



**HAL**  
open science

**Biological, histological and immunological factors predicting the relapse of autoimmune hepatitis in patients undergoing first line (azathioprine) and third line (rituximab) treatment**

Sabine Tedjini

► **To cite this version:**

Sabine Tedjini. Biological, histological and immunological factors predicting the relapse of autoimmune hepatitis in patients undergoing first line (azathioprine) and third line (rituximab) treatment. Human health and pathology. 2020. dumas-02968451

**HAL Id: dumas-02968451**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02968451>**

Submitted on 15 Oct 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine  
Pharmacie de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

Année 2020

**BIOLOGICAL, HISTOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL FACTORS  
PREDICTING THE RELAPSE OF AUTOIMMUNE HEPATITIS IN PATIENTS  
UNDERGOING FIRST LINE (AZATHIOPRINE) AND THIRD LINE (RITUXIMAB)  
TREATMENT**

THÈSE  
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE  
DIPLOME D'ÉTAT

Sabine TEDJINI

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Le :13/10/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Professeur Thomas Decaens

Membres :

Professeur Nathalie STURM

Professeur Jean Pierre ZARSKI (directeur de thèse)

Dr et MCU Giovanna Clavarino

Dr et MCU Chantal DUMESTRE-PERARD

*L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2019-2020

**ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE**

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	APTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
MCF Ass.MG	BENDAMENE Farouk	Médecine Générale
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
PU-PH	BLAISE Sophie	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Bactériologie-virologie
PU-PH	BOLLA Michel	Cancérologie-Radiothérapie
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastroentérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Nutrition
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PR Ass.MG	BOUCHAUD Jacques	Médecine Générale
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUSSAT Bastien	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	BOUZAT Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique-médecine de la douleur
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PR Ass.MG	CARRILLO Yannick	Médecine Générale
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHARLES Julie	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	CHAUVET Marion	Médecine Générale
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Cancérologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaëtan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE GOUELLEC Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	LEDOUX Jean-Nicolas	Médecine Générale
PU-PH	LEROY Vincent	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Bactériologie-virologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Hygiène hospitalière
PU-PH	MALLION Jean-Michel	Cardiologie
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie ; Transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie-virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Histologie, embryologie et cytogénétique
MCU-PH	MONDET Julie	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie-virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MORTAMET Guillaume	Pédiatrie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCF Ass.MG	ODDOU Christel	Médecine Générale
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PAILHE Régis	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PR Ass.MG	PAUMIER-DESBRIERES Françoise	Médecine Générale
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Bactériologie-virologie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIETHMULLER Didier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie et biologie moléculaire
MCF Ass.MG	ROYER DE VERICOURT Guillaume	Médecine Générale
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL Carole	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Médecine intensive-réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUÏ Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

PU-PH : Professeur des Universités - Praticiens Hospitaliers  
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers  
 PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale  
 MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale  
 PR Ass.MG : Professeur des Universités Associé de Médecine Générale  
 MCF Ass.MG : Maître de Conférences Associé de Médecine Générale

## CONCLUSION

Thèse soutenue par TEDJINI SABINE

### **BIOLOGICAL, HISTOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL FACTORS PREDICTING THE RELAPSE OF AUTOIMMUNE HEPATITIS IN PATIENTS UNDERGOING FIRST LINE (AZATHIOPRINE) AND 3RD LINE (RITUXIMAB) TREATMENT**

This work aims to explore predictive factors of relapse in patients with auto-immune hepatitis (AIH) under standard treatment by Azathioprine (control group) as compared to patients with complex refractory AIH under third line therapy by Rituximab. We have proposed two protocols in order to investigate known predictive factors of relapse, measured before stopping treatment and defined by the scientific societies of Hepatology (namely ALT -AST- IgG levels -liver biopsy) and new immunologic factors assessed after treatment cessation, by extrapolating available data on the monitoring of optic neuromyelitis and myasthenia gravis after rituximab treatment (CD27+ memory B cell).

The first protocol, named HAI FR BIO, assessed retrospectively AST, ALT and IgG levels before stopping treatment and showed no statistical difference between relapser and no relapse patients. Similar results were observed concerning histological parameters: parcellar necrosis, lobular necrosis and plasma cells. Nevertheless, the second protocol named HAI FR BIH, will prospectively study the rate of CD27+ memory B cell after stopping treatment, in the two same groups of patients. The purpose of this second study is to find a correlation between CD27 memory B cell increase and recurrence of disease. This protocol will start in January 2021 after IRB approbation, and hope to publish results in January 2023.

### **VU ET PERMIS D'IMPRIMER**

Grenoble, le 21/09/2020

**LE DOYEN**  
**Pr. Patrice Morand**

Pour le Président  
et par délégation

Le Doyen de Médecine  
Pr. Patrice MORAND

**LE PRESIDENT DU JURY**  
**Pr. Thomas DECAËNS**



## **TABLE OF CONTENT:**

<b>I.</b>	<b>GLOSSARY .....</b>	<b>9</b>
I.1	ENGLISH VERSION.....	9
I.2	VERSION FRANÇAISE.....	9
<b>II.</b>	<b>RESUME.....</b>	<b>11</b>
<b>III.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>0</b>
<b>IV.</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>V.</b>	<b>MATERIAL AND METHODS:.....</b>	<b>6</b>
V.1	POPULATION FEATURE:.....	6
•	Inclusion criteria: .....	7
•	Exclusion criteria: .....	7
V.2	FIRST PROTOCOL: HAI-FR- BIO.....	8
V.2.1	<i>Purpose of the study:</i> .....	8
V.3	SECOND PROTOCOL: HAI-FR-BIH .....	9
V.3.1	<i>Purpose of the study:</i> .....	9
•	Retrospective end point criteria.....	9
•	Prospective end point criteria.....	10
V.3.2	<i>Research process</i> .....	10
V.3.3	<i>Projected study milestones</i> .....	12
.....	.....	12
.....	.....	12
V.4	MEANS : .....	13
V.4.1	<i>Study of Immunological parameters</i> .....	13
•	Immunofluorescence staining and flow cytometry analysis methods: .....	13
•	Study of Histological parameters: .....	13
V.5	STATISTICAL ANALYSIS:.....	14
<b>VI.</b>	<b>RESULTS OF HAI-FR-BIO:.....</b>	<b>15</b>
VI.1	DEMOGRAPHICS:.....	15
VI.2	BIOCHEMICAL PARAMETERS: .....	17
VI.3	IMMUNOLOGICAL PARAMETERS: .....	17
VI.4	HISTOLOGICAL PARAMETERS: .....	19
<b>VII.</b>	<b>DISCUSSION :.....</b>	<b>20</b>
VII.1	PREDICTIVE FACTOR OF RELAPSE OF HAI-FR-BIO:.....	20
VII.2	RATIONALE OF HAI-FR-BIH : .....	22
•	Exploration of circulating lymphocyte CD27 : .....	22
•	Cytokine storage : .....	23

VII.2.1	<i>Application of RITUXIMAB in refractory Autoimmune Hepatitis:</i>	24
<b>VIII.</b>	<b>PROTOCOL HAI-FR-BIH</b>	<b>26</b>
VIII.1	RESUME DE LA RECHERCHE	26
VIII.2	LISTES DES INTERVENANTS:	34
VIII.3	VALIDATION SCIENTIFIQUE	35
<b>IX.</b>	<b>APPENDICE:</b>	<b>36</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAPHY:</b>	<b>42</b>

## **TABLE OF ILLUSTRATION**

Figure 1:	Flow chart HAI-FR-BIH	12
Figure 2 :	Flow chart HAI-FR-BIO	15
Figure 3 :	IgG median (vertical scale) box plot in remission and relapse group (horizontal scale)	18
Figure 4 :	ALT median (vertical scale) box plot in remission and relapse group (horizontal scale)	18
Figure 5 :	AST median (vertical scale) box plot in remission and relapse group (horizontal scale)	18
Figure 6 :	Evaluation of presence of PM/ NL and PL in remission and relapse group	37
Figure 7:	Metavir score activity	38
Figure 8 :	Physiopathology of B cell implication in AIH	38
Figure 9 :	Liver biopsy with sign of activity of AIH, HES staining	39
Figure 10 :	Liver biopsy of AIH : Mononuclear infiltration in portal space and around the lobular central vein	40
Figure 11 :	Liver biopsy with sign of activity of AIH, HES staining : lymphoplasmocytic infiltration crossing the bordering lamina, with apoptotic body	41
Table 1 :	Characteristic of population study	16
Table 2 :	Median of ALT/AST/IgG in different group and total population	17
Table 3:	Evaluation of PM (piecemeal necrosis), LN (lobular necrosis) and PL (presence of plasma cells) in relapse and remission group	19
Table 4 :	Scale of lobular and piecemeal necrosis	36

