seuls des taux très faibles de Rituximab ont été détectés dans le liquide céphalo-rachidien d'un patient atteint d'un lymphome à localisation cérébrale (69).

Les facteurs liés à l'expression de CD20

La densité cellulaire en CD20 peut varier selon le type de cellules, comme cela a été observé au cours des lymphomes. A titre d'exemple, la densité d'expression du CD20 est beaucoup plus faible au cours des LLC qu'au cours de différents lymphomes comme le lymphome folliculaire. Cette constatation peut expliquer des mécanismes de résistance au Rituximab.

Certains lymphomes en rechute après Rituximab n'expriment plus le CD20. Ce mécanisme d'échappement existe, mais semble particulièrement rare (70-72). Ce mécanisme a été confirmé récemment dans la LLC en

observant que le CD20 cellulaire devenait indétectable après Rituximab. Il ne s'agit pas simplement d'un « masquage » du CD20 par le Rituximab, mais d'une réduction d'expression transitoire de son ARN messager (36). Dans la LLC, un travail particulièrement original vient de démontrer que les LB CD20+ après la fixation du Rituximab peuvent être séquestrés par des cellules phagocytaires dans le foie et/ou la rate. Cette séquestration n'est que transitoire car ces LB sont relargués dans la circulation mais après disparition du complexe CD20-Rituximab-C3b(i). Ces LB qui n'expriment plus le CD20 peuvent donc échapper au traitement (37). Ce mécanisme explique peut-être des phénomènes analogues observés précédemment (73). Récemment, il a été démontré, aussi dans la LLC, l'existence de CD20 circulant dont les taux élevés sont corrélés à une réduction de la survie. En fait, il ne s'agit pas réellement de CD20 soluble, mais plutôt de CD20 circulant sous forme de complexe ou de fragment de membrane cellulaire observé aussi chez des sujets sains. Ce CD20 circulant pourrait avoir une importance en interférant éventuellement avec la pharmacocinétique des anticorps anti-CD20. (74)

Les facteurs liés à la fixation de l'anticorps sur le CD20

Après fixation du Rituximab sur le CD20, différentes modifications sont possibles. Ces modifications qui touchent les radeaux lipidiques et la signalisation intracellulaire peuvent réduire l'efficacité du Rituximab (32, 34, 44, 75.). Différentes anomalies ont été observées :

- Des modifications des signaux pro et anti-apoptotiques peuvent modifier l'apoptose induite par le Rituximab.
- Le rôle des protéines inhibitrices du complément et des Fcγ récepteurs dans la régulation de la cytotoxicité a été discuté préalablement.
- Des cellules tumorales sont capables de produire des inhibiteurs de protéases qui vont les protéger (76).

Ces mécanismes devront être précisément étudiés en particulier pour évaluer l'intérêt et la tolérance de traitements répétés dans les maladies auto-immunes. Une façon élégante est d'étudier la transcription des gènes sous l'effet du Rituximab en comparant les répondeurs et les non répondeurs. Cette étude transcriptionnelle a été récemment effectuée dans le lymphome folliculaire (37). Une étude par microarray des prélèvements de tissus lymphoïdes tumoraux de 24 lymphomes folliculaires ont montré que le profil d'expression des gènes des non répondeurs est plus proche d'un tissu lymphoïde normal que celui des

répondeurs. Les gènes hyper-exprimés chez les non-répondeurs sont des gènes des voies cytokiniques (STAT4,...), des éléments de la voie du complément (C4B, C1S,...), des éléments du récepteur à l'antigène des lymphocytes T et des facteurs intervenant dans les voies de signalisation du TNF (38)

Comment améliorer l'efficacité du Rituximab les corticoïdes

Une des questions principales est de savoir si les corticoïdes réduisent ou amplifient l'efficacité du Rituximab. L'évaluation de l'association dexaméthasone-Rituximab a été faite in vitro chez 9 patients atteints de lymphomes B. Schématiquement, une préincubation avec la dexaméthasone amplifie la CDC induite par le Rituximab mais diminue légèrement l'ADCC permettant globalement une synergie cytotoxique (77).

Les cytokines

Différentes cytokines (IL-2, IFN α 2, IFN γ) peuvent augmenter l'expression du CD20 sur les lymphocytes cibles et certains facteurs de croissance myéloïdes (G-CSF) peuvent amplifier la fonction des cellules effectrices en présence de Rituximab (41, 55, 78-80). Ces molécules peuvent donc amplifier la réponse au Rituximab. Néanmoins, leur utilisation dans les maladies auto-immunes, en particulier l'IFN α 2 dans le lupus, peut s'avérer délétère.

Explications sur l'efficacité du Rituximab dans les maladies auto-immunes

Le LB est un acteur-clef des maladies auto-immunes justifiant l'évaluation du Rituximab dans différentes d'entre elles, mais pour l'instant, il n'y a pas de modèles expérimentaux car il n'y a pas d'anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 murin disponible (28, 81).

Comment expliquer l'efficacité parfois prolongée des anticorps anti-LB dans les maladies auto-immunes ?

- L'action du Rituximab peut s'expliquer par une réduction du taux d'auto-anticorps, comme le suggère dans la PR l'observation d'une corrélation entre la réapparition des auto-anticorps et des signes cliniques après Rituximab (82). Cependant, cela ne suffit probablement pas comme le suggèrent différentes constatations.
- L'efficacité clinique n'est pas forcément liée à la baisse des auto-anticorps comme cela été confirmé dans les thrombopénies immunologiques et la polyarthrite rhumatoïde.
- Les auto-anticorps ne disparaissent pas complètement et chez certains patients les taux restent même stables. Globalement, les anticorps qui semblent les plus sensibles au

Rituximab sont les IgM en particulier les facteurs rhumatoïdes et les IgM anti-myéline (MAG et GM1). Une des explications pourrait être la sensibilité au Rituximab des plasmocytes circulants CD20+ sécréteurs d'IgM. Une observation qui pourrait étayer cette hypothèse est la description récente d'une importante baisse des IgM chez des patients atteints de myélome traités par Rituximab après autogreffe de cellules souches (83). Dans d'autres maladies autoimmunes comme le lupus, les auto-anticorps d'isotype IgG, comme les anti-ADN natifs, semblent peu ou plus rarement réduits. En fait, il existe une assez grande diversité de réponses car dans quelques observations, il est signalé la baisse, voire la disparition d'auto-anticorps IgG, en particulier d'anti-CCP dans la polyarthrite rhumatoïde, d'anti-PR3 dans le Wegener et même parfois d'IgG anti-ADN natif.

- L'action du Rituximab peut s'expliquer par une destruction des LB potentiellement présentateurs d'antigènes et producteurs de cytokines. Ces LB auto-réactifs ont un rôle fondamental dans la régulation de la maturation de cellules dendritiques et dans la collaboration avec les lymphocytes T auto-réactifs. Cependant actuellement, il n'y a aucun argument formel pour démontrer ce mode d'action, mais la constatation de l'efficacité du Rituximab dans des maladies auto-immunes sans anticorps pathogènes est peut-être un élément. Pour démontrer l'effet du Rituximab dans le développement d'une réponse immunitaire, il est intéressant d'analyser son impact sur la réponse vaccinale. En effet, le Rituximab peut inhiber la réponse vaccinale humorale primaire et secondaire, ce qui suggère qu'il élimine non seulement les lymphocytes B périphériques, mais aussi une population de lymphocytes B mémoires susceptibles d'exprimer le CD20. Reste à comprendre pourquoi dans la majorité des études, le taux d'immunoglobulines ne baisse pas ou peu, alors qu'il existe une déplétion marquée prolongée en lymphocytes B. Cette constatation est peut-être liée à l'existence de plasmocytes B de longue durée localisés essentiellement dans la moelle et la rate, qui ne seraient pas détruits par le Rituximab (84). Néanmoins, il existe malgré tout quelque déplétion B prolongée notamment chez l'enfant souvent lors de l'association avec des immunosuppresseurs (85).

