



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira. Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie et Santé

Réf :

En vue de l'obtention du diplôme MASTER Biotechnologie et Santé

Thème

*Mise au point des techniques d'évaluation de
l'efficacité in vitro et de
l'immunogénicité du rituximab*

Présenté par :

Berraki Walid & Bessaou Kamel

Soutenu le 12/09/2023, devant le jury composé de :

Président	Mme Yahiaoui. H	MAA	U.A.M.Bejaia
Encadreur	Mr Nouri Hamid	MCA	U.A.M.Bejaia
Examineur	Yanat B	MAA	U.A.M.Bejaia
Co-Encadrante	Mme Ammi Nassima	MAA	Fac Centrale Alger

Année Universitaire : 2022-2023

Remerciements

En tout premier lieu, on remercie le bon dieu, tout puissant, de nous avoir données le courage, la patience, la volonté et la force nécessaire pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés et les obstacles qui sont hissés au travers de notre chemin d'étude.

*Nos vifs remerciements et profonde gratitude s'adressent à notre encadreur **Mr Nouri Hamid** qui a accepté de nous encadrer, nous la remercie infiniment pour sa grande patience, ses encouragements, son aide et ses conseils judicieux, durant la réalisation de ce travail.*

*Nos vifs remerciements s'adressent à **Mme Yahiaoui**. Il d'avoir accepté de présider le jury de notre travail.*

*Nous tenons à remercier également **Yanet B** d'avoir accepté d'examiner notre mémoire de fin d'étude.*

*Nous tenons à remercier particulièrement notre co-promotrice la doctorante **Mme Ammi Nassima** qui nous avoir aidé durant la réalisation de ce travail, merci de nous avoir accompagnées et guidées et au niveau de laboratoire tout au long de travaux pratiques et aussi pour ses précieux conseils et son suivi qu'elle nous a prodigués.*

Nos remerciement vivement aux techniciens de laboratoire d'analyse instrumentale, pour son aide, et ses conseils, et toutes les personnes qui ont participé au succès de notre de notre stage.



B. Walid & B. Kamel -

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné à la vie,
qui s'est sacrifié pour mon bonheur et ma réussite,*

*A ma
mère...*

*A mon père, qui a été mon ombre durant toutes les années
d'études, qui a veillé à me donner l'aide,*

*A m'encourager et à me protéger, que dieu les gardes et
les protèges.*

A mon adorable sœur et mes frères

A ma très chère nièce

A tout ma famille

A mes très chers amis

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime



B. Walid -

Dédicace

Tout d'abord je tiens à remercier Allah et le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour mener à terme de pouvoir réaliser ce mémoire.

A mère qui m'a beaucoup encouragé.

A mon cher frère.

A mes chères sœurs et à leurs maris.

A tous les membres de la famille.

A toutes mes chères amies.

A mon cher binôme et sa famille.

A tous mes collègues.

A tous ceux que j'aime

Avec toute mon affection et mon amour.

Je leur dédie ce modeste travail.



- B.Kamel -

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Sommaire

Liste d'abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction Générale..... 1

Partie théorique

Chapitre I

Les anticorps monoclonaux

I.1. Définition.....	5
I.2. Structure des anticorps monoclonaux	5
I.3. Classes d'anticorps monoclonaux	7
I.4. Types d'anticorps monoclonaux.....	7
I.5. Origine des anticorps monoclonaux	8
I.5.1. Technique des hybridomes.....	8
I.5.2. Phage display	8
I.5.3. Techniques d'ingénierie des protéines.....	8

Chapitre II

Le Rituximab dans le traitement des maladies auto-immunes

II.1. Cluster of Differentiation 20	10
II.2. Le Rituximab : Un Anti-CD20	11
II.3. Mécanisme d'action du Rituximab dans le traitement des maladies auto-immunes.....	11
II.3.1. L'apoptose	11
II.3.2. La cytotoxicité dépendante du complément ou CDC	12
II.3.3. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC	13
II.4. Tolérance et immunogénicité du rituximab	14
II.4.1. Polymorphisme du récepteur FcγRIIIa	15
II.4.2. Polymorphisme FCGR3A-158F/V	15
II.4.3. Polymorphisme FCGR2A-131H/R.....	15
II.5. Protéines et inhibiteurs favorisant l'action du rituximab	15
II.5.1. Inhibiteurs du complément CD55 et CD59	15
II.5.2. Expression de la protéine Bcl-2	15
II.5.3. Association entre l'expression de Bcl-2 et l'interleukine 10 (IL-10)	16
II.6. Conséquences cliniques de l'immunogénicité du rituximab	16

Sommaire

Partie pratique

Chapitre III

Matériels et méthode

III.1. Objectifs et terrain de stage.....	19
III.2. Matériels	19
III.2.1. Matériel biologique.....	19
III.2.2. Produits testés	20
III.2.3. Réactifs	20
III.3. Méthodes	22
III.3.1. Evaluation de l'activité biologique d'un biosimilaire du Rituximab (CDC) (Partie In Vitro)	22
III.3.1.1. Préparation du milieu de culture et entretien de la lignée Wil2-S.....	22
III.3.1.2. Test de cytotoxicité dépendante du complément (CDC).....	23
III.4. Evaluation du potentiel immunogène du Rituximab : (Partie In Vivo)	25
III.4.1. Procédure de recherche des anticorps anti rituximab dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde par technique ELISA	25
III.4.2. Procédure d'essai.....	27
III.5. Vérification de la neutralisation des anticorps anti-RTX.....	29

Chapitre IV

Résultats et discussions

IV.1. Test de cytotoxicité dépendante du complément	32
IV.1.1. Valeurs des Densités Optiques du test CDC	32
IV.1.2. Evaluation de la lyse cellulaire :.....	33
IV.1.3. Comparaison de l'activité du biosimilaire à celle des échantillons de référence	34
IV.1.3.1. Vérification de la validité de l'essai	34
IV.1.3.2. Calcul de l'activité relative du biosimilaire par rapport aux 03 lots du produit de référence	35
IV.2. Procédure de recherche des anticorps anti rituximab dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde par technique ELISA.....	39
IV.3. Vérification de la neutralisation des anticorps anti-RTX.....	43
Conclusion Générale	45
Références bibliographiques.....	52
Annexes.....	55

Liste d'abréviation

ACM : Anticorps Monoclonaux

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

ARA : Anticorps Anti-Rituximab

BcL-2 : Protéine Anti-apoptotique

BCR : B Cell Receptor

CD20 : Cluster of Differentiation 20

CDC : Cytotoxicité cellulaire dépendante du complément

CDR : Complementarity determining regions

Fab : Fragment Antigen Binding

Fc : Fragment Cristallisable

FDA : Food and Drug Administration

IL : Interleukine

LB : Lymphocyte B

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LNH : Lymphome non hodgkinien

MAC : Complexe d'Attaque Membranaire

RTX : Rituximab

TNF : Tumor Necrosis Factor

HAMA : Anticorps Humain Anti Souris

STAT 3 : Protéine impliquée dans la regulation de la signalisation cellulaire et du processus apoptotique

HLA (CMH) : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

NK : Cellule Natural Killer

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1: Classes des anticorps	7
Tableau 2: Fiche technique des cellules Wi12-S (ATCC® CRL-8885™).....	19
Tableau 3: Listes des réactifs.....	20
Tableau 4: Composantes du KIT ELISA.....	21
Tableau V: Préparation des réactifs	23
Tableau 6: Tableau des dilutions des standards.....	27
Tableau 7: Schéma de la microplaque d'essai.....	28
Tableau 8: Critères d'acceptation du Test de validité	35
Tableau 9: Résultats de la Densité Optique des échantillons du test ELISA	39
Tableau 10: Résultats de la Densité Optique des échantillons du test ELISA	41

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'anticorps monoclonal	6
Figure 2 : Type d'anticorps monoclonaux	8
Figure 3 : Structure du CD20	10
Figure 4 : Apoptose induite par le rituximab (anti-CD20)	12
Figure 5 : Cytotoxicité dépendante du complément	13
Figure 6 : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps induits par le rituximab	14
Figure 7 : Schéma de la microplaque d'essai CDC	24
Figure 8 : Principe Technique Elisa	26
Figure 9 : Schéma de la microplaque de Terasaki	30
Figure 10 : Resultats des D.O du test CDC	32
Figure 11 : Graphique représentant les % de Lyse des différents produits	33
Figure 12 : Courbe Dose/Réponse Logiciel PLA	34
Figure 13 : Courbe Dose/Reponse du Biosimilaire et du Mab100 et son activité relative .	36
Figure 14 : Courbe Dose/Reponse du Biosimilaire et du Mab100(2) et son activité relative	37
Figure 15 : Courbe dose/réponse du biosimilaire et du Mab 500 et son activité relative ...	38
Figure 16 : Courbe du standard de référence	40
Figure 17 : Courbe dose réponse de l'étalon élaborée par le fabricant du kit	40
Figure 18 : Courbe du standard de référence du deuxième essai	42

Introducción General

Le rituximab, premier anticorps monoclonal approuvé pour le traitement de certains types de cancer du sang et de maladies auto-immunes, a marqué un tournant majeur dans l'histoire de la médecine. Développé par les laboratoires Hoffmann-La Roche et sa filiale Genentech sous les noms Rituxan et MabThera, ce médicament a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis en 1997 et celle de Santé Canada en 2000 [1,2].

Depuis lors, le rituximab est devenu un pilier essentiel du traitement de la macroglobulinémie de Waldenström, de la leucémie lymphoïde chronique, de certains lymphomes non hodgkiniens et de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus et le syndrome de Gougerot-Sjögren [1,2,3].

Au cours des dernières décennies, des traitements similaires au rituximab, qualifiés de biosimilaires, ont émergé, offrant une variété d'options en matière d'accessibilité et de coûts aux patients. De plus, différentes formulations de rituximab à longue durée d'action ont été développées, permettant des schémas posologiques moins fréquents et une meilleure gestion du traitement [5]

Cependant, malgré ses avantages thérapeutiques, le rituximab présente des risques potentiels liés à son immunogénicité. Il est donc crucial de déterminer des méthodes d'évaluation de cette immunogénicité afin d'assurer son efficacité et sa sécurité d'utilisation. De plus, avec la prolifération des biosimilaires du rituximab sur le marché, il devient impératif de comprendre comment évaluer leur qualité et d'explorer les techniques permettant de surveiller leur potentiel immunogénique.

Cette introduction approfondie souligne l'impact significatif du rituximab dans le domaine médical tout en mettant en évidence les défis actuels et futurs liés à son utilisation.

Partie théorique

Chapitre I

Les anticorps monoclonaux

I.1. Définition

Les anticorps dits « monoclonaux » sont des anticorps fabriqués spécifiquement pour traiter une maladie. [6] Ils sont produits par des cellules (il peut s'agir d'une bactérie, d'une levure ou d'une cellule de mammifère) qui ont été sélectionnées et cultivées pour leur capacité à produire un anticorps particulier. Celui-ci a d'abord été obtenu en exposant des cellules immunitaires rigoureusement identiques (un clone cellulaire) à une protéine dite « protéine cible » contre laquelle ce clone a fabriqué un anticorps, comme dans une réaction immunitaire. [6]

Ces anticorps monoclonaux traitent généralement des maladies tel que :

Cancer : Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour traiter différents types de cancer en ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses ou les protéines qui les soutiennent : Exemple : le Rituximab est utilisé pour traiter certains lymphomes et leucémies.

On peut citer le Lymphome non hodgkinien (LNH), Leucémie lymphoïde chronique (LLC).[7]

Maladies auto-immunes : telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le psoriasis et le lupus en supprimant la réponse immunitaire inappropriée. A l'instar de l'Adalimumab et l'Infliximab qui sont des exemples d'anticorps monoclonaux utilisés dans le traitement de ces conditions [8].

Maladies infectieuses : Certains anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour traiter des infections virales graves. Par exemple, le casirivimab et l'imdevimab ont été autorisés en urgence pour traiter la COVID-19 [9].

I.2. Structure des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont composés de plusieurs domaines, ils sont décrits ci-dessous :

Domaine variable (VH) : Situé à l'extrémité N-terminale des chaînes lourdes, il est responsable de la reconnaissance de l'épitope de l'antigène [10]

Domaine variable (VL) : Situé à l'extrémité N-terminale des chaînes légères, il est responsable de la reconnaissance de l'épitope de l'antigène [10]

Région charnière (CH) : Situé entre les domaines VH et CH1, il permet une certaine flexibilité dans la structure de l'anticorps [10]

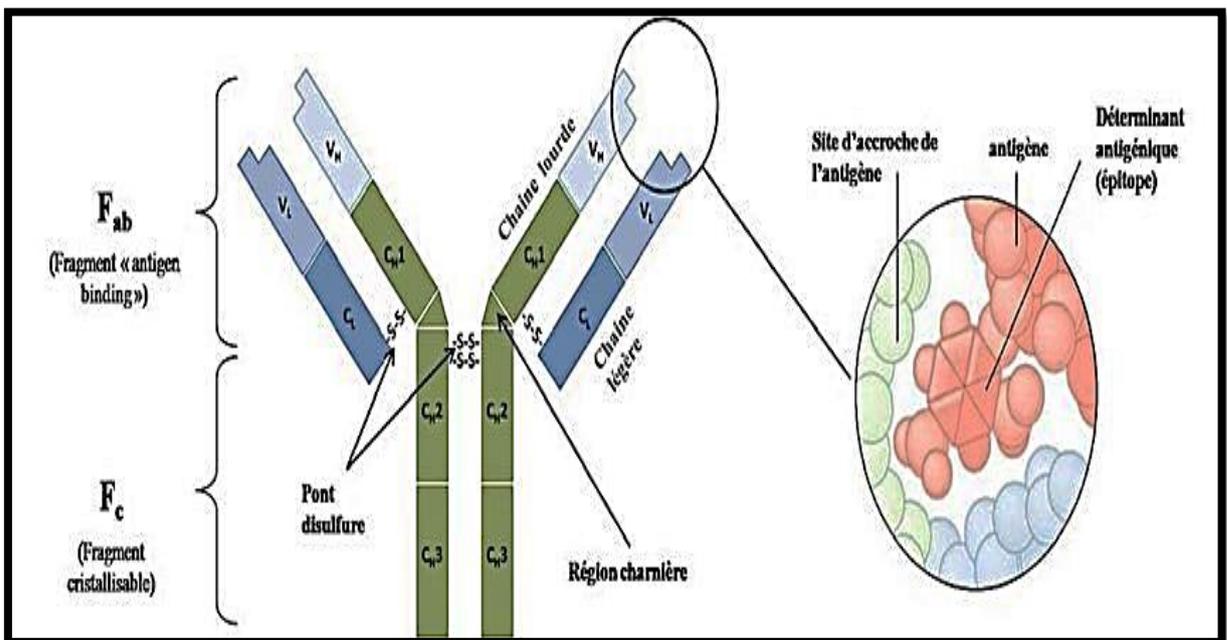
Domaine constant (CH1) : Situé à l'extrémité C-terminale des chaînes lourdes, il est responsable de la fixation des effecteurs du système immunitaire [10]

Domaine constant (CH2) : Situé entre les domaines CH1 et CH3, il est responsable de la fixation du complément et des récepteurs Fcγ [10]

Domaine constant (CH3) : Situé à l'extrémité C-terminale des chaînes lourdes, il est responsable de la fixation du complément et des récepteurs Fcγ [10]

Domaine constant (CL) : Situé à l'extrémité C-terminale des chaînes légères, il est responsable de la fixation des effecteurs du système immunitaire [10]

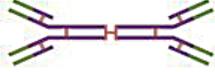
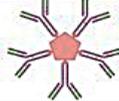
Figure 1 : Structure de l'anticorps [10]



I.3. Classes d'anticorps

Ils se divisent en différentes classes représentées dans ce tableau :

Tableau I : Classes des anticorps [11]

Nom	Propriétés	Structure
IgA	Présent dans le mucus, la salive, les larmes et le lait maternel. Protège contre les agents pathogènes.	
IgD	Fait partie du récepteur des cellules B. Active les basophiles et les mastocytes.	
IgE	Protège contre les vers parasites. Responsable pour les réactions allergiques.	
IgG	Secrété par les plasmocytes dans le sang. Capable de traverser le placenta pour atteindre le fœtus.	
IgM	Peut être fixé à la surface d'une cellule B ou sécrété dans le sang. Responsable pour les premiers stades de l'immunité.	

I.4. Types d'anticorps monoclonaux

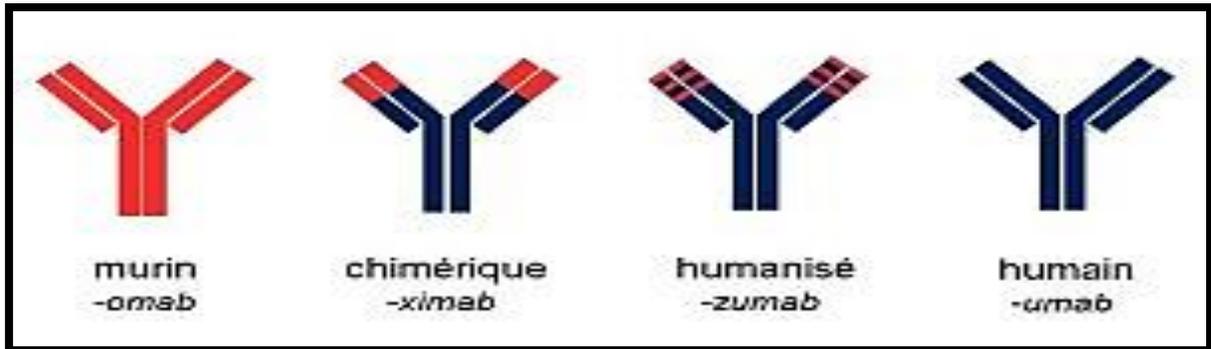
- **Les anticorps murins (suffixe-omab)** sont des anticorps produits chez la souris. Leur principal défaut est la production d'anticorps humains anti-souris (HAMA) lorsqu'ils sont utilisés comme agent thérapeutique chez l'homme. Aujourd'hui leur utilisation est limitée. [12]

- **Les anticorps chimériques (suffixe-ximab)** sont humains à 75%. Les parties constantes des chaînes lourdes et légères (CH et CL) d'anticorps humain sont greffées sur les parties variables respectives (VH et VL) d'un anticorps murin. [12]

- **Les anticorps humanisés (suffixe -zumab)** sont humains à 90%. Des parties hypervariables (CDR) d'un anticorps murin sont greffées sur une immunoglobuline humaine. L'anticorps humanisé est mieux toléré par l'organisme humain car ressemble plus « au soi ». Son efficacité est renforcée car sa demi-vie est plus longue dans l'organisme.[12]

- **Les anticorps humains (suffixe -umab)** sont humains à 100%. Ils ont l'avantage de limiter l'immunogénicité et diminue le risque de synthèse d'anticorps humains anti-souris retrouvés lorsque des anticorps chimériques et humanisés sont utilisés. [12]

Figure 2 : Type d'anticorps monoclonaux [12]



I.5. Origine des anticorps monoclonaux

Différentes techniques ont été développées au fil du temps pour optimiser la production d'anticorps monoclonaux (ACM).