Table 5: Scale of plasma cell infiltration .....	36
Table 6 :Panel of antibody used for exploration of leukocyte population in flow cytometry ( first line : stained antibody, second line target on leukocyte population).....	37

# **I. GLOSSARY**

---

## **I.1 English version**

AASLD : American Association for Study Of Liver Disease

AB : Antibody

AIH : Auto immune hepatitis

AZA: AZATHIOPRINE

CRID : Clinical Research and Innovation Department

EASL : European Association for the Study of the Liver

EPC : Endpoint criteria

HBV : Hepatitis B virus

HCC : Hepatocellularcarcinoma

HCV: Hepatitis C Virus

IAHG : International Autoimmune Hepatitis Group modified staging System

IgG : Type G Immunoglobulin

LN : Lobular Necrosis

NAFLD : Non Alcoholic fatty liver disease

NMOSD : Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder

PBC : Primary Biliary Cholangitis

PEP : primary endpoint

PL : Plasma Cells = Plamocytes

PM : Piecemeal Necrosis

PPC : Protection Persons Comity

RTX : RITUXIMAB

UGA : University of Grenoble Alpes

UHGA : University Hospital of Grenoble Alpes

## **I.2 Version Française**

AC: Anticorps

AZA: AZATHIOPRINE

CBP : Cholangite biliaire primitive

CHC: Carcinome hépatocellulaire

CHUGA : Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes  
CJP : Critère de jugement principale  
CPP : Comité de Protection des Personnes  
DRCI : Direction de la Recherche clinique et de l'Innovation  
HAI : Hépatite auto immune  
IgG : Immunoglobuline type G  
NL : Nécrose lobulaire  
NP : Nécrose parcellaire  
RTX : RITUXIMAB  
UGA : Université de Grenoble Alpes  
VHB : Virus de l'hépatite B  
VHC : Virus de l'hépatite C

## II. RESUME

### **FACTEURS BIOLOGIQUES, HISTOLOGIQUES ET IMMUNOLOGIQUES PREDISANT LA RECHUTE DE L'HEPATITE AUTO IMMUNE CHEZ LES PATIENTS SOUS TRAITEMENT DE PREMIERE LIGNE (AZATHIOPRINE) ET DE TROISIEME LIGNE (RITUXIMAB).**

S. Tedjini, JP Zarski, G. Clavarino, C. Dumestre-Perard, N. Sturm, JL Bosson.

**Introduction :** L'hépatite auto-immune est une maladie inflammatoire chronique du foie, rare, aux mécanismes physiopathologiques complexes, avec un taux élevé de récurrence à l'arrêt des traitements : 46 % chez l'adulte et 80% chez l'enfant dont 50% à 3 mois, 90% à 28 mois, selon l'AASLD (21-23)). Les principaux facteurs de risque documentés sont le taux d'ALAT, d'ASAT, d'IgG sérique, ou encore la présence d'une inflammation persistante avec plasmocytes peri-portaux sur les biopsies hépatiques, avant arrêt du traitement. Ces éléments ont été étudiés chez des patients sous traitement standard de première ligne par corticoïdes ou Azathioprine. Les marqueurs immunologiques impliqués dans les mécanismes de la dysfonction immunitaire favorisant l'apparition et l'entretien des lésions hépatiques sont peu connus. En utilisant le rationnel d'études portant sur d'autres maladies dysimmunitaires (myasthénie et la neuromyéélite optique), nous nous intéresserons à un nouveau marqueur: le taux de lymphocytes B mémoires CD27+ comme facteur prédictif de la récurrence après l'arrêt des traitements.

**Objectif:** Explorer les facteurs prédisant la récurrence de l'hépatite auto-immune après arrêt des traitements, chez des patients sous traitement de 1ère ligne par AZATHIOPRINE (groupe contrôle) et de 3<sup>ème</sup> ligne par RITUXIMAB (hépatite auto immune réfractaire).

**Matériels et méthodes:** Création de deux protocoles d'études monocentriques sur le CHU de Grenoble, incluant 24 patients sur une cohorte initiale de 173, après vérification des critères d'inclusion et d'exclusion:

-HAI FR BIO : étude rétrospective avec comme CJP l'association entre le taux d'ALAT (mesuré en UI/L) avant arrêt du traitement et risque de récurrence de l'HAI. L'étude a débuté en Juillet 2020 sur 2 mois, ses résultats sont présentés dans ce travail.

-HAI FR BIH : étude prospective permettant l'analyse de l'association entre le taux de lymphocytes B mémoires CD27+ (mesuré en % des GB), après l'arrêt des traitements tous les 3 mois et le risque de récurrence de l'HAI. Ce protocole débutera en Janvier 2021 après validation du Comité de protection des personnes.

**Résultats HAI-FR-BIO:** Il n'est pas mis en évidence d'association statistiquement significative entre le taux d'ALAT avant arrêt du traitement et le risque de récurrence de l'hépatite auto immune (*p value: 0,148*) Concernant les critères de jugement secondaires, nous n'avons pas mis en évidence de différence statistiquement significative entre le taux d'ASAT, la taux IgG ou la présence de nécrose lobulaire, parcellaire, de plasmocytes sur la biopsie hépatique et le risque de récurrence de l'hépatite auto immune.

**Conclusion :** Les analyses de HAI-FR-BIO ne mettent pas en évidence d'association statistiquement significative entre le taux d'ALAT avant arrêt du traitement et le risque de récurrence. Le principal facteur limitant est le faible nombre de sujets inclus s'agissant d'une maladie rare, avec réalisation d'une étude monocentrique. HAI-FR-BIH est une étude pilote qui permettra l'exploration du taux de lymphocytes B mémoires CD27+ jamais étudié dans l'HAI. L'analyse de ce nouveau biomarqueur permettrait une meilleure compréhension de la physiopathologie immunitaire complexe de cette maladie, avec l'objectif dans un futur proche de réduire le risque de récurrence de l'hépatite auto immune en standardisant le suivi du patient.

**MOTS CLÉS :** Hépatite auto immune, Récurrence, AZATHIOPRINE, RITUXIMAB, Transaminases sériques, Immunoglobuline type G, Lymphocyte B mémoire CD27+.

**FILIÈRE :** Hépato-gastro-entérologie

### III. ABSTRACT

---

#### **BIOLOGICAL, HISTOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL FACTORS PREDICTING THE RELAPSE OF AUTOIMMUNE HEPATITIS IN PATIENTS UNDERGOING FIRST LINE (AZATHIOPRINE) AND THIRD LINE (RITUXIMAB) TREATMENT.**

S. Tedjini, JP Zarski, G. Clavarino, C. Dumestre-Perard, N. Sturm, JL Bosson.

**Background:** Autoimmune hepatitis is a rare chronic inflammatory disease of the liver with complex pathophysiological mechanisms, and a high rate of recurrence when treatment is stopped: 46% in adults and 80% in children, of which 50% at 3 months, 90% at 28 months, according to AASLD (21-23)). The main documented risk factors are ALT, AST, serum IgG, or the presence of persistent inflammation with periportal plasma cells on liver biopsy prior to discontinuation of treatment. These factors have been studied in patients receiving standard first-line corticosteroid or AZATHIOPRINE therapy. Little is known about the immunological markers involved in the mechanism of immune dysfunction that promote the onset and maintenance of liver injury. Using the rationale of studies on other dysimmune diseases (myasthenia gravis and optic neuromyelitis), we will focus on a new marker: the CD27+ memory B lymphocyte level as a predictor of recurrence after stopping treatment.

**Objective:** To explore factors predicting recurrence of autoimmune hepatitis after discontinuation of treatment, in patients undergoing 1st line treatment with AZATHIOPRINE (control group) and 3rd line treatment with RITUXIMAB (refractory autoimmune hepatitis).

**Material and Methods:** Creation of two monocentric study protocols at the Grenoble University Hospital, including 24 patients out of an initial cohort of 173, after verification of the inclusion and exclusion criteria:

-HAI FR BIO: retrospective study with as CJP the association between the ALT level (measured in IU/L) before stopping treatment and the risk of HAI recurrence. The study started in July 2020 over 2 months, these results are presented in this paper.

