



Thèse

2015

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Prédicteurs d'infection chez de patients traités par rituximab pour des
maladies autoimmunes y compris la polyarthrite rhumatoïde

Lazarou, Ilias

How to cite

LAZAROU, Ilias. Prédicteurs d'infection chez de patients traités par rituximab pour des maladies autoimmunes y compris la polyarthrite rhumatoïde. Doctoral Thesis, 2015. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:78995

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:78995>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:78995](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:78995)



Section de médecine Clinique,

Département des Spécialités de Médecine

Service de Rhumatologie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Pierre-André Guerne

Prédicteurs d'infection chez de patients traités par rituximab pour des maladies
autoimmunes y compris la polyarthrite rhumatoïde

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine
par

Ilias LAZAROU

de
Grèce

Thèse n° 10786

Genève

2015

Lazarou I, Finckh A, Fischer L, Ribi C, Gascon D, Seebach JD, Guerne PA. *Low pre-treatment B-cell counts are not a risk factor of infection in patients treated with rituximab for autoimmune diseases: An observational study.* Joint Bone Spine. 2015 Dec 8. pii: S1297-319X(15)00249-3. doi: 10.1016/j.jbspin.2015.05.012

RESUME

Le rituximab (RTX) est de plus en plus utilisé chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (PR) et autres maladies autoimmunes systémiques (MAS). Souvent sa prescription est reportée ou complètement évitée en cas de lymphopénie B. Cette étude rétrospective de 161 patients traités par du RTX pour PR et autres MAS dans les Hôpitaux Universitaires de Genève visait à investiguer si le compte des LyB avant le traitement est prédictif du risque d'infection ultérieure et à identifier les facteurs de risque pour infection sévère.

L'incidence d'infections, leur type et les pathogènes étaient comparables à la littérature. Nous démontrons que le compte des LyB avant la perfusion de RTX (première ou ultérieure) n'est pas prédictif d'infections, confirmons le risque accru avec l'hypogammaglobulinémie (HR 2.36), l'âge (HR 1.03), le diabète (HR 3.61) et les MAS autres-que-la-PR (HR 4.68), ainsi que la survenue d'hypogammaglobulinémie au cours d'un traitement par RTX.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
I. LYMPHOCYTES B ET AUTOIMMUNITE.....	5
Introduction.....	5
Molécules de surface.....	5
Ontogénèse.....	5
Activation.....	7
Tolérance.....	7
Autoimmunité	8
II. RITUXIMAB	10
Traitement antilymphocytaire.....	10
Mécanisme d'action du rituximab	11
Indications.....	12
Autres traitements anti-CD20	13
III. SUJET DE L'ETUDE.....	15
Introduction.....	15
Rationnel.....	16
Patients et méthodes.....	17
Résultats.....	22
Discussion	31
IV. ETUDE	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUCTION.....	41
2. METHODS	42
2.1 Study design.....	42
2.2 Patients.....	43
2.3 Laboratory assays.....	44
2.4 Statistical analysis.....	44
2.5 Funding source.....	45
3. RESULTS.....	45
3.1 Patient characteristics.....	45
3.2 Rate of infections	48
3.2.1 Severe infections.....	50

3.2.2 Non-severe infections.....	52
3.3 Predictors of infection.....	52
4. DISCUSSION.....	56
V. CONCLUSION.....	64
VI. ABBREVIATIONS	64
VIII. REFERENCES.....	65

I. LYMPHOCYTES B ET AUTOIMMUNITE

Introduction

Les cellules souches hématopoïétiques (*Hematopoietic Stem Cells*- HSC) sont à l'origine de toute cellule sanguine et donc de la lignée lymphoïde (lymphocytes T, B et NK). Les lymphocytes B (LyB) sont notamment définis par la présence à leur surface d'immunoglobulines (Ig) transmembranaires.

Molécules de surface

Les Ig de surface des LyB sont identiques aux formes secrétées à l'exception d'une séquence d'acides aminés de la partie C terminale des chaînes lourdes H leur permettant de s'ancrer à la membrane cellulaire. Les Ig de surface jouent le rôle de protéines réceptrices d'antigène : le récepteur des LyB (*B cell receptor*- BCR) est composé, en dehors de cette Ig, d'un hétérodimère chargé de la transduction du signal (CD79a et CD79b) et il est caractérisé par une grande diversité, qui se traduit par la possibilité de reconnaître de nombreux antigènes différents. D'autres molécules sont aussi exprimées sur la surface dont l'expression dépend du stade de différenciation des LyB.

Ontogénèse

L'ontogénèse des lymphocytes B (LyB) peut être distinguée en deux phases en fonction de leur dépendance de la présence d'antigène. Ainsi, la première phase de différenciation, de HSC à

LyB, se déroule dans la moelle osseuse. Elle aboutit à la génération de LyB immatures exprimant à leur surface une Ig. La deuxième phase est par contre dépendante des antigènes du soi puis du non-soi au niveau des organes lymphoïdes secondaires et son produit final (les plasmocytes et les LyB à mémoire) constitue l'immunité humorale.

Schématiquement, les différents stades du développement des LyB avec leurs molécules de surface (liste non-exhaustive) (1) comprennent les :

- pré-pro-B (MHC class II, CD10, CD19, CD34) (2-4)
- pro-B (MHC class II, CD10, CD19, CD34, CD20, CD40) (5, 6)
- pré-B (MHC class II, CD19, CD20, CD21, CD34, CD40) (7, 8)
- LyB immature (MHC class II, CD19, CD20, CD21, CD23, CD32, CD35, CR1, CD40)

Les LyB immatures qui quittent la moelle osseuse sont sujets à la sélection périphérique (stade transitionnel). Ceux qui survivent expriment à leur surface une IgD ou une IgM, et peuvent être distingués davantage sur la base de la présence ou pas à leur surface du marqueur CD5 (9). Les LyB CD5⁻ sont impliqués dans la réponse humorale dépendante des LyT et sont appelés LyB folliculaires, ou conventionnels, ou B2 ; ils se trouvent dans la rate et les ganglions lymphatiques. Après activation ils peuvent se différencier en plasmocytes à IgM de courte durée de vie (dérivés des LyB non-folliculaires), en LyB à mémoire ou en plasmocytes à longue durée de vie. Les LyB CD5⁺ ou B1 (subdivisés en B1a et B1b) se rencontrent dans la zone folliculaire marginale de la rate et jouent un rôle dans la réponse humorale LyT-indépendante (10).

Activation

L'activation des LyB peut être médiée par le BCR ou induite par des signaux indépendants du BCR (mitogènes). Elle stimule leur prolifération ou leur apoptose, en fonction du stade de différenciation et du microenvironnement cellulaire, y compris les interactions des LyB B1b et B2 avec les LyT. Après stimulation, le LyB peut sécréter des IgM solubles alors que ses Ig membranaires disparaissent. Lorsque le LyB est activé par la voie du centre germinatif au sein des organes lymphoïdes secondaires, il subit une modulation de l'affinité de ses Ig pour l'antigène, grâce à des hypermutations somatiques des gènes codant les régions variables des Ig. La forte affinité de l'Ig du LyB pour son antigène résulte en une sélection positive et, finalement, à la commutation de classe, qui dépend également du microenvironnement : en présence de TGF- β p.ex. la commutation en classe IgA est favorisée (11).

Tolérance

La tolérance du soi par le système immunitaire est un état physiologique qui lui permet d'établir un équilibre entre la réactivité à une grande variété d'antigènes et la reconnaissance des éléments qui le constituent. Schématiquement cette tolérance est divisée en centrale et périphérique.

La tolérance centrale élimine les clones autoréactifs par l'édition des récepteurs d'antigène, la délétion clonale, l'anergie et l'ignorance clonale. Les clones autoréactifs qui y échappent sont contrôlés en périphérie par les mécanismes d'anergie (pour le cas de forte affinité du BCR pour un antigène soluble) et délétion (pour le cas de très forte affinité du BCR pour un antigène

membranaire). Les sites de ces processus sont le centre germinatif pour les LyB folliculaires et la rate pour les LyB transitionnels.

Autoimmunité

Les maladies autoimmunes systémiques (MAS) ont à leur origine une réponse autoimmune acquise ou adaptative médiée par des lymphocytes B et/ou T. Les interactions étroites entre ces lymphocytes jouent un rôle décisif dans la progression de l'autoimmunité à la maladie autoimmune (12). Les LyB autoréactifs contribuent en particulier à l'activation de LyT réactifs contre l'autoantigène original mais aussi contre d'autres antigènes ou épitopes liés à celui-ci. Par la suite les LyB, avec l'aide des LyT, augmentent leur affinité pour cet autoantigène, présentent plusieurs épitopes de l'antigène post-intériorisation, développent des mutations conduisant à d'autres auto-réactivités et diversifient leur fonction autoréactive par commutation d'isotype.

La première étape du passage de l'autoimmunité à la MAS est donc l'échec des mécanismes de tolérance centrale, avec passage d'un nombre accru de LyB autoréactifs en périphérie (13). Ce phénomène est plus important quand l'affinité du BCR pour l'antigène en question n'est pas forte (parce que les mécanismes de réédition du récepteur et de délétion ne seront pas efficaces) (13). Par analogie, il a été démontré que, quand le potentiel de signalisation du BCR est altéré par des mutations ou surexpression du CD19, les LyB autoréactifs ne sont pas éliminés et entrent dans la périphérie (14, 15). La présence de LyB autoréactifs en périphérie

ainsi que d'autoanticorps, précède donc souvent une MAS et augmente la probabilité d'en développer une (16-20), même si elle n'en est pas suffisante (21-26).

II. RITUXIMAB

Traitement antilymphocytaire

Ce type de traitement a progressé de la proposition théorique à la réalité entre 1997 et 1998 avec le rituximab (RTX). L'objectif, ambitieux, était de rétablir un certain degré de tolérance en interrompant le cercle vicieux d'une réaction immunopathologique maintenue en raison d'interactions inopportunes entre LyB et LyT. Le rationnel des thérapies antilymphocytaires B chez les patients souffrant de lupus érythémateux systémique (LES) et d'autres MAS est en fait complexe : diminution de la production des autoanticorps (et, par conséquent, inhibition des mécanismes dépendants des autoanticorps) mais aussi d'autres phénomènes médiés par les LyB comme la présentation d'antigènes, la production des cytokines pro-inflammatoires et l'activation des LyT (27). Le traitement anti-CD20 par du RTX est par exemple maintenant validé pour la polyarthrite rhumatoïde (PR) et les vasculites à anticorps antineutrophiles cytoplasmiques (ANCA), et le traitement anti-stimulateur de lymphocytes B (BLyS, également appelé BAFF et TNF SF-13) par bélimumab est indiqué pour le LES actif avec présence d'autoanticorps sous traitement de fonds. D'autres molécules ayant comme cibles les CD22, CD52 et le CD19 sont en cours d'investigations dans des études de phase III pour le LES (CD22), phase III pour la sclérose en plaques (CD52), phase II pour les cytopénies autoimmunes (CD52), et phase I pour la myosite à inclusions (CD52) (27). Le cas particulier des thérapies anti-CD19, qui présentent le bénéfice, au moins théorique, d'une déplétion plus ciblée, comparée à la thérapie anti-CD20, des plasmocytes et quelques pro- et pré-LyB, est actuellement étudié dans les hémopathies malignes à LyB (phase I/II).

Les anticorps monoclonaux anti-CD20 se classifient en type I et type II. Les traitements de type I, contrairement au type II, induisent la migration du CD20 dans des radeaux lipidiques, qui jouent un rôle de « plateforme » pour la signalisation cellulaire et le transport des récepteurs (28, 29). Les anti-CD20 de type I activent de manière très efficace une cytotoxicité dépendante du complément, alors que pour les anticorps de type II les mécanismes d'action sont plutôt la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et la mort cellulaire apoptotique (cf. prochaines sections). Il existe toutefois un chevauchement significatif entre ces mécanismes d'action des deux types d'anti-CD20. Il a été démontré in vitro que les anti-CD20 de type II sont au moins deux fois plus puissants que les type I pour induire une déplétion des lymphocytes B des patients avec LED et PR (30).

Mécanisme d'action du rituximab

Le RTX (MabThera[®], Rituxan[®]) est un anticorps monoclonal chimérique (murin/humain) de type I, qui se lie spécifiquement à l'antigène transmembranaire CD20. Il est constitué de domaines constants humains (IgG1Fck) ainsi que de domaines variables (chaînes lourdes et légères du fragment anti-CD20 murin IDEC-2B8, qui réagit avec le CD20 membranaire). Le CD20 ne s'internalise pas lors de la liaison de l'anticorps et n'est pas libéré de la membrane cellulaire ; il ne circule pas sous forme d'antigène libre dans le plasma et n'entre donc pas en compétition pour la liaison à l'anticorps.

Le RTX se lie à l'antigène CD20 des LyB et entraîne leur lyse. Les mécanismes de son action consistent en :

a. Une cytotoxicité dépendante du complément-CDC (31). La liaison RTX-CD20 entraîne la liaison de C1q et déclenche l'activation de la voie classique du complément. Le complexe d'attaque membranaire permet la lyse des LyB.

b. Une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps-ADCC (32, 33). Elle est médiée par des cellules « natural killer », monocytes et macrophages, qui sont recrutées à travers leur récepteur Fcγ lié au CD20 membranaire.

c. Une induction de l'apoptose (34).

Cette déplétion transitoire des LyB dure en moyenne 9-12 mois (35), mais peut être prolongée jusqu'à 24 mois (36) chez certains sujets.

Indications

Grâce à ses propriétés, le RTX est utilisé pour le traitement de certains types de lymphomes non-hodgkiniens d'une part, et plusieurs MAS d'autre part. Outre ses indications oncologiques, en Suisse le RTX est indiqué, en association avec le méthotrexate, dans le traitement de patients adultes atteints de PR active modérée à sévère, après échec d'un ou plusieurs traitements par des inhibiteurs du facteur de nécrose tumorale. Il est aussi approuvé, en combinaison avec des corticostéroïdes, pour le traitement des vasculites associées aux ANCA (granulomatose avec polyangéite ou maladie de Wegener et polyangéite microscopique) sévères actives.