- L'action du Rituximab peut être liée à une modification du répertoire B. Une étude préliminaire dans le lupus suggère qu'après Rituximab des anomalies de la signalisation des LB, en particulier de la voie CD40-CD40 ligand disparaissent lors de la reconstitution lymphoïde (86) Il a aussi été observé que le Rituximab

pourrait induire une neutropénie d'origine dysimmunitaire caractérisée par l'apparition d'anticorps anti-polynucléaires parfois associés à une hypogammaglobulinémie. Néanmoins, nous n'avons pas la preuve que ces modifications soient exclusivement liées au Rituximab.

- Le Rituximab pourrait agir plus spécifiquement contre des populations de lymphocytes B tissulaires particuliers. A titre d'exemple, il a été décrit dans la synoviale rhumatoïde une population de lymphocytes B CD20+, CD38-incapables de répondre aux mitogènes, mais capables de produire des anticorps et de survivre de façon prolongée (87). Reste à savoir quelle est la conséquence de leur élimination par le Rituximab.

Au total, l'ensemble de ces données suggère que le Rituximab est capable d'induire une profonde déplétion en LB périphériques, mais doit agir aussi potentiellement sur d'autres sous-populations de LB, en particulier des LB mémoires et des LB auto-réactifs. Toutes ces observations suggèrent de passionnantes questions concernant l'homéostasie lymphocytaire B.

- L'expression du CD20 par les LB normaux et les LB auto-réactifs est-elle la même ?

- Comment se comportent les LB intratissulaires sous Rituximab ?

- Pourquoi certains patients ont-ils une déplétion B prolongée inhabituelle et pourquoi apparaît une hypogammaglobulinémie chez certains ?

- Y a-t-il réellement des modifications quantitatives et qualificatives du répertoire lymphocytaire B après le Rituximab ?

- Le Rituximab est-il capable de modifier un comportement de populations lymphocytaires T régulatrices (T CD4/CD25) sachant qu'il existe une sous-population minoritaire (5%) de lymphocytes T CD20+.

Utilisation du Rituximab dans les maladies auto-immunes

Des études, de plus en plus nombreuses se sont intéressées à ce nouvel aspect thérapeutique (88-90)

La polyarthrite rhumatoïde

Initialement, il avait été observé que la PR s'améliorait chez les patients ayant développé un lymphome traité par anti-CD20 (91). En fait, c'est en 2001 qu'Edwards (92) et Cambridge (82) ont décrit les 5 premiers patients atteints de polyarthrite rhumatoïde réfractaire au traitement conventionnel, traités par Rituximab. Le traitement associait, un peu comme la chimiothérapie d'un lymphome, 4 perfusions hebdomadaires de Rituximab (initialement 300 mg, puis 600 mg) associées à deux perfusions

de cyclophosphamide (750 mg) et une corticothérapie *per os* (30 à 60 mg/jour). Tous les 5 patients ont eu une excellente réponse clinique de type ACR 70 chez 3 d'entre eux. Cette efficacité est maintenue au moins 6 mois et deux patients ont été retraités après 34 et 49 semaines, permettant à nouveau une excellente réponse (ACR 70).

Ces résultats ont été confirmés par deux autres études ouvertes ayant inclus l'une 22 patients (dont les 5 patients de la 1^{ère} étude ouverte) (93) et l'autre 5 patients atteints de polyarthrite réfractaire au traitement conventionnel (dont le Méthotrexate) (94). Ces deux études, menées selon un schéma comprenant aussi du cyclophosphamide et des corticoïdes, ont permis d'observer une efficacité comparable à la 1^{ère} étude pilote. Les données de suivi de l'étude de LEANDRO et al ont été présentées récemment, permettant d'observer que les taux d'auto-anticorps, en particulier les facteurs rhumatoïdes et les anti-CCP, baissent significativement (notamment les IgA et IgG), alors que le taux d'anticorps anti-microbien (anti-tétanos, anti-pneumocoque) n'est pas modifié (80). Parallèlement, les taux d'immunoglobulines (IgG, IgA, IgM) baissent légèrement mais cette diminution n'est pas significative sauf chez quelques patients (de l'ordre de 10%). Les LB réapparaissent progressivement après avoir été indétectables dans le sang périphérique en moyenne pendant 8,4 mois (3,5-20,8). Cette reconstitution précède la réapparition des auto-anticorps avec, dans près de 80% des cas (18/22), une rechute clinique survenant 0 à 17 mois après la réapparition des LB (82).

Dans une autre étude ouverte, 7 patients atteints de polyarthrite réfractaire aux traitements conventionnels et à l'infliximab ont été traités par Rituximab (sans cyclophosphamide et corticoïdes). Tous les patients ont répondu au traitement, mais l'efficacité semble moindre avec seulement 3 patients avec une réponse ACR 20 (95).

L'étude la plus intéressante est une étude randomisée comparant l'effet de Rituximab à un placebo chez les patients ayant une PR résistante au Méthotrexate (96). Au total, 161 patients ont été inclus, répartis en 4 groupes : le groupe A : poursuite du Méthotrexate seul, le groupe B : Rituximab seul (2 x 1 g à J1 et J15), le groupe C : Rituximab (2 x 1 g à J1 et J15) et cyclophosphamide (2 x 750 mg) et le groupe D : Rituximab associé à la poursuite du Méthotrexate. Ce traitement était associé à une corticothérapie les deux premières semaines (une semaine à 1 mg/kg et la 2^{ème} semaine à 0,5 mg/kg). A 6 mois, l'analyse d'une cohorte intermédiaire de 122 patients a démontré une efficacité spectaculaire, surtout de l'association

Rituximab + méthotrexate avec près de 50% de réponse ACR 50 (figure 4). Le suivi de 1 an de cette étude randomisée a été présenté récemment confirmant le maintien de l'efficacité clinique, mais pour l'instant sans présenter de résultats concernant l'efficacité structurale (97). A 6 mois, il y a eu 11 événements indésirables sérieux répartis dans les différents groupes dont 4 infections sévères : 1 dans le groupe Méthotrexate seul et 2 (bronchopneumonie) dans les groupes Rituximab. Ces résultats sont extrêmement séduisants suggérant l'efficacité du Rituximab et la bonne tolérance d'un anticorps monoclonal anti-CD20 dans la polyarthrite rhumatoïde (96).

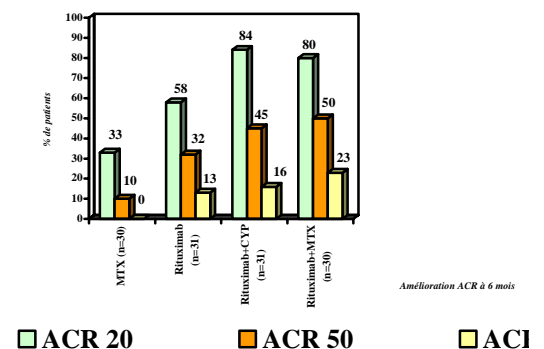


Figure 4 : Réponse ACR à 6 mois dans une cohorte intermédiaire de PR réfractaires aux traitements de fond, traités par rituximab seul ou associé au méthotrexate (MTX) ou au cyclophosphamide (CYP) comparé au méthotrexate seul (étude contrôlée randomisée)
*** p<0,001 ** p<0,01

Le lupus systémique

L'expérience dans le lupus systémique est plus limitée, mais les premiers résultats semblent aussi très intéressants compte tenu du rôle des LB dans cette affection (98, 99). Une étude de doses a inclus des lupus actifs mais sans lésion viscérale sévère avec un score SLAM (SLE disease activity measure score) <6. Ces 18 patients étaient répartis dans un groupe « faible dose » avec une perfusion de 100 mg/m², un groupe « dose moyenne » avec une perfusion de 375 mg/m² et un groupe « forte dose » avec 4 perfusions hebdomadaires de 375 mg/m². Ce traitement a permis une amélioration des manifestations cutanées et articulaires et de la fatigue, mais sans modification significative du taux d'anti-ADN natif et du complément lors des 12 mois de suivi. L'efficacité a été meilleure chez les patients caractérisés par une forte déplétion en LB (<1%) qui est due au génotype FcγRIIIA des patients (86, 100). A noter l'apparition d'anticorps anti-chimériques chez 3 des 12 patients analysés, mais a priori sans complication clinique.