-HAI FR BIH: prospective study allowing the analysis of the association between the CD27+ memory B lymphocyte rate (measured in % of GB), after stopping treatment every 3 months and the risk of HAI recurrence. This protocol will begin in January 2021 after validation by the Committee for the Protection of Persons.

**Results HAI-FR-BIO:** There was no statistically significant association between the ALT level before discontinuation of treatment and the risk of recurrence of autoimmune hepatitis (p value: 0.148). Regarding secondary endpoints, no statistically significant difference was found between the AST level, the IgG level or the presence of lobular, fragmentary or plasma cells necrosis on liver biopsy and the risk of recurrence of autoimmune hepatitis.

**Conclusion:** Analyses of HAI-FR-BIO did not show a statistically significant association between the ALT rate before treatment discontinuation and the risk of recurrence. The main limiting factor is the small number of subjects included as this is a rare disease; the study being monocentric moreover. HAI-FR-BIH is a pilot study that will explore the level of CD27+ memory B lymphocytes never studied in HAI. The analysis of this new biomarker would allow a better understanding of the complex immune pathophysiology of this disease, with the goal in a close future of reducing the risk of recurrence of autoimmune hepatitis, by standardizing patient follow-up.

**KEY WORD :** Autoimmune hepatitis, Recurrence, AZATHIOPRINE, RITUXIMAB, Serum transaminases, Immunoglobulin type G, CD27+ memory B lymphocyte

**FIELD :** Hepato-gastroenterology.

## IV. INTRODUCTION

---

Auto immune hepatitis or AIH is a chronic inflammatory disease of liver occurring at any age, affecting preferentially women and girls (71%-95% , 60%-76%) with no regards to ethnicities (1). The first description was made in 1950 by Waldenström as a disease affecting young women characterized by jaundice, high serum gammaglobulin level, and amenorrhea causing liver cirrhosis. It has been known by many different labels including “lupoid” hepatitis, but AIH has been accepted as the most appropriate term. The wide heterogeneity of clinical presentation and relatively rare incidence of this disease, from 16 to 18 cases per 100000 persons in Europe (2), has limited the advancement in clinical trials. Therefore, more than 50 years after its original description, AIH remains a therapeutic challenge.

The physiopathology is very complex and link to dysfunction of immune homeostasis with an increase in the Th2 and Th1 response and a decrease in circulating regulatory T cells (3,4).

The immune models currently described imply activation of naive T lymphocytes by antigen presenting cells, in the presence of an autoantigen (HLA class II), releasing cascade of activation of the TH1 pathway (via interleukin 2) with a pro-inflammatory effect and the TH2 pathway (mainly mediated by interleukin 4) with a pro-fibrosis effect (5,6). Activation of the TH 17 pathway induces an increase in pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines while stimulating hepatocyte survival. At the same time, we can constate a qualitative and quantitative deficit of the regulatory T lymphocytes making it impossible to stop production of adenosine, inflammation, hepatocyte destruction and pro-fibrosis effect on liver.

There are currently several types of autoimmune hepatitis characterized by different serological profiles. The validated detection technic for autoantibodies is indirect immunofluorescence (ILF) for the vast majority of antibodies: antinuclear antibodies, anti-smooth muscle antibodies, anti-LKM antibodies (anti-kidney microsome antibody) with the exception of anti-SLA / P (Soluble Liver Antigen) detected only by the Elisa or Western Blot methods. 20% of AIH are seronegative.

According to the latest guidelines of European Association for the Study of the Liver (EASL guidelines 2015), the most common is type 1, representing 90% of all AIHs. It is characterized by the presence of anti-nuclear antibodies (65%), anti-smooth muscle anti-actin F type AB, anti-SLA AB. These are mainly women, of all ages with HLA DR3 and DR4 or DR13. This form of autoimmune hepatitis usually occurs in adulthood and is often cortico-sensitive (7,8).



Autoimmune hepatitis type 2 accounts for 10% of AIHs and is characterized by the presence of antibodies directed against the endoplasmic reticulum: anti-liver microsomes or LKM-1 antibody, rarely LKM-3 and anti-liver cytosol or anti-LC1 antibody. It occurs mainly in childhood with a positive HLA DR3 and DR7 profile. The disease is generally more severe and responds badly to the administration of corticosteroids and immunosuppressive drugs (2).

Finally, autoimmune hepatitis type 3 is very similar to type 1 and characterized by presence of anti-SLA/P (the only antibody specific of AIH and a poor prognosis factor) and often Ro/SSA antibody (2).

Other autoantibodies are currently described to help with the diagnosis of seronegative forms: atypical anti-neutrophil cytoplasmic antibody *p*-ANCA and anti-mitochondrial antibody AMA (present in primary biliary cholangitis, described in 8-12% of cases in AIH with or without overlap syndrome) (2,9).

These autoantibodies also have a prognosis value. Indeed their blood levels are correlated in children and adults to the severity of the disease and to treatment response. However they are not correlated to AIH activity along the follow-up. Presence of anti-SLA antibody (only specific AIH antibody) is associated to a severe disease and a higher risk of relapse after stopping treatment (9).

Note that presence of anti-nuclear antibodies and anti-smooth muscle antibodies is also described in chronic liver disease of: PBC, HBV, HCV, NAFLD and even in alcoholic cirrhosis. However, presences of both antibodies increase the diagnostic sensitivity of AIH from 58 to 74%. (9)

Other immunological features of this disease include the presence of hypergammaglobulinemia (IgG) in 90% of patients.

Histological analysis is essential for positive diagnosis, evaluation of AIH activity and liver fibrosis gradation with or without cirrhosis at diagnostic time (30% of adults and 38% of children). In particular, it eliminates alternative diagnosis. There are no specific signs of autoimmune hepatitis on liver biopsy, however 4 lesions are characteristic (10):

1-The most typical lesion is the interface hepatitis (66% of case), also called piecemeal necrosis, which denotes inflammation of hepatocytes at the junction of the portal tract and hepatic parenchyma.

When interface hepatitis is absent or mild, AIH is unlikely.(11).

2- Irregular distribution and intense portal infiltrate with either periportal or (in cases with bridging fibrosis or cirrhosis) paraseptal interface hepatitis is typical. This infiltrate is composed of plasma cells, eosinophils and lymphocytes. The plasma cells are characteristic, but they are not always the dominant cells in 1/3 of AIH, and in the appropriate clinical setting, the diagnosis can be made with only modest numbers. In some cases, lymphocytes are dominant instead. When this occurs, plasma cells in small clusters at the interface support the diagnosis (12).

3-Rosette formation (33% of AIH) is seen with significant lobular involvement and regenerative activity.

4- Emperipolesis (65 % of AIH ) characterised by penetration of an intact cell within a single intact cell difference from phagocytosis (12,13).

Portal-to-portal or portal-to central fibrosis and cirrhosis are seen. Other features also help to establish the diagnosis. For example, AIH differs from chronic hepatitis C in having more severe lobular inflammation and necrosis as well as greater numbers of plasma cells, more marked interface hepatitis, and broad areas of parenchymal collapse.

Centrilobular necrosis is well described in AIH : hepatocyte necrosis, inflammation and centrilobular haemorrhage are described in 17 % of AIH (14,15). These lesions are rarely isolated, mostly associated with interface hepatitis.

Biliary changes are uncommon in AIH and are almost always indicative of some other disorders. However isolated bile duct injury as destructive lymphocytic cholangitis, can be seen in 10-15% of AIH and does not exclude the diagnosis.

Regarding the severe or fulminant autoimmune hepatitis 4 lesions are described (16) :

- Extensive necrosis with centrilobular haemorrhage
- Centrovenular endothelitis
- Lymphocyte follicle absent in case of chronic AIH
- Infiltration mainly composed by plasma cell

Key histological features contributing positively to a score allowing diagnosis of AIH, according to the revised International Autoimmune Hepatitis Group modified staging System (IAHG) of 2008, are interface hepatitis (+3), which is the most important; a lymphoplasmacytic

infiltrate (+1); and rosette formation (+1) with a specificity diagnosis of 89 %. This simplified score has a good specificity (90% vs 73%) but lower sensitivity (100% vs 95%) compare to the original of 1990. These scores are a diagnostic aid whose use is limited in children , acute and fulminant AIH or even overlap syndrome (12).

The current recommendation of the learned societies (2,8,17) is to treat all patients with active or advanced disease at the fibrosis / cirrhosis stage. Asymptomatic patients require individual management according to their risk factors (age, comorbidity, etc.)

Finally, decompensated cirrhotic patients or those without signs of inflammatory activity on the biopsy do not benefit from the treatment.