I.5.1. Technique des hybridomes

La technique des hybridomes, développée par Köhler et Milstein en 1975, consiste à fusionner une cellule B avec une cellule tumorale immortelle pour former un hybridome capable de produire des anticorps monoclonaux identiques à ceux de la cellule LB d'origine.[13]

I.5.2. Phage display

Le phage display, introduit par Smith en 1985, utilise des phages bactériens pour afficher des fragments d'anticorps à leur surface. Cette technique permet de sélectionner rapidement des anticorps monoclonaux à partir d'une bibliothèque de phages génétiquement modifiés. [12]

I.5.3. Techniques d'ingénierie des protéines

Les techniques d'ingénierie des protéines ont été utilisées pour améliorer les propriétés des anticorps monoclonaux. Des études, telles que celle de Chothia et Lesk en 1987, ont permis de caractériser les structures canoniques des régions hypervariables des immunoglobulines. [14] De plus, l'optimisation de l'affinité de liaison, la réduction de l'immunogénicité et la modification des constantes Fc pour influencer l'effet fonctionnel des anticorps ont été réalisées selon les travaux de Presta en 2006 [14].

Chapitre II

Le Rituximab dans le traitement des maladies auto-immunes

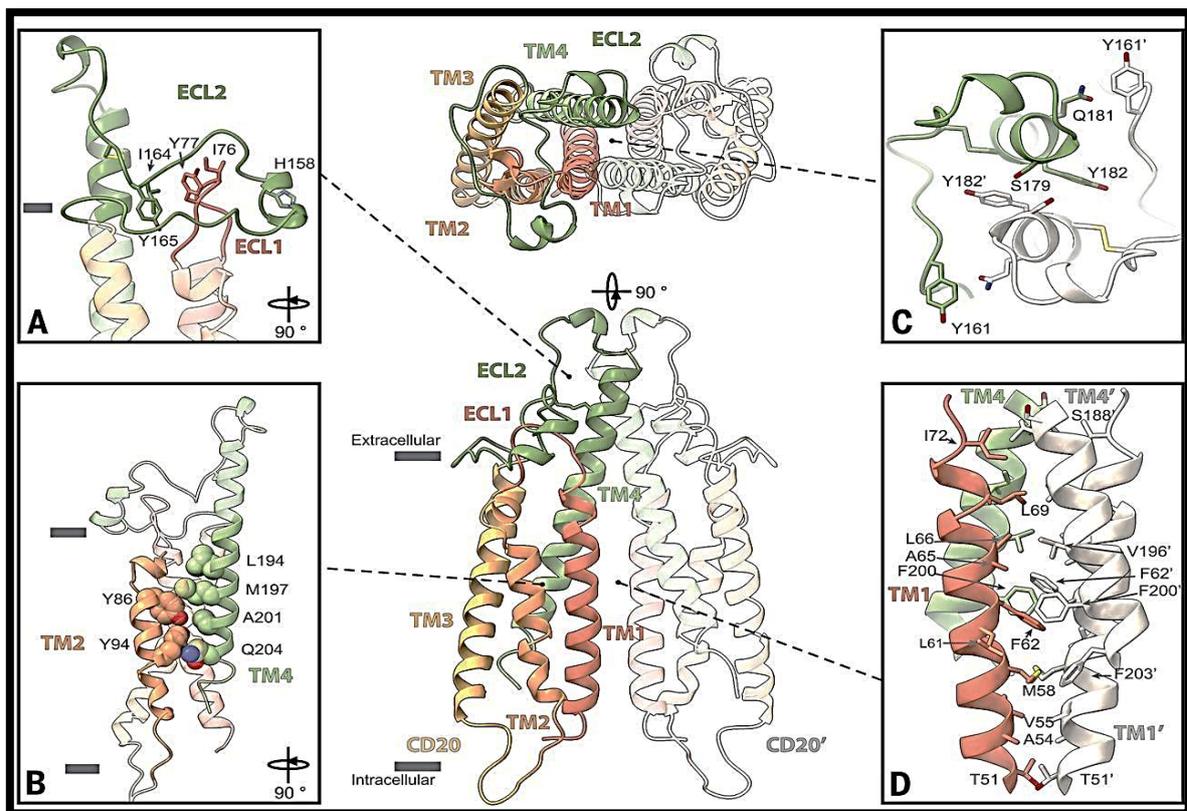
II.1. Cluster of Differentiation 20

Le Cluster of Differentiation (CD 20) est une molécule spécifique des lymphocytes B, présente en grande quantité à la surface des lymphocytes pré-B et des lymphocytes B matures. Il s'agit d'une protéine transmembranaire appelée phosphoprotéine, d'une taille de 33 à 37 KDA, qui pourrait jouer un rôle dans la régulation des flux calciques. Lorsqu'il est activé par des anticorps, tels que le rituximab, qui se lie à sa partie extra-membranaire et induisent une interaction croisée, il déclenche la transmission d'un signal conduisant à l'activation et à la différenciation des lymphocytes B. En raison de ses caractéristiques, le CD 20 est une cible thérapeutique intéressante pour deux raisons principales :

- Il est présent sur les lymphocytes B, mais pas sur les cellules souches ni sur la plupart des plasmocytes, ce qui permet de maintenir un niveau d'immunoglobulines relativement stable et potentiellement de prévenir certaines infections.

- Le CD 20 est abondamment exprimé à la surface cellulaire et ne semble pas être sécrété ou libéré dans la circulation. [15]

Figure 2 : Structure du CD20. [15]



II.2. Le Rituximab : Un Anti-CD20

Le Rituximab est un anticorps anti-CD20 (récepteur associé B-cell receptor (**BCR**)) utilisé dans les lymphomes folliculaires sur-exprimant le CD20 et dans les La polyarthrite rhumatoïde sévères ou résistantes au méthotrexate ou à au moins un anti-Tumor Necrosis Factor (**TNF**). Il permet la mort cellulaire via 3 voies immunologiques :

1. La fixation de l'ACM sur le CD20 active le complément pour former un complexe d'attaque membranaire ce qui provoque la lyse de la cellule par mécanisme de CDC.
2. La liaison du Rituximab aux LcB permet l'interaction avec les cellules NK via le FcgRIII ce qui provoque la mort par ADCC.
3. Le Fc du Rituximab permet de recruter des macrophages via le FcgR et ceci aboutit à la mort cellulaire par apoptose et ADCC. [16]

II.3. Mécanisme d'action du Rituximab dans le traitement des maladies auto-immunes

L'action du Rituximab s'exerce par trois mécanismes principaux : induction d'apoptose, lyse par le complément, et cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant.

L'**apoptose** est induite par la voie mitochondriale (cytochrome C) en utilisant l'activation de la Caspase 3. Il agit également par **Cytotoxicité Dépendante du Complément (CDC)** ; cette lyse par le complément est immédiate et permet sans doute d'expliquer les effets indésirables immédiats après certaines perfusions. [17]

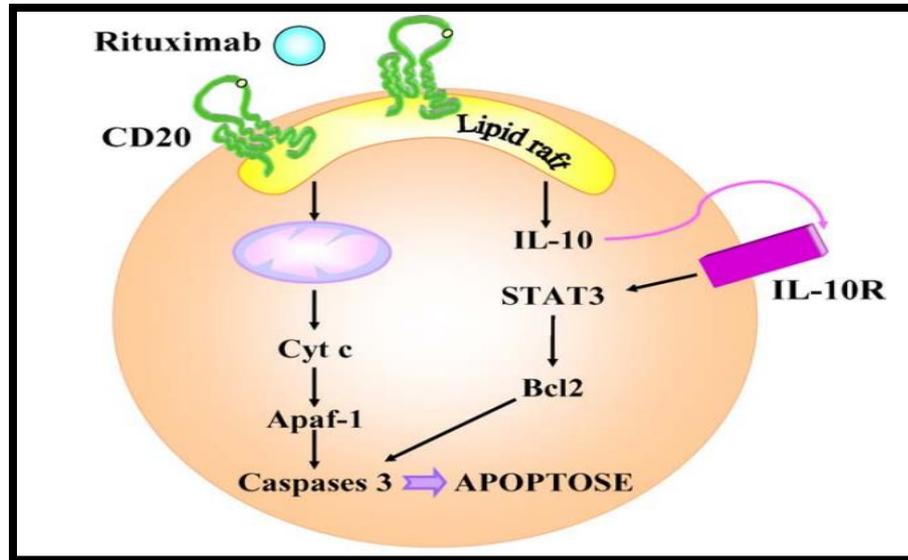
La cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant ou ADCC est le troisième mécanisme d'action du rituximab. La destruction cellulaire se fait alors par l'intermédiaire des cellules tels les macrophages et les cellules NK.[17]

II.3.1. L'apoptose

Le rituximab a la capacité d'induire l'apoptose, en particulier dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Ce processus d'apoptose ne semble pas dépendre de la voie du TNF (récepteur du TNF) ni de la voie Fas/Fas L, mais plutôt de la voie mitochondriale, qui entraîne l'activation de la caspase 3. Dans un modèle cellulaire spécifique (une lignée lymphoïde appelée 2 F7 dérivée d'un lymphome de Burkitt lié au VIH), il a été observé que le rituximab pouvait réduire l'expression de Bcl-2 grâce à la synthèse autocrine d'IL10.

D'autres études ont également montré que le rituximab pouvait réduire l'expression d'autres molécules anti-apoptotiques telles que XIAP et Mcl-1. Cependant, l'importance de l'apoptose en tant que mécanisme effecteur des Anti-CD20 reste encore hypothétique.

Figure 3 : Apoptose induite par le rituximab (anti-CD20) [17]



II.3.2. La cytotoxicité dépendante du complément ou CDC

Le mécanisme d'action du rituximab via la CDC est un processus complexe impliquant plusieurs étapes clés :

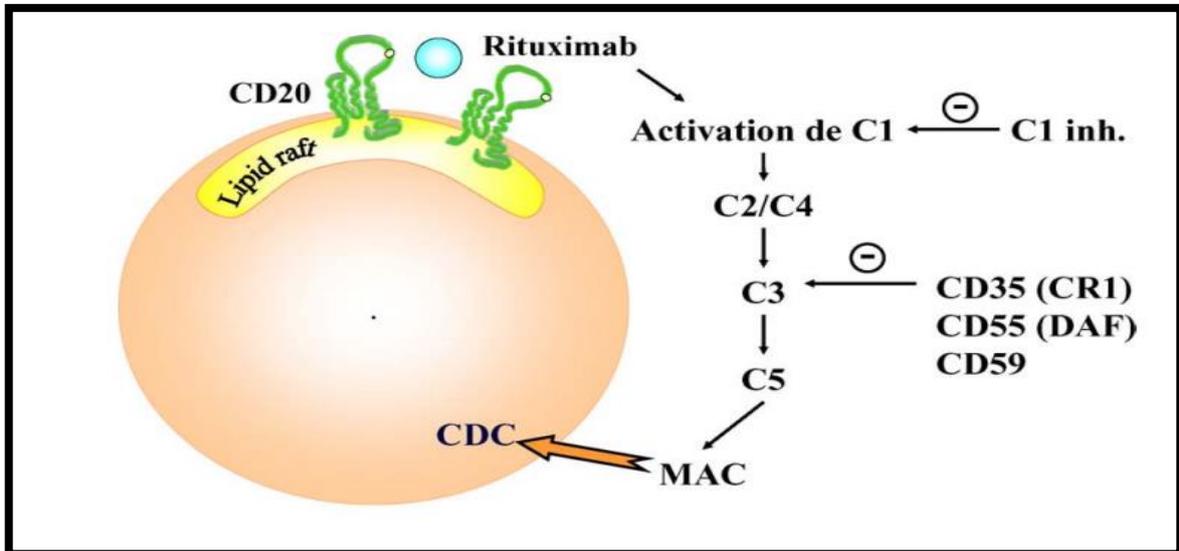
- **Reconnaissance et liaison** : Le rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20, une protéine exprimée à la surface des lymphocytes B malins. Lorsqu'il se lie spécifiquement au CD20, le rituximab marque les cellules cibles pour l'activation ultérieure du complément.

- **Activation du complément** : Une fois lié au CD20, la portion Fc du rituximab active la voie classique du complément en interagissant avec les composants C1q, C4 et C3 du système du complément. Cette interaction entraîne une cascade enzymatique complexe, aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC).

- **Formation du complexe d'attaque membranaire (MAC)** : Le MAC est formé par l'assemblage des composants C5b, C6, C7, C8 et C9 du complément. Une fois formé, le MAC s'insère dans la membrane cellulaire cible, créant un pore qui perturbe l'intégrité de la membrane et conduit finalement à la lyse cellulaire.

• **Lyse cellulaire :** La formation du MAC et la perturbation de la membrane cellulaire induisent la lyse des cellules cibles exprimant le CD20. Cela entraîne la destruction des lymphocytes B malins, réduisant ainsi la charge tumorale. [17]

Figure 4 : Cytotoxicité dépendante du complément [17]

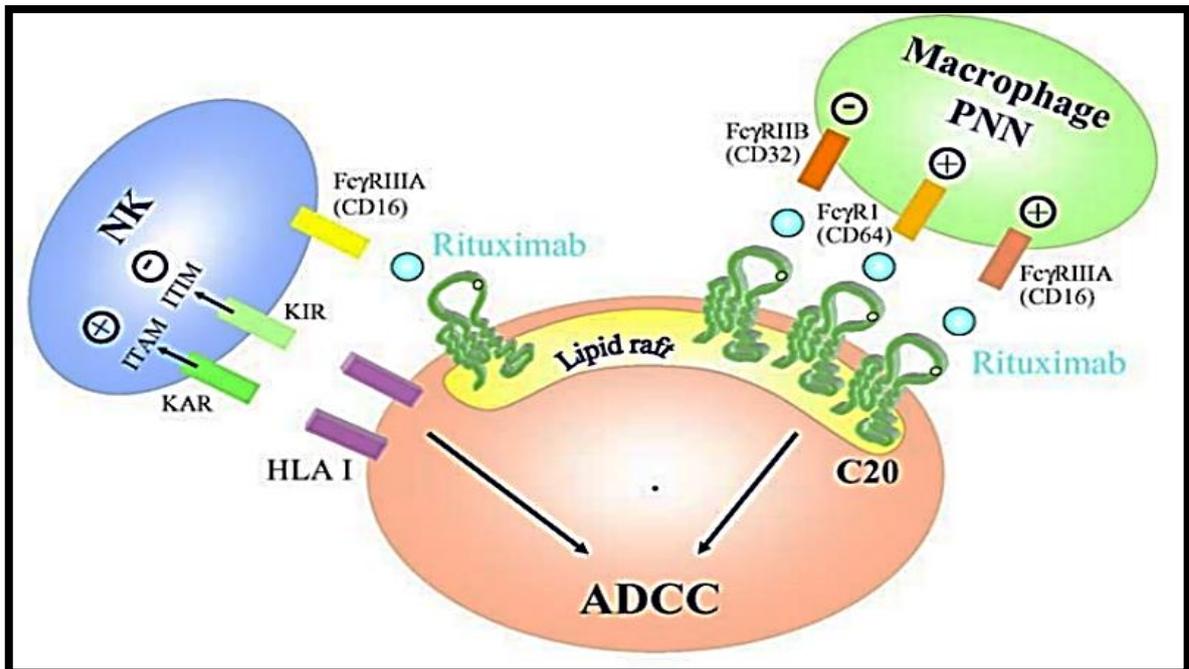


II.3.3. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC

L'ADCC est un mécanisme impliquant la liaison de la portion Fc de l'anticorps au récepteur Fc exprimée à la surface des cellules immunitaires cytotoxiques telles que les cellules NK, les monocytes et les granulocytes. Ces cellules vont conduire à la destruction du complexe rituximab-cellule B soit par phagocytose soit par la libération de granules cytotoxiques contenus dans ces cellules immunitaires.

Les cellules effectrices agissent, après liaison de la portion Fc de l'IgG du rituximab sur leur récepteur spécifique Fc γ R, contre les cellules sur lesquelles sont liés les Ac afin de les détruire.[17]

Figure 5 : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps induits par le rituximab[17]



II.4. Tolérance et immunogénicité du rituximab

L'immunogénicité du rituximab se réfère à sa capacité à induire une réponse immunitaire chez les patients traités [18]. Comme le rituximab est dérivé d'une source exogène (hybridome de cellules de souris) (figure 02), il est considéré comme un antigène étranger par le système immunitaire humain. Par conséquent, des anticorps dirigés contre le rituximab, appelés anticorps anti-rituximab (ARA), peuvent être produits par les patients traités.