Dans une autre étude ouverte, 6 patients atteints de lupus résistant au traitement immunosuppresseur, ont bénéficié de 2 injections de Rituximab (500 mg J1 et J7), de 2 injections de cyclophosphamide (2 x 750 mg) associées à une corticothérapie orale (101, 102). Tous les patients avaient des affections particulièrement sévères (3 atteintes rénales, 1 atteinte du système nerveux central) et des titres élevés d'anticorps anti-ADN natif associé à une consommation du complément. Pendant le suivi (6 à 18 mois), il a été noté une amélioration significative du score BILAG (British Isles Lupus Assessment group global score) de 15,3 à l'inclusion à 8,3 en moyenne à 6 mois. La plupart des signes cliniques se sont améliorés, en particulier l'atteinte rénale chez 2 malades sur 3, cela malgré l'absence de modifications significatives du taux d'anti-DNA natif et du taux d'immunoglobulines (IgG, IgA, IgM). Seul le taux de C3 s'est normalisé transitoirement chez la plupart des patients. L'absence d'amélioration des signes neurologiques centraux chez un patient a été attribuée à des lésions séquellaires. Il est intéressant d'observer que chez quelques patients, le bénéfice clinique persiste même après la normalisation du taux de lymphocytes B circulants (comme dans la polyarthrite rhumatoïde).

Récemment, les observations de deux patients souffrant de lupus sévère ont été décrites. Le premier patient âgé de 39 ans souffrait d'une épilepsie liée à une vasculopathie cérébrale associée à des antiphospholipides, réfractaire au traitement classique. Le traitement par Rituximab (4 perfusions hebdomadaires de 375mg/m²) suivi d'un traitement d'entretien de 375 mg/m² tous les 3 mois a permis une disparition complète de la symptomatologie et une réduction significative du taux d'anticorps antinucléaires et d'antiphospholipides. Cette amélioration persiste 30 mois après le début de traitement (103). Le 2^{ème} patient atteint aussi d'un lupus réfractaire a été traité selon les mêmes modalités avec une amélioration très significative de la symptomatologie clinique et biologique (104).

Dans une autre étude récente, 4 lupus compliqués de thrombopénie ont été traités par Rituximab. Une véritable efficacité avec une correction durable de la thrombopénie (associée à la disparition des anti-ADN natifs n'a été observée que chez 1 patient (85). L'observation de l'efficacité du Rituximab a aussi été suggérée dans une anémie hémolytique réfractaire (105). Dans le syndrome des antiphospholipides plusieurs observations d'amélioration sous Rituximab ont été observées chez l'adulte et l'enfant (106).

Les neuropathies avec anticorps anti-myéline

Une première étude ouverte a évalué l'intérêt du Rituximab chez 5 patients atteints de polyneuropathies sévères dont 4 avec des IgM anti-MAG (myelin-associated-glycoprotein) et 1 avec des IgM anti-GM1. Ce traitement a permis dans les 6 mois une amélioration clinique significative et une réduction des titres d'auto-anticorps en moyenne de 47% parallèlement à une baisse des IgM (de l'ordre de 31%) sans modification significative des IgA et des IgG (107). Cette étude a été complétée par une extension ayant inclus 21 polyneuropathies avec des auto-anticorps d'isotype IgM, qui a confirmé ces résultats (108).

Dans une autre étude ouverte, 9 patients atteints d'une polyneuropathie liée à des IgM anti-MAG ont été traités par Rituximab (4 perfusions hebdomadaires de 375 mg/m²). Chez ces patients, le taux d'IgM sérique a été réduit de en moyenne de 58% avec une réduction des anti-MAG de plus de 50% chez 8 d'entre eux. Chez 6 patients, une amélioration clinique confirmée pour la plupart par un électromyogramme a aussi été observée (109). Néanmoins, il faut rester prudent car l'amélioration observée est souvent cliniquement assez modeste, moins spectaculaire qu'avec des traitements comme les immunoglobulines intraveineuses... affaire à suivre. (110)

Les cytopénies auto-immunes et les autres complications hématologiques de l'adulte et de l'enfant

Les thrombopénies auto-immunes

Le Rituximab a été évalué dans le purpura thrombopénique de l'adulte résistant aux traitements conventionnels. Dans la plupart des études, le traitement (4 perfusions hebdomadaires de 375 mg/m²) a permis une amélioration significative de la thrombopénie, même dans des formes réfractaires à la splénectomie (111-116). Cette efficacité est observée dans près de 50% avec 15 à 50% de réponse complète (i.e un taux de plaquette > 150000/mm³) Cette amélioration peut survenir précocement dès les premières perfusions ou plus tardivement jusqu'à 6 semaines après la dernière perfusion (113). En revanche, l'amélioration clinique n'est pas forcément corrélée à une décroissance du taux d'anticorps anti-plaquettes (114). Une splénectomie préalable, une corticothérapie associée ou d'autres facteurs comme l'âge, le sexe et le taux de plaquette n'influence pas la réponse thérapeutique. A signaler l'observation très particulière d'une thrombopénie auto-immune réfractaire au cours d'un syndrome auto-immunité – lymphoprolifération par

mutation de Fas (CD95) corrigé par le Rituximab (associé à la vincristine) (117).

Les anémies hémolytiques auto-immunes

Dans les anémies hémolytiques auto-immunes réfractaires de l'enfant, plusieurs observations et études ouvertes ont démontré l'efficacité et la bonne tolérance du Rituximab, même dans des formes chroniques et rebelles (118-121). Ce traitement utilisé selon un schéma classique (3 ou 4 perfusions hebdomadaires de 375 mg/m²) a permis une rémission dans près de 90% des cas. Cette rémission persiste souvent jusqu'à 10 à 20 mois après le Rituximab, sans traitement complémentaire. Cette efficacité semble confirmée aussi par les syndromes d'Evans (121-123). Chez l'adulte, les observations sont moins nombreuses, mais une efficacité est possible dans les formes réfractaires (124, 125).

La maladie des agglutinines froides

Dans la maladie des agglutinines froides (associant ou non une lymphoprolifération), le Rituximab peut aussi avoir un intérêt qui reste à confirmer (80,126-135). Dans une étude ouverte très récente ayant inclus 27 patients atteints de formes primitives de maladie des agglutinines froides une réponse a été observée chez la majorité d'entre eux avec un gain moyen d'hémoglobine de 4,0 g/dl pour une durée de réponse moyenne de 11 mois. Des arguments cytologiques ont suggéré la disparition des lymphocytes clonaux CD20+ K+ producteurs de l'IgMk à activité agglutinines froides (80).

Le purpura thrombotique thrombocytopénique

Dans le purpura thrombotique thrombocytopénique, lié à des anticorps inhibiteurs de l'ADAMTS 13 (von Willebrand factor-cleaving métalloprotéinase) le Rituximab (associé au cyclophosphamide) peut être efficace même après l'échec successif de nombreuses tentatives thérapeutiques. Ce traitement permet une normalisation de l'activité ADAMTS 13 corrélée à la disparition des auto-anticorps dirigés contre cette protéase (136).