First-line treatment is based on the administration of corticosteroids alone or in combination with AZATHIOPRINE (IMUREL®).

The second line of treatment is composed, without a high level of evidence, of mTor inhibitors and calcineurin inhibitors.

Finally, in the event of the failure of the two first lines therapy with contraindication to liver transplantation, a therapeutic alternative could be RITUXIMAB (MABTHERA® : anti-CD20 monoclonal antibody) for which is currently not licensed therapy in AIH.(13,14) . It is a chimeric (murine / human) monoclonal antibody directed against B cells. RITUXIMAB is currently licensed for positive B cell lymphoma, rheumatoid arthritis, or vasculitis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies.

Biological remission is defined as the normalization of ALAT, ASAT levels and IgG concentration. Approximately 80 to 90% of patients present an improvement in transaminase levels quickly with the institution of these immunosuppressive drugs; 20% obtained prolonged remission after stopping treatment according to the EASL repository, with a median follow-up of more than 6 years. (8)

Histological remission, defined as minimal hepatitis (AIH score less than or equal to 4 on biopsy), is rarer and lags behind normalization of laboratory values by at least 6-12 months (2). Indeed around 45% of the patients who maintain a ALT level and gamma globulin concentration in the limit of the normal value present a persisting histological activity and therefore as shown in the study of Dhaliwal HK of 2015 a higher need for liver

transplantation :« *failure to attain remission histologically despite doing so biochemically is associated with >2-fold increased risk of progression to transplantation and all-cause mortality* »(20)

After obtaining remission, treatment should be continued for three years and at least 24 months after the normalization of transaminase and IgG levels (biological remission).

However, the recurrence of the disease after stopping treatment is very frequent and is defined by the raise in ALT to 3 times upper the limit of normal value or moderate elevation in ALT and IgG > 20ng/mL according to IA-HIG criterion. Relapse rate is estimated at 46 % in adults to 80% in children in the largest American cohorts according to AASLD. In 50% of case it occurred in the first three months and in 90% of case in the first 28 months after stopping treatment (21–23). In Europe, the Dutch AIH working Group have reported a relapse rate of 59%, 81% and 88% at 1, 3 and 5 years, respectively, even when treatment was tapered and/or discontinued after clinical and biochemical remission had been sustained for >2 years (21).

The risk of relapse appears to be higher in young patient (< 18 years old), and in HLA-DRB1\*04:01 positive patient (24).

If relapse occurred, the recommendation of *AASLD guidelines 2010* is re-introduction of the first line of treatment with corticosteroids more or less associated with AZATHIOPRINE. After two recurrences of HAI, subsequent discontinuation of treatment after remission is contraindicated (2)

The **predictive factors for relapse** described in the literature in patients receiving conventional first line treatment are:

-**On the biological level**, we describe a rate of ALT at 50 % of the normal upper limit and IgG level > 12g/L measured before stopping treatment (25) as predictive factor of relapse.

- **Histologically**, the predictors of recurrence identified in the literature are the persistence of inflammation with lobular necrosis and piecemeal necrosis (interface hepatitis). More recently, one study of 2004 introduced the persistence of periportal plasma cells on liver biopsy and before treatment stopped, as a predictive factor of relapse.

-**In immunological terms**: Currently, there are no validated markers for monitoring immune-mediated hepatic inflammation in AIH. Two recent studies (26,27) bearing on myasthenia

gravis and optic neuromyelitis (NMOSD) , which also are auto immune disease treated with RTX, explore a new biomarker for monitoring inflammation and relapse of disease after stopping treatment : the level of CD27 memory B lymphocytes +. These type of lymphocytes B allow in physiological condition to increase and prolonge the immune response against antigen that triggers its differentiation. For all we know, patient undergoing treatment by RTX can be follow by measurement of lymphocyte B CD20+ in the blood, but with a delay of re-emergence of at least 6 months but some patients will relapse before. These memory B cell seems to be more sensitive to relapse in NMOSD and myasthenia that usual B lymphocyte. Level of CD27+ memory B lymphocyte has never been tested in patients with autoimmune hepatitis treated with RTX. Based on the same rationale as the studies cited above, the CD27 + memory B cells rate could be a witness to RTX-induced "therapeutic" immunosuppression and its rise at a distance from treatment would predict recurrence of AIH. The aim of our study was to explore in refractory autoimmune hepatitis patients on RITUXIMAB (a new third-line treatment) the already validated predictive factors for relapse in patients on standard first-line therapy (i.e. AST, ALT, type G immunoglobulin levels and histological features) and a new immunological marker used in the follow-up of other autoimmune diseases (such as myasthenia gravis or optic neuromyelitis): blood level of CD27+ memory B lymphocyte after cessation of treatment.

## **V. MATERIAL AND METHODS:**

---

In order to explore predictive factors of autoimmune hepatitis recurrence we have created two study protocols.

The first protocol is named HAI-FR-BIO, it allows the study of serum transaminases, immunoglobulins and liver biopsy slides, measured before the cessation of treatment. It is a retrospective study without patient intervention (research not involving the human person).

The second protocol, named HAI-FR-BIH, is prospective and will mainly allow the study of new blood immunological markers after the cessation of treatments (research involving the human person).

### **V.1 POPULATION FEATURE:**

Each study takes place in France in one center, University Hospital of Grenoble Alpes (UHGA). The population was composed of male and female, aging between 18 to 75 years old, with seronegative or seropositive AIH all histologically proven and followed in the UHGA. We retrospectively assessed the number of patients followed in UHGA for AIH from 2007 to 2020 i.e. 173 patients. From this database, only 24 patients meet protocol inclusion and exclusion criteria presented below. We could therefore estimate a number of subjects including at 22 subjects considering that 90 % gave their non-opposition.

Patients were separated into 2 groups, one under standard therapy use as a group control and this other under new therapy by RITUXIMAB:

-Group 1 (control): patients who received a first line therapy by AZATHIOPRINE in monotherapy and currently in remission (A) or in relapse (B).

-Group 2: patients with refractory AIH who received a third line of treatment by RITUXIMAB and currently in remission (C) or in relapse (D).

- **Inclusion criteria:**

- Male or female from 18 to 75 years old followed at UHGA
- Seronegative autoimmune hepatitis (negative Anti-Actin F smooth muscle AB , negative Anti-SLA AB, negative Anti-LKM1 AB , negative Anti-LC1 AB) or seropositive (positive Anti-Actin F smooth muscle antibodies, positive Anti-SLA AB, positive Anti-LKM1 AB or positive Anti-LC1 AB )
- Autoimmune hepatitis was histologically proven (liver biopsy in favor).
- Having had a treatment interruption for AIH remission in the last 3 months
- Not having objected to the study after clear, fair and intelligible information

- **Exclusion criteria:**

- Patients with Overlap syndrome (an overlap syndrome between autoimmune hepatitis and cholestatic liver disease).
- Refractory AIH under alternative treatment other than RITUXIMAB.
- Liver transplantation in group 1.
- Subjects under guardianship, deprived of liberty and/or long time hospitalized.

## V.2 FIRST PROTOCOL: HAI-FR- BIO

We began our analysis by creation of this small assay as a preliminary analysis. It only focused on retrospective computerized data and paper medical records available in the Hepato-gastroenterology Department. Validation of this protocol was obtained in July 2020 by the Department of Clinical Research and Innovation. Data were collected between July to August 2020 and data analysis was performed in August 2020.

### V.2.1 Purpose of the study:

The **primary end point criteria** is assessed retrospectively: description of the relation between ALT rate measured in UI/L within one month before stopping treatment and the risk of AIH recurrence after treatment stopped in group 1 and 2.

The **second end point criterias** are multiple, also assessed retrospectively in the two groups:  
-Description of the report between AST level in UI/L, IgG in g/L measured within one month before stopping treatment, and the risk of AIH recurrence after treatment stopped in group 1 and 2.

-Description of the relationship between the presence of parcel, lobular necrosis according to Metavir score (cotation of NP from 0 to 3, NL from 1 to 2), plasma cell on a liver biopsy performed before stopping treatment, and the risk of AIH recurrence after treatment stopped in group 1 and 2.

This first protocol is a pilot study, allowing a retrospective description and analysis of well-known predictive factor (transaminases, immunoglobulin and liver biopsy before treatment stopped) of AIH relapse.

The study of innovative immunological factor in serum (CD27+ memory B cells serum level) and on liver biopsy (immuno-labelling in formalin of CD27+ memory B cells, plasmocytes and CD20+ memory B cells) of patients monitored for autoimmune hepatitis requires the creation of a prospective study concerning human being called "HAI-FR-BIH".