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'immunogénicité du rituximab ; Des études ont montré que la dose administrée, la fréquence des administrations, la voie d'administration, la maladie sous-jacente du patient et l'état immunitaire individuel peuvent tous jouer un rôle dans la réponse immunitaire au rtx [18]. Par exemple, des doses plus élevées de rituximab peuvent augmenter le risque d'immunogénicité [18].

Quant à la tolérance du rituximab cette dernière est due à des polymorphismes présents dans les acides aminés formant l'anticorps parmi lesquelles on peut citer :

II.4.1. Polymorphisme du récepteur FcγRIIIa

Il existe un polymorphisme du récepteur FcγRIIIa, où la substitution d'une phénylalanine (F) en une valine (V) en position 158 peut modifier son affinité de liaison à la portion Fc de l'anticorps. Ce polymorphisme peut influencer la réponse de l'ADCC déclenchée par le rituximab. [19]

II.4.2. Polymorphisme FCGR3A-158F/V

Les patients atteints de lymphome non hodgkinien de bas grade résistant au rituximab peuvent être liés au polymorphisme de FCGR3A. Les patients homozygotes pour l'allèle 158V ont une plus grande probabilité d'avoir une réponse clinique au rituximab par rapport aux patients homozygotes pour l'allèle 158F ou hétérozygotes. [20,19]

II.4.3. Polymorphisme FCGR2A-131H/R

Un autre polymorphisme, FCGR2A-131H/R, semble également être lié à la réponse au rituximab. Les patients homozygotes pour l'allèle 131H ont un meilleur taux de réponse au rituximab que les porteurs de l'allèle 131R. [20]

II.5. Protéines et inhibiteurs favorisant l'action du rituximab

Certaines protéines et inhibiteurs peuvent être utiles pour contrer l'immunogénicité du rituximab et favoriser son action.

II.5.1. Inhibiteurs du complément CD55 et CD59

Les inhibiteurs du complément CD55 et CD59 peuvent jouer un rôle dans l'hétérogénéité de la réponse au rituximab. Le blocage de ces inhibiteurs peut augmenter l'activité cytotoxique dépendante du complément (CDC) et améliorer la réponse clinique chez les patients résistants au rituximab.[20]

II.5.2. Expression de la protéine Bcl-2

L'expression de la protéine anti apoptotique Bcl-2 confère une résistance contre l'apoptose induite par le rituximab. La régulation pharmacologique des protéines Bcl-2 ou l'utilisation de leurs inhibiteurs peut être une stratégie pour surmonter la résistance au rituximab.[20]

II.5.3. Association entre l'expression de Bcl-2 et l'interleukine 10 (IL-10)

L'expression de Bcl-2 est associée à l'IL-10, qui agit comme un facteur protecteur favorisant la croissance cellulaire. L'inhibition de l'IL-10 peut diminuer l'expression de Bcl-2 et rendre les cellules lymphomatoses plus sensibles à l'activité cytotoxique des chimiothérapies.

II.6. Conséquences cliniques de l'immunogénicité du rituximab

La présence d'ARA peut avoir des conséquences cliniques significatives. Les ARA peuvent neutraliser le rituximab en se liant à lui, réduisant ainsi son efficacité thérapeutique [20,19]. De plus, la formation d'ARA peut entraîner des réactions d'hypersensibilité et des effets indésirables chez les patients traités. Il est donc essentiel de surveiller et de prendre en compte l'immunogénicité du rituximab pour optimiser son utilisation clinique.

Partie pratique

Chapitre III
Matériel et méthodes

III.1. Objectifs et terrain de stage

La partie pratique de notre mémoire s'est déroulée au niveau du service de pharmacologie - toxicologie de l'Agence Nationale Des Produits Pharmaceutiques (ANPP), Plus précisément au niveau de l'unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire, et ce durant la période allant de fin mars à mi-Juillet 2023.

Introduction :

Les objectifs principaux de ce stage :

Contrôler l'activité biologique d'un biosimilaire du Rituximab et ce via une comparabilité de la cytotoxicité dépendante du complément par rapport au produit de référence (MAB).

(Partie In vitro)

Mettre au point les techniques permettant d'évaluer le potentiel immunogène du Rituximab chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR), à savoir : (Partie In Vivo)

- La détection des Anticorps Anti-Médicament
- La détection de leur pouvoir neutralisant

III.2. Matériels

III.2.1. Matériel biologique

Lignée cellulaire :

Working Cell Bank (P14) des WIL2-S (ATCC® CRL-8885™)

Tableau II : Fiche technique des cellules Wil2-S (ATCC® CRL-8885™)

Cellules	Wil2-s
Organisme	<i>Homo sapiens</i> , humain
Tissus	Rate
Pathologie	Sphérocytose héréditaire
Type de cellules	Lymphoblaste B
Age	5 ans
Sexe	Masculin
Morphologie	Lymphoblaste
Propriétés de croissance	Suspension
Milieu de croissance	Milieu RPMI 1640, 90% ; sérum bovin fœtal Inactivé par la chaleur, 10%

Conditions de manipulation	Centrifugation : 125 x g, 5 à 10 min Concentration de la suspension : 1 x 10 ⁵ et 1 x 10 ⁶ cellules / ml. Incubation : 37° C, 5% CO ₂ . Renouvellement : 2 à 3 jours.
----------------------------	---

III.2.2. Produits testés

Dans la partie In Vitro :

- Rituximab Mabthera® (Roche, Etats unis) (500mg/50ml, 100mg/10ml)
- Biosimilaire (500mg/50ml) (Par éthique, le nom et le « producteur » du biosimilaire ne peut être divulgué)

Dans la partie In vivo :

- Sérums de Patients atteints de PR après 6 mois de traitement sous Rituximab

III.2.3. Réactifs

Tableau III : Listes des réactifs

Produit	Références
Milieu RPMI 1640 Gibco™	11875-093, Etat unis
SVF Gibco® : sérum de veau foetal	26140087, Etat unis
BSA : sérum albumine bovine	A2153-10G sigma Aldrich, Etat unis
Solution tampon HEPES (1M)	Royaume uni
Solution de bleu de trypan (0.4%)	T8154 sigma-Aldrich, Etat unis
Triton-X100	Sigma-Aldrich, Etat unis
Pénicilline- streptomycine Gibco™	15140-148, Etat unis
Complément de lapin lyophilisé	CABC-1D One lambda, Etat unis
CCK8 (cell counting Kit 8)	CK04 Dojindo, japon
KRIBIOLISA™ Rituximab (RITUXAN) ELISA	KBI1010
Bromure d'éthidium	/
Orange d'acridine	/

Tableau IV : Composantes du KIT ELISA

Partie	Description	Qte
Enrobé d'anti-Rituximab Plaques de microfiltration	III.2.4. Microplaque de 96 puits en polystyrène (12 barrettes de 8 puits) recouverte d'Anti-Anticorps monoclonal Rituximab.	1 x 96 puits
Rituximab Standard, (lyophilisé)	Rituximab recombinant dans une base protéique tamponnée et des conservateurs 0,02 % de méthylisothiazolone et 0,02 % de bromonitrodioxane. (lyophilisé, concentré 1 ug/ml)	2 flacons
Conjugué anti-Rituximab:HRP	Anti-Rituximab conjugué à la peroxydase de raifort avec un stabilisateur de protéines et des conservateurs 0,02% de méthylisothiazolone et 0,02% d'antioxydants. bromonitrodioxane.	12 ml
III.2.5. Diluant standard	III.2.6. Base protéique tamponnée avec conservateur thiomersol < 0,01%.	10 ml
Diluant de l'échantillon	Base protéique tamponnée avec conservateur thiomersol < 0,01%.	III.2.7. 2 x 50 ml
(20X) Tampon de lavage	Solution concentrée 20 fois d'agent tensioactif tamponné avec conservateur thiomersol < 0,01%. Peut jaunir avec le temps.	25 ml
Substrat TMB	Chromogène stabilisé	12 ml
Solution d'arrêt	Acide sulfurique 2N	12 ml

Matériel de laboratoire :

- Hôte à flux laminaire
- Centrifugeuse
- Agitateur
- Incubateur à CO₂
- Microscope optique inversé
- Microscope à fluorescence optique

- Lecteur de microplaque
- Microplaques 96 puits
- Microplaques de Terasaki
- Cellules de Malassez
- Micropipettes
- Pipettes stériles
- Flask

III.3. Méthodes

III.3.1. Evaluation de l'activité biologique d'un biosimilaire du Rituximab (CDC) (Partie In Vitro)

III.3.1.1. Préparation du milieu de culture et entretien de la lignée Wil2-S

Nous avons préparé le milieu de culture des cellules en ajoutant au milieu RPMI :

10% de SVF + 1% antibiotique + 1% de glutamine. (Voir annexes)

Décongélation des cellules :

Les cellules sont livrées respectant la chaîne de froid, dans des Cryo tubes conservés à -70° degrés. Nous les avons ensuite décongelées dans un bain marie à 37°. (Voir annexes)

Amplification des cellules :

Après avoir décongelé les cellules Wil2S nous les avons sédimentés en les soumettant à une centrifugation à 300g pendant 10 minutes puis nous les avons incubées pendant 48h dans des flasques de 25 ML contenant le milieu de culture dans un incubateur à CO₂ (5%, 37°) (Voir Annexes)

Passages et renouvellement de milieux :

Les nutriments composant le milieu arrivant à épuisement, Un passage est effectué toutes **les 48h**, permettant ainsi de garantir un milieu de culture riche.

Test de viabilité et concentration cellulaire :

Nous avons mélangé 50ul de cellules avec 50ul de colorant Bleu de Trypan dans un micro tube, la solution est ensuite observée sous microscope optique inversé via Cellules de Mallassez pour la rémunération de cellules vivantes et ce pour calculer le volume total nécessaire pour obtenir une suspension de travail de 5×10^5 cellules/ml ; Sachant que la viabilité doit être égale ou supérieure à 90%. (Voir Annexes Cellules de Malassez)

III.3.1.2. Test de cytotoxicité dépendante du complément (CDC)

Principe :

Des séries de dilutions du Biosimilaire et de 3 lots du produit de référence sont incubé avec les cellules WIL2S surexprimant le CD20 et le complément de lapin pendant 2 heures. Le marqueur de viabilité cellulaire CCK 8 est ensuite ajouté et incubé pendant 15 à 21 heures. La densité optique est enfin mesurée via le lecteur de microplaque à 450nm.

Tableau V : Préparation des réactifs

BSA à 6%	3g de BSA dans 50 ml d'eau distillée, conservé entre 2- 8°C.
Milieux D'es	Milieu RPMI 1640 : 48.15ml (96.3%), HEPES 1M : 1ml (2%), BSA 6% : 0.85ml (1.7%) Filtré avec des filtres stériles de 0.22µm et pH a été ajusté à 7.2- 7.5. La solution est conservée entre 2-8°C.
Triton à 2%	60 ul de Triton-X100 avec 3ml du milieu d'essai, puis vortexer et filtrer à 0.22µm et conserver entre 2-8°C.
Complément de Lapin	Reconstituer le complément en ajoutant 1ml d'eau PPI puis agiter. Diluer à 1/6 avec le milieu d'essai

Préparation des dilutions des échantillons à tester :

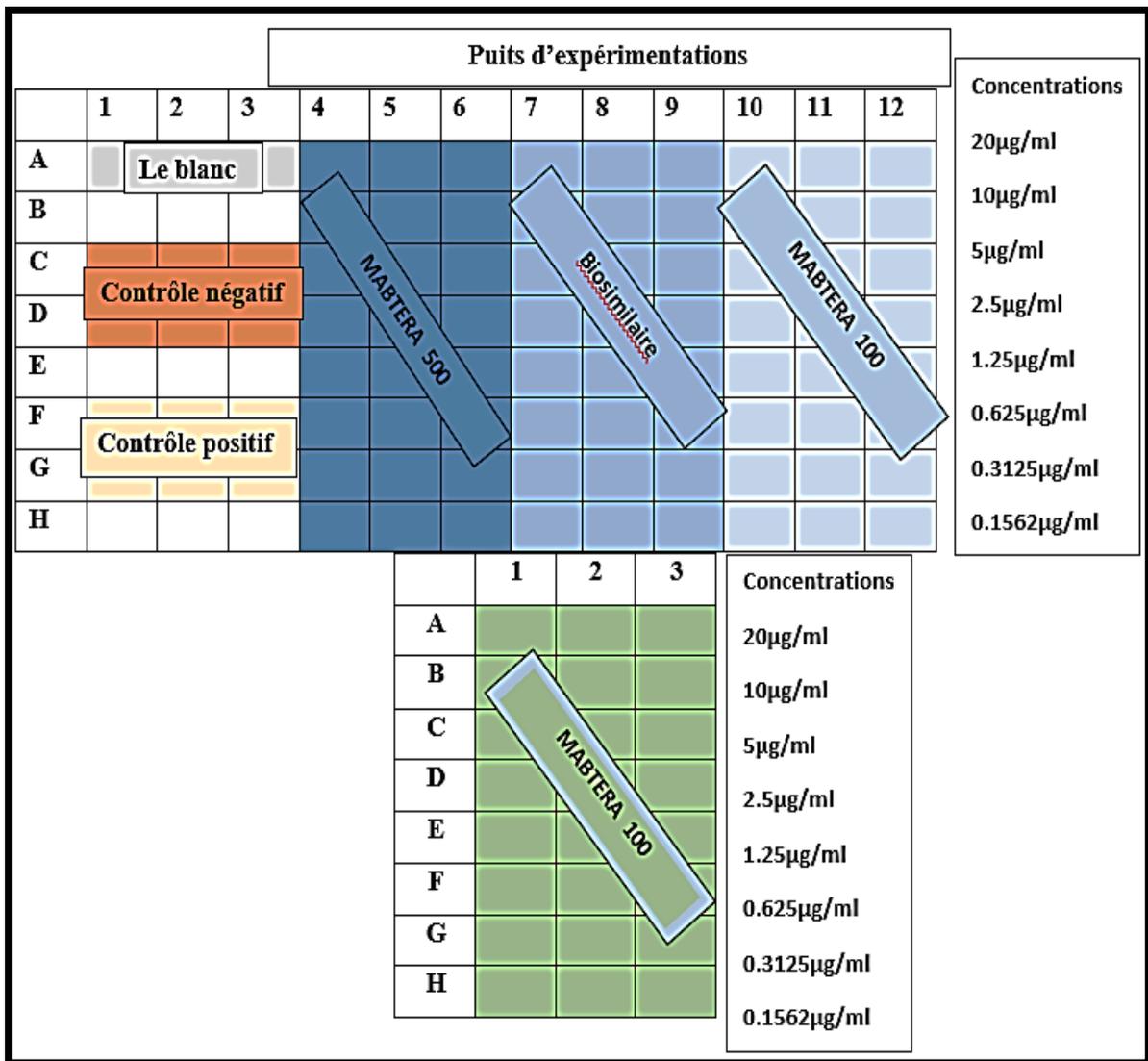
Chaque échantillon de Rituximab est dilué avec le milieu d'essai ; Une série de dilutions allant de 20ug/ml à 0.15ug/ml a été préparée à partir d'un flacon dont la concentration est de 10mg/ml.

Chaque dilution est testée en Triplicate (Photos dans Annexes).

Préparation de la microplaque d'essai :

La microplaque d'essai contenant 96 puits est préparée en suivant un schéma déterminé : (Voir Annexes)

Figure 6 : Schéma de la microplaque d'essai CDC



Puits d'expérimentation : 50ul des dilutions préparées pour le Rituximab sont mises dans les puits appropriés. Ensuite nous avons ajouté 50ul du complément de lapin lyophilisé reconstitué et dilué à 1/6 comme source de complément. Nous Ajoutons enfin, 100ul des cellules WIL2S dont la concentration est de $5 \cdot 10^5$ cellules/ml.

Puits du Contrôle Positif : Les puits de contrôle positif contiennent 100ul de TRITON-X100 avec 100ul de la suspension cellulaire. Le triton étant un détergent provoquant la lyse des cellules.

Puits du Contrôle Négatif : Les puits du contrôle négatif sont préparés en ajoutant 100ul de la suspension cellulaire, avec 50ul de Complément et 50ul du milieu d'essai.

Puits à Blanc : Les puits à blanc sont des puits ne contenant que le milieu d'essai. 200ul de milieu d'essai sont ajoutés à ces puits.

Incubation et ajout du CCK8 :

Nous avons incubé les microplaques d'essai pendant 2H, avant d'ajouter 10ul du Réactif CCK8 ; Les microplaques sont enfin réincubées pendant 15 à 21H.