L'hémophilie acquise auto-immune

Dans les syndromes hémorragiques liés à la présence d'auto-anticorps anti-facteur VIII, l'efficacité du Rituximab a également été suggérée dans une étude ouverte chez 4 patients au cours de laquelle une baisse importante des anti-VIII a été observée chez 3 d'entre eux (137). Il est intéressant d'observer chez ces patients la disparition, après traitement, d'un anticoagulant circulant (antiphospholipide) observé chez deux patients et d'une gammopathie monoclonale chez un 3ème. Des

observations comparables ont été faites par d'autres (138).

Les autres maladies auto-immunes et les vascularites

Le Rituximab a également été utilisé dans d'autres maladies auto-immunes, surtout en cas d'échec des thérapeutiques conventionnelles.

Dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, l'expérience est pour l'instant très limitée

Un patient de 46 ans souffrant d'un lymphome parotidien de la zone marginale au cours d'un syndrome de Gougerot-Sjögren avec anti-SS-A/SS-B a été traité par Rituximab (4 perfusions hebdomadaires de 375 mg/m²). Ce traitement a permis une rémission presque complète de son lymphome, caractérisée par une très nette amélioration clinique, une amélioration des lésions IRM et une normalisation du PETscan (2 – (18F) fluoro-2-déoxy-D-glucose ou FDG). En revanche, la biopsie confirme la persistance d'un infiltrat lymphomateux justifiant un 2^{ème} cycle de Rituximab dont l'efficacité n'a pas été décrite. Dans cette observation, il a aussi été noté une amélioration nette du syndrome sec avec une quasi-disparition des symptômes et une amélioration d'un certain nombre de paramètres objectifs comme le test de Schirmer, le temps de rupture des larmes et les empreintes conjonctivales et cornéennes. En revanche, il n'y a pas eu de modification du taux de facteurs rhumatoïdes, de disparition des anticorps anti-Ro/La, mais on peut noter une amélioration de la bêta-2-microglobuline (4 mg/dl avant traitement à 2,4 mg/dl après traitement). (139)

Une autre observation utilisant également le PETscan (FDG) a suggéré l'efficacité du Rituximab dans un lymphome parotidien chez un sujet atteint d'un Gougerot-Sjögren, mais sans donner de détails sur l'évolution du syndrome sec. Ces deux observations sont des arguments préliminaires intéressants compte-tenu du rôle des lymphocytes B dans le Gougerot-Sjögren, mais ces résultats, en particulier l'efficacité objective du traitement devront être validés. (140)

Dans les vascularites, pour l'instant, l'expérience est très limitée. L'intérêt de ce traitement a été suggéré par l'observation d'une granulomatose de Wegener traitée par Rituximab avec une efficacité spectaculaire et persistante sur les signes cliniques et le taux d'ANCA (141). Les développements sont envisagés dans les vascularites ANCA qui sont certainement une cible privilégiée d'une thérapeutique anti-lymphocyte CD20.

Dans le syndrome de Goodpasture résistant à un traitement associant corticoïdes, cyclophosphamide oral et plasmaphérèse, l'introduction du Rituximab (6 perfusions

hebdomadaires de 375 mg/m²) a permis une rémission complète avec une disparition des auto-anticorps anti-membrane basale glomérulaire (142).

Dans les néphropathies extra-membraneuses, le Rituximab a été évalué chez 8 patients caractérisés par un syndrome néphrotique important et persistant. Le rationnel de cette étude est que les dépôts immuns épithéliaux et glomérulaires à l'origine de l'altération du filtre sont liés à une réaction lymphocytaire B dont les auto-antigènes ne sont pas connus. Dans une étude préliminaire, l'efficacité sur l'albuminurie et l'albuminémie fait du Rituximab un traitement dont l'efficacité semble supérieure à toute autre thérapeutique immuno-suppressive (143, 144).

Dans les affections cutanées bulleuses auto-immunes, le Rituximab pourrait apporter aussi un bénéfice, comme cela est suggéré par son efficacité chez un patient atteint de pemphigus, et cela malgré l'absence de la disparition des auto-anticorps (antidesmogleine) (145) L'étude récente de 3 autres patients a confirmé ce résultat avec dans ce travail une constatation avec une diminution des titres d'auto-anticorps circulants (146)

Dans la myasthénie réfractaire, le Rituximab a été considéré comme efficace dans quelques observations isolées (147).

Les cryoglobulinémies mixtes

Deux études ouvertes récentes ont inclus 15 et 20 patients atteints d'une cryoglobulinémie mixte liée pour la plupart (32/35) au virus de l'hépatite C.. Il s'agissait de patients symptomatiques dont la cryoglobulinémie n'avait pas répondu au traitement conventionnel, en particulier l'interféron ou d'autres modalités thérapeutiques (corticoïdes, azathioprine, immunoglobulines intraveineuses ou ribavirine). Ils ont été traités par Rituximab (4 perfusions hebdomadaires de 375 mg/m²). Après un suivi prolongé allant de 6 à 31 mois, le traitement a été efficace sur les signes cliniques avec une rémission (souvent complète) dans près de 80% des cas. Dans l'une des études (148), trois lymphomes de bas grade associés à la cryoglobulinémie ont été mis, pour 2 d'entre eux, en rémission complète (dont une rechute précoce) et l'autre en rémission partielle. Dans l'autre étude (149), une étude moléculaire de la clonalité B des lymphocytes circulants montre une disparition des clones B chez les répondeurs au Rituximab. L'efficacité clinique s'associe à une réduction significative du cryoprécipité et par conséquent des titres de facteurs rhumatoïdes et d'anticorps IgG anti-VHC. En revanche, dans l'une des deux études, il a été observé une élévation (x2) de la virémie (PCR ARN), en particulier chez les répondeurs alors qu'ils étaient peu modifiés chez

les non-répondeurs. Cependant, il n'a pas été observé de modifications des transaminases ou de lésions histologiques hépatiques. Dans l'autre étude, l'impact sur la virémie a été beaucoup plus variable avec une stabilisation voire une amélioration des taux d'ARN VHC chez 5 des 8 malades étudiés (148). Globalement, dans les deux études, la tolérance a été bonne.

Cette expérience est confortée par quelques observations dont celle d'une femme de 45 ans prise en charge pour une cryoglobulinémie symptomatique résistant à l'Interféron, aux plasmaphèreses et au cyclophosphamide. Le Rituximab, relayé par un traitement par Interféron, a permis une rémission complète (150).

Les affections systémiques de l'enfant

Récemment, l'efficacité du Rituximab a été suggérée par l'observation de 4 enfants souffrant d'affections systémiques auto-immunes réfractaires au traitement conventionnel. Ces 4 enfants ont la particularité d'avoir des manifestations neurologiques centrales (atteinte des nerfs crâniens, atteinte démyélinisante, mouvements anormaux....) dont deux d'entre eux liés à un syndrome des antiphospholipides (151).

Une amélioration clinique parfois complète des manifestations neurologiques centrales a été observée. Cette efficacité sur les signes neurologiques centraux est particulièrement intéressante car les rares données dans le lymphome ne semblaient pas montrer de passage intrathécal du Rituximab.

Effets indésirables du Rituximab

Globalement, la tolérance du Rituximab est bonne, comme le confirme la très large expérience dans les lymphomes avec plus de 300 000 patients traités.

Les effets indésirables les plus fréquents sont une intolérance (malaise, fièvre, frissons, céphalées, hypotension) qui est observée dans plus de la moitié des cas lors de la 1^{ère} perfusion. Ces symptômes s'améliorent en ralentissant le débit de perfusion et ils tendent à disparaître lors des perfusions ultérieures.