### V.3 SECOND PROTOCOL: HAI-FR-BIH

The protocol was created between 2019 and 2020, at Grenoble University Hospital with involvement of Hepatologists, Immunologists, Pathologists and Statisticians. This is a type 3 study of the Jardé law, involving the human being. It was submitted to the Department of Clinical Research and Innovation in June 2020 and will be deposited at Protection of Persons Committee in November 2020 (awaiting budget approval)

HAI-FR-BIH is an explorative monocentric, observational and prospective study (with retrospective data collection also) succeeding to HAI-FR-BIO that will take place in the same center: Grenoble University Hospital, and will debut in January 2021.

#### V.3.1 Purpose of the study:

In this prospective and retrospective research, we differentiate between two types of judging criteria. Retrospective judgment criteria already studied in preliminary analysis by HAI-FR-BIO, and prospective criteria justifying the creation of this new protocol.

- **Retrospective end point criteria**

**The primary end point** is the same that HAI-FR-BIO and based on strong guidelines of AASLD (2):

Study of the relationship between the ALT level measured in IU / L, 1 month before stopping treatment and the recurrence of AIH after treatment stopped, with determination of an ALT threshold in absolute value, in two groups of patients (group 1 and 2).

The secondary end points are:

1a / Description of the relationship between AST level value measured in IU / L, within one month before stopping treatment, and the risk of recurrence of AIH after treatment stopped, in the 2 groups (group 1 and 2).

1b/ Description of the relationship between IgG concentration measured in g / L within one month before stopping treatment, and the risk of recurrence of AIH after treatment stopped in the 2 groups (group 1 and 2).



- **Prospective end point criteria**

2/ Study of liver biopsy performed before stopping treatment with RITUXIMAB (group 2) and AZATHIOPRINE (group 1) to analyze the relationship between:

- a) The inflammatory activity of AIH, defined by the presence of piecemeal necrosis and lobular necrosis, and the risk of recurrence of AIH after treatment stopped
- b) The presence of plasma cells, CD 20 +, CD27 + memory B cells and the risk of recurrent AIH after treatment stopped.

3 / Description of the relationship between the rate of blood CD27 + memory B cells (measured in% relative to leukocyte count) at 3, 6 ,9 and 12 months after stopping treatment, and the risk of AIH recurrence after treatment stopped, only in group 2.

### **V.3.2 Research process**

After signing the consents, participants will be seen again by the principal investigator at the inclusion visit and every 3 months for 12 months (M3-M6-M9-M12, +/- 15 days), as part of routine care, with an interview, a standard clinical examination and subsequent biological sampling:

1) The main samples for routine monitoring of autoimmune hepatitis will be taken every 3 months as part of routine care: serum ASAT/ALAT transaminases in IU/L, and a weight assay of IgG in g/L.

2) A sample consisting of 2 EDTA tubes of 6 ml with 1 dry tube of 7 ml containing a serum separator will be taken to perform the following assays:

o Routine care:

-Immunophenotyping by flow cytometry for the study of T, NK, and B lymphocyte subpopulations, in particular CD27+ memory B lymphocytes (1 EDTA tube of 6 ml).

o Excluding routine care:

Immunophenotyping by flow cytometry for exploration and characterization of a lymphocyte sub-population: T reg (T regulatory lymphocyte).

o Excluding routine care and with storage carried out in the gastroenterology department :

-Serum storage (1 dry tube with 7ml serum separator) for analysis of cytokines and chemokines of interest, such as IP10(8), IFN-gamma, IL-12, IL-6, IL-10 and galectin-9 (16).

-Storage of isolated PBMCs (from 1 6 ml EDTA tube) and frozen at -80° for exploration of the above cytokine and chemokine genes by quantitative PCR. These analyses will be carried out in a second phase subject to budget and human resources availability.

3) At inclusion and in routine care, a search for anti-tissue antibodies by indirect immunofluorescence, the search for liver marker antibodies by immunodot will be carried out for patients with an unknown serological profile.

Finally, we will review the liver biopsy slides taken before stopping treatment in certain patients. These slides are currently stored in the pathology laboratory of UHGA and will be reviewed with the supervision of Pr N. Sturm in charge of UF ACP.

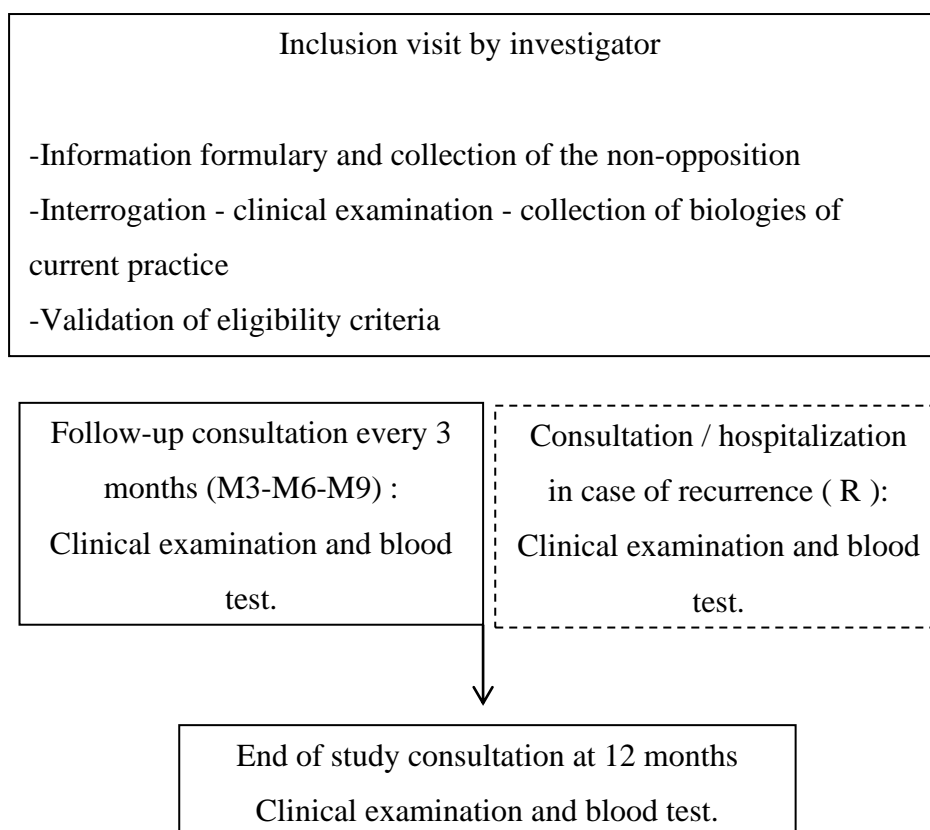
On these slides, we will analyze the following criteria:

- Quantification of parcel and lobular necrosis

- Description of the presence of interface hepatitis

- Semi-quantitative evaluation by immuno-labelling of plasma cells (CD38+ and MUM1), memory B lymphocytes CD 20+ and CD27+. Note that the labelling of CD27+ memory B lymphocytes requires the use of a new antibody produced by Abcam (Anti-CD27 antibody - Monoclonal rabbit clone [EPR8569] - ref. ab131254 -(dilution between 1/100 and 1/250)).

**Figure 1: Flow chart HAI-FR-BIH**



### **V.3.3 Projected study milestones**

- “Filfoie” network call for tenders filed on July 31, 2020.
  - PPC Protocol filings expected November 2020
  - Start of the protocol January 2021 according to the following schedule:
  - Start of inclusions and end of inclusions: January 2021 - June 2021 (6 months)
  - Duration of participation of each subject: 12 months
  - End of data collection : June 2022
  - Expected date of basic freeze: November 2022
  - End date of statistical analysis: February 2023
- Total research duration: 26 months

## V.4 MEANS :

### V.4.1 Study of Immunological parameters

- **Immunofluorescence staining and flow cytometry analysis methods:**

Phenotypic analysis of lymphocyte (T, B, Treg and NK) suspensions will be performed by flow cytometry. Cells will be stained with a different panel of colored antibody combinations. The following monoclonal antibodies will be used as a “backbone” in all combinations: CD3-FITC, PE-CD16/CD56 , PerCP-Cy5.5- CD45, PECy7-CD4, APC-IgM, APC-CD25, APC-H7-CD19, PeCy7-CD3 , PECy7-CD4, CD10-PE, CD20-V450, CD127-PE, HLA-DR V450, CD38-PerCP Cy5.5, PerCP Cy5.5-CD4, CD19-APC, APC-H7-CD8, CD45-V500 (BD Biosciences) , IgD FTIC (Agilent/Dako). Clone and isotype specificity of these antibodies are detailed in Table 6. The antibodies will be used at the dilution recommended by the manufacturers. Samples containing  $10^6$  cells in a volume of 100  $\mu$ l will be incubated with the combination of antibodies at the supplier recommended concentration during 20 minutes in the dark, at 4°C. After erythrocytes lysis with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  at 4°C for 5 minutes, samples will be washed with HBSS medium (Gibco).