Lecture de microplaque :

Après incubation, les microplaques sont soumises à une lecture de densité optique (DO) à 450nm dans un lecteur de microplaques. (Voir Annexes)

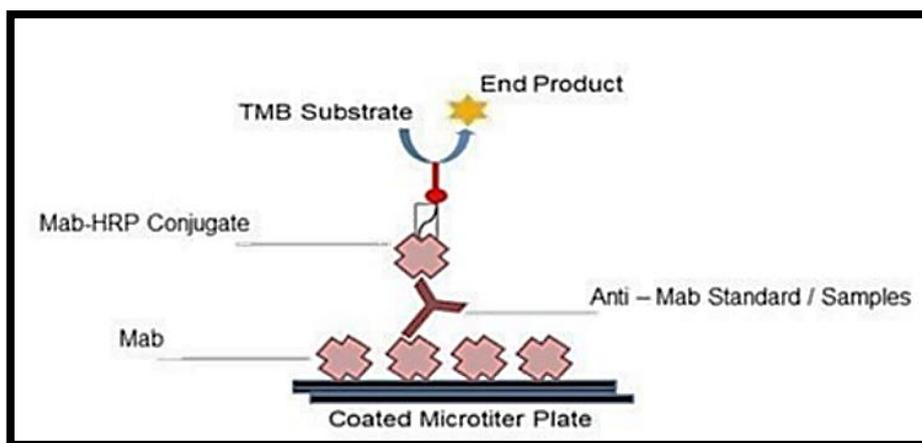
III.4. Evaluation du potentiel immunogène du Rituximab : (Partie In Vivo)

III.4.1. Procédure de recherche des anticorps anti rituximab dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde par technique ELISA

La détection des anticorps anti-rituximab dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) est un sujet d'intérêt dans le domaine de la médecine et de la recherche clinique. Car dans certains cas, des anticorps dirigés contre le médicament lui-même (anticorps anti-rtx) peuvent se développer chez les patients. Cela peut avoir des implications cliniques importantes, notamment en réduisant l'efficacité du traitement. (à mettre dans discussion)

Principe : La détection et la quantification des anticorps anti-rituximab dans les sérums des patients s'est faite via une méthode de dosage immuno-enzymatique en sandwich : Les sérums susceptibles de contenir les Anticorps Anti-Rituximab humain sont incubés dans les micro-puits traités au Rituximab. Ensuite, un Anticorps Anti-Anticorps conjugué à une enzyme (HRP) est ajouté et incubé. Après avoir éliminé les liaisons non spécifiques par lavage, une solution de substrat (TMB) est ajoutée, provoquant une couleur proportionnelle à la quantité des Anti RTX. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et l'absorbance est mesurée à 450 nm.

Figure 7 : Principe Technique Elisa



Préparation des échantillons d'essai

Nous avons procédé à une dilution des sérums à 1:1000 (v/v). (1 μ l + 999 μ l de diluant d'échantillon) Les échantillons peuvent être conservés à une température allant de 2°C à 8°C pendant une période maximale de trois jours (Voir Photos dans Annexes).

Préparation des réactifs (tous les réactifs doivent être dilués immédiatement avant utilisation) :

1. Lorsque nous préparons des aliquotes, nous les étiquetons avec le numéro de lot du kit et la date de péremption, puis nous les conservons dans les conditions appropriées. (Voir Annexes)
2. Avant de les utiliser, nous nous assurons de laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante.
3. Pour préparer le tampon de lavage (1X), nous diluons 25 ml du tampon de lavage 20X dans 475 ml d'eau distillée.

Préparation des étalons :

Nous avons reconstitué le flacon lyophilisé de l'étalon concentré avec 1 ml de diluant pour étalon afin d'obtenir une concentration de 1 ug/ml.

Une série de dilution allant de 640ng/ml à 10ng/ml est préparée. (Voir tableau ci-dessous)

Nous avons utilisé le diluant pour étalon comme étalon zéro (étalon n° 0).

Tableau VI : Tableau des dilutions des standards

Concentration Standard	Flacon Standard	Dilutions
1ug/ml	Norme Originale	Standard lyophilisé fourni dans le kit + 1ml de diluant standard
640ng/ml	Norme n°7	320ul d'étalon reconstitué (1ug/ml) + 180ul de diluant d'étalon
320ng/ml	Norme n°6	250ul Standard No.7+ 250ul Diluant standard
160ng/ml	Norme n°5	250ul Standard No.6 + 250ul Diluant standard
80ng/ml	Norme n°4	250ul Standard No.5 + 250ul Diluant standard
40ng/ml	Norme n°3	250ul Standard No.4 +250ul Diluant standard
20ng/ml	Norme n°2	250ul Standard No.3 + 250ul Diluant standard
10ng/ml	Norme n°1	250ul Standard No.2 + 250ul Diluant standard

III.4.2. Procédure d'essai

1. Les étalons et les échantillons sont réalisés (16 sérums) en duplicatas, Et toutes les étapes sont effectuées à une température de 37°C.
2. 100 µl de standards préparés et d'échantillons dilués sont ajoutés dans les puits correspondants de la plaque.
3. La plaque est couverte et incubé pendant 60 minutes à 37°C.

4. Après cette période, le liquide des puits est aspiré, et la plaque est lavée 4 fois avec du tampon de lavage (1X). Pour garantir la propreté des puits, nous épongeons tout tampon résiduel en tapant fermement la plaque à l'envers sur du papier absorbant.
5. **100 µl** de conjugué Anti-Anti-**Rituximab : HRP** sont ensuite ajoutés dans chaque puits.
6. La plaque est à nouveau couverte incubée pendant 60 minutes à 37°C.
7. Après cette étape, Le processus de lavage est répétée en aspirant et en lavant la plaque 4 fois avec du tampon de lavage (1X), puis nous épongeons le tampon résiduel comme précédemment.
8. **100 µl du substrat TMB** sont ensuite ajoutés dans chaque puits.
9. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes dans l'obscurité, sans agitation, pour éviter d'augmenter le bruit de fond et de nuire à la précision. Les puits positifs prendront une couleur bleuâtre.
10. Enfin, 100 µl de solution d'arrêt sont ajoutés dans chaque puits. Cette étape fait passer les puits du bleu au jaune.
11. Pour conclure, nous utilisons un lecteur de microplaques pour mesurer l'absorbance

Tableau VII : Schéma de la microplaque d'essai

Concentration en ng/ml		1	2	3	4	5	6	7	8
	A	STD 640	STD 640	P n°1	P n°1	P n°9	P n°9	P n°17	P n°17
320	B	STD 2	STD 2	P n°2	P n°2	P n°10	P n°10	P n°18	P n°18
160	C	STD 3	STD 3	P n°3	P n°3	P n°11	P n°11	P n°19	P n°19
80	D	STD 4	STD 4	P n°4	P n°4	P n°12	P n°12	P n°20	P n°20
40	E	STD 5	STD 5	P n°5	P n°5	P n°13	P n°13		
20	F	STD 6	STD 6	P n°6	P n°6	P n°14	P n°14		
10	G	STD 7	STD 7	P n°7	P n°7	P n°15	P n°15		
0	H	STD 8	STD 8	P n°8	P n°8	P n°16	P n°16		

Cette opération a été réalisée une deuxième fois afin de tester 04 autres sérums de patients et pour confirmer les sérums positifs du premier essai.

Calcul des résultats :

L'absorbance moyenne pour chaque série d'étalons et d'échantillons effectuée en duplicate est calculée.

Ensuite, la valeur de l'absorbance moyenne de chaque série est reportée sur l'axe des Y.

Et la valeur des concentrations correspondantes est reportée sur l'axe des X.

Une courbe polynomiale de second ordre (Ordre 2nd) est ensuite tracée par le logiciel GRAPH PAD 8 afin d'obtenir des résultats automatisés.

III.5. Vérification de la neutralisation des anticorps anti-RTX

Des anticorps anti-RTX ont été détectés par ELISA chez 5 patients (25%). Nous avons ensuite vérifié si ces anticorps avaient un effet neutralisant avec la méthode de la plaque de Terasaki. [23]

Principe :

Le principe de cette manipulation consiste à évaluer la Cytotoxicité dépendante du complément du RTX en présence des Anticorps Anti-RTX, permettant ainsi de tester le pouvoir neutralisant de ces derniers.

La lecture des résultats se fait directement par dénombrement direct des cellules mortes et vivantes sur microscope à fluorescence optique en utilisant une double coloration Acridine Orange/ Ethidium Bromide.

Procédure d'essai :**Préparation des échantillons et pré-incubation :**

10 µl en duplicate des sérums provenant de patients présentant des anticorps anti-rituximab ont été prélevés.

Ensuite, 10µl de Rituximab à la concentration de 50ng/ml ont été ajoutés aux 10µl de prélèvements des patients.

Enfin, le mélange Sérum-RTX est pré-incubé pendant 2 heures.

Préparation du contrôle négatif :

Un sérum d'un donneur sain a été employé comme témoin négatif, il a été traité de la même manière que les sérums de patients.

Incubation avec les cellules Wil2S :

10µl de chaque mélange sérum-RTX ont été déposés dans le puit de la microplaque de Terazaki (**voir schéma ci-dessous**) puis ont été rajoutés $1,5 \times 10^3$ de cellules WIL2S pour une incubation de 30 minutes à température ambiante.

Activation du complément :

5 µl par puits de complément de lapin ont été ajoutés aux puits de la microplaque de Terazaki, cette dernière a été incubée à température ambiante pendant 45 minutes

Détection des cellules mortes :

Le dénombrement des cellules mortes et des cellules vivantes a été effectuée après l'ajout de 2,5µl par puits de colorant Fluoroquenched AO/EB et incubation pendant 10 minutes dans l'obscurité.

La lecture de la microplaque via microscope à fluorescence optique a été faite dans une chambre obscure.

Figure 8 : Schéma de la microplaque de Terasaki

10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
						C + Complément		Témoin négatif		A
						Cellules		P12	P12	B
										C
										D
										E
										F

Chapitre IV

Résultats et discussions

IV.1. Test de cytotoxicité dépendante du complément

IV.1.1. Valeurs des Densités Optiques du test CDC

Au cours de cette étude, nous avons mené une évaluation comparative de la cytotoxicité dépendante du complément du biosimilaire par rapport à trois lots de Mabthera : Mabthera 100 (1), Mabthera 100 (2) et Mabthera 500. Les valeurs des DO après incubation sont fournies dans la figure 10 :

Figure 9 : Resultats des D.O du test CDC

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	MAB 100(1)			MAB 100(2)			MAB 500			BIOSIMILAIRE		
20	0,547	0,383	0,386	0,616	0,625	0,486	0,408	0,407	0,458	0,49	0,486	0,543
10	0,829	0,593	0,543	0,641	0,663	0,654	0,589	0,629	0,702	0,778	0,55	0,687
5	1,2	1,044	0,915	0,825	1,151	1,157	0,829	1,023	0,962	1,646	1,142	0,818
2,5	1,823	1,597	1,529	1,033	1,103	1,106	1,219	1,22	1,609	1,581	0,943	0,959
1,25	2,023	1,836	1,742	1,291	1,582	1,573	2,707	1,879	2,088	1,393	1,258	1,34
0,625	2,785	2,318	1,853	1,486	2,267	1,734	0,269	2,721	2,563	2	1,537	1,756
0,3125	2,266	2,622	1,296	2,263	2,255	2,467	0,263	3,051	3,052	1,979	2,405	2,243
0,15625	2,922	2,906	0,486	2,621	2,916	2,738	0,378	3,018	2,957	3,101	2,178	2,556

Les observations initiales ont révélé une tendance marquée dans la variation de la densité optique en fonction de la concentration des médicaments. Cette tendance, conforme à l'effet attendu, indique que l'augmentation de la concentration de l'anticorps monoclonal est directement corrélée à une augmentation de son effet cytotoxique.

En d'autres termes, plus sa concentration est élevée, plus son action cytotoxique sur les cellules est prononcée, se traduisant par une diminution de l'absorbance, un reflet direct de la mortalité cellulaire accrue (voir Figure 10).

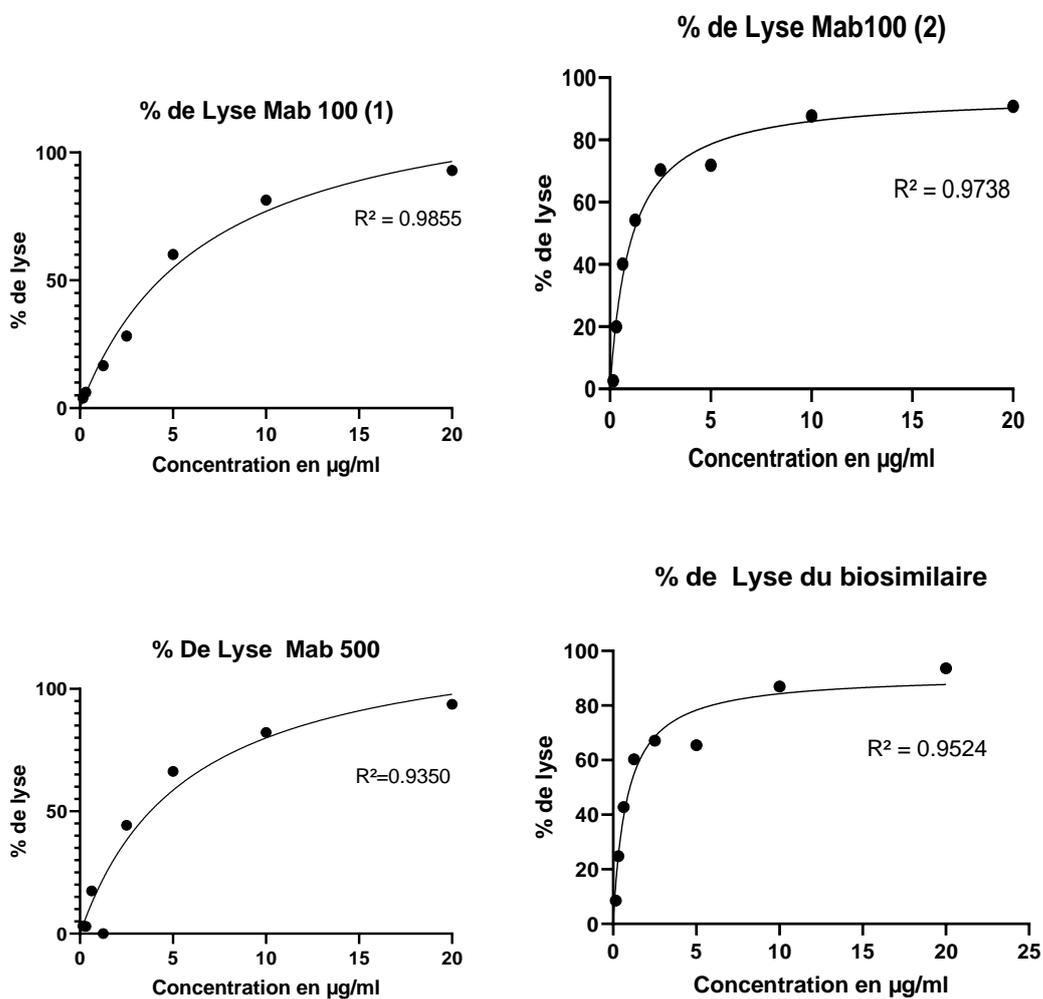
IV.1.2. Evaluation de la lyse cellulaire :

Le pourcentage de lyse de chaque produit de standard et du biosimilaire ont été calculés via la formules suivante : $\frac{DO(\text{du produit d'essai}) - DO(\text{Cellules + Complément})}{DO(\text{Cellules + Triton}) - DO(\text{Cellules + Complément})} \times 100$

X100

Nous avons représenté les données des pourcentages de lyse de chaque produit via un Graphique exposant une courbe des % de Lyse en fonction de la concentration en produit.

Figure 10 : Graphique représentant les % de Lyse des différents produits



Le pourcentage de lyse en fonction de la concentration a révélé une caractéristique de courbe sigmoïde, à une concentration de 10 µg/ml, tous les médicaments testés ont démontré un pourcentage de lyse dépassant 80 %. Ce qui signifie que le biosimilaire possède un potentiel cytotoxique comparable à celui des formulations de produit de référence.

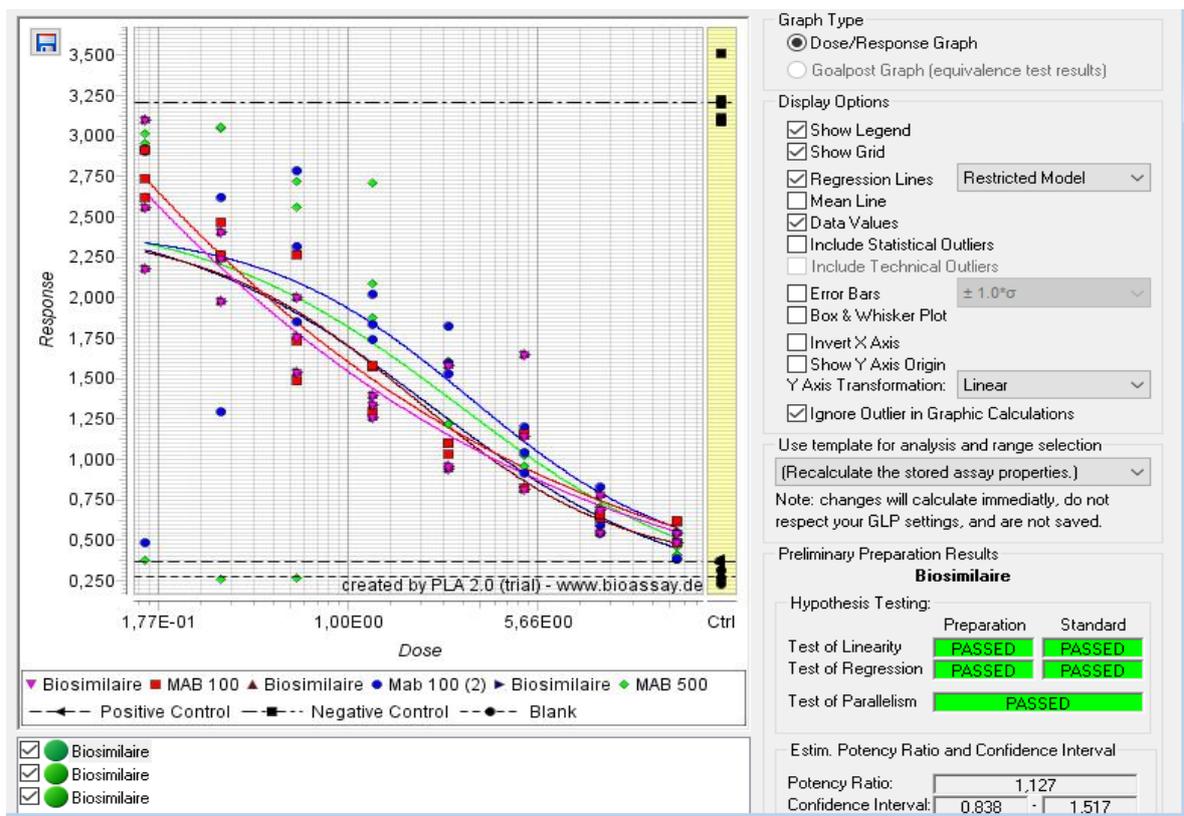
IV.1.3. Comparaison de l'activité du biosimilaire à celle des échantillons de référence

Il est nécessaire de calculer la puissance relative qui désigne la capacité d'un échantillon d'essai, d'activité inconnue, à produire une réponse souhaitée par rapport à un échantillon de référence, lorsqu'il est testé dans les mêmes conditions.