En pratique, cependant, le RTX est souvent utilisé en dehors des indications enregistrées (« off-label ») (37), comme le lupus ou la sclérose systémique, surtout en cas de MAS réfractaire aux traitements de première ligne, en rechute ou menaçant le pronostic vital, ou en cas d'intolérance aux immunosuppresseurs classiques (38). De nombreuses revues et case-reports existent dans la littérature sur son efficacité dans les MAS autres que la PR ou les vasculites à ANCA (37, 39-42), mais les résultats des rares études contrôlées ne sont pas concluants, souvent en raison d'une puissance insuffisante, et/ou d'une conception inadéquate, en particulier en ce qui concerne le choix des paramètres d'évaluation et les traitements associés au rituximab/placebo.

Le plus souvent le RTX est administré, dans les indications non-oncologiques, en 2 doses de 1000mg à 2 semaines d'intervalle. La perfusion est précédée d'une prémédication de paracétamol, corticostéroïdes et antihistaminique. Selon l'indication ce cycle de traitement est répété, soit suite à la recrudescence des symptômes, soit selon un schéma « fixe » après quelques mois (d'habitude 6-12). Il n'existe à l'heure actuelle pas de consensus sur les modalités du traitement après le premier cycle.

Autres traitements anti-CD20

Il existe une panoplie d'anti-CD20 (rituximab, ofatumumab, ocrelizumab, obinutuzumab, tositumomab, ibritumomab tiuxetan). Les plus importants à mentionner sont :

Ofatumumab. Parmi les anticorps anti-CD20 de type I, citons l'ofatumumab, une molécule de deuxième génération complètement humanisée. L'ofatumumab exerce in vitro une activité CDC

plus puissante, probablement du fait de son affinité plus grande pour le CD20 et le recrutement plus énergique de C1q (43). Sa place exacte dans le traitement des hémopathies malignes est en cours d'investigation (44). En Suisse, il est utilisé pour la leucémie lymphoïde chronique (LLC) non précédemment traitée en association avec un traitement à base d'agents alkylants et la LLC récidivante ou réfractaire en monothérapie. Il existe quelques données sur la PR (45) (ofatumumab iv efficace contre placebo à 24 semaines chez des patients ne répondant pas au méthotrexate) et le lupus (un cas rapporté (46)).

Ocrelizumab, aussi une molécule de type I, comparé au RTX in vitro montre moins de CDC et plus d'ADCC. L'étude BELONG dans la néphrite lupique a été arrêtée prématurément en raison du nombre accru d'infections sévères (47). Des résultats similaires ont été obtenus dans la PR (48). Le fabricant a mis fin au programme de développement pour cette indication, afin de se concentrer sur la sclérose multiple.

Obinutuzumab. Cet anti-CD20 humain de type II (agissant donc plutôt par ADCC) est supérieur au rituximab et l'ofatumumab en ce qui concerne la déplétion lymphocytaire B in vitro et ex vivo (49). Il est approuvé par Swissmedic pour le traitement de la LLC non précédemment traitée en association avec le chlorambucil. Une étude de phase II est en cours pour la néphrite lupique (NCT02550652).

III. SUJET DE L'ETUDE

Introduction

Le RTX est donc utilisé en rhumatologie comme traitement de troisième ligne dans la PR, dans les vasculites à ANCA, ainsi que hors indications. Ces populations sont souvent gravement malades et exposées fréquemment à de lourds traitements immunosuppresseurs préalables, ce qui soulève des craintes par rapport à l'augmentation du risque infectieux suite à la déplétion des LyB, en particulier du risque d'infection sévère. Cet effet indésirable rend impérative l'estimation du rapport risque-bénéfice de ce traitement onéreux.

Le taux d'infections sévères chez ces patients traités par du RTX varie selon les méthodes d'évaluation utilisées et les indications de la thérapie au RTX. Dans la PR, une méta-analyse d'essais randomisés contrôlés a montré une incidence d'infections sévères de 2.3% comparé à 1.5% chez les patients sous placebo (50). Dans le registre français des PR traitées par du RTX l'incidence s'élevait même à 5% par année (51). Dans les études randomisées contrôlées chez les patients avec MAS autres que la PR, le risque d'infection sévère par année peut s'élever jusqu'à 14.1% (52-56). On ne sait toutefois pas clairement si ces résultats sont extrapolables à la pratique clinique, où les patients souffrent souvent de comorbidités avec impact potentiel sur la fonction immunitaire, et reçoivent des traitements immunosuppresseurs conventionnels ou biologiques prolongés et souvent combinés. Le risque accru d'infection sévère chez les patients traités par RTX pour des MAS autres que la PR est néanmoins confirmé dans des études observationnelles de cohorte, allant jusqu'à 22.5/100 patients-années (39, 41, 42, 57-59).

Ces études ont cherché à identifier des facteurs de risque additionnels pour les infections sévères. Bien qu'il existe des incertitudes sur ce point (39, 42), les facteurs de risque reconnus sont l'hypogammaglobulinémie, l'âge, certaines comorbidités, y compris les maladies cardiorespiratoires chroniques et le diabète, les manifestations extra-articulaires de la PR et l'immunosuppression concomitante.

Rationnel

La typisation lymphocytaire par cytométrie de flux avant le traitement semble peu utile pour la prédiction de réponse au RTX dans la PR (60). Dans la pratique et notre expérience, les médecins demandent cependant souvent une typisation lymphocytaire et sont parfois réticents à introduire du RTX si les LyB sont anormalement bas.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de consensus sur la nécessité d'attendre ou pas la remontée des LyB circulants à des valeurs normales. Le fait d'attendre, si ce n'est pas nécessaire, risque théoriquement d'imposer aux patients des délais de traitement susceptibles de permettre à la maladie de se réactiver et d'éventuellement entraîner des lésions irréversibles. Ce risque est d'autant plus grand que souvent les effets d'une cure de RTX ne se déploient pleinement qu'après plusieurs semaines à mois de latence. Inversement, si le fait de ne pas attendre la restauration d'un nombre normal de LyB augmente significativement le risque infectieux, cela devrait être connu afin de ne pas exposer dangereusement des patients déjà fragiles à des infections sévères. En outre, il n'est pas exclu que la situation soit variable en fonction des pathologies traitées, compte tenu de possibles différences dans la répartition tissulaire

différentes du pool des LyB, le reste du status immunitaire ou les thérapies concomitantes utilisées. A notre connaissance, personne n'a à ce jour systématiquement étudié si le taux de LyB au moment du traitement était corrélé au risque infectieux.

Face à cette incertitude, nous avons donc décidé d'entreprendre ce projet en revoyant tous les patients des services de Rhumatologie et d'Immunologie-Allergologie des Hôpitaux Universitaires de Genève traités par RTX pour une PR ou autre MAS, en analysant la survenue d'infections sévères au décours du traitement et, surtout, les facteurs prédisposants.

Patients et méthodes

Conception de l'étude. Il s'agit d'une étude monocentrique, de cohorte historique des patients traités par RTX pour une PR ou une autre MAS entre 2002 et 2012 dans les Services de Rhumatologie et Immunologie-Allergologie des Hôpitaux Universitaires de Genève. Les données épidémiologiques, cliniques et biologiques ont été récoltées au moment de la première cure de RTX ainsi que chaque fois qu'elles étaient disponibles, en ce qui concerne les valeurs de laboratoire telles que le compte des LyB et le taux des Ig, à travers le dossier électronique et des questionnaires. Le médecin traitant et le rhumatologue privé du patient ont également été contactés pour fournir des informations supplémentaires sur la survenue des infections pendant le suivi.

L'approbation du Comité d'éthique a été obtenue (HUG REC11-186). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé écrit avant leur inclusion dans l'étude. Comme spécifié dans le

protocole, toutes les infections sévères ont été déclarées à l'Institut Suisse des Produits Thérapeutiques (Swissmedic).

L'étude a été soutenue par une bourse de recherche sans restriction de Roche. Roche n'était pas impliquée dans la conception, l'élaboration du protocole, la récolte des données, ou l'analyse statistique de l'étude.

Dans un premier temps nous avons dépisté dans les archives des Services de Rhumatologie et d'Immunologie-Allergologie tous les patients qui ont reçu un traitement de RTX. Nous avons également contacté les collègues des HUG qui administrent ce type de traitement pour des indications non-oncologiques, comme par exemple les Services de Neurologie, Néphrologie et Dermatologie, afin d'inclure leurs patients dans notre dépistage. Aucun patient supplémentaire n'a cependant pu être recruté ainsi. Tous les patients jugés éligibles lors de ce dépistage ont par la suite été contactés par l'investigateur principal ou l'infirmière de recherche clinique, soit par téléphone, soit lors de leur prochain rendez-vous dans les HUG, après l'aval du médecin en charge.

Pour des raisons pratiques, nous avons créé deux bases de données, une pour chaque Service. Elles étaient complétées par deux collaborateurs avec les données facilement accessibles à travers le dossier électronique et le dossier papier des HUG. Par la suite, la qualité de toutes ces données a été assurée par un deuxième contrôle effectué par l'investigateur principal, qui a aussi complété les données manquantes. Afin d'améliorer la puissance de l'étude, les patients ont été interrogés quant à la survenue d'infections éventuelles depuis le début de leur traitement par RTX ainsi que la poursuite éventuelle de ce traitement hors HUG. Dans ce

dernier cas, le rhumatologue traitant a été contacté pour fournir des informations supplémentaires sur les doses, dates, contrôles biologiques et effets secondaires.

La plupart des infections définies comme sévères (cf. infra) ont abouti à une hospitalisation dans notre établissement. Deux patients ont été hospitalisés pour des infections sévères dans d'autres cliniques à Genève ou dans d'autres cantons. Dans ces cas, ainsi que dans les cas où une infection non-sévère a été rapportée par le patient, le médecin traitant et/ou le rhumatologue ont été contactés. Ainsi, les données biologiques et les détails du traitement immunosuppresseur au moment de l'infection ont été obtenus. Avec l'accord des patients, les rhumatologues installés ont été invités par écrit à fournir des informations, même quand le patient ne rapportait pas d'infection.

Enfin, les bases des données complétées ont été anonymisées et l'analyse statistique effectuée par un collaborateur qui n'était pas impliqué dans la récolte des données.

Les critères d'évaluation principaux étaient l'occurrence d'une infection sévère (c.à.d. nécessitant un traitement antibiotique parentéral et/ou une hospitalisation et/ou aboutissant à une invalidité ou le décès) et d'une infection non-sévère (c.à.d. nécessitant un traitement antibiotique). La période à risque a été définie comme le temps-sujet entre la première perfusion de RTX et la dernière visite ou le décès. Dans l'analyse primaire nous n'avons donc pas restreint la fenêtre « à risque » à une période particulière, étant donné que les effets du RTX peuvent être prolongés chez certains patients. En accord avec les recommandations de l'EULAR sur le rapport des données de sécurité des registres des traitements biologiques (61), nous avons cependant réalisé plusieurs analyses de sensibilité ultérieures avec variation de la

durée de cette période « à risque » de 6, 12 et 18 mois après la dernière perfusion de RTX. L'indicateur d'intérêt primaire était le compte absolu des LyB avant les perfusions (premières ou suivantes) évalué par cytométrie de flux. La déplétion complète des LyB était définie comme une valeur de CD19 inférieure à 0.01×10^9 cellules/L; la lymphopénie B comme une valeur inférieure à 90×10^6 cellules/L. Un taux d'IgG plasmatique supérieure à 7g/L est considéré comme normal (valeurs dérivées d'une population des donneurs de sang aux HUG +/- 2 DS).

Patients. Les patients inclus étaient âgés de >18ans, portaient un diagnostic de PR ou d'une autre MAS, et ont reçu un traitement par du RTX dans les Services de Rhumatologie et Immunologie clinique et Allergologie des HUG entre 2002 et 2012. L'indication au RTX avait été posée par le médecin en charge du patient. Les patients chez qui aucune typisation lymphocytaire n'avait été réalisée étaient exclus de l'étude.

Cytométrie en flux. Les populations lymphocytaires étaient énumérées par cytométrie de flux du sang périphérique dans de l'EDTA en utilisant des tubes TruCOUNT™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) et une procédure « *lysed-not-washed* ». Les anticorps monoclonaux utilisés étaient : CD45-PerCP, CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PE, CD16-CD56-PE and CD19-APC de Becton Dickinson. Les cellules étaient analysées par un FACS Calibur 4-Color (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Le logiciel BD Multiset™ calculait automatiquement les sous-populations cellulaires.

Dosage des immunoglobulines. Les taux d'IgG, IgA et IgM étaient mesurés par néphélométrie (BN ProSpec, Siemens, Marburg, Germany).

Analyse statistique. Nous avons comparé les caractéristiques des patients qui ont développé une infection sévère pendant le suivi avec celles des patients qui n'en ont pas développé, en utilisant des statistiques descriptives standards. L'incidence d'infections sévères était calculée comme le nombre d'évènements par 100 patients-années. Le temps-jusqu' à-infection était analysé à l'aide du modèle Anderson-Gill. Le temps-jusqu' à-infection brut a été analysé à l'aide de courbes de survie Kaplan-Meier. Nous avons investigué la relation entre les infections et de multiples prédictors potentiels (âge, sexe, diagnostic, durée de la maladie, dose cumulée de RTX, dose de corticostéroïdes, utilisation d'immunosuppresseurs, comorbidités, qui comprenaient les maladies oncologiques traitées par chimiothérapie et/ou radiothérapie, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale, le syndrome néphrotique, l'insuffisance hépatocellulaire, la splénectomie, l'infection à VIH, les immunodéficiences primaires, les hémoglobinopathies et les cathéters centraux, et valeurs de laboratoire telles que comptes des neutrophiles, lymphocytes, LyB, le taux IgG, IgA, IgM et la créatinine). Les résultats sont exprimés comme *hasard ratio* (HR) avec 95% d'intervalle de confiance (IC). Afin d'analyser les associations indépendantes entre les infections et les expositions d'intérêt, nous avons appliqué un modèle multivarié proportionnel Cox, en ajustant pour des facteurs de confusion potentiels, comme diabète et autres maladies chroniques, MAS, prescription concomitante de corticostéroïdes et immunosuppresseurs, âge et sexe. Toutes les valeurs $p < 0.05$ étaient considérées comme significatives. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel STATA Version 12.0 (StataCorp LP, College Station, TX).