Analysis will be then performed using 3-laser, 8-colour BD FACSCanto II flow cytometer (BD Bio- sciences) and FACSDiva software version 6 (BD Biosciences). BD CompBeads (BD Biosciences) is used for compensation settings. Cytometer performances will be checked daily using CST beads (BD Biosciences).

- **Study of Histological parameters:**

Finally, we have reviewed liver biopsy slides available in several patients. These slides were produced before the decision to stop treatment and the analysis of the histological activity with parcel and lobular necrosis, semi quantitative evaluation of plasma cells (using CD38+ AB and MUM labeling) ,CD 20 + and CD27 + memory B cells on biopsy.

This evaluation is performed under the supervision of a senior Pathologist Pr N Sturm, in the pathology department using old biopsies of patients stored in IBD.

Graduation of lobular and parcellar necrosis is based on the Metavir scoring system which evaluated necrotico-inflammatory activity without taking into account portal inflammation contrary to Ishak Score (Figure 6).

The proofreading of liver biopsy is realized under optical microscope, slide are already marked with HES staining and for some of them MUM immunostaining of the plasma cells is available. Immunostaining by CD38+ AB for plasma cells and anti-CD27+ memory B cells antibody will be performed in the second protocol after getting patient and PPC consent.

The labeling of CD27 + memory B cells involves utilization of a new antibody produced by Abcam (Anti-CD27 antibody - Monoclonal rabbit clone (dilution between 1/100 and 1/250.) Semi quantitative evaluation of plasma cell is performed using a specific classification describe in Table 4.

## **V.5 STATISTICAL ANALYSIS:**

As a pilot, monocentric and descriptive study, the descriptive analysis initially consists of measurement of medians, interquartile concerning continuous variables of no normal distribution.

Concerning dichotomous variables, we will express them in percentage and effective.

The first and second end point criteria of the two protocols analyze continuous variables with application of a non -parametric “Wilcoxon-Mann-Whitney” test in the absence of all conditions of validity for the Student test.

Concerning the second end point criteria exploiting biopsy, the analysis is performed on dichotomous variables with the use of a Chi2 or Fischer test when the Cochran criteria are not met.

The condition for applying the Student test is the normality of the analyzed parameters. The application conditions according to Cochran's criteria for the Chi2 test are a workforce greater than 20 individuals, and a theoretical workforce in the comparison of variables greater than 5 individuals for each subclass.

The software used is the software developed by the UGA r4web, based on the R environment.

## VI. RESULTS OF HAI-FR-BIO:

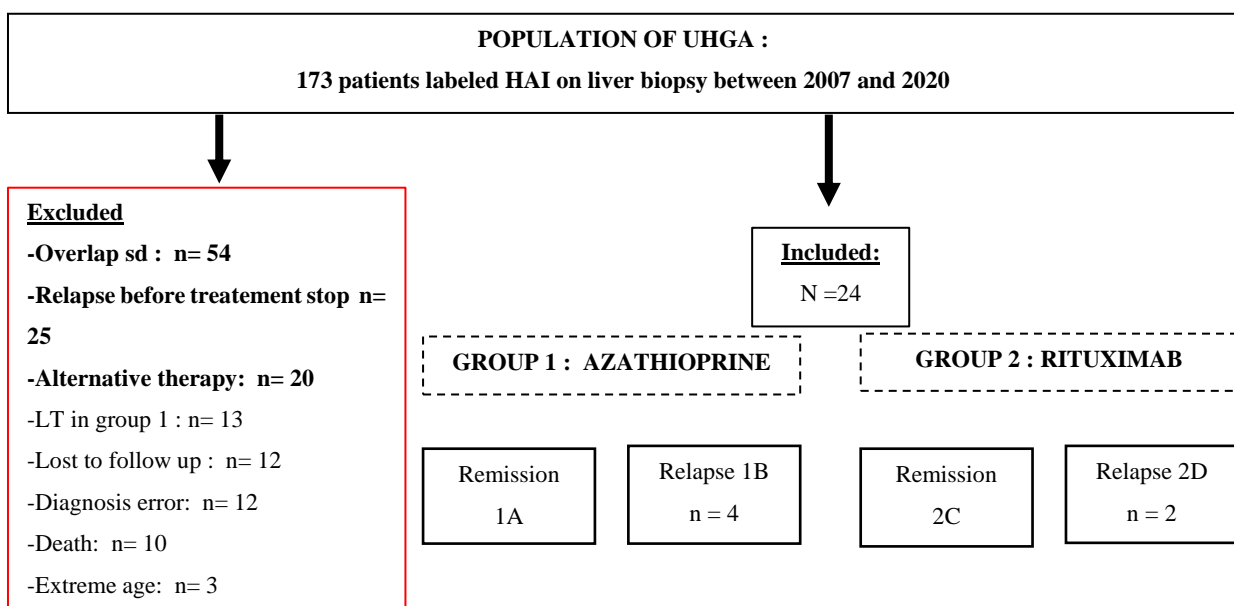
### VI.1 Demographics:

Data were collected retrospectively in the collection of 173 biopsies established from 2007 to 2020 in University Hospital of Grenoble. A total of 24 patients were recruited for HAI-FR-BIO protocols according to inclusion and exclusion criteria, without opposition. Twenty patients were under AZATHIOPRINE therapy (group 1) and only four under RITUXIMAB therapy (group 2).

All patients were in sustainable remission for at least 2 years in the AZA group as recommended in EASL guidelines 2019. However in RTX group only one patient respected a delay of 2 years in remission before stopping treatment. A total of 6 patients relapsed, 4 in group 1 and 2 in group 2. Mean delay of relapse was 20.5 months (range: from 3 to 48 months) after treatment stop; only one patient relapsed in the first 3 months.

Most patients were female (62,5%), with a median age of 56 years-old (range 26-75). In this population 33% patient had an associated auto immune disease such as hypothyroid, Sjogren syndrom, connectivitis and even 1 vasularitis (knotty periarteritis). Cirrhosis was present in 5 patients (20 %) and always well compensated (Child Pugh A). Analysis of immunological profile showed a majority of type 1 AIH (58%), equality of type 2 AIH (20%) and seronegative AIH (20%). Primary analysis was performed on biochemical, immunological and histological parameters using the first protocol (HAI-FR-BIO) as indicated in material and methods.

Figure 2 : Flow chart HAI-FR-BIO



**Table 1 : Characteristic of population study**

<b>Patients Feature :</b>	<b>Median, IQR (25%-75% ) or number and %</b>
Age	56 years old (range from 26 to 75 years old)
Gender	9 male (37,5%) 15 female (62,5%)
<b>Comorbidity :</b>	
Associated auto immune disease	8 (33%)
Cirrhosis	5 (20%)
<b>Treatment :</b>	
-RTX	4 patients (16%)
-AZA	20 patients (83 %)
-AZA dosage (in mg per day)	100 (93 -100)
-RTX dosage (total of administration in mg)	2000 (1800-3450)
-Duration of remission before treatment stop	60 months ( range 3-312 months)
<b>Immunologics parameters :</b>	
-Seronegative AIH	5 (21%)
-Type 1 AIH	14 (58%)
-Type 2 AIH	5 (21%)
-Dosage of IgG (g/L)	11 (10 - 13)
<b>Biochemical Parameters</b>	
ALT (UI/L)	25 (16,50 - 34)
AST (UI/L)	20,5 (14 - 35,5)
<b>Histological Parameters</b>	
<u>Number of liver biopsy</u>	18 (75%)
-in RTX group	1
-in AZA group	17
<u>Parcellar necrosis :</u>	
- grade 0	16 (90%)
- grade 1	1 (5%)
- grade 2	1 (5%)
<u>Lobular necrosis :</u>	
- grade 0	17 (95%)
- grade 1	0
- grade 2	1 (5%)
<u>Plasma cell :</u>	
-PL 0 ( <i>absent</i> )	10 (56%)
-PL 1 ( <i>rare</i> )	7 (39%)
-PL 2 ( <i>few</i> )	0
-PL 3 ( <i>many</i> )	1 (6%)
<u>Stage Fibrosis</u>	
-F0	6 (33%)
-F1	5 (28%)
-F2	5 (28%)
-F3	2 (11%)
<u>Steatosis</u>	4 ( 22%)
<b>Relapse</b>	
Total of AIH relapse in population study	6 (25%)
-Relapse in RTX group (2D)	2
-Relapse in AZA group (1B)	4
-Delay of relapse	20,5 months in median (range: 3 -48 months)

## VI.2 Biochemical Parameters:

**Analysis of aminotransferase levels:** ALT and AST levels measured one month before treatment stopped in total population show a median of 25 UI/L (*IQR* 25%-75%: 16,50 - 34) for ALT and 20.5 UI/L (*IQR* 25%-75%: 14 - 35,5) for AST with no normal distribution.