IV.1.3.1. Vérification de la validité de l'essai

Selon le chapitre 5.3 de la pharmacopée européenne avant d'interpréter les résultats on doit s'assurer que la **régression**, la **linéarité**, et le **parallélisme** soient validés par la méthode de lignes parallèles ; Nous avons utilisé les logiciel PLA 2.0 à cet effet. (Voir figure 12)

Figure 11 : Courbe Dose/Réponse Logiciel PLA



Les paramètres de Linéarité, Régression et Parallélisme ont tous été validés par le logiciel, cela confirme la crédibilité de la manipulation et de ses résultats.

Ci-dessous un tableau récapitulatif des tests de validité de linéarité, régression et parallélisme pour chaque produit de standard comparé au Biosimilaire :

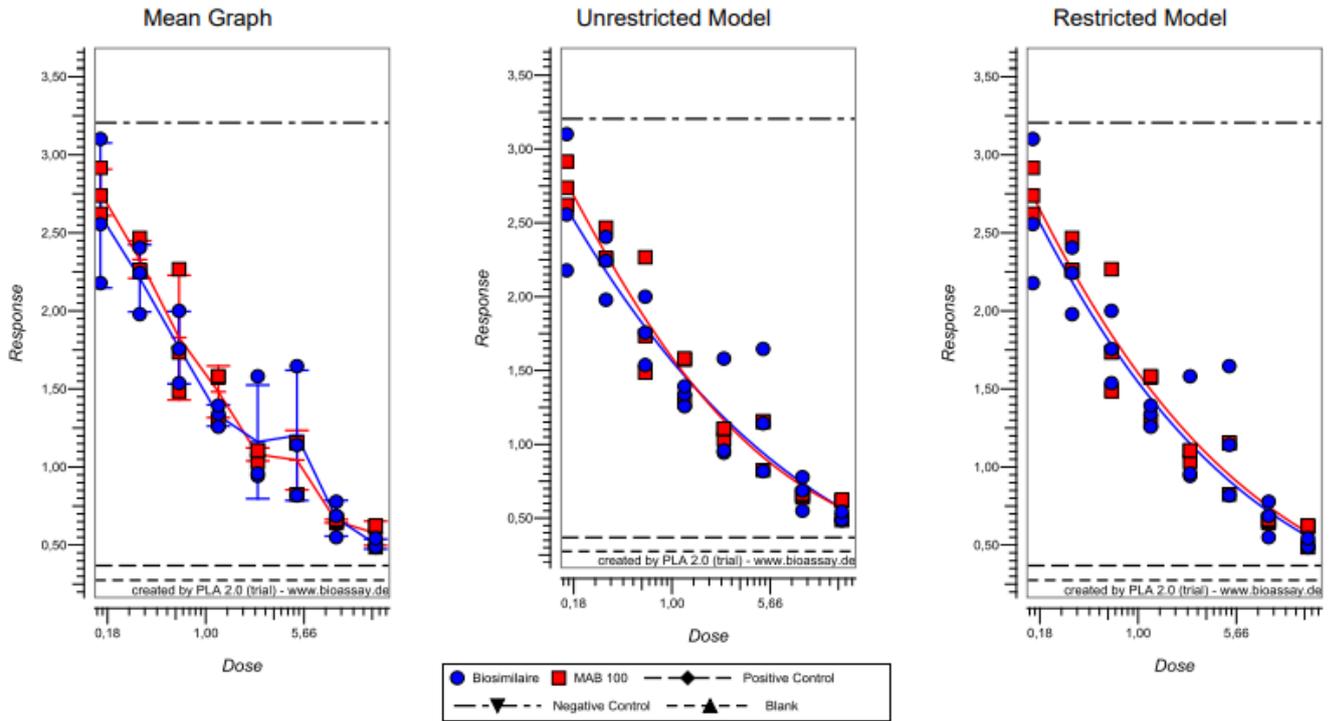
Tableau VIII : Critères d'acceptation du Test de validité

Critères du Test	Biosimilaire vs STD (1) Mab 100 (1)	Biosimilaire vs STD Mab 100 (2)	Biosimilaire vs STD Mab 500
Parallélisme F-test (95%) doit être satisfait $F < F$ théorique	$F = 0.208$ F théorique = 2.901 Test Satisfait	$F = 1.702$ F théorique = 2.901 Test Satisfait	$F = 0.811$ F théorique = 2.901 Test Satisfait
Linéarité F-test (95%) doit être satisfait $F < F$ théorique	$F = 0.844$ F théorique = 2.244 Test Satisfait	$F = 0.292$ F théorique = 2.244 Test Satisfait	$F = 0.206$ F théorique = 2.244 Test Satisfait
Régression F-test (95%) doit être satisfait $F > F$ théorique	$F = 138.512$ F théorique = 2.901 Test satisfait	$F = 31.303$ F théorique = 2.901 Test satisfait	$F = 13.935$ F théorique = 2.901 Test satisfait

IV.1.3.2. Calcul de l'activité relative du biosimilaire par rapport aux 03 lots du produit de référence

Les rapports (activité du médicament biosimilaire / Activité du produit de référence) ont été calculés via le logiciel **PLA 2.0** ; Le biosimilaire a présenté une activité de 112%, 167% et 130% relativement aux 3 lots du produit de référence respectivement. **(Voir Figure)**

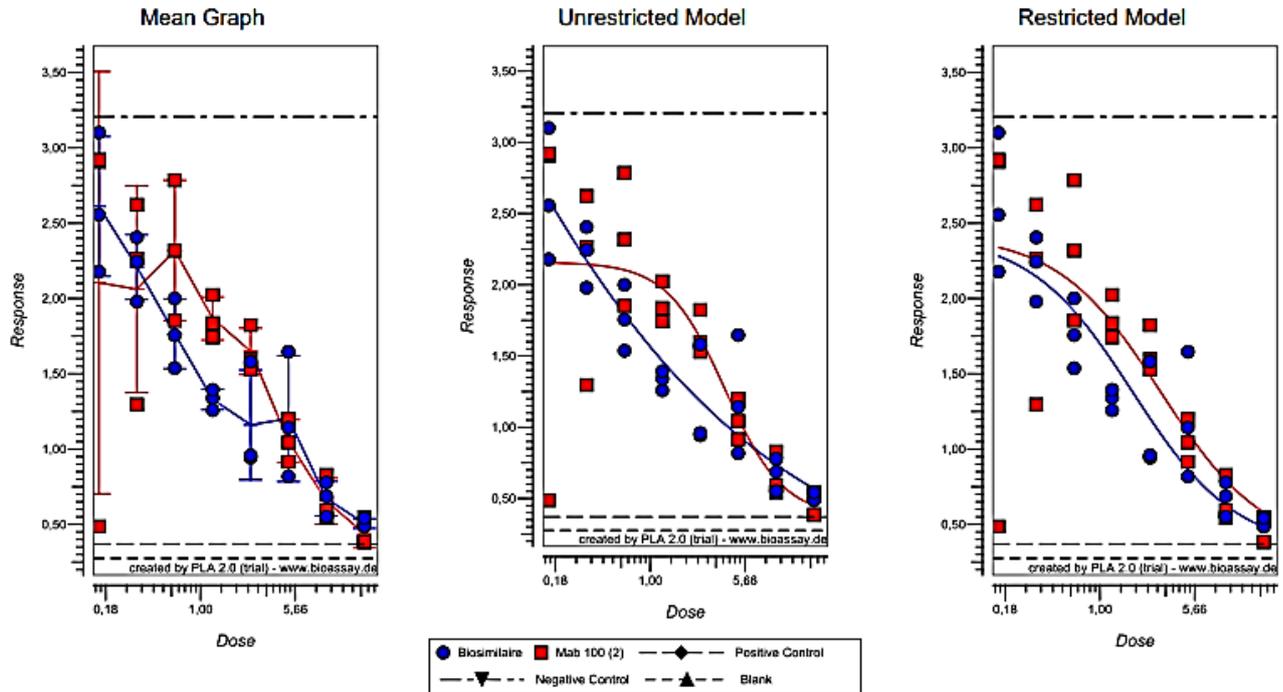
Figure 12 : Courbe Dose/Reponse du Biosimilaire et du Mab100 et son activité relative



Potency Estimation

Biosimilaire vs. MAB 100	
Potency Ratio (without Pre-Dilution Factors)	1.127
95.0% Confidence Interval	0.838 - 1.517
Relative Confidence Interval	74.3% - 134.5% (60.2%)

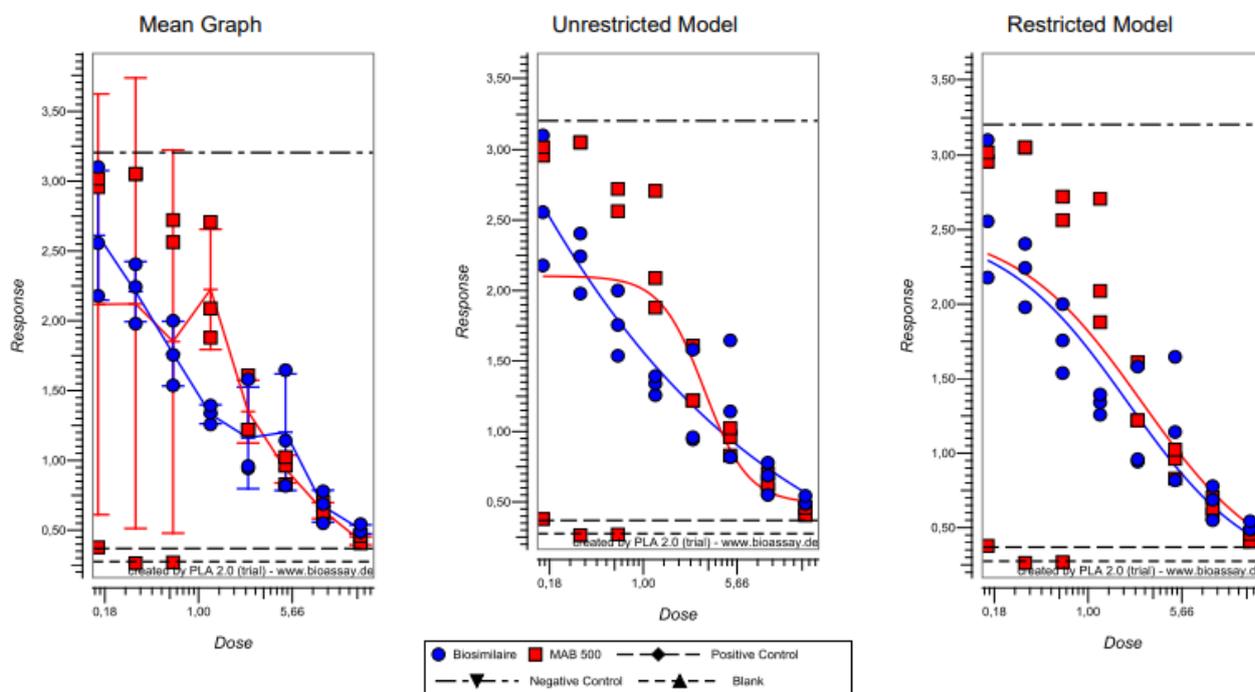
Figure 13 : Courbe Dose/Reponse du Biosimilaire et du Mab100(2) et son activité relative



Potency Estimation

Biosimilaire vs. Mab 100 (2)	
Potency Ratio (without Pre-Dilution Factors)	1.670
95.0% Confidence Interval	0.803 - 3.472
Relative Confidence Interval	48.1% - 207.9% (159.8%)

Figure 14 : Courbe dose/réponse du biosimilaire et du Mab 500 et son activité relative



Potency Estimation

Biosimilaire vs. MAB 500	
Potency Ratio (without Pre-Dilution Factors)	1.303
95.0% Confidence Interval	0.437 - 3.886
Relative Confidence Interval	33.5% - 298.2% (264.7%)

L'activité du produit biosimilaire est estimée comparable par rapport aux lots Mab 100 (1) et Mab 500 (2) Cependant elle est plus élevée par rapport au lot Mab 100 (2).

Cependant il est a noté que le pourcentage de lyse obtenu avec ce dernier est le plus faible Relativement aux lots Mab 100 (1) et Mab 500 Ce qui peut justifier en partie le résultat obtenu.

La lignée cellulaire Wil2-S est préconisée pour le test CDC du rituximab ; Il s'agit d'une lignée de lymphoblastes qui surexprime le CD20 cible thérapeutique du Rituximab[21]

Nos résultats renforcent la validité du biosimilaire dans le contexte de la cytotoxicité dépendante du complément. En résumé, ces données fournissent une base solide pour l'approbation du biosimilaire.

Toutefois, il reste à élargir cette évaluation sur un nombre plus important de lots du biosimilaire et du produit de référence.

IV.2. Procédure de recherche des anticorps anti rituximab dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde par technique ELISA

La détection des anticorps anti-rituximab dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) est un sujet d'intérêt dans le domaine de la médecine et de la recherche clinique. Car dans certains cas, des anticorps dirigés contre le médicament lui-même (anticorps anti-rtx) peuvent se développer chez les patients. Cela peut avoir des implications cliniques importantes, notamment en réduisant l'efficacité du traitement.

La recherches des anticorps a été effectuée via le test Elisa.

Les densités optiques obtenues pour les étalons et les sérums figurent dans le tableau :

Tableau IX : Résultats de la Densité Optique des échantillons du test ELISA

		STANDARD			PATIENTS				
Concentration en µg/ml		1	2	3	4	5	6	7	8
640	A	2,595	2,74	0,008	0,003	0,01	0,011	0,008	0,012
320	B	2,32	2,051	0,004	0,004	0,003	0,004	0,007	0,011
160	C	1,336	1,367	0,015	0,003	0,002	0,003	0,012	0,010
80	D	0,62	0,518	0,003	0,005	0,003	0,004	0,019	0,022
40	E	0,309	0,257	0,004	0,004	0,002	0,004		
20	F	0,125	0,128	0,008	0,005	0,002	0,003		
10	G	0,079	0,072	0,004	0,004	0,002	0,003		
0	H	0,005	0,005	0,01	0,005	0,005	0,006		

Figure 15 : Courbe du standard de référence

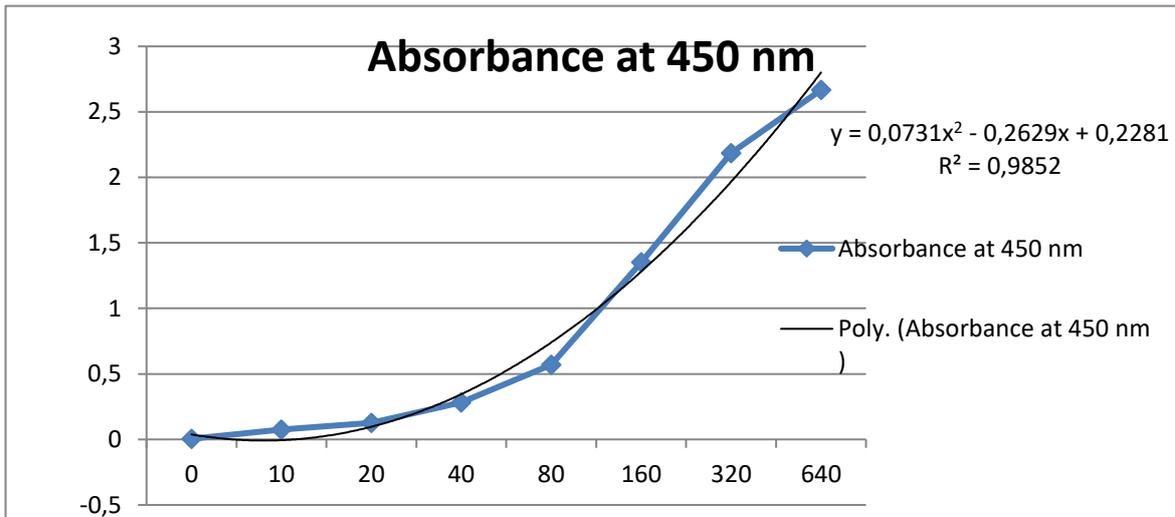
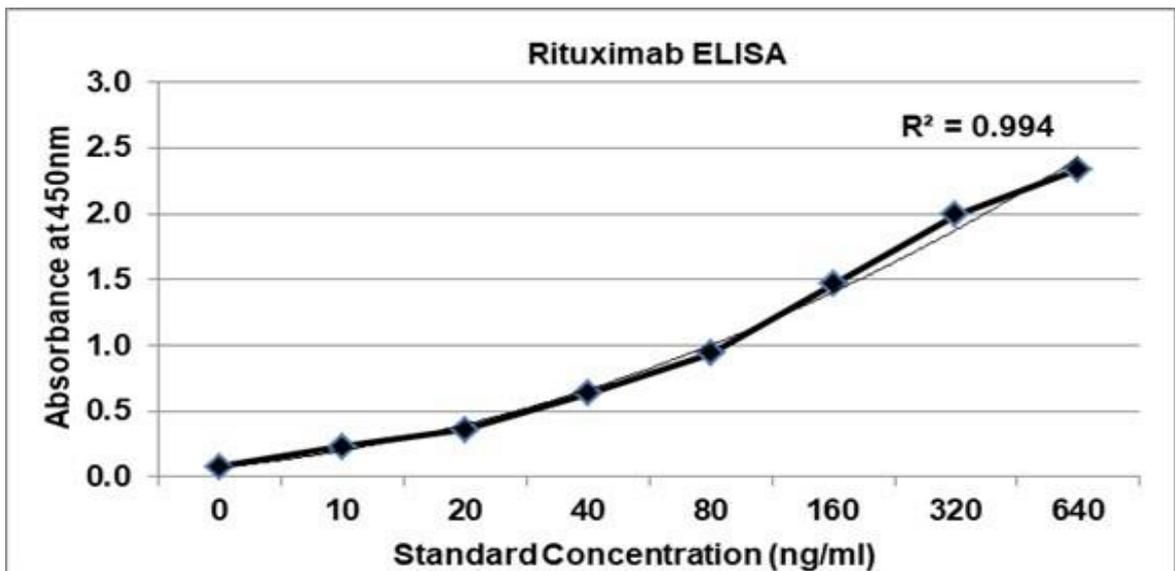


Figure 16 : Courbe dose réponse de l'étalon élaborée par le fabricant du kit



Comme les deux figures le montrent, le coefficient de corrélation R^2 de la courbe dose réponse de l'étalon est de $R^2 = 0.9852$ et est comparable à celui de la courbe tracée par le fabricant du KIT, ainsi il est possible d'interpréter les résultats obtenus pour nos patients.