Résultats

Caractéristiques des patients. En tout, 168 patients étaient éligibles ; trois ont refusé d'y participer et quatre étaient exclus en raison de données manquantes. Les 161 patients restant représentaient 722 perfusions de RTX entre mars 2002 et décembre 2012. Quarante-sept (53%) patients souffraient de PR et les autres 75 (47%) d'une autre MAS, principalement de connectivites et vasculites. Les données démographiques sont présentées à la Table 1.

Le suivi moyen était de 2.4 ans (médiane 2.0 ; interquartile (IQR) 0.90 – 3.4). Onze décès ont été rapportés lors du suivi ; quatre étaient dû à une infection. Deux patients sont décédés d'une pneumonie, un d'une candidémie et un d'une infection intraabdominale.

Comorbidités. Quatre (12%) des patients qui ont présenté une infection sévère étaient diabétiques, par rapport à 9 (7%) patients du groupe sans infection sévère ($p=0.339$). D'autres comorbidités étaient présentes dans 10 (30%) des patients du groupe infection sévère et dans 18 (14%) du groupe sans infection sévère ($p = 0.028$). Ces comorbidités comprenaient les maladies oncologiques traitées par chimiothérapie et/ou radiothérapie, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale, le syndrome néphrotique, l'insuffisance hépatocellulaire, la splénectomie, l'infection à VIH, les immunodéficiences primaires, les hémoglobinopathies et les cathéters centraux. Sept (8.1%) et 12 (13.9%) des patients avec PR étaient diabétiques ou souffraient d'une autre maladie chronique respectivement. Dans le groupe non-PR (autre MAS), 6 (8%) étaient diabétiques et 23 (30.7%) portaient un des autres diagnostics susmentionnés.

Taux d'infections. En tout, 162 infections ont été enregistrées pendant le suivi dont 61 (38%) sévères et 101 (62%) non-sévères. Le taux d'incidence de toute infection était 19.2/100

patients-années dans le groupe PR et 62.8/100 patients-années dans le groupe MAS ($p < 0.001$). Le temps -jusqu' à-infection médian était de 1.8 ans (IQR 0.6 – 2.9) avec un temps-jusqu' à-infection médian de 4 ans (IQR 1.6 – 6.9) pour le groupe PR et 0.8 ans (IQR 0.3 – 2.1) pour le groupe autre MAS. Le temps moyen jusqu'à l'infection depuis la dernière perfusion de RTX était de 5 mois (IQR 2 – 12). La durée de la maladie, le suivi moyen, la dose cumulée de RTX, l'utilisation des corticostéroïdes, la dose de corticostéroïdes et la prescription d'autres immunosuppresseurs n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes.

Table 1. Caractéristiques des 161 patients avec maladies autoimmunes traitées par du rituximab

	Infection sévère n = 33	Pas d'infection sévère n = 128	Valeur p bilat.
Âge moyen, ans (IQR)	56.7 (39.5-71.5)	52.4 (42-62)	NS
Femmes, no. (%)	26 (78.8)	99 (77.3)	NS
Durée médiane de maladie, ans (IQR)	2.8 (0.8-8.8)	6.3 (2.2-13.6)	NS
Suivi moyen, ans (IQR)	2.7 (1.5-4.3)	2.3 (0.9-3.3)	NS
Diagnostic (%)			
PR	8 (24.2)	78 (60.9)	<0.001
LED	3 (9.1)	23 (17.9)	NS
Vasculite primaire	8 (24.2)	7 (5.5)	0.001
Syndrome de Sjögren	3 (9.1)	9 (7.0)	NS
Myopathie inflammatoire	2 (6.1)	2 (1.6)	NS
Autre¶	7 (27.3)	9 (7.0)	NS
Dose de RTX moyenne cumulée* en mg/m ² (IQR)	1658 (1188-2368)	1919 (1198-3223)	NS
Co-thérapies			
Corticostéroïdes, no. (%)	26 (78.8)	85 (66.4)	NS
Dose médiane de prednisone en mg (IQR)	17.5 (5-40)	7.5 (0-20)	0.025
Immunosuppresseurs, no. (%)	26 (78.8)	97 (75.8)	NS
Comorbidités			
Diabète, no. (%)	4 (12.1)	9 (7.0)	NS
Autre, no. (%)	10 (30.3)	18 (14.0)	0.028
Valeurs de laboratoire médianes (IQR)			
Neutrophiles, cellules/mm ³	5300 (3180-8760)	5060 (3530-6910)	NS
Lymphocytes, cellules/mm ³	1302 (765-1807)	1734 (1258-2620)	0.004
B-lymphocytes, cellules/mm ³	180 (82-185)	181.5 (117-294)	NS
IgG, gm/l	10.2 (7.0-12.0)	11.4 (9.2-13.7)	NS
IgA, gm/l	2.4 (1.8-3.5)	2.5 (1.8-3.6)	NS
IgM, gm/l	0.9 (0.4-1.6)	1.2 (0.9-1.8)	NS
Creatinine, µmol/l	68 (60-78)	66.5 (57-77)	NS

IQR, interquartile; NS, non-significatif ; PR, polyarthrite rhumatoïde ; LED, lupus érythémateux disséminé

* Au moment de la première infection versus dernière observation chez les patients sans infection

¶ Syndrome des anticorps antiphospholipides (n=1), maladie de Still de l'adulte (n=1), connective indifférenciée (n=3), syndrome de Schnitzler (n=1), encéphalite auto-immune (n=2), myasthénie (n=2), déficit en facteur XIII auto-immun (n=1), polyneuropathie inflammatoire chronique demyélinisante (n=2), neuromyéélite optique (n=1), glomérulonéphrite membraneuse (n=2), méningite chronique lymphocytaire (n=1), purpura thrombocytopénique idiopathique (n=1)

Infections sévères

Le taux d'incidence des infections sévères était 5.9/100 patients-années chez les patients avec PR, comparé à 24.9 pour les autres MAS ($p < 0.001$). Le temps-jusqu' à-infection-sévère médian était 4.8 ans (IQR 1.6 - ∞) ; pour le groupe PR il était de 6.9 ans (IQR: 6.1- ∞) et 2.8 ans (IQR: 0.76- ∞) pour les autres MAS. Ces infections sévères sont survenues dans les 6 mois suivant la dernière perfusion de RTX dans 69% des cas, dans les 12 mois dans 76%, et dans les 18 mois dans 87%. Les infections sévères les plus fréquentes étaient les pneumonies (37.7%), les bactériémies (19.67%), et les infections intraabdominales (14.75%) -Table 2. Un agent pathogène commun a été identifié dans 32 cas (52.46%) (*Escherichia coli* [n=6], *Staphylococcus aureus* [n=3], *Streptococcus pneumoniae* [n=2], *Klebsiella pneumoniae* [n=2], *Stenotrophomonas maltophilia* [n=2], *Staphylococcus epidermidis* [n=2], *Candida albicans* [n=2], *Varicella Zoster Virus-VZV* [n=2] et autres [n=11]). Six infections opportunistes ont été observées : deux pneumocystoses, survenues à deux et trois mois de la dernière perfusion du deuxième cycle de RTX, une nocardiose à quatre mois du premier cycle, une tuberculose pulmonaire trois mois après le huitième cycle, une méningite tuberculeuse à six semaines de la dernière perfusion du premier cycle et un cas d'aspergillose invasive six mois après la première perfusion de RTX.

Infections non-sévères

Les infections non-sévères sont survenues dans les 6 mois suivant la dernière perfusion de RTX dans 60% des cas, dans les 12 mois dans 80% et dans les 18 mois dans 92%. Elles impliquaient la peau et les tissus mous (27.72%), les poumons (25.74%), les voies respiratoires supérieures (17.82%), l'appareil génito-urinaire (16.83%) et l'abdomen (11.88%) (Table 2). Un pathogène a été identifié dans 46 (45.54%) des cas (HSV-1 [n=11], Escherichia coli [n=8], VZV [n=6], Candida albicans [n=6], Hélicobacter pylori [n=3], HSV-2 [n=2], Influenza virus [n=2] et autres [n=8]). Il est intéressant de souligner que les virus du groupe d'herpès étaient responsables de 19 des 28 (67.85%) infections de la peau et des muqueuses.

Table 2. Site des infections observées lors du suivi des patients traités par du rituximab.

	Infection sévère n = 61	Infection non-sévère n = 101
Respiratoire supérieur	-	18 (17.82%)
Respiratoire inférieur	23 (37.70%)	26 (25.74%)
Urogénitale	6 (9.83%)	17 (16.83%)
Abdominale	9 (14.75%)	12 (11.88%)
Peau et tissus mous	5 (8.20%)	28 (27.72%)
Système nerveux central	2 (3.27%)	-
Septicémie	12 (19.67%)	-
Ostéomyélite - arthrite	3 (4.91%)	-
Syphilis	1 (1.65%)	-

Prédicteurs d'infection. La lymphopénie B au moment de toute perfusion de RTX (et indépendamment du cycle) n'était pas associée à un risque augmenté d'infection sévère (HR ajusté 0.55, IC 0.059-5.126). En général, aucune valeur-seuil des LyB n'a été prédictive des infections sévères, qu'il s'agît à la première perfusion (adj HR 0.99, IC 0.997-1.002, p=0.95) ou du dernier contrôle pour les perfusions suivantes (adj HR 0.99, IC 0.989-1.004, p=0.46). Ces résultats ont été reproduits également pour toute infection, sévère et non-sévère. Néanmoins, les patients qui ont développé une lymphopénie B après traitement, à n'importe quel moment du suivi, avaient une tendance à présenter des infections sévères plus souvent que les patients non-lymphopéniques (adj HR 2.9, IC 0.993-8.483, p=0.052) et avaient aussi significativement plus d'infections globalement (adj HR 1.64, IC 1.01-2.68, p=0.05).

Par ailleurs, nous avons détecté une association statistiquement significative entre les taux des IgG <7g/l et les infections sévères (adj HR 2.36, IC 1.22-4.54, p=0.01) ainsi que avec toute infection (adj HR 2.17, IC 1.09-4.29, p=0.026). En outre, plus le taux d'IgG était haut, plus bas était le risque d'infection sévère: pour les valeurs d'IgG en dessous de 7.2 g/l, chaque gramme par litre d'IgG supplémentaire était associée à une diminution de risque d'infection sévère de 8% (adj HR 0.92, IC 0.86-0.98; p=0.01). Les taux d'IgG diminuaient au fil du temps chez les patients traités à répétition par RTX, lentement (0.31 g/l/an [95% IC 0.53 – 0.1]) mais de manière significative (p=0.005). Le risque d'infection sévère par quartile d'IgG et les courbes de survie sans infection de Kaplan-Meier en fonction du taux d'IgG sont illustrés dans la Figure 1. Les mêmes résultats pour les infections sévères et non-sévères confondues sont illustrés dans la Figure 2.

D'autres prédicteurs significatifs pour les infections sévères étaient un diagnostic autre que PR (autre MAS) (adj HR 4.68, IC 2.11-10.39, $p < 0.001$), l'âge (adj HR 1.03, IC 1.01-1.05, $p = 0.01$) et le diabète (adj HR 3.61, IC 1.33-9.82, $p = 0.01$); la présence d'une comorbidité n'en était pas.

En ce qui concerne les infections sévères et non-sévères confondues, les prédicteurs étaient: un diagnostic autre que PR (adj HR 3.47, IC 2.25-5.33, $p < 0.001$), l'âge avancé (adj HR 1.02 par année, IC 1.01-1.04, $p = 0.005$), une comorbidité autre que le diabète (adj HR 4.19, IC 1.48-11.89, $p = 0.007$) et le diabète (adj HR 5.51, IC 1.45-20.95, $p = 0.012$). Les analyses de sensibilité en utilisant de différentes définitions de la période « à risque » après le RTX (cf. *Patients et méthodes – Conception de l'étude*) ont démontré une tendance similaire, ce qui confirme que ces résultats sont robustes.

Figure 1. Risque d'infection sévère par quartile d'IgG et courbes de survie sans infection de Kaplan-Meier en fonction du taux d'IgG.