-Median of ALT measured one month before treatment stopped is superior in relapse group 1B and 2D: 43,5 UI/L (*IQR* 25%-75% :17 - 85) compared to remission group 1A and 2C: 26,5 UI/L (*IQR* 25%-75%: 14,5 - 31,5) (Figure 3). Nevertheless, this tendency, there is no significant statistical difference between the 2 groups after treatment stopped (*p* value of 0,148 by using the *Mann Withney test*).

-Median of AST measured one month before treatment stopped, is also superior in relapse group 1B and 2D: 32 UI/L (*IQR* 25%-75%: 11,75– 53,75) compared to the remission group 1A and 2C: 20,5 UI/L (*IQR* 25%-75%: 16,25– 29). (Figure 4). However, no significant correlation is observed between AST rate and relapse of AIH after treatment stopped (*Mann Withney test*: *p* value 0,333).

## VI.3 Immunological Parameters:

**Analysis of IgG concentration** measured one month before treatment stopped in total population show a median of 11g/L (*IQR* 25%-75%: 10-13) with no normal distribution.

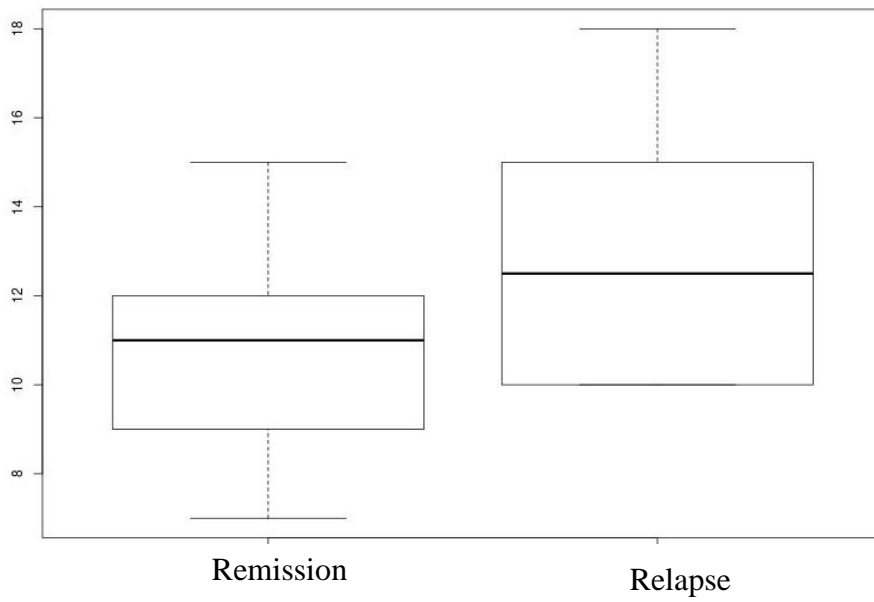
Median of IgG concentration measured one month before treatment stopped is a higher in relapse group 1B and 2D: 12,5 g/L (*IQR* 25%-75%: 10,5– 14,5) compared to remission group 1A and 2C: 11g/L (*IQR* 25%-75%: 9,25–12). However, there is no statistical difference between the 2 groups (*Mann Withney*: *p*-value 0. 191) (Figure 2).

All these results are presented in Table 3 below.

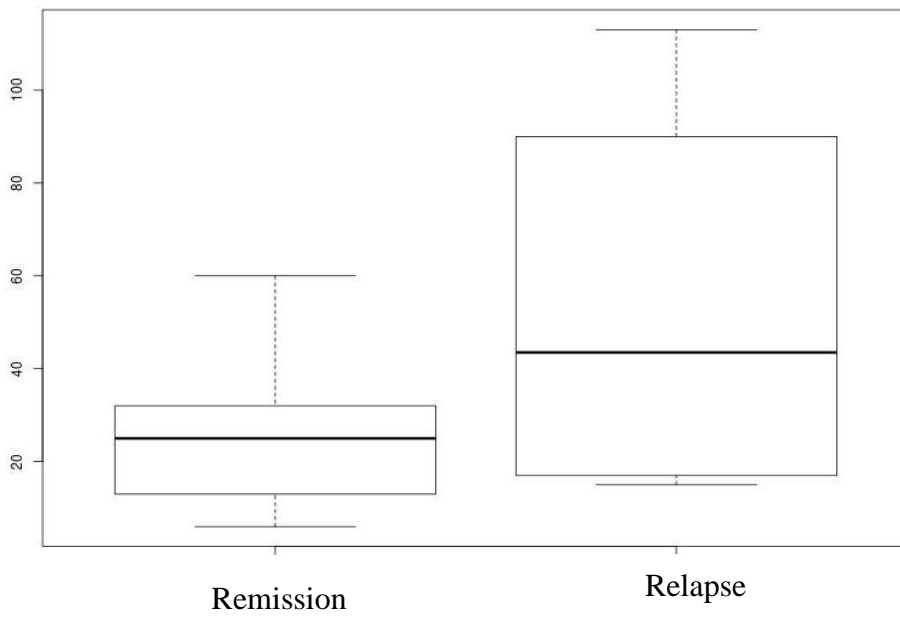
	Relapse group			Remission group			Population study
	1B	2D	total	1A	2C	total	total
ALT in UI/L	17	50	43,5	24	20,5	26,5	25
AST in UI/L	14	87	32	22	22,5	20,5	20,5
IgG in g/L	13	12,5	12,5	11	9,1	11	11

**Table 2 : Median of ALT/AST/IgG in different group and total population**

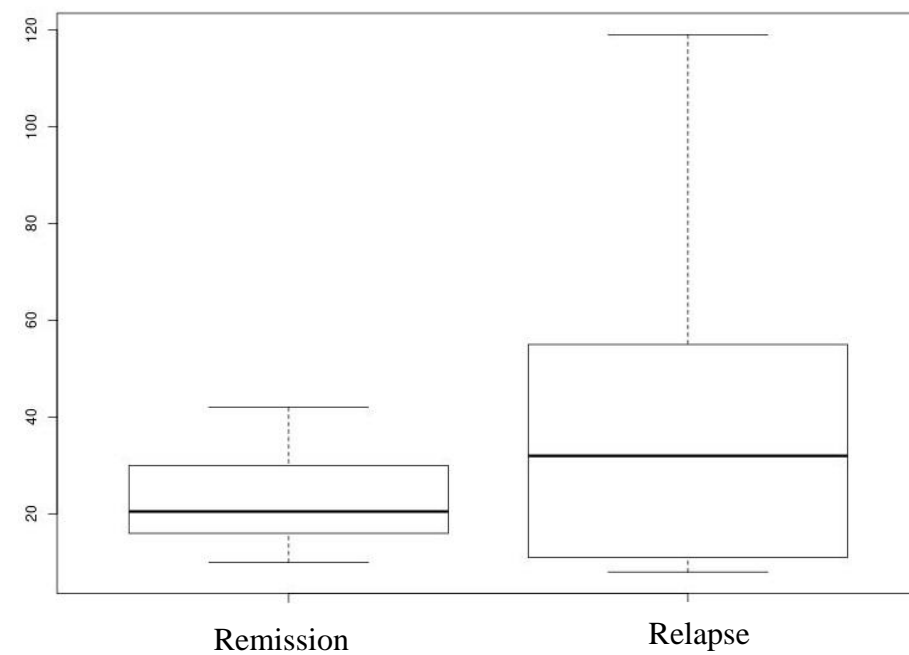




**Figure 3 : IgG median (vertical scale) box plot in remission and relapse group (horizontal scale)**



**Figure 4 : ALT median (vertical scale) box plot in remission and relapse group (horizontal scale)**



**Figure 5 : AST median (vertical scale) box plot in remission and relapse group (horizontal scale)**

#### VI.4 Histological Parameters:

Liver biopsy analysis was performed in 18 patients (17 in AZA group and only 1 in RTX group).