Les sérums des patients : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ont présenté une DO inférieure ou égale à celle du témoin négatif. De ce fait on peut conclure que ces patients n'ont pas développé d'anticorps anti rituximab après 06 mois de traitement par ce dernier

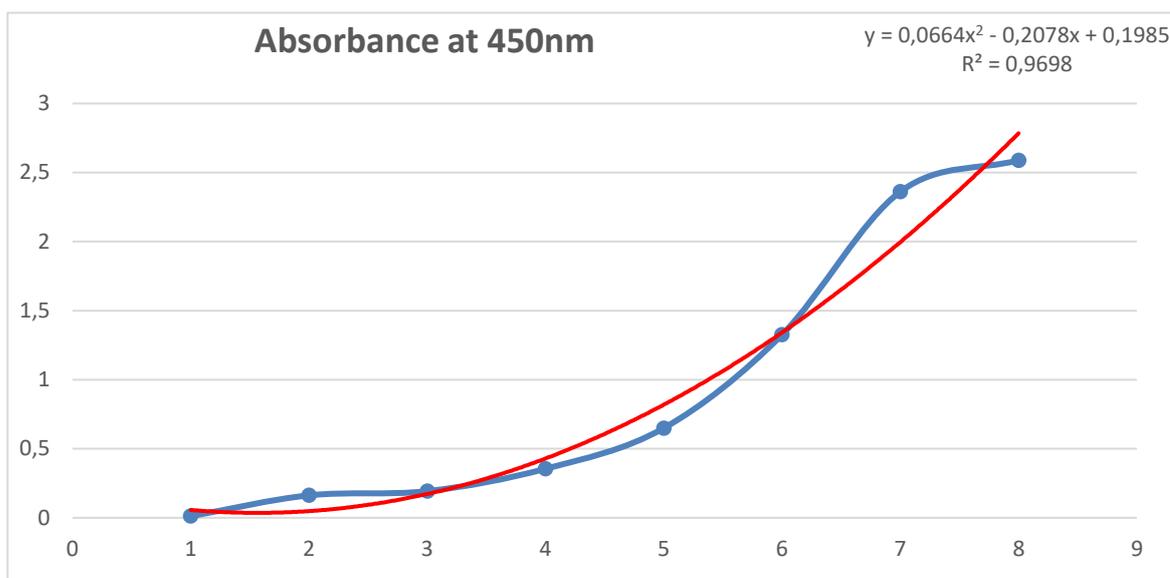
Quant aux sérums des patients 7, 9, 11, 12 ; les DO sont supérieurs à celles du témoin négatif, une confirmation de la positivité des échantillons est nécessaire en effectuant un deuxième essai.

Résultats du deuxième TEST ELISA pour les patients suspectés :

Tableau X : Résultats de la Densité Optique des échantillons du test ELISA

		STANDARD		PATIENTS		
Concentration en µg/ml		1	2	Duplicate 1	Duplicate 2	Numéro des patients
640	A	2,586	2,592	0,011	0,025	P7
320	B	2,602	2,121	0,02	0,019	P9
160	C	1,578	1,074	0,016	0,01	P11
80	D	0,661	0,638	0,019	0,022	P12
40	E	0,359	0,351			
20	F	0,209	0,177			
10	G	0,113	0,212			
0	H	0,012	0,012			

Figure 17 : Courbe du standard de référence du deuxième essai



Encore une fois le coefficient R^2 est similaire à celui du graphique fourni par le constructeur du KIT.

Ce deuxième essai confirme la positivité de l'échantillon du patient 12, les résultats des **D.O** de ce dernier sont effectivement au-dessus du témoin négatif, cela indique une présence d'Anticorps Anti-Rituximab.

Les échantillons des patients N° 11, 7, et 9 sont par contre négatif.

La concentration en **ARA** présente dans le sérum du patient 12 peut être calculée via l'équation du graphique des étalons de standard :

$$y = 0,0664x^2 - 0,2078x + 0,1985$$

La concentration en **ARA** du patient 12 est de $X = 3.631 \mu\text{g/ml}$.

En conclusion, sur les 20 patients traités, 95% semblent ne pas présenter de réponse immunitaire contre le rituximab, Quant au patient N°12, les deux essais prouvent clairement qu'il a effectivement développé des ARA, dont la concentration est de **3.631 $\mu\text{g/ml}$** .

Sur les 20 patients suivis pendant 06 mois seulement 1 (95%) atteints de polyarthrite rhumatoïde a développé des anticorps anti-RTX.

Une étude, menée par **Snehamayee Nayak** sur les patients de néphrotiques idiopathiques traitée par RTX indique que sur les 34 patients suivis pendant un an, 5 patients (14,7 %) ont développé des anticorps anti-RTX. [22]

Nos résultats indiquent un taux plus faible d'anticorps anti-RTX parmi les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde par rapport aux patients néphrotique idiopathique traités par le RTX.

Néanmoins, nous ne pouvons affirmer si ces ARA présentent un pouvoir neutralisant contre le Rituximab, c'est pour cela que dans une deuxième étape, nous avons effectué une expérimentation qui vise à mettre en évidence la capacité neutralisante de ces derniers.

IV.3. Vérification de la neutralisation des anticorps anti-RTX

Dans cette partie, nous présentons les résultats d'une expérience visant à évaluer le potentiel neutralisant des anticorps anti-RTX via l'évaluation de la cytotoxicité dépendante du complément du rituximab (produit fini) pré-incubé avec le sérum du patient.

La lecture se fait par observation directe avec un microscope à fluorescence des cellules Wil2S. Suite à notre test nous avons dénombré les cellules :

Le blanc :

- Cellules vivantes : 1342 → 92%
- Cellules mortes : 118 → 8%

Cellules + Complément :

- Cellules vivantes : 580 → 97,3%
- Cellules mortes : 16 → 2,7%

Témoin Négatif :

- Cellules vivantes : 1444 → 88,04%
- Cellules mortes : 196 → 11,96%

Patient :

- Cellules vivantes : 1304 → 91,3%
- Cellules mortes : 124 → 8,7%

Nous remarquons que le taux de viabilité cellulaire dépasse 88% pour le témoin négatif (ne contenant pas d'**ARA**). Alors qu'une cytotoxicité est attendue dans ce cas de figure.

De ce fait, l'essai ne peut être validé et nous ne pouvons pas interpréter les résultats obtenus pour le patient.

*Conclusion Générale &
Résumé*

En conclusion, cette évaluation approfondie de l'efficacité et l'immunogénicité du rituximab et de son biosimilaire, associée à des résultats prometteurs, renforce la confiance dans la viabilité de ce médicament en tant qu'alternative sécuritaire et efficace pour les patients.

L'étude a révélé une faible immunogénicité du rituximab, avec seulement 05% des patients présentant des réponses immunitaires positives. Cette faible immunogénicité est un indicateur crucial de la tolérance du traitement, suggérant que le médicament est bien accepté par le système immunitaire des patients.

Les résultats obtenus montrent une efficacité convaincante du biosimilaire, comparable à celle du rituximab, ce qui est une avancée significative pour les options thérapeutiques disponibles.

L'essai d'évaluation du potentiel neutralisant des anticorps anti-RTX ne peut pas être validé car les résultats montrent une viabilité cellulaire élevée pour le témoin négatif, ce qui contredit les attentes de cytotoxicité. Par conséquent, les résultats obtenus pour le patient ne peuvent pas être interprétés de manière fiable.

En somme, les données recueillies soutiennent fortement l'intégration du biosimilaire du rituximab dans les pratiques cliniques courantes, offrant aux patients une alternative thérapeutique efficace et bien tolérée, tout en soulignant l'importance de d'une vigilance constante pour préserver les standards élevés de soins médicaux.

Résumé

L'évaluation de l'efficacité et de la tolérance d'un biosimilaire du rituximab est d'une importance primordiale dans le processus d'approbation et d'adoption de ces médicaments. En tant que traitement crucial pour de nombreuses maladies graves, il est essentiel que les biosimilaires conservent des niveaux d'efficacité et de tolérance équivalents à ceux du produit de référence. Une évaluation rigoureuse est indispensable pour assurer la sécurité des patients qui dépendent de ce médicament.

Dans notre étude, nous avons utilisé le test de cytotoxicité dépendante du complément (CDC) pour comparer l'efficacité du biosimilaire avec celle du produit de référence. Les résultats ont démontré une similitude significative entre le biosimilaire et le produit de référence, renforçant ainsi la confiance dans l'efficacité du biosimilaire. Cette méthode souligne l'importance de tests robustes et de la transparence des données pour une évaluation approfondie des biosimilaires.

Par ailleurs, notre évaluation de l'immunogénicité du rituximab à l'aide de la technique ELISA a révélé que seulement 5 % des patients présentaient des réponses positives. Cette faible immunogénicité est un résultat positif, suggérant que le rituximab, ainsi que son biosimilaire, sont bien tolérés par la majorité des patients.

L'expérience visant à évaluer le potentiel neutralisant des anticorps anti-RTX en analysant la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) du rituximab (RTX) pré-incubé avec le sérum du patient. Les observations sont faites à l'aide d'un microscope à fluorescence pour déterminer la viabilité des cellules Wil2S. Cependant, le taux de viabilité cellulaire du témoin négatif a été trop élevé, ce qui a empêché de valider l'essai et d'interpréter les résultats pour le patient.

Alors que les biosimilaires du rituximab offrent une opportunité d'améliorer l'accessibilité et la gestion des maladies, il est impératif de maintenir des normes élevées en matière d'évaluation et de surveillance afin de garantir la sécurité et l'efficacité des traitements pour les patients, aujourd'hui et à l'avenir.

Evaluating the efficacy and safety of a rituximab biosimilar is of paramount importance in the approval and adoption process of these drugs. As a crucial treatment for many serious diseases, it is essential that biosimilars maintain levels of efficacy and tolerability equivalent to those of the reference product. Rigorous evaluation is essential to ensure the safety of patients who rely on this medicine.

In our study, we used the complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay to compare the efficacy of the biosimilar with that of the reference product. The results demonstrated significant similarity between the biosimilar and the reference product, thereby increasing confidence in the effectiveness of the biosimilar. This method highlights the importance of robust testing and data transparency for thorough biosimilar evaluation.

Furthermore, our evaluation of the immunogenicity of rituximab using the ELISA technique revealed that only 5% of patients had positive responses. This low immunogenicity is a positive result, suggesting that rituximab, as well as its biosimilar, are well tolerated by the majority of patients.

The experiment aimed at evaluating the neutralizing potential of anti-RTX antibodies by analyzing the complement-dependent cytotoxicity (CDC) of rituximab (RTX) pre-incubated with patient serum. Observations are made using a fluorescence microscope to determine the viability of Wil2S cells. However, the cell viability rate of the negative control was too high, making it impossible to validate the assay and interpret the results for the patient.

While rituximab biosimilars offer an opportunity to improve accessibility and disease management, it is imperative to maintain high standards of evaluation and monitoring to ensure the safety and effectiveness of treatments for patients, today and in the future.

إن تقييم فعالية وسلامة البديل الحيوي ريتوكسيماب له أهمية قصوى في عملية الموافقة على هذه الأدوية واعتمادها. كعلاج حاسم للعديد من الأمراض الخطيرة، من الضروري أن تحافظ البدائل الحيوية على مستويات من الفعالية والتحمل تعادل تلك الموجودة في المنتج المرجعي. التقييم الدقيق ضروري لضمان سلامة المرضى الذين يعتمدون على هذا الدواء.

لمقارنة فعالية البديل الحيوي مع فعالية (CDC) في دراستنا، استخدمنا مقياس السمية الخلوية المعتمدة على المكملات المنتج المرجعي. أظهرت النتائج تشابهًا كبيرًا بين البديل الحيوي والمنتج المرجعي، وبالتالي زيادة الثقة في فعالية البديل الحيوي. تسلط هذه الطريقة الضوء على أهمية الاختبار القوي وشفافية البيانات لإجراء تقييم شامل للبدائل الحيوية.

أن 5% فقط من المرضى كانت لديهم ELISA علاوة على ذلك، كشف تقييمنا لمناعة ريتوكسيماب باستخدام تقنية استجابات إيجابية. يعد انخفاض المناعة نتيجة إيجابية، مما يشير إلى أن ريتوكسيماب، بالإضافة إلى بدائله الحيوية، يتحملها غالبية المرضى جيدًا.

من خلال تحليل السمية الخلوية المعتمدة على المكملات RTX تهدف التجربة إلى تقييم قدرة تحييد الأجسام المضادة لـ المحتضن مسبقًا بمصل المريض. يتم إجراء الملاحظات باستخدام مجهر مضان (RTX) لريتوكسيماب (CDC) ومع ذلك، كان معدل بقاء الخلية للتحكم السلبي مرتفعًا جدًا، مما يجعل من Wil2S لتحديد مدى صلاحية خلايا المستحيل التحقق من صحة الفحص وتفسير النتائج للمريض.

في حين أن البدائل الحيوية لريتوكسيماب توفر فرصة لتحسين إمكانية الوصول وإدارة الأمراض، فمن الضروري... الحفاظ على معايير عالية من التقييم والرصد لضمان سلامة وفعالية العلاجات للمرضى، اليوم وفي المستقبل.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Rituximab>
2. <https://iwmf.com/wp-content/uploads/2020/10/RituximabFactSheet-French.pdf>
3. <https://www.lymphoma.ca/fr/comprendre-lusage-du-rituximab-rituxan-au-canada/>
4. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, et al. IDEC-C2B8 (rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90(6):2188-2195.
5. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D, et al. B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum*. 2004;50(8):2580-2589.
6. Les anticorps monoclonaux © Les défis du CEA / J. Perrodeau Octobre 2022
7. Byrd JC, et al. Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance. *J Clin Oncol*. 1999 ;17(3) :791-795.
8. Weinblatt ME, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum*. 2003 ;48(1) :35-45
9. Weinreich DM, et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(3):238-251.
10. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Anticorps>
11. https://theory.labster.com/antibody_variation-fr/45
12. https://acthera.univ-lille.fr/co/04_type.html cours université de Lille
13. Weiner GJ. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2015 ;15(6) :361-370.
14. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol*. 1987 ;196(4):901-917. doi: 10.1016/0022-2836(87)90412-8
15. L. Rougé et al., *Science* 10.1126/science.aaz9356 (2020).
16. https://acthera.univ-lille.fr/co/Rituximab__MABTHERAJ_.html
17. Le rituximab : une biothérapie originale dans les maladies auto-immunes J. Sibilica C. Sordet (2005)

Références bibliographiques

18. Smith, M. R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22(47), 7359–7368. doi:10.1038/sj.onc.1206939
19. Cernota, W. H., et al. (2017). Immunogenicity of monoclonal antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(10), 2927-2936.
20. Malik, S., et al. (2019). Immunogenicity of therapeutic monoclonal antibodies: manufacturing, preclinical, and clinical considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20(1), 12-22.
21. Dorvignit, D., Palacios, J.L., Merino, M., Hernández, T., Sosa, K., Casacó, A., LópezRequena, A., Acosta, C.M. de, 2012. Expression and biological characterization of an anti-CD20 biosimilar candidate antibody. *mAbs* 4, 488–496. <https://doi.org/10.4161/mabs.20761>
22. Snehamayee Nayak, Rina Tripathy, Subal Kumar Pradhan. Anti-Rituximab Antibodies in Idiopathic Nephrotic Children Treated with Rituximab : A Prospective Single Centre Study
23. Sonia Boyer. Anti-CD20 monoclonal antibodies immuno-monitoring in primary membranous nephropathy to guide personalized treatment. *Human health and pathology*. 2017. ffdumas-02328650

Annexes

Annexes

Annexe 01

Sterilisation du matériels

Avant chaque manipulation nous mettons le matériels qu'on doit utiliser dans la hote a flux laminaire et nous activons les UV pendant 10minutes.