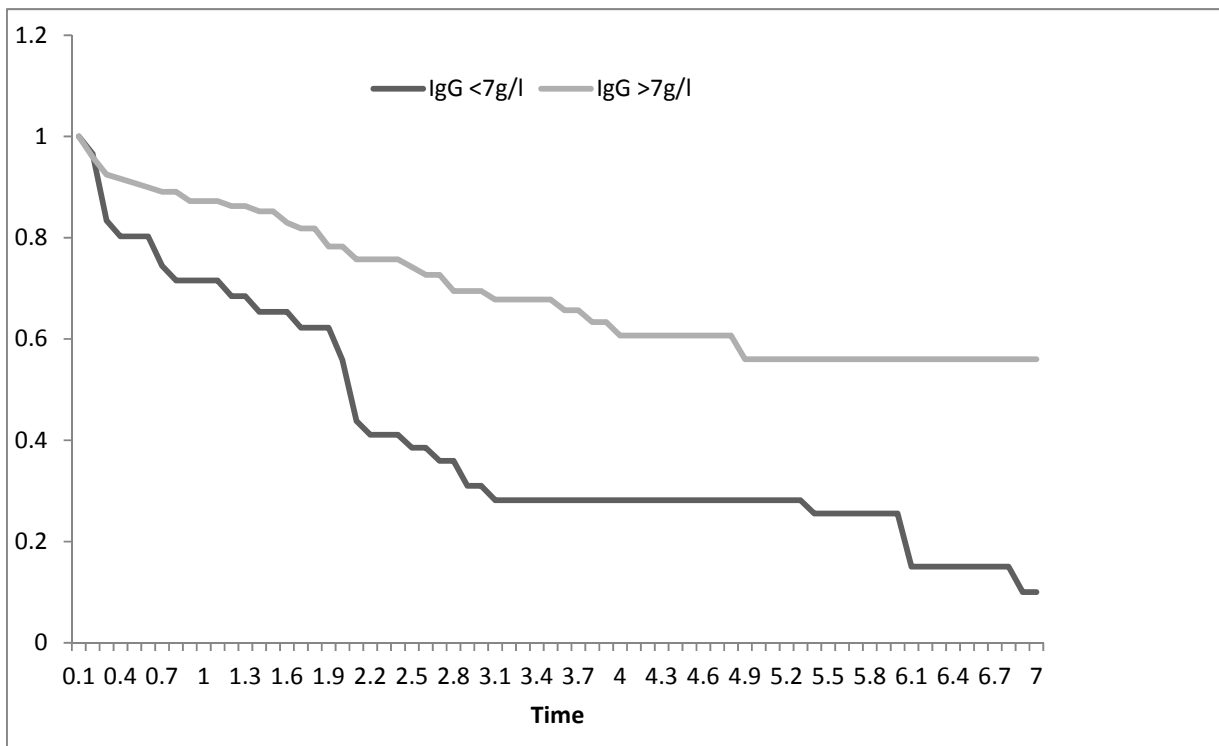
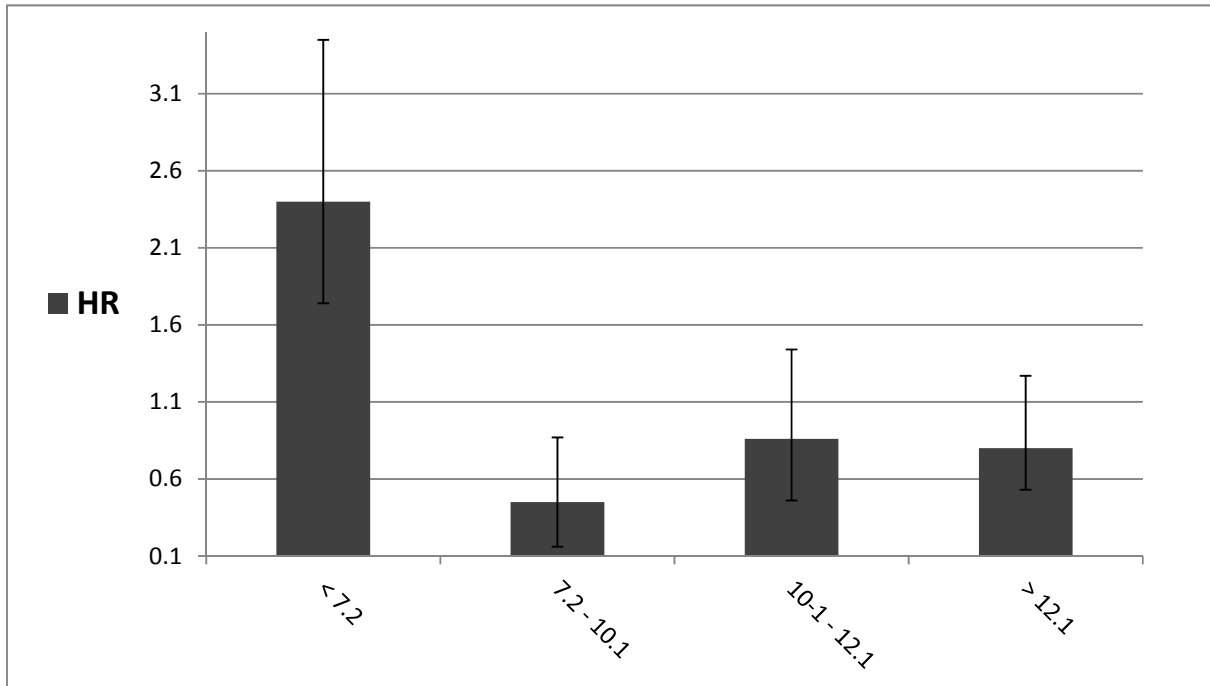
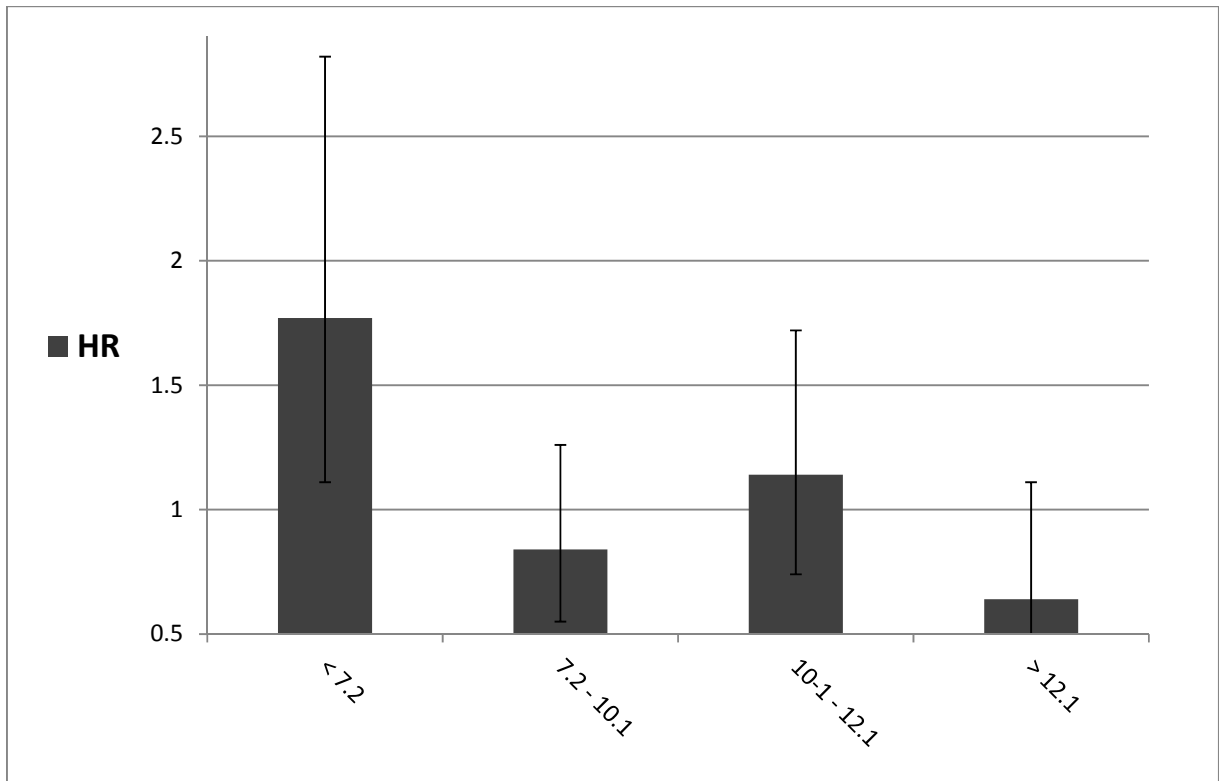


Figure 2. Risque d'infection de toute sévérité par quartile d'IgG



Discussion

Dans cette étude observationnelle, nous avons tout d'abord investigué l'association entre les comptes des LyB et les infections dans une population de patients traités par du RTX pour PR ou une autre MAS. Nous avons démontré que la lymphopénie B avant le traitement ne permet pas de prédire la survenue d'infections sévères et non-sévères. En cohérence avec les résultats d'autres études, nous avons confirmé dans notre population un risque accru d'infection sévère chez les patients âgés (39, 42), chez ceux qui présentent un taux d'IgG bas (42, 51), et portent un diagnostic de MAS autre que la PR (39, 41, 42, 51, 55). Contrairement à certaines données publiées, nous n'avons pas trouvé d'association statistiquement significative entre les infections sévères et les cardiopathies ou pneumopathies chroniques (51), les cycles multiples de RTX (39) ou les corticostéroïdes à haute dose (42). De plus, il n'existait pas d'association entre la dose cumulée de RTX et les infections.

Un des mécanismes postulés pour cette observation, qui vient d'une étude dans une population de patients avec PR réfractaire qui sont arrivés à une rémission complète prolongée avec un schéma fixe de RTX, est que la production d'autoanticorps est plus susceptible à la déplétion lymphocytaire B que la production d'anticorps protecteurs (36). Par ailleurs, dans la PR en tout cas, les LyB circulants reflètent probablement mal les taux de LyB dans les tissus, en particulier dans le tissu synovial et la moelle osseuse.

Le faible nombre de patients inclus dans les essais cliniques randomisés, leur courte durée et leur critères de sélection strictes ne permettent pas de détecter les effets indésirables rares. La période d'extension de ces études fournit des données à long terme avec toutefois le même

nombre des limitations et, en plus, l'absence de groupe-contrôle (souvent tous les participants reçoivent le traitement actif). Enfin, les études observationnelles (registres), indispensables à la pharmacovigilance, doivent être interprétées avec prudence en raison des biais et facteurs confondants, comme par exemple la prescription des biothérapies chez les patients les plus sévèrement malades ou -en revanche- la diminution du risque d'infection avec le temps résultante de l'exclusion des patients les plus malades ou de ceux qui s'infectent au fil du temps. Par conséquent, on manque de recul pour les biothérapies relativement récentes, comparées aux premiers anti-TNF α et la plupart des données dérivent des études randomisées et méta-analyses.

Dans la PR, une méta-analyse n'a pas montré d'augmentation globale du risque d'infection sévère avec le RTX avec toutefois une tendance non-significative pour les posologies les plus élevées (1000mg comparés à 500mg) (62). Les données à long terme du programme d'essais cliniques avec le RTX, avec un suivi de >11.000 patients-années, parlent d'une incidence de 3.94/100 patients-années (en diminution progressive avec le temps) (62, 63). Dans une étude américaine sur la PR, le risque global d'infection était plus bas avec le RTX comparé à l'infliximab (IFX), mais cette observation était inversée dans le sous-groupe des patients porteurs des risques d'infection sévère avant le traitement (64), ce qui ne sous-entend pas forcément une causalité mais pourrait être liée à des biais de sélection. En effet, le risque infectieux avec l'IFX comparé à d'autres anti-TNF α était plus élevé dans quelques études, éventuellement en raison d'un biais de déclaration, étant donné que les patients sous IFX sont vus plus souvent pour la perfusion que les patients sous traitement auto-administrés. Par conséquent, il n'est pas clair si cette différence entre le RTX et l'IFX est liée à une prescription

plus fréquente du RTX chez les patients à haut risque d'infection ou à une vraie différence de risque dû aux traitements.

Les données des études dans les autres indications varient (cf infra). Pour l'indication reconnue dans les vasculites, les études prospectives montrent un risque de 7% dans chacun des groupes RTX et cyclophosphamide (53, 56), qui était augmenté de presque 4 fois pour les traitements combinés (53).

Pour notre groupe PR, l'occurrence d'infections sévères 5.9/100 patients-années était comparable à celle rapportée dans les études randomisées contrôlées (4.1-12.6/100 patients-années, suivi jusqu'à 5 ans) (65-69) et les registres (39, 41, 42, 51, 58). Les données françaises de registre (population de PR comparable à la nôtre) montrent sur 1303 patients et 1629 patients-années de suivi un risque d'infection sévère de 5/100 patients-années dont 80% sont survenues les six premiers mois (51).

Une incidence d'infections sévères étonnamment élevée, de 24.9/100 patients-années, a été observée chez les patients non-PR. D'autres études montrent une incidence de l'ordre de 6.6 à 22.5/100 patients-années, la plus haute étant observée chez des patients vasculitiques (59). Des biais de sélection (maladie sévère, réfractaire, utilisation de corticostéroïdes et/ou autres immunosuppresseurs), la définition exacte de l'infection sévère et son application (y compris de la période à risque et un seuil d'hospitalisation possiblement plus bas dans notre institution) peuvent contribuer à ces différences. De manière cohérente, les quatre décès que nous avons observés sont survenus dans le groupe MAS non-PR. La sévérité de la maladie sous-jacente, les

doses des corticostéroïdes et la définition de l'infection sévère y compris de la période à risque pourraient aussi contribuer à ces différences.

Les infections sévères étaient principalement d'origine bactérienne (germes Gram négatifs et positifs) et, dans six cas, opportunistes. La survenue précoce de certaines des infections opportunistes suggère que les corticostéroïdes administrés à hautes doses juste avant la perfusion de RTX peuvent être -au moins partiellement- à l'origine de cette observation. Les infections opportunistes dans notre étude représentaient 9.8% des infections sévères (6/61). Les infections non-sévères étaient bactériennes ou virales, souvent herpétiques.

Globalement, ces résultats concordent avec ceux de la littérature (40, 42, 51). Seulement une petite minorité des études observationnelles précisent les sites des infections et/ou les pathogènes. Plus particulièrement, dans le registre français de PR traitée par RTX (51), un pathogène a été identifié dans 35,4% des cas et les pathogènes et les sites d'infection étaient comparables à ceux que nous avons observé (par ordre de fréquence respiratoire, cutané, urinaire, gastro-intestinal et ostéo-articulaire). Dans cette étude aucun cas de tuberculose n'a été rapporté, ce qui était le cas dans deux autres études de PR –un cas dans chacune (62, 63), ainsi que dans le registre espagnol (cf. infra). Il est à noter qu'une revue systématique et méta-analyse des études randomisées contrôlées et leur extension des maladies auto-immunes traitées par biothérapies et tofacitinib, n'a pas montré d'augmentation du risque de tuberculose avec le RTX. Il est intéressant de mentionner que les patients avec PR présentaient à la base un risque de tuberculose plus élevé même avec les traitements non-biologiques, comparés aux patients avec autres MAS, risque qui était accru par les biothérapies (70). Nous

avons observé deux cas de tuberculose, qui représentent 3,3% des infections sévères. Aucun cas d'encéphalopathie multifocale progressive n'a été diagnostiqué, mais la taille de l'échantillon et la rareté de cet effet secondaire (71) ne permettent pas de tirer des conclusions solides.