Les authentiques réactions allergiques sont théoriquement possibles, soit immédiates (anaphylactiques), soit retardées, mais elles sont très rares. La relation entre ces accidents et l'apparition d'anticorps anti-chimériques est possible sans être formellement établi (70).

Malgré la déplétion majeure en lymphocytes B périphériques, le taux d'immunoglobulines n'est pas significativement modifié dans les lymphomes, sauf cas particulier. Il faut signaler la baisse majeure des IgM dans des myélomes traités par Rituximab après autogreffe de

cellules souches (83). Dans les maladies auto-immunes, différentes études montrent des résultats variables difficiles à interpréter. Dans certaines études consacrées à la polyarthrite rhumatoïde, il y a un petit contingent (de l'ordre de 10%) de sujets qui ont développé une hypogammaglobulinémie significative qui porte sur les IgM et les autres isotypes (82). Dans les neuropathies à IgM, situation où le Rituximab est souvent utilisé seul (108, 109), ce sont surtout les IgM qui baissent. Leandro *et al* (101, 102) chez 6 patients atteints de lupus traités par Rituximab (2 x 500 mg), mais associé à du cyclophosphamide (2 x 750 mg) et des corticoïdes forte dose ont observé à 6 mois une baisse moyenne des IgG de 3,9 g/l (0-6,13). Comme cela été suggéré dans d'autres observations, cette hypogammaglobulinémie semble plus fréquente en cas de traitement immunosuppresseur associé (85). Chez l'enfant souffrant d'une cytopénie auto-immune traitée par Rituximab, une hypogammaglobulinémie profonde et durable peut être observée (118). Cette hypogammaglobulinémie pourrait être favorisée par des traitements immunomodulateurs associés et par la répétition des cycles du Rituximab. Il se pourrait également qu'au cours des cytopénies auto-immunes de l'enfant, la fréquence des déficits immunitaires primitifs B soit plus importante, mais cela n'est pas démontré.

Le risque d'infection semble particulièrement faible, malgré la déplétion en lymphocytes B et ses conséquences, en particulier diminution de la réponse vaccinale (152). Chez l'adulte, au cours de lymphomes, seules quelques infections le plus souvent virales ont été observées. Des infections bactériennes plus sévères (pneumocoque...) peuvent être observées au cours de myélome dont le traitement par Rituximab a entraîné une baisse importante des Ig M (83). Chez l'enfant, des infections également virales (virus zona varicelle, entérovirus, ...) sont possibles ; elles sont peut-être un peu plus fréquentes que chez l'adulte sans que cela puisse être affirmé (118, 120, 121). Quelques observations « anecdotiques » de pneumocystose, d'infection par le parvovirus B19 ou par le virus de l'hépatite B ont été signalées (153, 154). Dans ce contexte, il faut rappeler le risque d'aggravation d'une virémie VHC dans les cryoglobulinémies mixtes traitées par Rituximab. Ce risque infectieux n'a pas encore été clairement évalué dans les maladies auto-immunes traitées par Rituximab.

Des neutropénies de causes diverses ont été observées sous Rituximab dans les lymphomes. Ces neutropénies peuvent être transitoires, mais il s'agit le plus souvent de neutropénies retardées survenant 1 à 5 mois après la dernière

perfusion de Rituximab. Leur prévalence semble variable (0,02 à 13 %) (70, 155). L'hypothèse la plus simple est celle d'une lyse des polynucléaires par la fixation du Rituximab sur leur Fc γ receptor membranaire (70). Néanmoins, il existe probablement des mécanismes dysimmunitaires comme le suggère dans certains cas l'apparition d'anticorps anti-neutrophiles et des perturbations immunitaires (lymphopénie, anémie hémolytique, hypogammaglobulinémie) attribuées à des modifications du répertoire B (155-157). Dans une neutropénie réfractaire aux facteurs de croissance survenue après une autogreffe suivie d'un traitement par Rituximab pour un lymphome B, l'efficacité de la cyclosporine suggère une myélotoxicité T-dépendante (158). Une autre hypothèse pourrait être l'apparition d'une population de LGL (large granular lymphocyte) myélotoxique, comme cela été observé dans des lymphomes B traités par l'association chimiothérapie et Rituximab dans un contexte d'allo ou d'autogreffe (159-161). La dernière hypothèse pour expliquer ces neutropénies pourrait être le relargage parfois important de TNF α potentiellement myélotoxique lors de la lyse tumorale (22). Pour l'instant, ce type de complication n'a pas été décrit dans les maladies auto-immunes sous Rituximab.

D'autres complications plus rares semblent également liées au syndrome de lyse tumorale et en particulier à la libération de TNF α (22). Récemment, deux observations de pneumopathie interstitielle (162) et une polyarthrite mimant une PR au cours d'une macroglobulinémie de Waldenström ont été décrites (163, 164).

Au total, malgré ces effets indésirables, le Rituximab semble particulièrement bien toléré chez l'adulte. En particulier, il a l'avantage de ne pas entraîner, sauf exception, d'immunosuppression profonde et prolongée, ce qui, au moins en théorie, réduit le risque d'infection et de néoplasie observé avec la plupart des immunosuppresseurs classiques. Reste à démontrer quelle sera la tolérance dans les maladies auto-immunes, mais les premiers indicateurs semblent très favorables.

Conclusion

Le Rituximab est une fantastique perspective thérapeutique qui pourrait être utilisée dans de nombreuses maladies auto-immunes, quelle soit ou non associée à des auto-anticorps pathogènes.

Dans un premier temps, il est impérativement nécessaire de faire un inventaire de l'expérience qu'ont déjà de nombreux centres dans l'utilisation de cette molécule dans les maladies auto-immunes. Pour cela, le CRI ([Club](#)

Rhumatisme et Inflammations) a lancé une enquête rétro et prospective depuis décembre 2003. Néanmoins, des études contrôlées s'imposent pour déterminer l'efficacité et la tolérance réelle de cette molécule. L'expérience récente de l'évaluation de l'infliximab dans le syndrome de Gougerot-Sjögren incite à valider impérativement nos pratiques, surtout quand elles concernent des thérapeutiques innovantes et coûteuses (Mariette *et al.* sous presse 162). L'avenir sera, peut-être à l'image des lymphomes, l'évaluation d'autres anticorps monoclonaux comme l'apratuzimab ou l'alentuzimab dirigés contres d'autres cibles du LB (CD22) (165-169)

Quoiqu'il en soit, notre expérience préliminaire suscite déjà un grand espoir, mais pose aussi de nombreuses questions passionnantes concernant « l'homéostasie » et le rôle des lymphocytes B dans les maladies auto-immunes.