Annexes

Annexe 02

Quelques photos montrant la décongélation d'un Cryotube de cellule Wil2s :



Annexe 03

Calcul de la viabilité via la cellule de Malassez

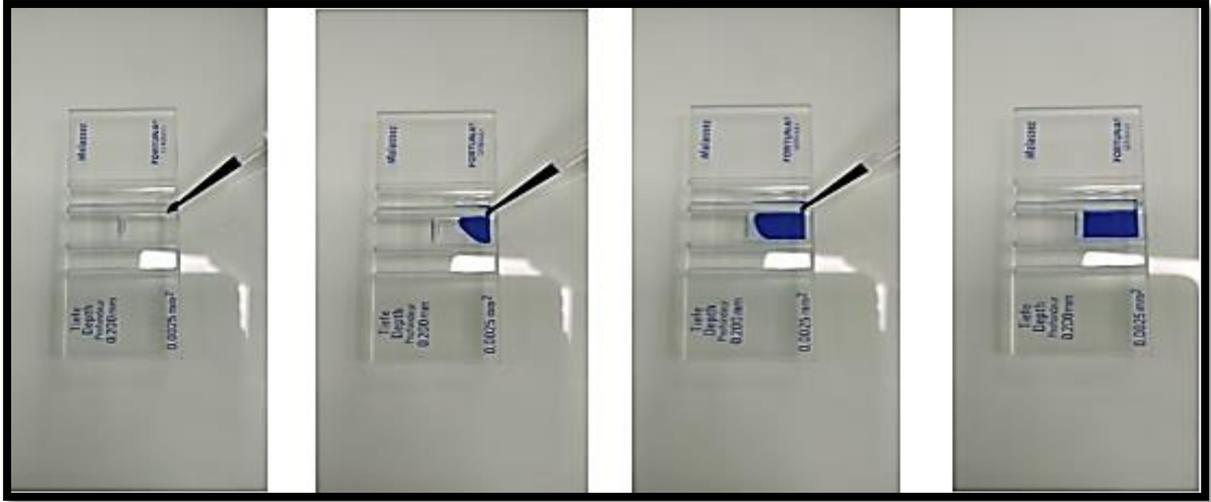


Figure : Remplissage de la cellule de Malassez

Calcul de la viabilité via la cellule de malassez :

La concentration cellulaire est compte en utilisant la formule ci-dessous :

(Nombre de cellules / nombre de cases) * facteur de dilution * 10^5

Ensuite le taux de viabilité est calculé un utilisant la formule ci-dessous :

Nombre de cellules vivantes / Nombre de cellules total * 100

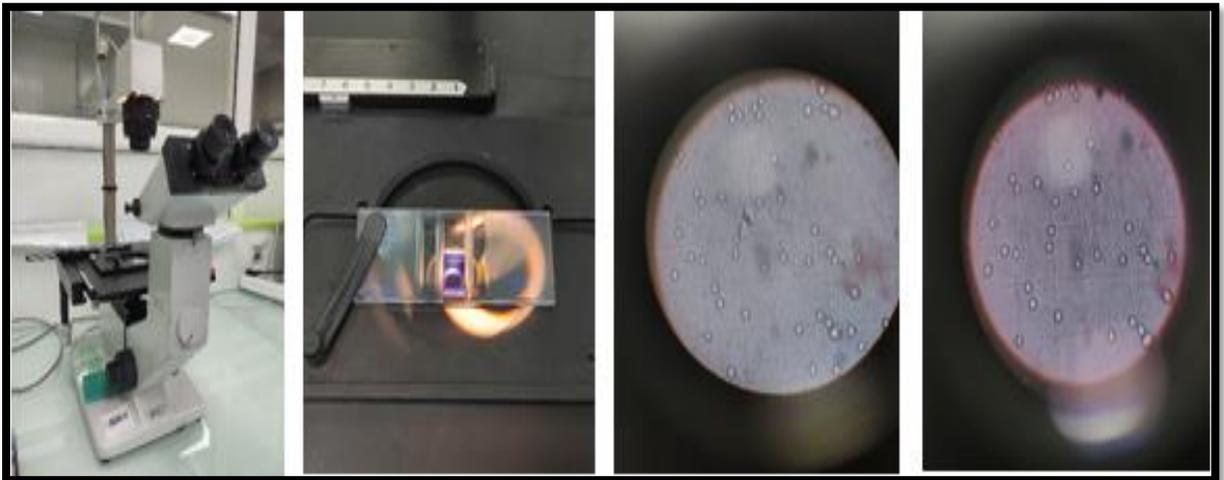
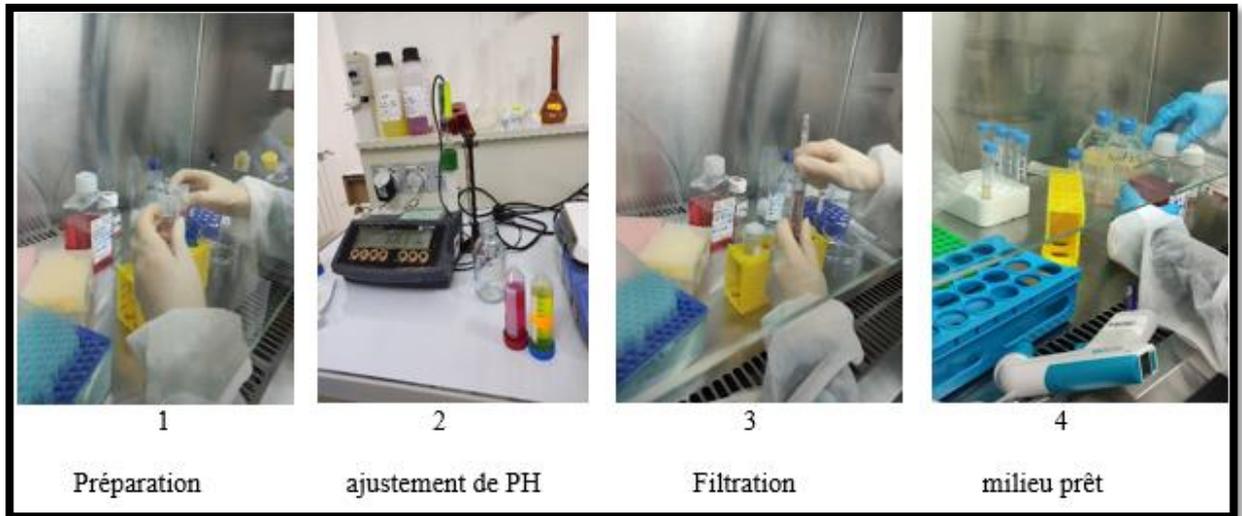


Figure : Dénombrement via cellule de malassez

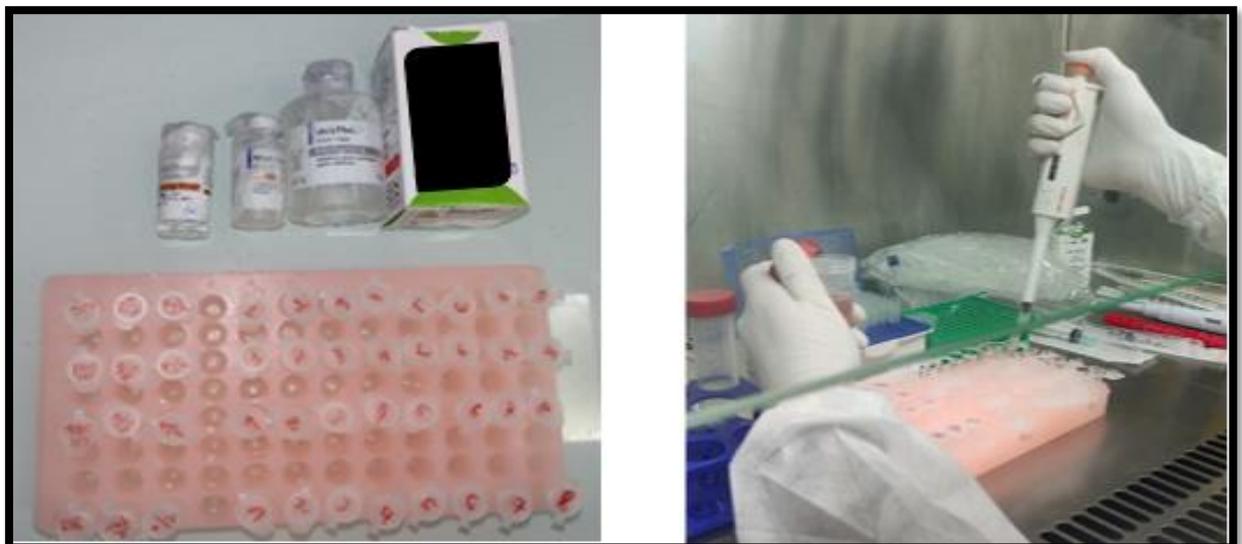
Annexe 03

Préparation des dilutions pour le test CDC

1. Milieu d'essai :



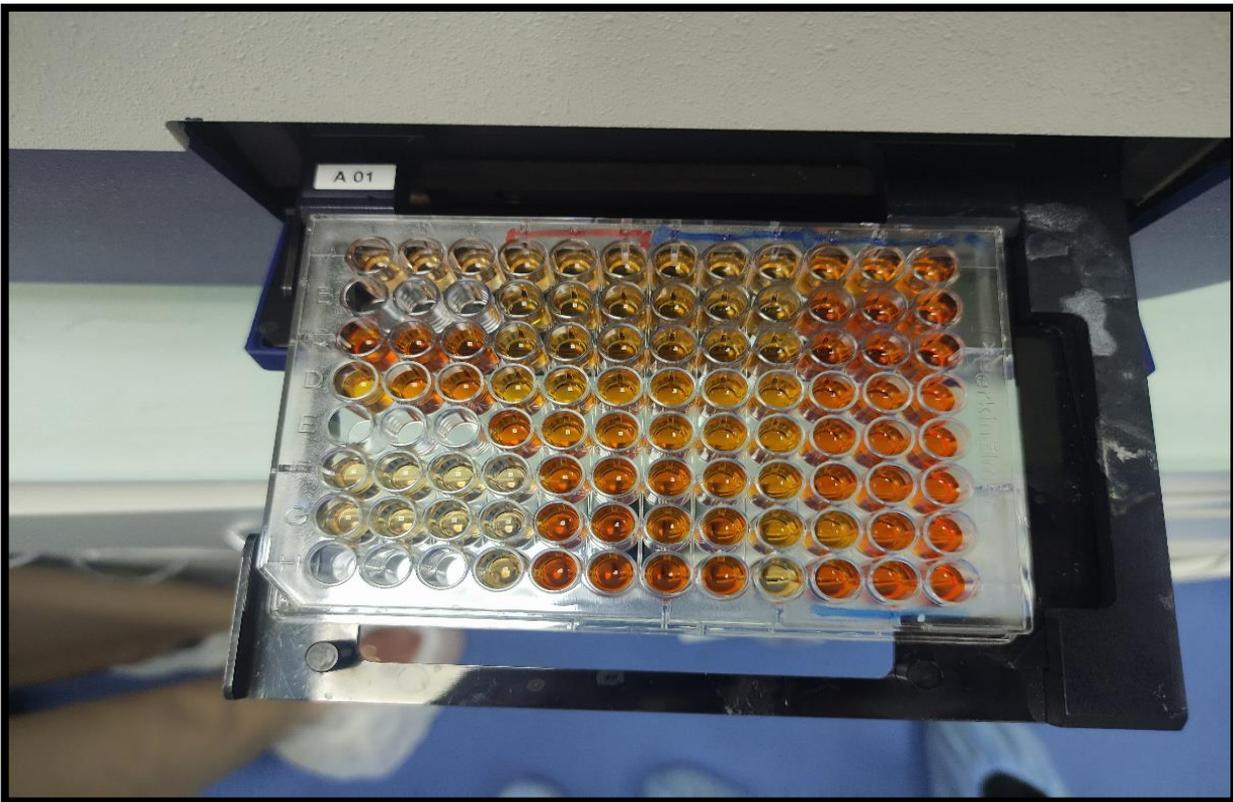
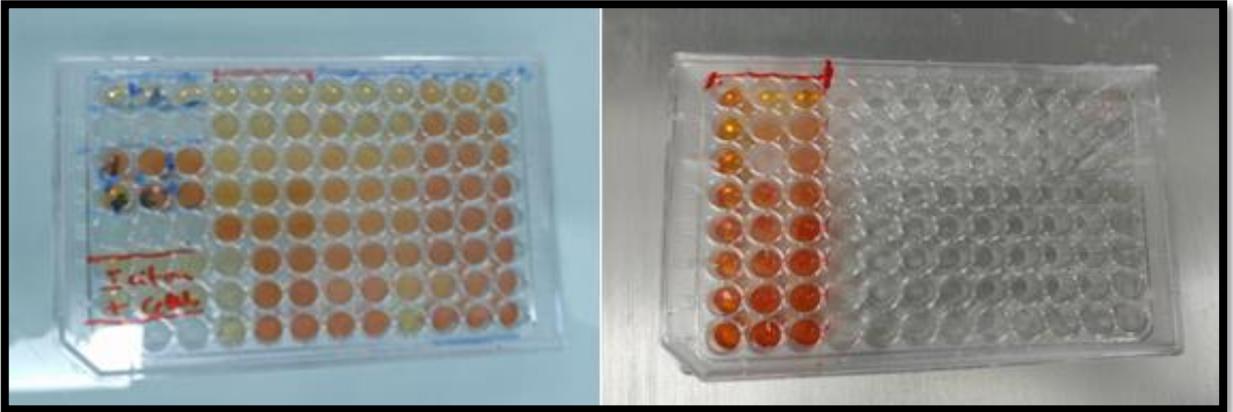
2. Les dilutions des rituximab et du biosimilaire :



Annexes

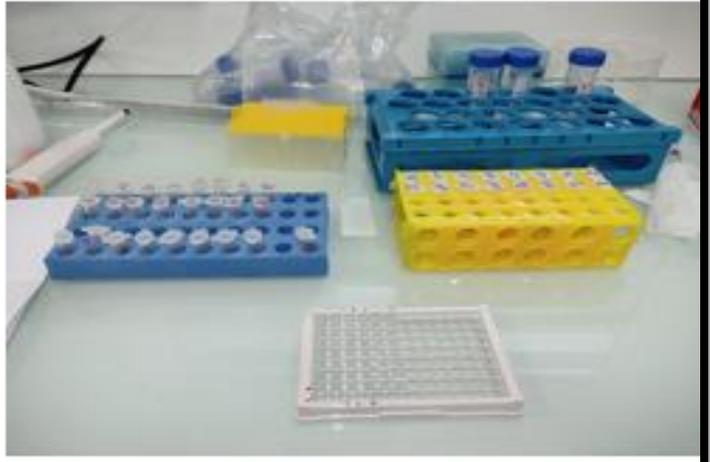
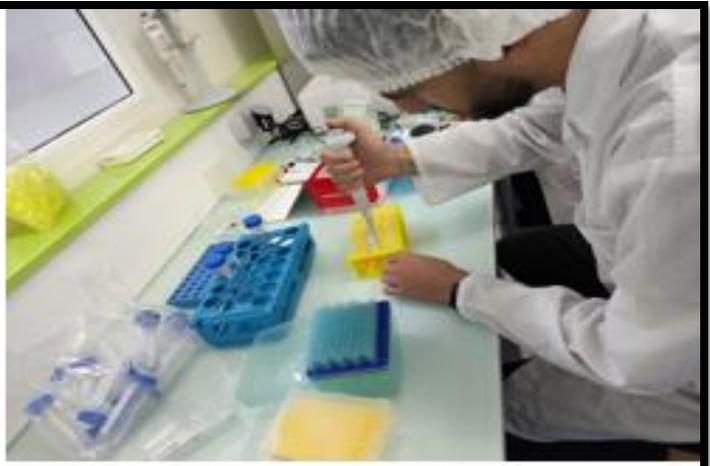
Annexe 04