Parmi le 53% des cas d'infection sévère où le pathogène a été identifié dans le registre espagnol des biologiques (39), les auteurs rapportent deux cas de tuberculose (sur un nombre total de 24 infections) et une pneumocystose. Cependant, dans cette analyse tous les biologiques étaient confondus. La pneumocystose a été racontée relativement souvent chez des patients avec vasculite : un cas dans l'étude randomisée de Guillevin et al (72), 1/7 patients infectés de Knight et al (73), 2/29 infections de Pullerits et al (74), 1/30 infections de la série de Cartin-Ceba et al après l'arrêt de la prophylaxie (75) et 1/35 infections de Besada et al (57). Par ailleurs ces trois derniers papiers rapportent au total six infections sévères à des virus du groupe d'herpès (sur 94 infections). Malheureusement, on ne dispose pas suffisamment de données sur la prescription systématique ou pas de prophylaxie antibiotique contre la pneumocystose dans ces diverses études. Cependant, les recommandations françaises d'experts favorisent une prophylaxie par co-trimoxazol, aérosols de pentamidine ou atovaquone chez les patients vasculitiques surtout ceux ayant au moment de la première perfusion une lymphopénie CD4 profonde $<200/\text{mm}^3$ (Club Rhumatismes et Inflammations et (76)). Une telle prophylaxie n'est en revanche pas recommandée dans la PR. En Suisse, selon les recommandations de la Société Suisse de Rhumatologie, tous les patients doivent être vaccinés contre les pneumocoques tous les cinq ans et contre la grippe chaque année; les autres vaccinations du programme de l'OFSP doivent être mises à jour idéalement avant le début du traitement par RTX.

Comme dans la plupart des études observationnelles, non-interventionnelles, les données manquantes constituent une possible limitation de notre étude. Le nombre des informations sporadiques manquantes était cependant limité grâce à un système de santé centralisé dans notre région et aux enquêtes minutieuses, qui comportaient l'interrogation du patient, de son médecin traitant et de son rhumatologue privé, le cas échéant. Malgré tout, les infections sévères, mais surtout non-sévères peuvent avoir été sous-rapportées dans le contexte du suivi non-standardisé. En outre, en ce qui concerne le critère d'évaluation principal (les infections sévères), notre étude n'est possiblement pas assez puissante. Néanmoins, le fait qu'on a pu démontrer une association entre le taux bas d'IgG et les infections suggère que la puissance statistique de notre étude était suffisante pour détecter les facteurs prédictifs importants. Même si, chez les patients avec PR, l'incidence des infections était moindre que chez les patients avec autre MAS, nous n'avons pas de données systématiques sur les manifestations extra-articulaires chez nos patients avec PR, manifestations qui sont décrites comme étant associées à un risque accru d'infection sévère chez les patients traités par RTX (51). Notre définition de la période « à risque » est arbitraire, étant donné que le RTX n'est pas toujours administré à des intervalles fixes et que la repopulation en LyB prend occasionnellement beaucoup plus de temps que les 6 à 12 mois souvent rapportés (36).

Un des points forts de cette étude est qu'elle analyse une population de la vraie vie, indépendamment des comorbidités et les traitements antérieurs et concomitants. Les critères d'exclusion limités reflètent l'utilisation actuelle du RTX en Suisse pour le traitement de la PR, des vasculites à ANCA mais aussi des MAS en « hors indication ». Il est intéressant de souligner que seulement 51% de nos patients avec PR reçoivent le RTX en association avec le

méthotrexate, comme recommandé, une tendance qui est observée dans la littérature actuelle. En effet, dans les études publiées, cette combinaison varie entre 33 et 53% (51, 77). Contrairement aux données de la littérature, nous avons pu étendre la récolte des données à toutes les infections en plus des infections sévères, qui sont habituellement les seules rapportées. Nous avons démontré qu'un compte de LyB bas avant le traitement n'augmente globalement pas le risque d'infection et qu'un diagnostic autre que la PR, un taux bas d'IgG, un âge avancé et des comorbidités sont de facteurs de risque importants pour les infection sévères et non-sévères.

Dans notre cohorte, les cycles répétés de RTX diminuent le taux d'IgG plasmatique de 0.31g/l par an, ce qui suggère que les IgG doivent être surveillées chez les patients qui reçoivent ce traitement d'une manière prolongée. Chez les patients qui développent une hypogammaglobulinémie, un traitement alternatif ou une substitution en Ig intraveineuse devraient être discutées, surtout pour ceux qui ont un antécédent d'infection sévère, sont âgés, diabétiques et portent un diagnostic de MAS autre que la PR. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la fréquence optimale des contrôles des IgG chez les patients sous RTX et établir une valeur-seuil à laquelle l'arrêt de ce traitement devrait être discuté.

Dans notre service, les patients avec PR sont retraités par RTX soit sur la base d'un régime fixe (p.ex. tous les six mois), soit à la demande. Les attitudes sont encore plus variables pour les vasculites à ANCA et les indications « *off-label* » pour autres MAS. Il a été démontré que les LyB dans le sang périphérique avant la perfusion de RTX ne prédisent pas la réponse au traitement (et leur déplétion à deux semaines ne prédit pas le succès du traitement) dans la PR (60) et que

les LyB ne sont pas prédictifs des poussées de la maladie et restent indétectables dans 65% des poussées des vasculites à ANCA (78). Cette observation est d'autant plus importante que beaucoup de nos patients semblent présenter une poussée de leur maladie alors que leurs LyB sont toujours bas, même si notre étude n'a pas été conçue pour répondre à cette question. Ainsi, si le (re-) traitement par RTX est par ailleurs considéré comme indiqué, un compte bas de LyB ne doit pas constituer-en soi- une contraindication en ce qui concerne le risque d'infection sévère.

Globalement, l'évaluation du compte lymphocytaire B avant le RTX ne paraît pas permettre d'identifier les patients prédisposés à des infections sévères, et la lymphopénie B avant le RTX n'est pas associée aux infections dans cette population.

IV. ETUDE

Low pre-treatment B-cell counts are not a risk factor of infection in patients treated with rituximab for autoimmune diseases: an observational study

Ilias Lazarou¹, Axel Finckh¹, Lara Fischer², Camillo Ribi², Danielle Gascon¹, Jörg D. Seebach², Pierre-André Guerne¹

¹ Division of Rheumatology, University Hospital and Medical Faculty of Geneva, Geneva, Switzerland

² Division of Immunology and Allergology, University Hospital and Medical Faculty of Geneva, Geneva, Switzerland

Corresponding Author/ Reprint requests

Name/ Surname: Ilias N. Lazarou
Address: University Hospital of Geneva
Division of Rheumatology
26 avenue Beau-Séjour
1206 Geneva
SWITZERLAND
E-mail: Ilias.Lazarou@hcuge.ch
Telephone: +41 22 372 36 78
Fax: +41 22 372 35 30

Institution: University Hospital of Geneva
Division of Rheumatology
26, avenue Beau-Séjour
1206 Geneva
SWITZERLAND

ABSTRACT

Objectives. Rituximab (RTX) is increasingly used in patients with refractory rheumatoid arthritis (RA) and other severe autoimmune diseases (AID). In practice, many clinicians are reluctant to prescribe RTX in patients with low B-cell counts because of the presumed risk of infection. The aim of this study was therefore to investigate whether B-cell counts before treatment or retreatment with RTX predict the occurrence of infections.

Methods. Observational, single-centre study of 161 patients treated with RTX for RA and other AID at a tertiary hospital. CD19+ B-cell counts were assessed by flow cytometry and multivariate statistical analysis adjusted for various potential predictors was performed.

Results. The rate of severe infection was 5.9 /100 patient-years in RA patients and 24.9 in non-RA AID ($p < 0.001$). Low B-cell counts at the time of RTX infusion were not associated with subsequent severe (HR 0.55, $p = 0.60$) or overall infection (HR 0.85, $p = 0.58$). Significant pre-treatment predictors of severe infection were a diagnosis other than RA (HR 4.68, $p < 0.001$), immunoglobulin (Ig) G levels $< 7 \text{ gr/L}$ (HR 2.36, $p = 0.01$), age (HR 1.03, $p = 0.01$), and diabetes (HR 3.61, $p = 0.01$).

Conclusions. Low B-cell counts before RTX infusion did not predict subsequent infections in this population treated with RTX for RA and other AID, therefore not supporting the practice of pre-treatment assessment of B-cells. Nevertheless, a higher risk of severe infection was confirmed for low pre-treatment IgG levels, older age, diabetes, and AID other than RA.

Keywords: rituximab, rheumatoid arthritis, autoimmune disease, infection, B cells

1. INTRODUCTION

Rituximab (RTX) induces profound depletion of B-cells through complement-mediated mechanisms, antibody-dependent cellular cytotoxicity, and apoptosis (1, 2). RTX is currently licenced by the European Medicines Agency (EMA) and the US Food and Drug Administration (FDA) for use in anti-TNF α -refractory rheumatoid arthritis (RA) and severe anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA)-associated vasculitis. However, RTX is widely used off-label as an add-on therapy for a variety of other autoimmune diseases (AID) (3, 4), in particular for patients with severe refractory disease or intolerant to classical immunosuppressive regimens.

The risk of infection in patients treated with RTX depends on the criteria used for defining treatment-related infections and the indication for its use, i.e. hematologic malignancies versus AID (5). In RA, a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials has demonstrated an incidence of severe infections of 2.3% in patients treated with RTX compared to 1.5% in the placebo group (6), and data from the French registry revealed a rate of severe infections of 5/100 patient-years (7). Data from observational cohorts and randomized controlled trials generally show a higher risk in non-RA patients following RTX treatment, up to 22.5/100 patient-years (8-19). Recognised risk factors for severe infections in these populations included low immunoglobulin (Ig) G levels, older age, comorbidities, extraarticular RA involvement, and concomitant immunosuppressive therapy.

Assessment of circulating B-cell counts before treatment seems to be of limited clinical value for the prediction of response to RTX in RA (20). An open question, however, is the value of B-cell counts before treatment or retreatment with regards to the risk of infection. Many clinicians assess baseline counts before treatment or retreatment and seem reluctant to administer RTX if B-cells are decreased, due to the presumed risk of severe infections in these particularly vulnerable immunosuppressed patients with refractory RA and other AID. The aim of the present study was therefore to examine whether low circulating B-cell counts at the time of RTX infusion were associated or not with an increased risk of infection in a real-life setting.

2. METHODS

2.1 Study design

This was a tertiary-care, single-centre historical cohort study on a registry of all patients treated with RTX for RA and other AID over the past ten years in the Rheumatology and Immunology Divisions of the University Hospitals of Geneva. The clinical and laboratory data such as B-cell counts and immunoglobulins were collected at baseline and 12 months, prior to each RTX cycle, as well as whenever available during follow-up. Data on infections and conditions predisposing to infections were collected through electronic medical chart analysis and patient questionnaires. In addition, the primary care physicians and/or rheumatologists of each patient were contacted and provided information on the occurrence of infections during follow-up.

Institutional review board and Research Ethics Committee of the University Hospitals of Geneva approval (HUG REC11-186) was obtained for the study protocol and all

patients provided written informed consent prior to their inclusion in the study according to the Declaration of Helsinki. Severe infections were reported to the Swiss regulatory authorities for drug safety (Swissmedic).

Primary outcome was the occurrence of severe (requiring parenteral treatment or hospitalisation and/or leading to severe disability or death) and non-severe infection (requiring antimicrobial treatment). The “at-risk” period was defined as the person-time between patient’s first RTX infusion and either death or last visit. In the primary analysis, we did not restrict the “at-risk” window to a particular period (“ever at risk”), as the duration of effect with RTX may be much longer in certain patients. In accordance with the EULAR recommendations for reporting safety data of biologics registers (21), we performed several sensitivity analyses with varying duration of the “at-risk” window after the last RTX infusion (6, 12 or 18 months). Primary predictor of interest was the absolute B-cell count, assessed by flow cytometry before RTX treatment or retreatment. Complete B-cell depletion was defined as CD19-values below 0.01×10^9 cells/L, B-lymphopenia was defined as CD19-values below 90×10^6 cells/L and serum IgG levels above 7g/L are considered normal (95% CI) in the target population (data deriving from healthy blood donors).

2.2 Patients

Patients enrolled were aged >18 years, had a diagnosis of either RA or other AID, and were treated with RTX in the Rheumatology and Immunology Divisions of the University Hospitals of Geneva. The indication for RTX prescription was posed by the treating physician. Patients were excluded if no B-cell count assessment was performed.

2.3 Laboratory assays

Lymphocyte populations were enumerated by flow cytometry in EDTA-whole blood using TruCOUNT™ Tubes (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and a lysed-no-washed procedure. The following monoclonal antibodies were used: CD45-PerCP, CD3-FITC, CD4-APC, CD8-PE, CD16-CD56-PE and CD19-APC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Cells were analysed by a 4-Color FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using CD45 versus side scatter of complexity (SSC) gating. BD Multiset™ software automatically calculated subset absolute counts.

IgG, IgA and IgM were measured by nephelometry using BN ProSpec® nephelometer and reagents (Siemens, Marburg, Germany).

2.4 Statistical analysis

We compared the baseline characteristics of patients who developed a severe infection during follow-up with patients who did not, using standard descriptive statistics. The incidence of severe infections was calculated as events per 100 patient-years. Time-to-infection was analysed using a Cox proportional hazard model. Some patients developed multiple severe infections; to adjust for multiple infections within the same individuals, we analysed time-to-infection using a Cox proportional hazard model modified for the multiple failures (infections) per subject data (Anderson-Gill model). Crude time-to-infection was displayed using Kaplan-Meier survival curves. The relationship between severe (or any) infection and a variety of potential predictors (age, sex, diagnosis, disease duration, comorbidities, mean cumulative RTX dose, at-baseline and at-infection glucocorticoid use and dose, concomitant immunosuppressive therapy, such as methotrexate, leflunomide, azathioprine, cyclosporine A, tacrolimus,

cyclophosphamide, mycophenolate mofetil, and serum laboratory values, such as neutrophil, lymphocyte, and B-cell counts, IgG, IgA, IgM, and creatinine levels) was investigated. All results are expressed as adjusted hazard ratios (HR) with 95% confidence intervals (CI). To analyse the independent associations between our exposures of interest and incident infections, we performed a multivariate Cox proportional hazard model, adjusting for potential confounders, such as diabetes and other chronic diseases, AID other than RA, concomitant glucocorticoids use, concomitant immunosuppressive therapy, age and sex. The impact of laboratory parameters on RTX safety may vary between disease indications. We decided to pool data of patients treated with RTX in the different indications only if there was no effect modification (interaction) by diagnosis. All p-values < 0.05 (two-sided) were judged significant. Statistical analysis was performed using STATA® Version 12.0 software (StataCorp LP, College Station, TX).

2.5 Funding source

This project was partially funded by an unrestricted research grant from Roche.