Références

1. Weyand CM, Kurtin PJ, Goronzy JJ. Ectopic lymphoid organogenesis: a fast track for autoimmunity. *Am J Pathol* 2001; 159:787-93.
2. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 2001; 167:4710-8.
3. Shiokawa S, Matsumoto N, Nishimura J. Clonal analysis of B cells in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003; 32:12-8.
4. Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM et al. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nat Immunol* 2002; 3:360-5.
5. Maccioni M, Zeder-Lutz G, Huang H et al. Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 2002; 195:1071-7.
6. Matsumoto I, Lee DM, Goldbach-Mansky R et al. Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* 2003; 48:944-54.
7. Dorner T, Burmester GR. The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:246-52.
8. Mariette X, Roux S, Zhang J et al. The level of BlyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:168-71.
9. Stohl W, Metsyas S, Tan SM, Cheema GS, Oamar B, Xu D, Roschke V, Wu Y, Baker KP, Hilbert DM. B Lymphocyte stimulator Over expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* . 2003; 48: 3475-3486.
10. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, HE B, Schaffer A, Caing Sali P, Ceruti A Dendritic cells CD40-independent immunoglobulin class swichting through BlyS and APRIL. *Nature Immunol* 2002; 9: 822-9
11. Gorelik L, Cutler AH, Thill G et al. Cutting Edge: BAFF Regulates CD21/35 and CD23 Expression Independent of Its B Cell Survival Function. *J Immunol* 2004; 172:762-6.
12. Baker KP, Edwards BM, Main SH ET AL. Génération and characterization of lymphostat B, a monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulation. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3253-68
13. Chan OT, Shlomchik MJ. A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* 1998; 160:51-9.
14. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 1999; 189:1639-48.
15. Hayglass KT, Naides SJ, Scott CF Jr, Benacerraf B, Sy MS. T cell development in B cell-deficient mice. IV. The role of B cells as antigen-presenting cells in vivo. *J Immunol* 1986; 136:823-9.
16. Rivera A, Chen CC, Ron N, Dougherty JP, Ron Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int Immunol* 2001; 13:1583-93.
17. Ron Y, Sprent J. T cell priming in vivo: a major role for B cells in presenting antigen to T cells in lymph nodes. *J Immunol* 1987; 138:2848-56.
18. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 2001; 167: 4710-8
19. Gonzalez M, Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH, Noelle RJ. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *J Exp Med* 1998; 187:997-1007.
20. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002; 3:944-50.
21. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med* 2003; 197:489-501.
22. Bienvenu J, Chvetzoff R, Salles G et al. Tumor necrosis factor alpha release is a major biological event associated with rituximab treatment. *Hematol J* 2001; 2: 378-84.

23. Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:147-53.
24. Moulin V, Andris F, Thielemans K, Maliszewski C, Urbain J, Moser M. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J Exp Med* 2000; 192: 475-82.
25. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416:603-7.
26. Treon SP, Mitsiades C, Mitsiades N et al. Tumor Cell Expression of CD59 Is Associated With Resistance to CD20 Serotherapy in Patients With B-Cell Malignancies. *J Immunother* 2001; 24:263-271.
27. Gonzalez-Stawinski GV, Yu PB, Love SD, Parker W, Davis RD Jr. Hapten-induced primary and memory humoral responses are inhibited by the infusion of anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, Rituximab). *Clin Immunol* 2001; 98:175-9.
28. Looney RJ. Treating human autoimmune disease by depleting B cells. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:863-6.
29. Saville MW, Benyunes MC, Multani PS. No clinical evidence for CD4+ cell depletion caused by rituximab. *Blood* 2003; 102:408; author reply 408-9.
30. O'Keete TL, Williams Gt, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying CD20 gene disruption. *Immunogenetics* 1998; 48: 125-32
31. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 48:673-83.
32. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26:133-43.
33. Pedersen IM, Buhl AM, Klausen P, Geisler CH, Jurlander J. The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99:1314-9.
34. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 2003; 101:1045-52.
35. Semac I, Palomba C, Kulangara K et al. Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells. *Cancer Res* 2003; 63:534-40.
36. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, Thomas DA et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 102:3514-20.
37. Kennedy AD, Beum PV, Sliga MD, Dilillo DJ. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD 20 Loss in chronic lymphocytic leukemia. *J. Immunol.* 2004; 172: 3280-3288
38. Bohan SP, Troyanskaya OG, Alter O et al. Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1926-30.
39. Grillo-Lopez AJ. Rituximab: an insider's historical perspective. *Semin Oncol* 2000; 27(Suppl 12):9-16.
40. Villamor N, Montserrat E, Colomer D. Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2003; 30:424-33.
41. Treon SP, Raje N, Anderson KC. Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies. *Semin Oncol* 2000; 27:598-613.
42. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91:1644-52.
43. Selenko N, Maidic O, Draxier S et al. CD20 antibody (C2B8)-induced apoptosis of lymphoma cells promotes phagocytosis by dendritic cells and cross-priming of CD8+ cytotoxic T cells. *Leukemia* 2001; 15:1619-26.
44. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* 2002; 107:176-82.
45. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW 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* 2002; 99: 1038-43.
46. Alas S, Ng CP, Bonavida B. Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:836-45.
47. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW et al. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1466-71.
48. Cardarelli PM, Quinn M, Buckman D et al. Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51:15-24.

49. Weng WK, Levy R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; 98:1352-7.
50. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001; 98:3383-9.
51. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001; 98: 2771-7.
52. Van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hack CE, van Oers MH. Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br J Haematol* 2001; 115:807-11.
53. Manches O, Lui G, Chaperot L et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003; 101:949-54.
54. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000; 95:3900-8.
55. Treon SP, Shima Y, Grossbard ML, Preffer FI, Belch AR, Pilaski LM, Anderson KC. Treatment of multiple myeloma by antibody mediated immunotherapy and induction of myeloma selective antigens. *Ann Oncol*. 2000; 11 Suppl 1: 107-11
56. Donin N, Jurianz K, Ziporen L, Schultz S, Kirschfink M, Fishelson Z. Complement resistance of human carcinoma cells depends on membrane regulatory proteins, protein kinases and sialic acid. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:254-63.
57. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6:443-6.
58. Fossati G, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Differential role of neutrophil Fc gamma receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1351-61.
59. Hogarth PM. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:798-802.
60. Cartron G, Dacheux L, Salles G et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene. *Blood* 2002; 99:754-8.
61. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21:3940-7.
62. Farag SS, Flinn IW, Modali R, Lehman TA, Young D, Byrd JC. Fc gamma RIIIa and Fc gamma RIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003 [Epub ahead of print]
63. Anolik JH, Campbell D, Felgar RE et al. The relationship of Fc gamma RIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 455-9.
64. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol* 2000; 51:634-41.
65. DiGaetano N, Cittera E, Nota R et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol* 2003; 171:1581-7.
66. Kennedy AD, Solga MD, Schuman TA et al. An anti-C3b(i) mAb enhances complement activation, C3b(i) deposition, and killing of CD20+ cells by rituximab. *Blood* 2003; 101:1071-9
67. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003; 22:7359-68.
68. Van der Kolk LE, de Haas M, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, van Oers MH. Analysis of CD20-dependent cellular cytotoxicity by G-CSF-stimulated neutrophils. *Leukemia* 2002; 16:693-9.
69. Harjunpaa A, Wiklund T, Collan J et al. Complement activation in circulation and central nervous system after rituximab (anti-CD20) treatment of B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42:731-8.
70. Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA et al. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 2000; 18:3135-43.
71. Haidar JH, Shamseddine A, Salem Z et al. Loss of CD20 expression in relapsed lymphomas after rituximab therapy. *Eur J Haematol* 2003; 70:330-2.
72. Kennedy GA, Tey SK, Cobcroft R et al. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review *Br J Haematol* 2002; 119:412-6.