Microplaque utilisée dans le test CDC



Annexe 05

Photos de notre manipulation Elisa



Annexe 07

Photos de la microplaque Elisa

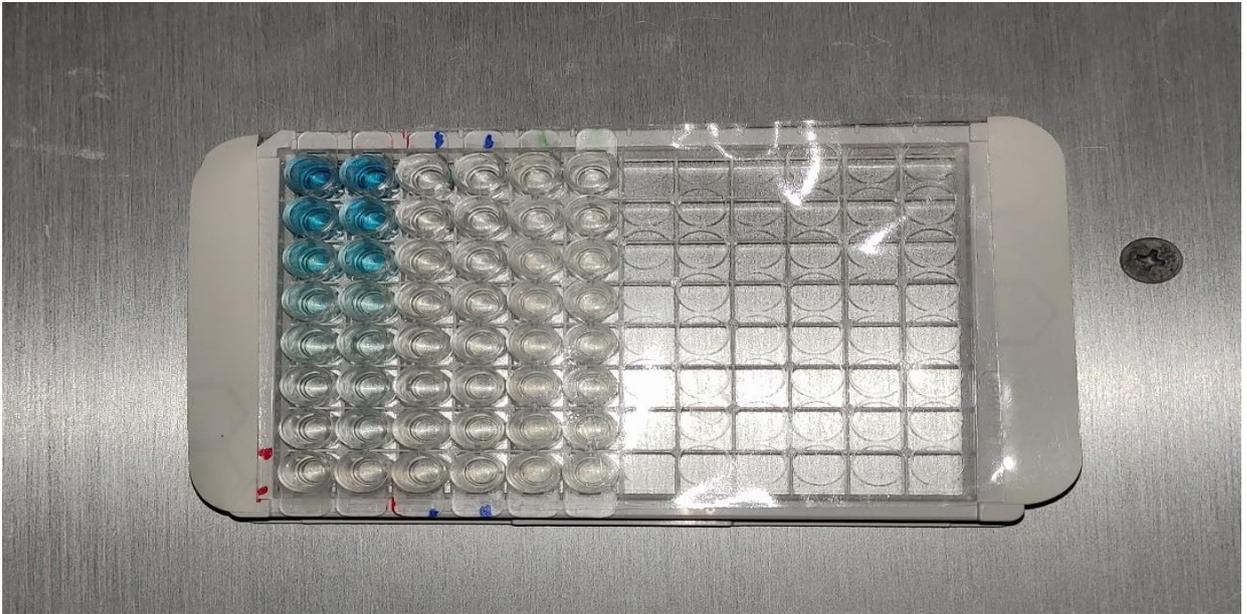


Figure : Microplaque elisa apres ajout du substrat TMB

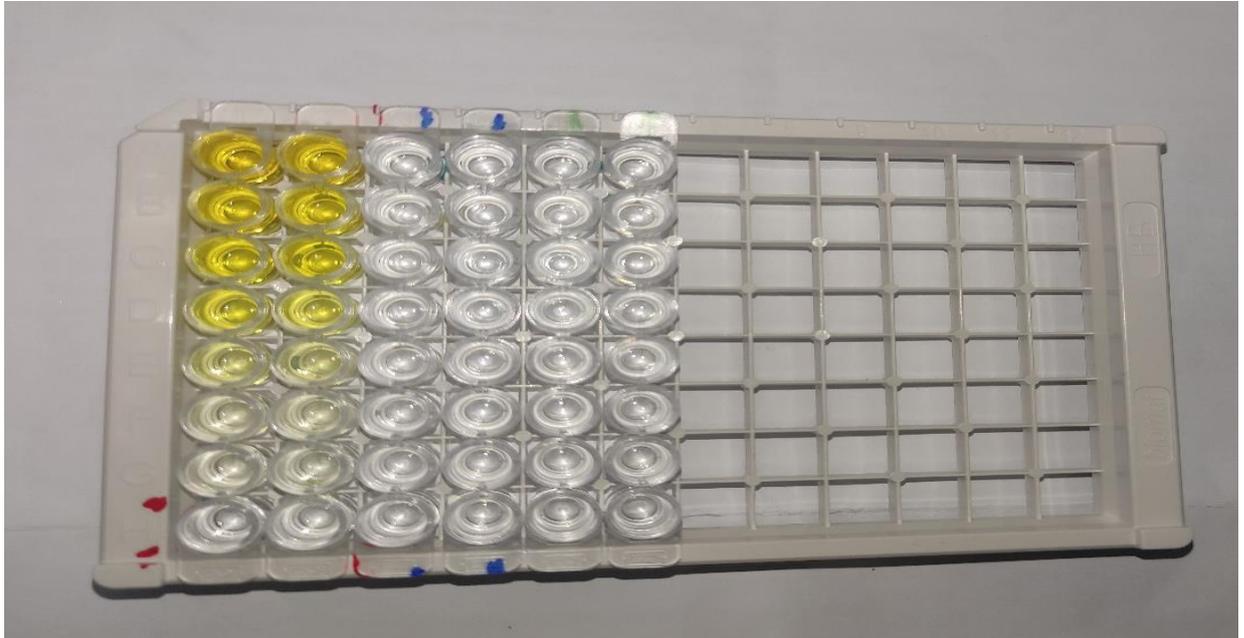


Figure : Microplaque Elisa après ajout de la solution d'arrêt

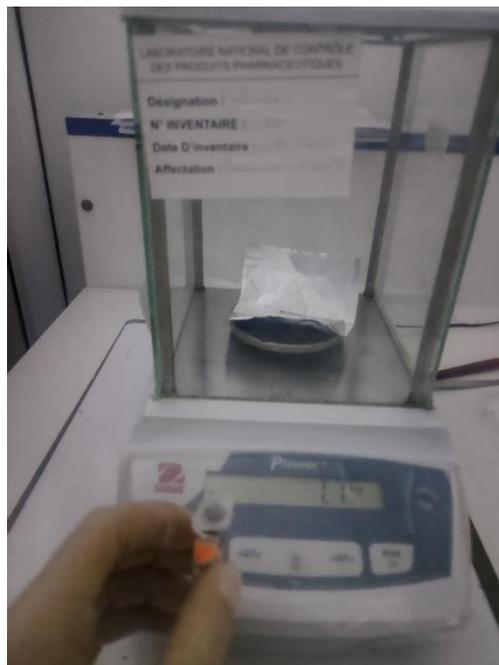
Annexe 08

Photos lors de l'expérimentation de la technique de terasaki :

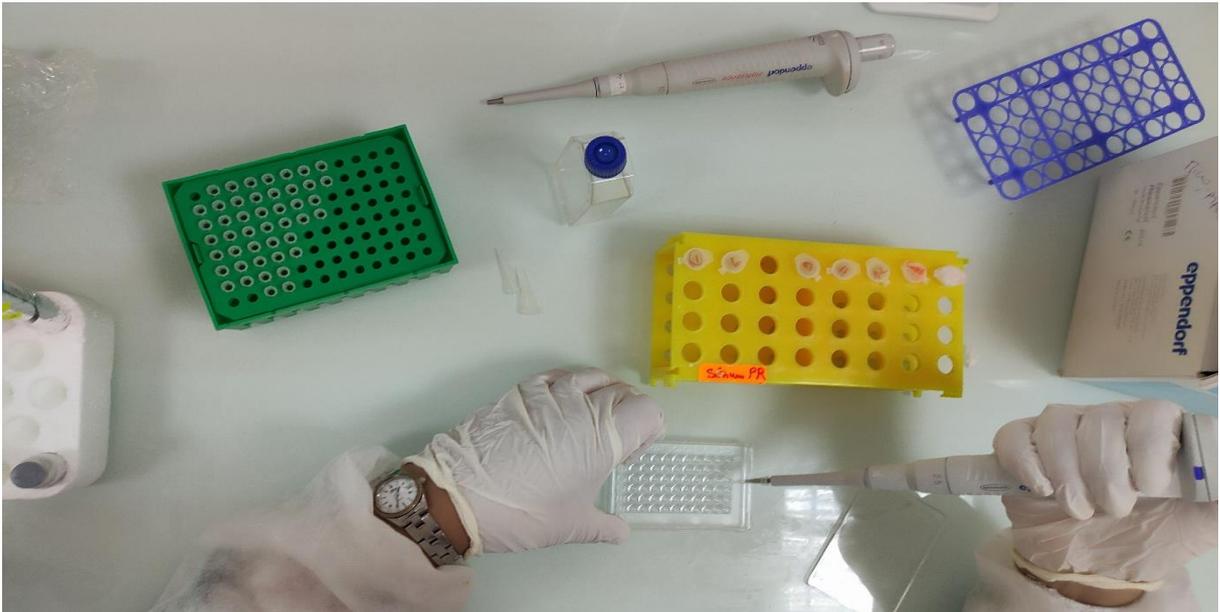


Photo de microplaque de terasaki 60 puits

Pesée de l'orange d'acridine :



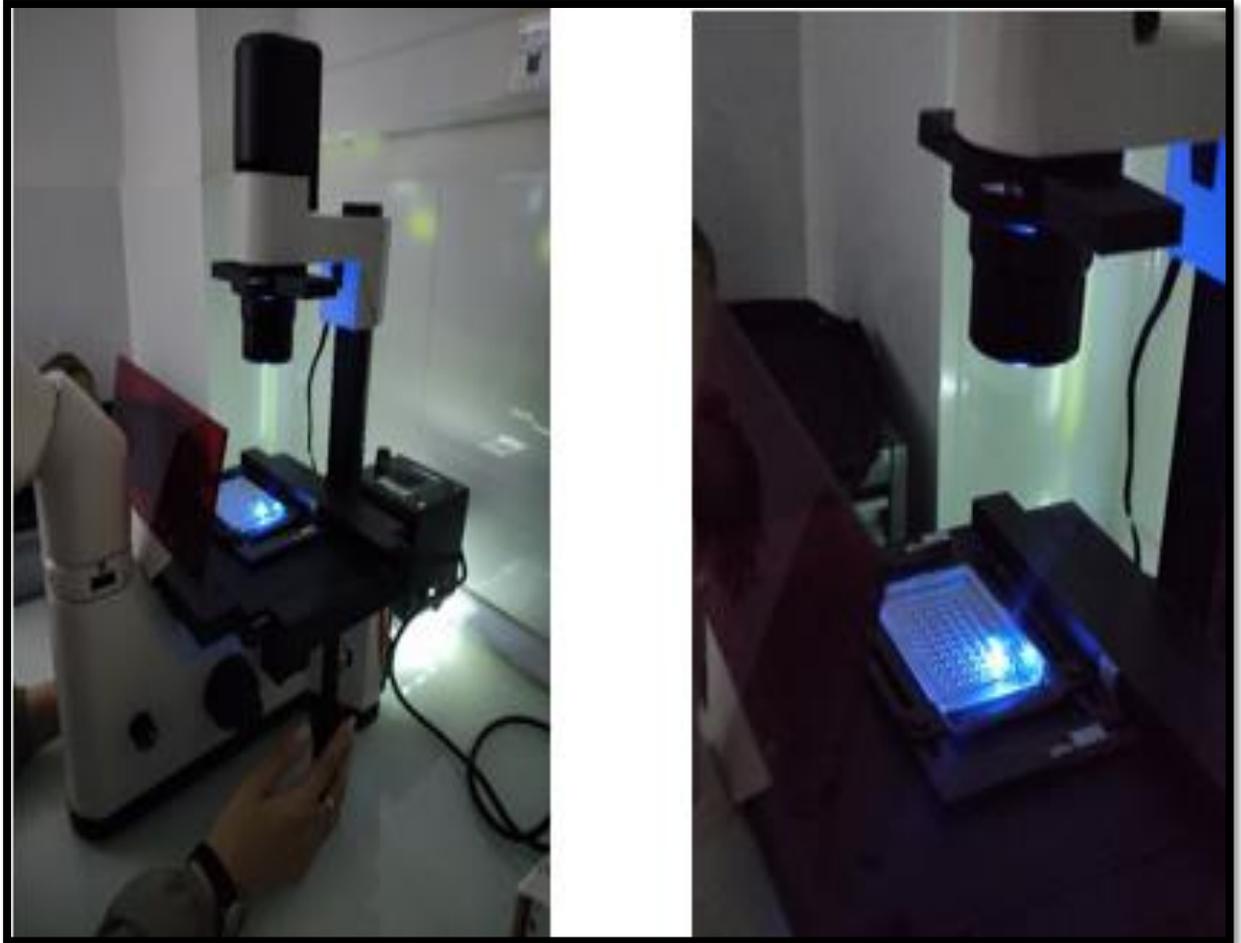
Remplissage des puits :



Nous avons fait un prélèvement sanguin et nous l'avons utilisé comme témoin négatif dans cette expérience.

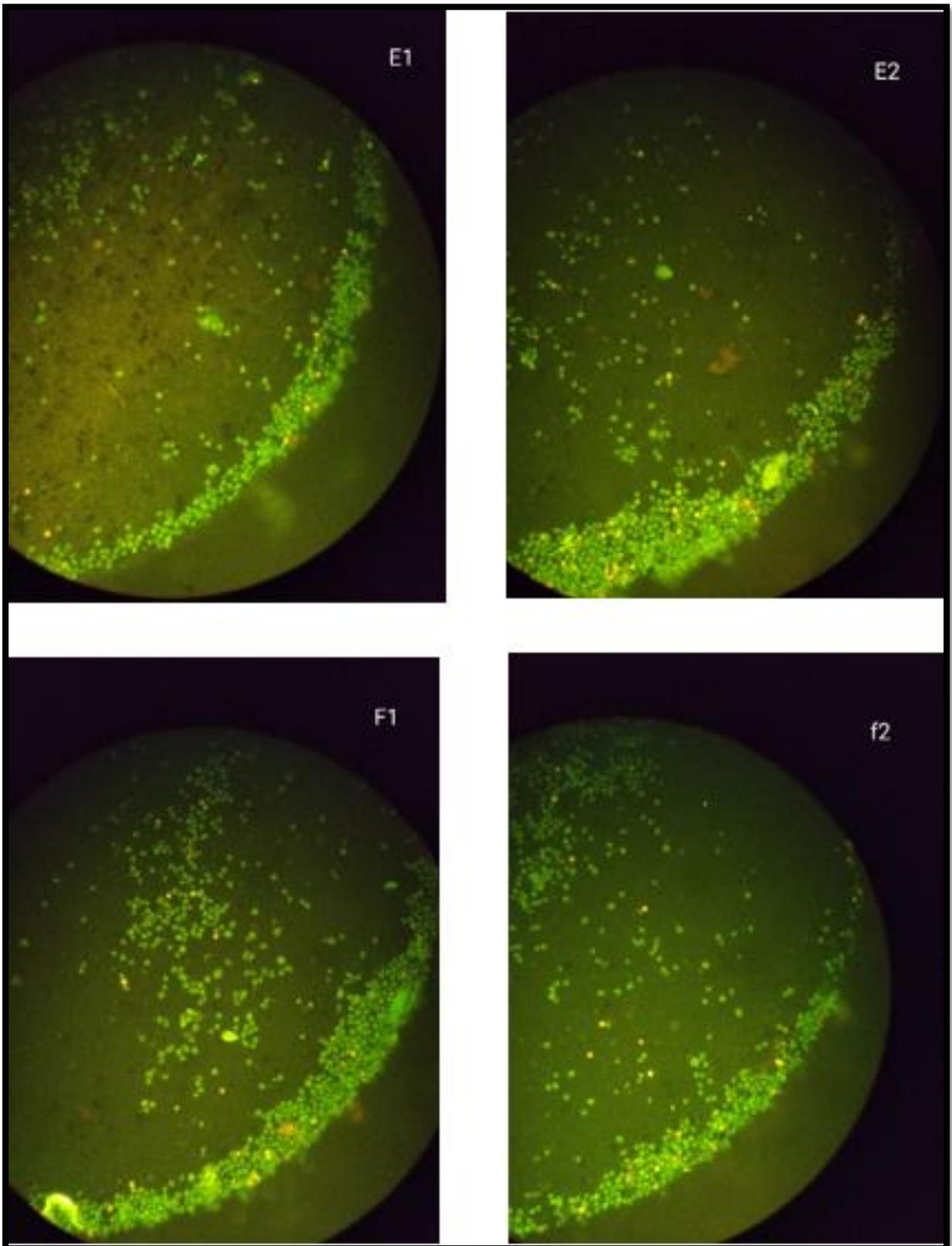


Observation sous microscope a fluorescence :

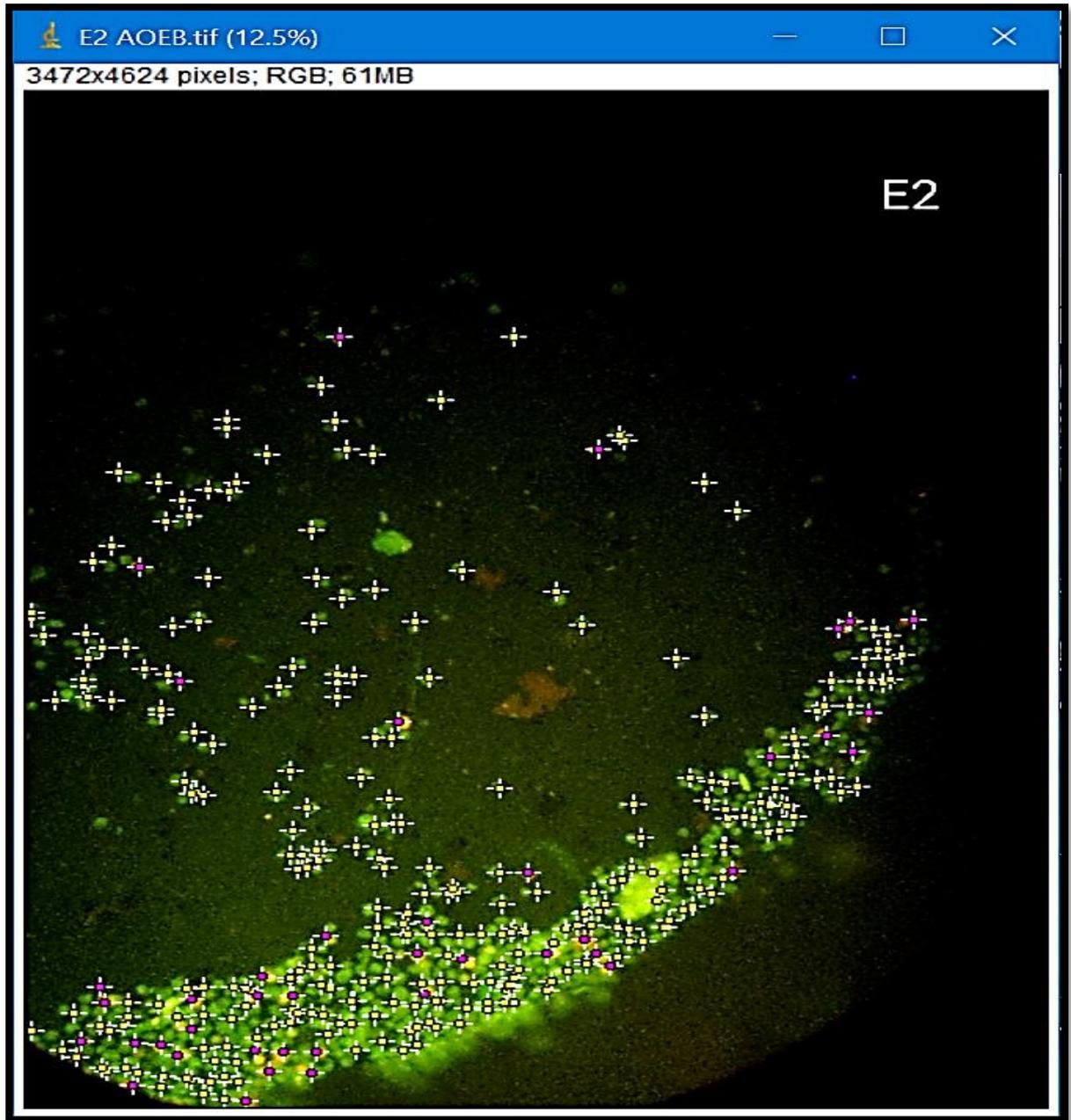


Microscope inversée a fluorescence

Ci-dessous le resultat dobservation de quelque patients (E1,E2), (F1,F2) :



Le dénombrement des cellules a été effectué manuellement via le logiciel IMAGEJ.



NB : Les cellules verte sont vivantes et les cellules oranges sont mortes