3. RESULTS

3.1 Patient characteristics

A total of 168 patients were eligible for enrolment; three refused to participate and four were excluded because of missing data. The remaining 161 patients accounted for 722 RTX infusions. Eighty-six patients (53%) had RA and the remaining 75 (47%) had other AID, mainly connective tissue disorders and vasculitis. Mean follow-up was 2.4 years

(median 2.0; interquartile range (IQR) 0.90 - 3.4). Patients' baseline characteristics are detailed in Table 1.

Four (12%) patients who subsequently presented a severe infection were diabetic, compared to 9 (7%) patients without severe infection ($p=0.339$). Other chronic comorbidities predisposing to infections (malignancy treated by chemotherapy and/or radiotherapy, heart failure, chronic kidney failure, nephrotic syndrome, liver failure, splenectomy, HIV infection, primary immunodeficiency, haemoglobinopathy and indwelling catheters) were found in 10 (30%) of patients with severe infections compared to 18 (14%) without severe infections ($p = 0.028$). A similar trend was present when examining patient subgroups with RA and AID: seven (8.1%) and 12 (13.9%) of RA patients had diabetes and other comorbidities respectively. Among non-RA patients, 6 (8%) were diabetic and 23 (30.7%) had other comorbidities.

Table 1. Baseline characteristics of the study population

	RA N = 86	AID N = 75	Bilateral p value
Mean age in years (range)	56.9 (19-85)	54.5 (20-92)	NS
Sex, <i>n</i> (%)			
Male	22 (25.6)	14 (18.7)	NS
Female	64 (74.4)	61 (81.3)	
Median disease duration in years (IQR)	11 (6.5-19.5)	7 (3-11.3)	<0.001
Diagnosis, <i>n</i> (%)			
SLE	-	26 (34.7)	-
Primary vasculitis	-	15 (20)	-
Sjögren's syndrome	-	12 (16)	-
Inflammatory myopathy	-	4 (5.3)	-
Other [¶]	-	18 (24)	-
Concomitant therapy			
Systemic glucocorticoids, <i>n</i> (%)	50 (58)	61 (81.3)	0.002
Median prednisone dose in mg (IQR)	10 (5-20)	18.75 (10-40)	0.025
Immunosuppressants, <i>n</i> (%)	74 (86)	55 (73.3)	NS
Concomitant disease, <i>n</i> (%)			
Diabetes mellitus	7 (8.1)	6 (8)	NS
Other comorbidities	12 (13.9)	23 (30.7)	NS
Baseline laboratory values, median (IQR)			
Neutrophil, total count, cells/mm ³	5165 (3690-7020)	4925 (2980-6985)	NS
Lymphocyte, total count, cells/mm ³	1955 (1385-2703)	1420 (968-1990)	<0.001
B-cell count, cells/mm ³	228 (145-306)	139 (62-268)	0.002
B-lymphopenia (<90 cells/mm ³), <i>n</i> (%)	12 (14)	22 (29.3)	0.008
IgG, g/l	11.4 (9.05-13.8)	10.8 (8-13.7)	NS
IgG <7g/l, <i>n</i> (%)	9 (10.5)	7 (9.3)	NS
IgA, g/l	2.93 (2.07-3.96)	2.24 (1.42-1.97)	0.001
IgM, g/l	1.38 (0.93-1.75)	1.16 (0.6-1.83)	NS
Creatinine, μmol/l	65 (57-73)	68 (60-88)	0.005

IQR, interquartile range; NS, non-significant

[¶] Antiphospholipid antibody syndrome (n=1), adult-onset Still's disease (n=1), undifferentiated connective tissue disease (n=3), Schnitzler's syndrome (n=1), auto-immune encephalitis (n=2), myasthenia (n=2), auto-immune factor XIII deficiency (n=1), chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (n=2), neuromyelitis optica (n=1), membranous glomerulonephritis (n=2), chronic lymphocytic meningitis (n=1), idiopathic thrombocytopenic purpura (n=1)

3.2 Rate of infections

A total of 162 infectious events were recorded during follow-up in 75/161 patients, of which 61 (38%), occurring in 33 patients, were considered severe and 101 (62%), occurring in 42 patients, non-severe. Table 2 compares the baseline characteristics of these two patient groups.

The overall incidence rate of infection was 19.2/100 patient-years in RA patients compared to 62.8/100 patient-years in other AID ($p < 0.001$). The median time-to-any-infection since RTX initiation was 1.8 years (IQR: 0.6-2.9), with a median time-to-any-infection of 4 years (IQR: 1.6-6.9) for RA patients compared to 0.8 years for other AID (IQR: 0.3-2.1). The median time-to-any-infection since the last RTX infusion was 5 months (IQR 2-12).

Table 2. Comparison of baseline characteristics of patients who suffered severe infections versus patients who did not.

	Patients with severe infections N = 33	Patients without severe infections N = 128	Bilateral p Value
Mean age, years (IQR)	56.7 (39.5-71.5)	52.4 (42-62)	NS
Female patients, <i>n</i> (%)	26 (78.8)	99 (77.3)	NS
Median disease duration, years (IQR)	2.8 (0.8-8.8)	6.3 (2.2-13.6)	NS
Mean follow-up, years (IQR)	2.7 (1.5-4.3)	2.3 (0.9-3.3)	NS
Diagnosis (%)			
RA (<i>n</i> =86)	8 (24.2)	78 (60.9)	<0.001
SLE (<i>n</i> =26)	4 (12.1)	22 (17.1)	NS
Primary vasculitis (<i>n</i> =15)	8 (24.2)	7 (5.5)	0.001
Sjögren's syndrome (<i>n</i> =12)	3 (9.1)	9 (7.0)	NS
Inflammatory myopathy (<i>n</i> =4)	2 (6.1)	2 (1.6)	NS
Other (<i>n</i> =18)	8 (24.2)	10 (7.8)	NS
Mean cumulative dose* of RTX in mg/m ² (IQR)	1658 (1188-2368)	1919 (1198-3223)	NS
Concomitant therapy			
Systemic glucocorticoids, <i>n</i> (%)	26 (78.8)	85 (66.4)	NS
Median prednisone dose in mg (IQR)	17.5 (5-40)	7.5 (0-20)	0.025
Immunosuppressants, <i>n</i> (%)	26 (78.8)	97 (75.8)	NS
Concomitant disease			
Diabetes mellitus, <i>n</i> (%)	4 (12.1)	9 (7.0)	NS
Other comorbidities, <i>n</i> (%)	10 (30.3)	18 (14.0)	0.028
Baseline laboratory values, median (IQR)			
Neutrophils -total count, cells/mm ³	5300 (3180-8760)	5060 (3530-6910)	NS
Lymphocytes -total count, cells/mm ³	1302 (765-1807)	1734 (1258-2620)	0.004
B-cell count, cells/mm ³	180 (82-185)	181.5 (117-294)	NS
IgG, g/l	10.2 (7.0-12.0)	11.4 (9.2-13.7)	NS
IgA, g/l	2.4 (1.8-3.5)	2.5 (1.8-3.6)	NS
IgM, g/l	0.9 (0.4-1.6)	1.2 (0.9-1.8)	NS
Creatinine, μmol/l	68 (60-78)	66.5 (57-77)	NS

IQR, interquartile range; NS, non-significant

3.2.1 Severe infections

A total of 61 severe infections occurred in 33 patients. The incidence was 5.9 /100 patient-years in RA patients compared to 24.9 in other AID patients ($p<0.001$). The median time-to-severe-infection since RTX initiation was 4.8 years (IQR: 1.6- ∞); with median time-to-severe infection of 6.9 years (IQR: 6.1- ∞) for RA patients compared to 2.8 years for other AID (IQR: 0.76- ∞). The median time-to-severe-infection since the last RTX infusion was 4 months (IQR 1.375-12). Severe infections occurred within 6 months of the last RTX infusion in 69%, within 12 months in 76%, and within 18 months in 87% of patients. Most frequent severe infection sites (Table 3) were the lower respiratory tract (37.7%), the blood (septicaemia) (19.67%), and the abdomen (14.75%).

A pathogen was identified in 32 (52.46%) of the severe infections (*E.coli* [n=6], *S. aureus* [n=3], *S. pneumoniae* [n=2], *K. pneumoniae* [n=2], *S. maltophilia* [n=2], *S. epidermidis* [n=2], *C. albicans* [n=2], Varicella zoster virus-VZV [n=2], and other). There were 6 cases of opportunistic infections: two *Pneumocystis jirovecii* pneumonias occurring 2 and 3 months after the RTX infusion, respectively (both second cycles and both in patients not receiving prophylaxis), one case of nocardiosis 4 months after RTX, one case of pulmonary tuberculosis 3 months after the 8th cycle of RTX, one case of tuberculous meningitis 6 weeks after RTX, and one case of invasive aspergillosis 5 months after the first RTX infusion. Eleven deaths were recorded during follow-up; four were due to infections. Two patients died of pneumonia, one of candidemia, and one of abdominal infection.

Table 3. Site of the infections observed during follow-up in 161 patients treated with RTX.

	Severe infections <i>N</i> = 61	Non-severe infections <i>N</i> = 101
Upper respiratory tract	-	18 (17.82%)
Lower respiratory tract	23 (37.70%)	26 (25.74%)
Genitourinary tract	6 (9.83%)	17 (16.83%)
Abdomen	9 (14.75%)	12 (11.88%)
Skin and soft tissue	5 (8.20%)	28 (27.72%)
Central nervous system	2 (3.27%)	-
Septicaemia	12 (19.67%)	-
Bone and joint infection	3 (4.91%)	-
Syphilis	1 (1.65%)	-

3.2.2 Non-severe infections

Milder infections occurred in 42 patients, within 6 months of the last RTX infusion in 60%, within 12 months in 80%, and within 18 months in 92%. These infections involved the skin and soft tissues (27.72%), lower (25.74%) and upper respiratory systems (17.82%), genitourinary (16.83%) and abdominal (11.88%) tracts (Table 3). A pathogen was identified in 46 (45.54%) of these non-severe infections (HSV-1 [n=11], *E. coli* [n=8], VZV [n=6], *C. albicans* [n=6], *H.pylori* [n=3], HSV-2 [n=2], Influenza virus [n=2], among others). Interestingly, herpes group viruses accounted for 19/28 (67.85%) of all skin and mucous membranes infections.

3.3 Predictors of infection

B-lymphopenia at the time of any RTX cycle (first treatment or retreatment) was not associated with an increased risk of subsequent severe infection (HR 0.55, CI 0.06-5.13, p=0.60). In general, B-cell counts were not predictive of severe infections, whether measured at the time of the first RTX infusion (HR 0.99, CI 0.997-1.002, p=0.96), or subsequent cycles (HR 0.99, CI 0.989-1.004, p=0.46). The aforementioned results were also reproduced for all infections, i.e. severe and non-severe, analysed together (Table 4). We found no effect modification by diagnosis (i.e. of the effect of B-lymphopenia) on the incidence of infection (p= 0.44), thus we pooled the results across diagnoses.

Table 4. Predictors of infection in patients treated with Rituximab: (A) severe infections, (B) infections of any severity.

Variable	Severe infections			Overall infections		
	Hazard Ratio	P value	95% Confidence Interval	Hazard Ratio	P value	95% Confidence Interval
B-lymphopenia (before any infusion)	0.55	NS	0.06 - 5.13	0.85	NS	0.47 - 1.53
B-cell count (before first infusion)	0.99	NS	0.99 - 1.00	0.46	NS	0.13 - 1.71
B-cell count (before subsequent infusions)	0.99	NS	0.99 - 1.00	0.99	NS	0.99 - 1.00
Age	1.03	0.01	1.01 - 1.05	1.02	0.005	1.01 - 1.04
Female sex	0.82	NS	0.37 - 1.82	1.19	NS	0.28 - 4.98
Diabetes	3.61	0.01	1.33 - 9.82	5.51	0.012	1.45 - 20.95
Associated chronic disease	1.23	NS	0.55 - 2.75	4.19	0.007	1.48 - 11.89
Non-RA AID	4.68	<0.001	2.11 - 10.39	3.47	<0.001	2.25 - 5.35
Glucocorticoid use*	1.19	NS	0.52 - 2.71	0.97	NS	0.61 - 1.54
Immunosuppressant use*	1.19	NS	0.43 - 3.25	1.03	NS	0.63 - 1.68
IgG <7g/l (before any infusion)	2.36	0.01	1.23 - 4.54	2.17	0.026	1.09 - 4.29

* Baseline data. Qualitatively similar (i.e. non-significant) results were obtained when using data “at infection” for patients who presented an infection versus “last recorded data” for patients who did not.

AID, autoimmune disease; NS, non-significant; RA, rheumatoid arthritis

There was a significant association between pre-treatment IgG levels <7g/l and severe infections (HR 2.36, CI 1.23-4.54, p=0.01) (Figure 1), and with overall infections (HR 2.17, CI 1.09-4.29, p=0.026). Furthermore, the higher the IgG levels were, the lower the risk of severe infection: every additional gram per litre of IgG reduced the risk of infection by 8% (HR 0.92, CI 0.86-0.98; p=0.01). We further found a linear association between decreased serum IgG and iterative RTX infusions: with every successive RTX cycle, the average serum IgG level decreased by 0.31 g/l.

Other significant predictors of severe infections were diagnosis other than RA (HR 4.68, CI 2.11-10.39, p<0.001), older age (HR 1.03 per year of age, CI 1.01-1.05, p=0.01), and diabetes (HR 3.61, CI 1.33-9.82, p=0.01); comorbidities other than diabetes were not predictive of severe infection. Concomitant immunosuppression did not appear to have any additional effect -beyond the effect of the specific diagnosis- on the rate of infections (p=0.74).

Predictors of infection of any severity were similar: diagnosis other than RA (HR 3.47, CI 2.25-5.35, p<0.001), higher age (HR 1.02 per year of age, CI 1.01-1.04, p=0.005), diabetes (HR 5.51, CI 1.45-20.95, p=0.012), and other comorbid conditions (HR 4.19, CI 1.48-11.89, p=0.007).

Sensitivity analyses using different definitions of the “at risk” window after RTX (see *Materials and Methods, Study design*) failed to establish any relationship between B-cell counts and subsequent infection (Table 5), and demonstrated similar trends for the other variables (data not shown), enhancing the robustness of the results.

Table 5. Sensitivity analysis for various at-risk windows in patients treated with RTX for RA and other AID.