73. Foran JM, Norton AJ, Micallef IN, Taussig DC. Loss of CD 20 expression following treatment with rituximab (chimaeric monoclonal antiCD20) : a retrospective cohort analysis. *Br J Haematol* 2002; 118: 927.
74. Manshouri T, Do KA, Wang X et al. Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 2003; 101:2507-13.
75. Petrie RJ, Deans JP. Colocalization of the cell receptor and CD 20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J Immunol* 2002; 15: 2886-91.
76. Bladergroen BA, Meijer CJ, ten Berge RL et al. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 2002; 99: 232-7.
77. Rose AL, Forsythe AM, Maloney DG. Agranulocytosis unresponsive to growth factors following rituximab in vivo purging. *Blood* 2003; 101:4225-6.
78. Friedberg JW, Neuberg D, Gribben JG et al. Combination immunotherapy with rituximab and interleukin 2 in patients with relapsed or refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2002; 117:828-34.
79. Kimby E. Beyond immunochemotherapy: combinations of rituximab with cytokines interferon-alpha2a and granulocyte colony stimulating factor [corrected]. *Semin Oncol* 2002; 29(Suppl 6):7-10.
80. Berentsen S, Ulvestad E, Gjertsen BT et al. Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. *Blood* 2003 [Epub ahead of print]
81. Eisenberg R. Mechanisms of autoimmunity. *Immunol Res* 2003; 27:203-18.
82. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC et al. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2146-54.
83. LIM SH, Zhang V, Wang Z, Varadarajan R, Periman P, Esler WV. Rituximab administration following autologous stem cell transplantation for multiple myeloma is associated with severe Ig M deficiency. *BLOOD* 2004; 103: 1971-2
84. Manz RA, Radbruch A. Plasma cells for a lifetime? *Eur J Immunol* 2002; 32:923-7.
85. Kneitz C, Wilhem M, Tony HP. Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases. *Immunobiology*. 2002; 206: 519-27
86. Anolik JH, Barnard J, Carpione A, Pugh-Bernard A, Young f, LOONEY J, SANZ I. Effects of rituximab on B cells in Human SLE. *Arthritis Rheum* 2003;48, (suppl) S262 Abst 594
87. Reparón-Schuijt CC, Banesh WJ, Van Kooten C, Ezendam NP, Levarht EW, Breedveld FC et al. Presence of a population of CD20+, CD38- B lymphocytes with defective proliferation responsiveness in the synovial compartment of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2029-37
88. Edwards JC, Leandro MJ, Cambridge G. B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:824-8.
89. Patel DD. B cell-ablative therapy for the treatment of autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1984-5.
90. Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis Rheum* 2003; 48:1484-92.
91. Protheroe A, Edwards JC, Simmons A, MacLennan K, Selby P. Remission of inflammatory arthropathy in association with anti-CD20 therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Rheumatology* 1999; 38:1150-2.
92. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes *Rheumatology* 2001; 40:205-11.
93. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:883-8.
94. De Vita S, Zaja F, Sacco S, De Candia A, Fanin R, Ferraccioli G. Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2029-33.
95. Tuscano JM. Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab. *Arthritis Rheum* 2002; 46 : 3420, LB11.
96. Shaw T, Quan J, Totoritis MC. B cell therapy for rheumatoid arthritis: the rituximab (anti-CD20) experience. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 :ii55-9.
97. Emery P, Szczepanski L, Szechichinski J, Filipwicz-Sosnowska A, Edwards JC, Magrini F, Lehane PB, Shaw TH. Sustained efficacy at 48 weeks after single treatment course of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48 (Suppl) S439, Abst 1095
98. Eisenberg RS LE - Rituximab in lupus. *Arthritis Res Ther* 2003;5:157-9.
99. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001; 2:764-6.
100. Anolik JH, Campbell D, Ritchlin C, Holyst M, Rosenfeld S, Varnis C. B lymphocyte

- depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: phase I/II trial of rituximab (Rituxan) in SLE. *Arthritis Rheum* 2001; 44: Suppl9 S387
101. Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2673-7.
102. Leandro MJ, Edwards JCW, Isenberg D. An open study of B-lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2002; 41 (Suppl 1) : P18 (Abst).
103. Weide R, Heymanns J, Pandorf A, Koppler H. Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy. *Lupus* 2003; 12:779-82.
104. Fra GP, Avanzi GC, Bartoli E. Remission of refractory lupus nephritis with a protocol including rituximab. *Lupus* 2003; 12:783-7.
105. Perrotta S, Locatelli F, La Manna A, Cennamo L, De Stefano P, Nobili B. Anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) for life-threatening autoimmune haemolytic anaemia in a patient with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 2002; 116:465-7.
106. Merrill JT. Rituximab in antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5:381-2.
107. Levine TD, Pestronk A. IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab. *Neurology* 1999;52:1701-4.
108. Pestronk A, Florence J, Miller T, Choksi R, Al-Lozi MT, Levine TD. Treatment of IgM antibody associated polyneuropathies using rituximab. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:485-9.
109. Renaud S, Gregor M, Fuhr P et al. Rituximab in the treatment of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies. *Muscle Nerve* 2003; 27:611-5.
110. Czaplinski A, Steck AJ. Immune mediated neuropathies: an update on therapeutic strategies. *J Neurol* 2004; 251: 127-37.
111. Narang M, Penner JA, Williams D. Refractory autoimmune thrombocytopenic purpura: responses to treatment with a recombinant antibody to lymphocyte membrane antigen CD20 (rituximab). *Am J Hematol.* 2003; 74: 263-7
112. Stasi R, Pagano A, Stipa E, Amadori S. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001; 98:952-7.
113. Stasi R, Stipa E, Forte V, Meo P, Amadori S. Variable patterns of response to rituximab treatment in adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002; 99:3872-3.
114. Saleh MN, Gutheil J, Moore M et al. A pilot study of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in patients with refractory immune thrombocytopenia. *Semin Oncol* 2000; 27(Suppl 12):99-103.
115. Giagounidis AA, Anhu J, Schneider P et al. Treatment of relapsed idiopathic thrombocytopenic purpura with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: a pilot study. *Eur J Haematol* 2002; 69:95-100.
116. Patel K, Berman J, Ferber A, Caro J. Refractory autoimmune thrombocytopenic purpura treatment with Rituximab. *Am J Hematol* 2001; 67:59-60.
117. Heelan BT, Tormey V, Amlot P, Payne E, Mehta A, Webster AD. Effect of anti-CD20 (rituximab) on resistant thrombocytopenia in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br J Haematol* 2002; 118:1078-81.
118. Quartier P, Brethon B, Philippet P et al. Treatment of childhood autoimmune haemolytic anaemia with rituximab. *Lancet* 2001; 358: 1511-3.
119. Gottardo NG, Baker DL, Willis FR. Successful induction and maintenance of long-term remission in a child with chronic relapsing autoimmune hemolytic anemia using rituximab. *Pediatr Hematol Oncol* 2003; 20:557-61.
120. Motto DG, Williams JA, Boxer LA. Rituximab for refractory childhood autoimmune hemolytic anemia. *Isr Med Assoc J* 2002; 4: 1006-8.
121. Zecca M, Nobili B, Ramenghi U et al. Rituximab for the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in children. *Blood* 2003; 101:3857-61.
122. Shanafelt TD, Madueme HL, Wolf RC, Tefferi A. Rituximab for immune cytopenia in adults: idiopathic thrombocytopenic purpura, autoimmune hemolytic anemia, and Evans syndrome. *Mayo Clin Proc* 2003; 78:1340-6.
123. Zaja F, Iacona I, Masolini P et al. B-cell depletion with rituximab as treatment for immune hemolytic anemia and chronic thrombocytopenia. *Haematologica* 2002; 87:189-95. Erratum in: *Haematologica* 2002; 87:336.
124. Ahrens N, Kingreen D, Seltsam A, Salama A. Treatment of refractory autoimmune haemolytic anaemia with anti-CD20 (rituximab). *Br J Haematol* 2001; 114: 244-5.
125. Morselli M, Luppi M, Potenza L et al. Mixed warm and cold autoimmune hemolytic anemia: complete recovery after 2 courses of rituximab treatment. *Blood* 2002; 99:3478-9.
126. Layios N, Van Den Neste E, Jost E, Deneys V, Scheiff JM, Ferrant A. Remission of severe cold agglutinin disease after Rituximab therapy. *Leukemia* 2001; 15:187-8.