Variable	Ever at risk			18 months			12 months			6 months		
	HR	p	95% CI	HR	p	95% CI	HR	p	95% CI	HR	p	95% CI
B-lymphopenia (before any infusion)	0.85	NS	0.47 -1.53	0.99	NS	0.99 -1.00	0.99	NS	0.99 - 1.00	0.99	NS	0.99 - 1.00
B-cell count (before first infusion)	0.46	NS	0.13 - .71	1.00	NS	0.99 -1.00	1.00	NS	0.99 - 1.00	1.00	NS	0.99 - 1.00
B-cell count (before subsequent infusions)	0.99	NS	0.99 -1.00	0.99	NS	0.99 -1.00	0.99	NS	0.99 - 1.00	0.99	NS	0.99 - 1.00

The primary predictor of interest (B-cells) is shown when restricting infections at 18, 12, and 6 months or not at all. Whatever the time window, the results are qualitatively the same, i.e. non-significant.

AID, autoimmune disease; NS, non-significant; RA, rheumatoid arthritis

4. DISCUSSION

In this observational study we investigated the association of B-cell counts before RTX administration and infection in patients treated with RTX for RA and other AID, and demonstrated that B-cell count before treatment is predictive neither of severe nor of overall infections. In agreement with the results of other studies, we found a higher risk of severe infections for older age (10, 17), low IgG levels (7, 17), and AID other than RA(7, 10, 14, 16, 17, 22). In contrast to some published data, we did not find any significant association between severe infections and chronic heart or lung disease (7), or multiple RTX infusions (10). Furthermore, there was no apparent association between the cumulative dose of RTX and infections. However, this latter negative result might be due to an insufficient power of our study, as suggested by the fact that we were indeed able to show a significant correlation between cumulative dose of RTX and IgG levels on one hand and IgG levels and infections on the other hand.

One possible explanation for our observation that B-lymphopenia prior to RTX was not significantly associated with infections was recently put forward in a study of refractory RA patients achieving long-term remission with a fixed RTX regimen. The authors postulated that autoantibody production is more susceptible to B-cell depletion than protective antibody production (23). Another likely explanation is the fact that circulating B-cell levels probably reflect only poorly B-cell levels in the bone marrow, the synovia, and lymphoid tissues.

For RA patients treated with RTX, the rate of severe infections (5.9 /100 patient-years) was similar to that reported in randomized controlled trials (9, 11, 13-15) and registries (7, 10, 16-18). In non-RA patients, we observed a strikingly higher rate of severe

infections (24.9/100 patient-years) than in RA patients. Indeed, previous studies have shown incidence rates of up to 22.5/100 patient-years in this subgroup (8-19), the higher being observed in patients with vasculitis. Patient selection (severe, advanced, refractory disease leading to off-label use of RTX), different exposure to GC and/or other immunosuppressive agents, the different definition and application of “severe infection”, as well as the AID itself may account for the difference in the incidence of severe infections between RA and non-RA AID patients. In lupus, for instance, leukopenia may represent a risk factor of infections.

Severe infections were mainly of bacterial origin, with six cases caused by opportunistic pathogens including *Pneumocystis jirovecii*, underlining the importance of considering prophylaxis. Non-severe infections were of both bacterial and viral origin, mainly caused by Herpes viruses. These results are consistent with those of previous reports (7, 17, 24). Early occurrence of some of the opportunistic infections suggests that GC administered at high doses just before RTX infusions could be, at least partially, responsible. There was no case of progressive multifocal leukoencephalopathy, but the size of the sample and the rarity of this adverse effect (25) do not allow for any firm conclusion.

As in most observational studies, missing data constitutes a possible limitation of our study. However, the number of sporadically missing information was small, as a result of the centralised medical care system employed in our region and meticulous inquiries, including telephone interviews with treating physicians and patients. We used mean imputations for sporadically missing covariates. Nevertheless, non-severe infections may have been underreported, amongst others because they were defined as requiring

treatment, which inevitably excludes several viral infections. Besides, with regards to the main outcome (severe infections), our study may have been underpowered. However, the demonstration of an association between low IgG levels and infections suggests that we had enough statistical power to demonstrate important predictive factors. Even if RA seems to confer a lower risk of infection, we have no systematic data on extra-articular involvement, which has been shown to be associated with severe infections (7). Another limitation of our work is the absence of association of infections with disease activity, the latter not having been systematically recorded. As in most similar studies, our definition of the “at-risk” period for patients treated with RTX is arbitrary, as RTX is not always administered at fixed intervals, and B-cell repopulation occasionally takes much longer than the commonly reported period of 6 -12 months (23). Furthermore, we do not have data on B subpopulations’ or various B-cell compartments, as these analyses are not routinely performed in our institution. Finally, we have no data on the incidence of late-onset neutropenia in our population, a condition that occurs relatively infrequently after RTX but may present with infection (26-28).

One of the strengths of this study is the real-life profile of the study population regardless of potential differences in comorbidities, concomitant and previous treatments. The limited exclusion criteria thus reflect the current use of RTX in Switzerland for the licensed treatment of RA and ANCA-associated vasculitis, and the off-label treatment for other AID. Interestingly, only 51% of our RA patients were receiving RTX together with methotrexate (MTX) as recommended, a trend that is consistent with the current literature. Indeed, in previously published studies the

combination of RTX with MTX ranged from 33–53% (7, 29). However, RTX monotherapy for RA was rare in our patients (16%); most of them were on other immunosuppressants including leflunomide, azathioprine and/or mycophenolate mofetil.

An additional strength of this study is that we were able to extend data collection to all infections. The demonstration that low B-cell counts prior to RTX do not increase overall risk of infection, and that a diagnosis other than RA, low pre-treatment IgG levels, increasing age, and comorbidities are important risk factors for milder infections as well reinforces the data on the risk of severe infections.

Repeated RTX cycles reduce the serum IgG levels, requiring a regular monitoring of this established risk factor of infections. In patients who develop hypogammaglobulinaemia, interruption of RTX therapy or IVIg substitution is sometimes considered, especially in the case of previous recurrent infections, older age, diabetes, or AID other than RA. This strategy has been proven successful in primary immunodeficiencies (30). Nevertheless, there is no data to support that either strategy decreases the risk of infection. Further studies are needed to address that point and specify the optimal frequency of assessment of serum IgG levels in RTX-treated patients.

For re-treatment of RA patients with RTX, both fixed regimens and on-demand approaches are used in our institution. Attitudes vary, in particular, greatly for ANCA-associated vasculitis and off-label RTX use. It has been shown that baseline B-cell counts do not seem to predict response to RTX; their depletion at two weeks did not predict treatment success in RA in one study (20), but partial depletion was associated

with poorer EULAR and ACR20 response rates in another, recent, study (31), while B-cell counts did not predict disease flares and actually remained undetectable in 65% of ANCA-vasculitis flares (32). Many of our patients also appeared to suffer flares while their B-cell counts were still low. Thus, if RTX (re-)treatment is indicated according to the clinician's judgment, our results suggest that low B-cell counts should not represent a contraindication, as far as the risk of infections is concerned.

This observational study did not confirm concerns about a high risk of infection associated with low B-cell counts before treatment with RTX in patients with RA and other AID and therefore does not support the routine pre-treatment assessment of B-cell counts. Withholding RTX in these lymphopaenic patients does not seem to be justified if RTX is otherwise indicated. Future studies are needed to address the optimal monitoring of patients on RTX. As for now, caution is required for elderly, diabetic patients, or with a history of severe infections, an AID other than RA, and with low IgG levels.

CONFLICTS OF INTEREST

IL, LF, CR, DG, and JDS declare no competing interests. AF has received consulting fees from Roche, unrelated to this study. PAG has received consulting fees from Roche, Pfizer and Merck unrelated to this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mr Cherian Nishant for assistance with setting the database. We thank Mr Paul Thompson for his help in formatting the figures. We are grateful to Drs Barazonne, Bodmer, Thiebaud, Buchs, Christophe, Stingelin-Guerne, and Hunkeler for kindly

providing assistance with data collection. We acknowledge the support of Roche through an unrestricted research grant. We acknowledge the assistance of the Clinical Immunology and Allergology Laboratory and its director Dr Pascale Roux-Lombard.

REFERENCES

1. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant*. 2006;6:859-66.
2. Silverman GJ, Weisman S. Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48:1484-92.
3. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2009;9:10-25.
4. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Munoz S, Soto MJ. A systematic review of the off-label use of biological therapies in systemic autoimmune diseases. *Medicine*. 2008;87:345-64.
5. Gea-Banacloche JC. Rituximab-associated infections. *Seminars in hematology*. 2010;47:187-98.
6. Salliot C, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68:25-32.
7. 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 and rheumatism*. 2010;62:2625-32.
8. Besada E, Koldingsnes W, Nossent JC. Long-term efficacy and safety of pre-emptive maintenance therapy with rituximab in granulomatosis with polyangiitis: results from a single centre. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52:2041-7.
9. Dass S, Bowman SJ, Vital EM, Ikeda K, Pease CT, Hamburger J, et al. Reduction of fatigue in Sjogren syndrome with rituximab: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67:1541-4.
10. Diaz-Lagares C, Perez-Alvarez R, Garcia-Hernandez FJ, Ayala-Gutierrez MM, Callejas JL, Martinez-Berriotxo A, et al. Rates of, and risk factors for, severe infections in patients with systemic autoimmune diseases receiving biological agents off-label. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):R112.
11. Jones RB, Tervaert JW, Hauser T, Luqmani R, Morgan MD, Peh CA, et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *The New England journal of medicine*. 2010;363:211-20.
12. Knight A, Hallenberg H, Baecklund E. Efficacy and safety of rituximab as maintenance therapy for relapsing granulomatosis with polyangiitis-a case series. *Clinical rheumatology*. 2014; 33:841-8.
13. Meijer JM, Meiners PM, Vissink A, Spijkervet FK, Abdulahad W, Kamminga N, et al. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62:960-8.

14. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, Shanahan JC, Latinis KM, Oates JC, et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62:222-33.
15. Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *The New England journal of medicine*. 2010;363:221-32.
16. Terrier B, Amoura Z, Ravaud P, Hachulla E, Jouenne R, Combe B, et al. Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: results from 136 patients from the French AutoImmunity and Rituximab registry. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62:2458-66.
17. Terrier B, Launay D, Kaplanski G, Hot A, Larroche C, Cathebras P, et al. Safety and efficacy of rituximab in nonviral cryoglobulinemia vasculitis: data from the French Autoimmunity and Rituximab registry. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62:1787-95.
18. Tony HP, Burmester G, Schulze-Koops H, Grunke M, Henes J, Kotter I, et al. Safety and clinical outcomes of rituximab therapy in patients with different autoimmune diseases: experience from a national registry (GRAID). *Arthritis Res Ther*. 2011;13:R75.
19. Wendt M, Gunnarsson I, Bratt J, Bruchfeld A. Rituximab in relapsing or refractory ANCA-associated vasculitis: a case series of 16 patients. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2012;41:116-9.
20. Brezinschek HP, Rainer F, Brickmann K, Graninger WB. B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis Res Ther*. 2012;14:R161.
21. Dixon WG, Carmona L, Finckh A, Hetland ML, Kvien TK, Landewe R, et al. EULAR points to consider when establishing, analysing and reporting safety data of biologics registers in rheumatology. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69:1596-602.
22. Cobo-Ibanez T, Descalzo MA, Loza-Santamaria E, Carmona L, Munoz-Fernandez S. Serious infections in patients with rheumatoid arthritis and other immune-mediated connective tissue diseases exposed to anti-TNF or rituximab: data from the Spanish registry BIOBADASER 2.0. *Rheumatology international*. 2014 Jul;34:953-61.
23. Teng YK, Wheeler G, Hogan VE, Stocks P, Levarht EW, Huizinga TW, et al. Induction of long-term B-cell depletion in refractory rheumatoid arthritis patients preferentially affects autoreactive more than protective humoral immunity. *Arthritis Res Ther*. 2012;14:R57.
24. Ramos-Casals M, Garcia-Hernandez FJ, de Ramon E, Callejas JL, Martinez-Berriotxo A, Pallares L, et al. Off-label use of rituximab in 196 patients with severe, refractory systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28:468-76.
25. Palazzo E, Yahia SA. Progressive multifocal leukoencephalopathy in autoimmune diseases. *Joint Bone Spine*. 2012;79:351-5.
26. Abdulkader R, Dharmapalaiah C, Rose G, Shand LM, Clunie GP, Watts RA. Late-onset Neutropenia in Patients with Rheumatoid Arthritis after Treatment with Rituximab. *The Journal of rheumatology*. 2014;41:858-61.
27. Tesfa D, Ajeganova S, Hagglund H, Sander B, Fadeel B, Hafstrom I, et al. Late-onset neutropenia following rituximab therapy in rheumatic diseases: association with B lymphocyte depletion and infections. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63:2209-14.
28. Wolach O, Bairey O, Lahav M. Late-onset neutropenia after rituximab treatment: case series and comprehensive review of the literature. *Medicine*. 2010;89:308-18.
29. Soliman MM, Hyrich KL, Lunt M, Watson KD, Symmons DP, Ashcroft DM. Effectiveness of rituximab in patients with rheumatoid arthritis: observational study from the

British Society for Rheumatology Biologics Register. *The Journal of rheumatology*. 2012;39:240-6.

30. Cunningham-Rundles C. Key aspects for successful immunoglobulin therapy of primary immunodeficiencies. *Clinical and experimental immunology*. 2011;164 Suppl 2:16-9.

31. Vital EM, Dass S, Buch MH, Rawstron AC, Emery P. An extra dose of rituximab improves clinical response in rheumatoid arthritis patients with initial incomplete B cell depletion: a randomised controlled trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2014;0:1-7.

32. Miloslavsky E, Specks U, Stone JH, Grp RIR. Primary Endpoint Failure in the Rituximab in ANCA-Associated Vasculitis Trial. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64:S707-S.

V. CONCLUSION

Les résultats de notre étude ne soutiennent pas la nécessité de l'évaluation du nombre de LyB avant le traitement par RTX chez les patients avec MAS et PR, étant donné que les inquiétudes concernant le risque élevé d'infection chez les patients avec un taux de LyB circulants bas avant perfusion n'ont pas été confirmées. Il ne paraît ainsi pas justifié de priver ces patients de RTX, si ce traitement est par ailleurs indiqué. Les patients âgés, diabétiques, portant un diagnostic de MAS autre que la PR et qui ont un taux d'IgG bas doivent être traités avec prudence, surtout si ils ont des antécédents d'infection sévère. D'autres études sont nécessaires pour déterminer la fréquence optimale des contrôles des IgG pendant le traitement par RTX, et le taux minimal d'IgG permettant une protection raisonnable.

VI. ABBREVIATIONS

ADCC, antibody-dependent cellular toxicity; ANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; BAFF, B-cell activating factor; BCR, B-cell receptor; BLyS, B-cell stimulator; CDC, complement-dependent cytotoxicity; HSC, Hematopoietic Stem Cells; Ig, immunoglobuline; LES, lupus érythémateux systémique; LyB, lymphocyte B; LyT, lymphocyte T; MAS, maladies autoimmunes systémiques; PR, polyarthrite rhumatoïde; RTX, rituximab; TGF, Transforming growth factor

VIII. REFERENCES

1. Clark EA, Ledbetter JA. Structure, function, and genetics of human B cell-associated surface molecules. *Adv Cancer Res.* 1989;52:81-149.
2. Cossman J, Neckers LM, Arnold A, Korsmeyer SJ. Induction of differentiation in a case of common acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 1982;307(20):1251-4.
3. Nadler LM, Ritz J, Bates MP, Park EK, Anderson KC, Sallan SE, et al. Induction of human B cell antigens in non-T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 1982;70(2):433-42.
4. Shipp MA, Richardson NE, Sayre PH, Brown NR, Masteller EL, Clayton LK, et al. Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(13):4819-23.
5. Gauld SB, Dal Porto JM, Cambier JC. B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. *Science.* 2002;296(5573):1641-2.
6. He XY, Antao VP, Basila D, Marx JC, Davis BR. Isolation and molecular characterization of the human CD34 gene. *Blood.* 1992;79(9):2296-302.
7. Durie FH, Foy TM, Masters SR, Laman JD, Noelle RJ. The role of CD40 in the regulation of humoral and cell-mediated immunity. *Immunol Today.* 1994;15(9):406-11.
8. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today.* 1994;15(9):450-4.
9. Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol Today.* 1999;20(7):312-6.
10. Casali P, Notkins AL. Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:513-35.
11. Islam KB, Nilsson L, Sideras P, Hammarstrom L, Smith CI. TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol.* 1991;3(11):1099-106.
12. Salinas GF, Braza F, Brouard S, Tak PP, Baeten D. The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clin Immunol.* 2013;146(1):34-45.
13. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005;201(5):703-11.
14. Inaoki M, Sato S, Weintraub BC, Goodnow CC, Tedder TF. CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med.* 1997;186(11):1923-31.
15. Menard L, Saadoun D, Isnardi I, Ng YS, Meyers G, Massad C, et al. The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3635-44.
16. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349(16):1526-33.
17. Habib T, Funk A, Rieck M, Brahmandam A, Dai X, Panigrahi AK, et al. Altered B cell homeostasis is associated with type I diabetes and carriers of the PTPN22 allelic variant. *J Immunol.* 2012;188(1):487-96.

18. LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, Rowe RE, Monks S, Palmer JP, et al. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes Care*. 2002;25(3):505-11.
19. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):380-6.
20. Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(10):2741-9.
21. De Rycke L, Baeten D, Kruithof E, Van den Bosch F, Veys EM, De Keyser F. Infliximab, but not etanercept, induces IgM anti-double-stranded DNA autoantibodies as main antinuclear reactivity: biologic and clinical implications in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum*. 2005;52(7):2192-201.
22. Gulez N, Karaca NE, Aksu G, Kutukculer N. Increased percentages of autoantibodies in immunoglobulin A-deficient children do not correlate with clinical manifestations. *Autoimmunity*. 2009;42(1):74-9.
23. Karali Z, Basaranoglu ST, Karali Y, Oral B, Kilic SS. Autoimmunity and hepatitis A vaccine in children. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011;21(5):389-93.
24. Martinuc Porobic J, Avcin T, Bozic B, Kuhar M, Cucnik S, Zupancic M, et al. Anti-phospholipid antibodies following vaccination with recombinant hepatitis B vaccine. *Clin Exp Immunol*. 2005;142(2):377-80.
25. Toplak N, Kveder T, Trampus-Bakija A, Subelj V, Cucnik S, Avcin T. Autoimmune response following annual influenza vaccination in 92 apparently healthy adults. *Autoimmun Rev*. 2008;8(2):134-8.
26. Ursum J, Bos WH, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, van Schaardenburg D. Different properties of ACPA and IgM-RF derived from a large dataset: further evidence of two distinct autoantibody systems. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):R75.
27. Mei HE, Schmidt S, Dorner T. Rationale of anti-CD19 immunotherapy: an option to target autoreactive plasma cells in autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2012;14 Suppl 5:S1.
28. Beers SA, Chan CH, French RR, Cragg MS, Glennie MJ. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol*. 2010;47(2):107-14.
29. Cragg MS, Morgan SM, Chan HT, Morgan BP, Filatov AV, Johnson PW, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood*. 2003;101(3):1045-52.
30. Reddy V, Cambridge G, Isenberg DA, Glennie MJ, Cragg MS, Leandro M. Internalization of rituximab and the efficiency of B Cell depletion in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(8):2046-55.
31. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83(2):435-45.
32. Anderson DR, Grillo-Lopez A, Varns C, Chambers KS, Hanna N. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans*. 1997;25(2):705-8.

33. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6(4):443-6.
34. Shaw T, Quan J, Totoritis MC. B cell therapy for rheumatoid arthritis: the rituximab (anti-CD20) experience. *Ann Rheum Dis.* 2003;62 Suppl 2:ii55-9.
35. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998;16(8):2825-33.
36. Teng YK, Wheeler G, Hogan VE, Stocks P, Levarht EW, Huizinga TW, et al. Induction of long-term B-cell depletion in refractory rheumatoid arthritis patients preferentially affects autoreactive more than protective humoral immunity. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R57.
37. Gurcan HM, Keskin DB, Stern JN, Nitzberg MA, Shekhani H, Ahmed AR. A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(1):10-25.
38. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Munoz S, Soto MJ. A systematic review of the off-label use of biological therapies in systemic autoimmune diseases. *Medicine (Baltimore).* 2008;87(6):345-64.
39. Diaz-Lagares C, Perez-Alvarez R, Garcia-Hernandez FJ, Ayala-Gutierrez MM, Callejas JL, Martinez-Berriotxo A, et al. Rates of, and risk factors for, severe infections in patients with systemic autoimmune diseases receiving biological agents off-label. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4):R112.
40. Ramos-Casals M, Garcia-Hernandez FJ, de Ramon E, Callejas JL, Martinez-Berriotxo A, Pallares L, et al. Off-label use of rituximab in 196 patients with severe, refractory systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(4):468-76.
41. Terrier B, Amoura Z, Ravaud P, Hachulla E, Jouenne R, Combe B, et al. Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: results from 136 patients from the French AutoImmunity and Rituximab registry. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2458-66.
42. Terrier B, Launay D, Kaplanski G, Hot A, Larroche C, Cathebras P, et al. Safety and efficacy of rituximab in nonviral cryoglobulinemia vasculitis: data from the French Autoimmunity and Rituximab registry. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010;62(12):1787-95.
43. Pawluczkwycz AW, Beurskens FJ, Beum PV, Lindorfer MA, van de Winkel JG, Parren PW, et al. Binding of submaximal C1q promotes complement-dependent cytotoxicity (CDC) of B cells opsonized with anti-CD20 mAbs ofatumumab (OFA) or rituximab (RTX): considerably higher levels of CDC are induced by OFA than by RTX. *J Immunol.* 2009;183(1):749-58.
44. Teo EC, Chew Y, Phipps C. A review of monoclonal antibody therapies in lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015.
45. Taylor PC, Quattrocchi E, Mallett S, Kurrasch R, Petersen J, Chang DJ. Ofatumumab, a fully human anti-CD20 monoclonal antibody, in biological-naïve, rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(12):2119-25.
46. Thornton CC, Ambrose N, Ioannou Y. Ofatumumab: a novel treatment for severe systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(3):559-60.

47. Mysler EF, Spindler AJ, Guzman R, Bijl M, Jayne D, Furie RA, et al. Efficacy and safety of ocrelizumab in active proliferative lupus nephritis: results from a randomized, double-blind, phase III study. *Arthritis Rheum.* 2013;65(9):2368-79.
48. Emery P, Rigby W, Tak PP, Dorner T, Olech E, Martin C, et al. Safety with ocrelizumab in rheumatoid arthritis: results from the ocrelizumab phase III program. *PLoS One.* 2014;9(2):e87379.
49. Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T, et al. Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(10):2031-42.
50. Salliot C, Dougados M, Gossec L. Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(1):25-32.
51. 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.* 2010;62(9):2625-32.
52. Dass S, Bowman SJ, Vital EM, Ikeda K, Pease CT, Hamburger J, et al. Reduction of fatigue in Sjogren syndrome with rituximab: results of a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(11):1541-4.
53. Jones RB, Tervaert JW, Hauser T, Luqmani R, Morgan MD, Peh CA, et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med.* 2010;363(3):211-20.
54. Meijer JM, Meiners PM, Vissink A, Spijkervet FK, Abdulahad W, Kamminga N, et al. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62(4):960-8.
55. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, Shanahan JC, Latinis KM, Oates JC, et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):222-33.
56. Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hoffman GS, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med.* 2010;363(3):221-32.
57. Besada E, Koldingsnes W, Nossent JC. Long-term efficacy and safety of pre-emptive maintenance therapy with rituximab in granulomatosis with polyangiitis: results from a single centre. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(11):2041-7.
58. Tony HP, Burmester G, Schulze-Koops H, Grunke M, Henes J, Kotter I, et al. Safety and clinical outcomes of rituximab therapy in patients with different autoimmune diseases: experience from a national registry (GRAID). *Arthritis Res Ther.* 2011;13(3):R75.
59. Wendt M, Gunnarsson I, Bratt J, Bruchfeld A. Rituximab in relapsing or refractory ANCA-associated vasculitis: a case series of 16 patients. *Scand J Rheumatol.* 2012;41(2):116-9.
60. Brezinschek HP, Rainer F, Brickmann K, Graninger WB. B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(4):R161.
61. Dixon WG, Carmona L, Finckh A, Hetland ML, Kvien TK, Landewe R, et al. EULAR points to consider when establishing, analysing and reporting safety data of biologics registers in rheumatology. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(9):1596-602.

62. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd, Keystone EC, Fleischmann RM, Furst DE, et al. Long-term safety of rituximab in rheumatoid arthritis: 9.5-year follow-up of the global clinical trial programme with a focus on adverse events of interest in RA patients. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(9):1496-502.
63. Alten R, Kaine J, Keystone E, Nash P, Delaet I, Genovese MC. Long-term safety of subcutaneous abatacept in rheumatoid arthritis: integrated analysis of clinical trial data representing more than four years of treatment. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(8):1987-97.
64. Curtis JR, Xie F, Chen L, Baddley JW, Beukelman T, Saag KG, et al. The comparative risk of serious infections among rheumatoid arthritis patients starting or switching biological agents. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(8):1401-6.
65. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 2006;54(9):2793-806.
66. Emery P, Deodhar A, Rigby WF, Isaacs JD, Combe B, Racewicz AJ, et al. Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: a randomised, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX iNadequate rEsponders (SERENE)). *Ann Rheum Dis.* 2010;69(9):1629-35.
67. Keystone EC, Cohen SB, Emery P, Kremer JM, Dougados M, Loveless JE, et al. Multiple courses of rituximab produce sustained clinical and radiographic efficacy and safety in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to 1 or more tumor necrosis factor inhibitors: 5-year data from the REFLEX study. *J Rheumatol.* 2012;39(12):2238-46.
68. Tak PP, Rigby W, Rubbert-Roth A, Peterfy C, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Sustained inhibition of progressive joint damage with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: 2-year results from the randomised controlled trial IMAGE. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(3):351-7.
69. Tak PP, Rigby WF, Rubbert-Roth A, Peterfy CG, van Vollenhoven RF, Stohl W, et al. Inhibition of joint damage and improved clinical outcomes with rituximab plus methotrexate in early active rheumatoid arthritis: the IMAGE trial. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):39-46.
70. Souto A, Maneiro JR, Salgado E, Carmona L, Gomez-Reino JJ. Risk of tuberculosis in patients with chronic immune-mediated inflammatory diseases treated with biologics and tofacitinib: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and long-term extension studies. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(10):1872-85.
71. Palazzo E, Yahia SA. Progressive multifocal leukoencephalopathy in autoimmune diseases. *Joint Bone Spine.* 2012;79(4):351-5.
72. Guillevin L, Pagnoux C, Karras A, Khouatra C, Aumaitre O, Cohen P, et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med.* 2014;371(19):1771-80.
73. Knight A, Hallenberg H, Baecklund E. Efficacy and safety of rituximab as maintenance therapy for relapsing granulomatosis with polyangiitis-a case series. *Clin Rheumatol.* 2014;33(6):841-8.

74. Pullerits R, Ljevak M, Vikgren J, Bokarewa M. Off-trial evaluation of the B cell-targeting treatment in the refractory cases of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)-associated vasculitis: long-term follow-up from a single centre. *Scand J Immunol.* 2012;76(4):411-20.
75. Cartin-Ceba R, Golbin JM, Keogh KA, Peikert T, Sanchez-Menendez M, Ytterberg SR, et al. Rituximab for remission induction and maintenance in refractory granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): ten-year experience at a single center. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3770-8.
76. Guillevin L. Infections in vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2013;27(1):19-31.
77. Soliman MM, Hyrich KL, Lunt M, Watson KD, Symmons DP, Ashcroft DM. Effectiveness of rituximab in patients with rheumatoid arthritis: observational study from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *J Rheumatol.* 2012;39(2):240-6.
78. Miloslavsky E, Specks U, Stone JH, Grp RIR. Primary Endpoint Failure in the Rituximab in ANCA-Associated Vasculitis Trial. *Arthritis Rheum.* 2012;64(10):S707-S.