127. Lee EJ, Kueck B. Rituxan in the treatment of cold agglutinin disease. *Blood* 1998; 92:3490-1.
128. Sparling TG, Andricevic M, Wass H. Remission of cold hemagglutinin disease induced by rituximab therapy. *CMAJ* 2001; 164:1405.
129. Bauduer F. Rituximab: a very efficient therapy in cold agglutinins and refractory autoimmune haemolytic anaemia associated with CD20-positive, low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2001; 112: 1085-6.
130. Engelhardt M, Jakob A, Ruter B, Trepel M, Hirsch F, Lubbert M. Severe cold hemagglutinin disease (CHD) successfully treated with rituximab. *Blood* 2002; 100:1922-3.
131. Cohen Y, Polliack A, Zelig O, Goldfarb A. Monotherapy with rituximab induces rapid remission of recurrent cold agglutinin-mediated hemolytic anemia in a patient with indolent lympho-plasmacytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42:1405-8.
132. Berentsen S, Tjonnfjord GE, Brudevold R et al. Favourable response to therapy with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in primary chronic cold agglutinin disease. *Br J Haematol* 2001; 115: 79-83.
133. Pulik M, Genet P, Lionnet F, Touahri T. Treatment of primary chronic cold agglutinin disease with rituximab: maintenance therapy may improve the results. *Br J Haematol* 2002;117:998-9.
134. Mori A, Tamaru J, Sumi H, Kondo H. Beneficial effects of rituximab on primary cold agglutinin disease refractory to conventional therapy. *Eur J Haematol* 2002; 68:243-6.
135. Trape G, Fianchi L, Lai M, Laurenti L, Piscitelli R, Leone G, Pagano L. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for refractory hemolytic anemia in patients with lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 2003; 88:223-5.
136. Zheng X, Pallera AM, Goodnough LT, Sadler JE, Blinder MA. Remission of chronic thrombotic thrombocytopenic purpura after treatment with cyclophosphamide and rituximab. *Ann Intern Med* 2003; 138:105-8. Summary for patients in: *Ann Intern Med.* 2003;138: 138.
137. Wiestner A, Cho HJ, Asch AS et al. Rituximab in the treatment of acquired factor VIII inhibitors. *Blood* 2002; 100:3426-8.
138. Kain S, Copeland TS, Leahy MF. Treatment of refractory autoimmune (acquired) haemophilia with anti-CD20 (rituximab). *Br J Haematol* 2002; 119:578.
139. Somer BG, Tsai DE, Downs L, Weinstein B, Schuster SJ. Improvement in Sjogren's syndrome following therapy with rituximab for marginal zone lymphoma. *Arthritis Rheum* 2003; 49:394-8.
140. Shih WJ, Ghesani N, Hongming Z, Alavi A, Schusper S, Mozley D. F-18 FDG positron emission tomography demonstrates resolution of non-Hodgkin's lymphoma of the parotid gland in a patient with Sjogren's syndrome: before and after anti-CD20 antibody rituximab therapy. *Clin Nucl Med* 2002; 27:142-3.
141. Specks U, Fervenza FC, McDonald TJ, Hogan MC. Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2836-40.
142. Arzoo K, Sadeghi S, Liebman HA. Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 922-4.
143. Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, Brusegan V, Bontempelli M, Ruggenti P. Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet* 2002; 360:923-4. Erratum in: *Lancet* 2002; 360:2090.
144. Ruggenti P, Chiurciu C, Brusegan V et al. Rituximab in idiopathic membranous nephropathy: a one-year prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1851-7.
145. Cooper HL, Healy E, Theaker JM, Friedmann PS. Treatment of resistant pemphigus vulgaris with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab). *Clin Exp Dermatol* 2003; 28:366-8.
146. Dupuy A, Viguier M, Bedane C, Cordoliani F, Blaise S, Aucouturier F, Bonnetblanc JM, Morel P, Dubertret L, Bachelez H. Treatment of refractory pemphigus vulgaris with rituximab (anti-CD 20 monoclonal antibody). *Arch Dermatol* 2004; 140: 91-6
147. Wylam ME, Anderson PM, Kuntz NL, Rodriguez V. Successful treatment of refractory myasthenia gravis using rituximab: a pediatric case report. *J Pediatr* 2003; 143:674-7.
148. Zaja F, De Vita S, Mazzaro C et al. Efficacy and safety of rituximab in type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2003; 101:3827-34.
149. Sansonno D, De Re V, Lauletta G, Tucci FA, Boiocchi M, Dammacco F. Monoclonal antibody treatment of mixed cryoglobulinemia resistant to interferon alpha with an anti-CD20. *Blood* 2003; 101:3818-26.
150. Lamprecht P, Leringlozano, Merz H, Dennin RH, Gauze A, Voswinkel J, Peters SO, Gutzeit O, Arlt AC, Solbach W, Gross WL. Rituximab induces remission in refractory HCV associated cryoglobulinemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1230-3
151. Binstadt BA, Caldas AM, Turvey SE et al. Rituximab therapy for multisystem autoimmune diseases in pediatric patients. *J Pediatr* 2003; 143: 598-604.

152. Van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MH. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood* 2002; 100:2257-9.
153. Sharma VR, Fleming DR, Slone SP. Pure red cell aplasia due to parvovirus B19 in a patient treated with rituximab. *Blood* 2000; 96:1184-6.
154. Dervite I, Hober D, Morel P. Acute hepatitis B in a patient with antibodies to hepatitis B surface antigen who was receiving rituximab. *N Engl J Med* 2001; 344:68-9.
155. Chaiwatanatorn K, Lee N, Grigg A, Filshie R, Firkin F. Delayed-onset neutropenia associated with rituximab therapy. *Br J Haematol* 2003; 121:913-8.
156. Voog E, Morschhauser F, Solal-Celigny P. Neutropenia in patients treated with rituximab. *N Engl J Med* 2003; 348:2691-4; discussion 2691-4.
157. Jourdan E, Topart D, Richard B, Jourdan J, Sotto A. Severe autoimmune hemolytic anemia following rituximab therapy in a patient with a lymphoproliferative disorder. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:889-90.
158. Rose AL, Smith BE, Maloney DG. Glucocorticoids and rituximab in vitro: synergistic direct antiproliferative and apoptotic effects. *Blood* 2002; 100 :1765-73.
159. Stamatopoulos K. Neutropenia and Rituximab. *Blood* 2003 ; 102 : 1557-8
160. Papadaki T, Stamatopoulos K, Stavroyianni N et al. Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leuk Res* 2002; 26:597-600.
161. Papadaki T, Stamatopoulos K, Anagnostopoulos A, Fassas A. Rituximab-associated immune myelopathy. *Blood* 2003;102:1557-8.
162. Burton C, Kaczmarski R, Jan-Mohamed R. Interstitial pneumonitis related to rituximab therapy. *N Engl J Med* 2003; 348: 2690-1; discussion 2690-1.
163. Buda-Okreglak EM, Drabick JJ, Delaney NR. Proinflammatory syndrome mimicking acute rheumatoid arthritis in a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia treated with rituximab. *Ann Hematol* 2003 [Epub ahead of print].
164. Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 1999; 94:2217-24.
165. Mariette X, Ravaud Ph, Steinfeld S, Baron G, Goetz J, Hachulla E, Combe B, Puechal X, Pennel Y, Sauvezie B, Perdriger A, Hayem G, Janin A, Sibilia J. Absence of efficacy of infliximab in the trial of Remicade in primary Sjögren's syndrome (TRIPSS): randomized controlled trial. *Arthritis Rheum* 2004 (in press)
166. Carnahan J, Wang P, Kendall R et al. Epratuzumab, a humanized monoclonal antibody targeting CD22: characterization of in vitro properties. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3982S-90S.
167. Faderl S, Thomas DA, O'Brien S et al. Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 101:3413-5.
168. Leonard JP, Link BK. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with hLL2 (epratuzumab, an anti-CD22 monoclonal antibody) and Hu1D10 (apolizumab). *Semin Oncol* 2002; 29(Suppl 2):81-6.
169. Moreton P, Hillmen P. Alemtuzumab therapy in B-cell lymphoproliferative disorders. *Semin Oncol* 2003;30:493-501.