-Piecemeal necrosis (PM) is present in only 2 patients, but only in remission group (*table 3 and figure 6*). Evaluation of relationship between PM and relapse after treatment stop is not statistically significant (*p-value : 1 at Fischer test*).

-Lobular necrosis (LN) is present in only 1 patient with remission (*table 3 and figure 6*). Evaluation of association between LN and relapse is not statistically significant (*p value: 1 at Fischer test*).

-Plasma cells (PL) are present in 8 on 18 biopsy (45%) most of time in rare number (*i.e. grade PL1 : 39% of the biopsy*) and in only one liver biopsy we observed many plasma cells (*i.e. grade PL3*). Evaluation of relationship between presence of plasma cells and relapse after treatment stop was not statistically significant (*p-value : 1 at Fischer test*).

Results are displayed in table 3 and Figure 6.

**Table 3: Evaluation of PM (piecemeal necrosis), LN (lobular necrosis) and PL (presence of plasma cells) in relapse and remission group**

	PM		LN		PL	
	YES	NO	YES	NO	YES	NO
<b>Relapse group</b>	2	4	0	6	2	4
<b>Remission group</b>	2	12	1	13	6	8

## VII. DISCUSSION :

---

### VII.1 Predictive factor of relapse of HAI-FR-BIO:

This first protocol HAI-FR-BIO does not highlight significant association between the known biological and histological markers quoted earlier and relapse, with a principal limitation linked with the low effectiveness of studied patient.

Concerning the primary end-point criteria, we observe a tendency to a higher ALT level in relapse group (43.5 UI/L) as compared to remission group (26.5 UI/L) with a wide dispersion of value (*IQR* 25% :17 UI/L – *IQR* 75% 85 UI/L) sometimes above the normal value related to the fact that most city laboratories do not have the same standards. To overcome this variability, these rates are generally expressed qualitatively (% of normal value) in the literature which was not possible in our study due to the lack of data in the medical records at the time of collection (normal range of city laboratories not recorded). Note also that the population study is very heterogeneous with potential uncontrolled recurrence factors such as age, autoantibodies, etc... Another bias in RTX group could be the delay of remission before treatment stopped, which is inferior of 2 years of sustainable biological remission in 3 on 4 patient, as normally recommended by EASL guidelines 2015(8). Of course, these recommendations are difficult to apply to the patient on RITUXIMAB in view of the treatment modalities and its pathophysiological mechanism that is discussed later. A recent study of *Harlt and al. in J.Hepatol 2015 (25)* demonstrates that a rate of ALT level below the upper limit combined with an IgG level of less than 12g/L before treatment stopped, could be a reliable predictive factor of sustained remission after treatment cessation (25). In this study ALT level is analyzed as predictive factor of relapse on 28 patients treated by AZATHIOPRINE or CORTICOSTEROID, with a sustainable remission of at least 2 years before treatment stopped. On these 28 patients, 54% patient belong to remission group and 46% to relapse group, with a median of follow up of 28 months after treatment cessation. They observe a median of ALT before treatment cessation at 20.1 UI/L (*IQ* 95%: 14-34) in relapse group VS 14.7 UI/L (*IQ* 95%: 8-17) in remission group, with a significant statistical difference (*p* value 0.008 with *Man Withney test*). Based on these results and using the Nquery software, to detect a statistically significant relationship in our study between the ALT level before treatment cessation and the risk of autoimmune hepatitis recurrence (with alpha risk of 5% and beta-risk of 20%) we should have included 68 patients. Despite the size of the initial population of approximately 150 patients, this target of 68 patients

enrolled is not achieved because most patients had exclusion factors such as overlap syndrome or a progressive discontinuation of AZATHIOPRINE with recurrence before treatment was totally stopped. Note also that the population study is very heterogeneous with potential uncontrolled recurrence factors such as age, autoantibodies, etc...

Moreover in the study of *Harlt and al in J.Hepatol 2015 (25)*, we observed 62% of relapse before 6 months ,77% in 10 months and 92% at 1 year . In our study the delay of relapse after treatment cessation seem to be longer with a median of 20.5 months (range 3-48 months).

Finally, the study of the association between IgG concentration before stopping treatment and recurrence of AIH after treatment stopped is also not statistically significant, but we could observe a tendency toward a higher level in the relapse group.

Regarding analysis of histological markers, we also do not observe statistically significant correlation between the presence of plasma cells before treatment stopped and the risk of recurrence of autoimmune hepatitis after treatment cessation, mainly related to the low number of liver biopsies available in relapse group (4 biopsies) compare to remission group (14 biopsies). In recent publication, we do no longer consider persistence of inflammation on liver biopsies before treatment discontinuation (defined by AIH score greater than 3) as a predictive factor of relapse, but we rather focus on the type of persistent inflammation. Two recent studies of *Dhaliwal HK and al JHepatol 2015 (20)* and *Czaja AJ and al Liver 2003 (28)*, concentrate mainly on the presence of periportal plasma cells before stopping treatment, as a stigma of insufficient impregnation of corticosteroids to inhibit IL-2 promoting the cytotoxic reaction. The sensitivity of periportal plasma cells for recurrence is 31% with a specificity of 93%, predictability rate of relapse 50% (20,28).

Nevertheless in our protocol, evaluation of plasma cells was only semi quantitative using a HES staining which decrease accuracy and facility to identify these cells inside the mononuclear infiltrate. For this reason the next protocol involve an immunostaining using CD38+ AB, MUM staining to simplify plasma cells counting.

Regarding the other histological markers of inflammation in autoimmune hepatitis such as parcellar necrosis and lobular necrosis, none of them are linked to relapse in our study. The same observation is made in the study of *Czaja AJ and al Liver 2003*, with most of the time a presence of interface hepatitis before treatment stopped in patients who relapse but without any significant objective difference with the remission group (36 VS 20 %, p 0.1)(28) . According

to the latest recommendation, histological remission before stopping treatment reduces the risk of recurrence by 28% (2). Therefore, in AASLD guidelines of 2019 (2) realization of liver biopsy before treatment cessation is no longer mandatory in adults but only advised.

## **VII.2 Rationale of HAI-FR-BIH :**

The future study HAI-FR-BIH start in January 2020 after consent of the PPC. We use the same primary end-point criteria because of its reproducibility and is statistically relevant in the literature. However some limitations are likely to be observed because the low number of patients include in the study. According to the consort statement of 2010, we emphasize on the explorer nature of this pilot study which investigate new immunological predictive factor of AIH relapse:

- **Exploration of circulating lymphocyte CD27 :**

Two recent study show a correlation between the level of CD27+ memory B cells post-treatment with RITUXIMAB and the risk of recurrence of the myasthenia or optica neuromylitis, making it possible to determine the timing of resumption of RITUXIMAB injections. The positivity threshold of CD27+ memory B cells is defined at 0,05% of the total leukocyte count , with indication to carry on or retreat above this rate (27) .The mean time of detection for re-emerging CD27+ memory B cells was 7.5 months (extreme value : 3-12 months ) in myasthenia (26) and 8.9 months (range 6 to 16 months) in optica neuromyelitis(27). After 1 year under the limit of 0,05% of total leukocyte, patients are considered as prolonged responders. Another important point is the absence of significant correlation between detection of CD27+ memory B cells and CD19+ memory B cells which is not a good marker for monitoring time of retreatment. Note also that RTX level is not correlate with CD27+ memory B cells re-emergence, and can be still detected about 3-6 months after last injection.

Our protocol will explore CD27+ memory B cells only in RITUXIMAB group, every 3 months during 1 a year, with a delay of at least 3 months after treatment cessation. We rely our analysis on the previous positive threshold of 0.05% of total leukocyte count to affirm the resurgence of CD27+ memory B cells.

Another ambition of our study is to search for CD27+ memory B cells on a liver biopsy realized before treatment stopped using a new formalin-compatible CD27+ antibody. Therefore, we could evaluate compartment of CD27+ memory B cells before treatment stopped in hepatic tissue, to improve knowledge of liver injury mechanisms in autoimmune hepatitis; especially the type of cells involved which may represent a marker of disease activity.

- **Cytokine storage :**

One of them is the GALECTINE 9 (Gal-9) which is study in a recent paper published by *Matsuoka N and al in Medecine 2019 (29)*. This cytokine appear to have a role in liver inflammation, fibrosis and even tumorigenesis. Physiological hypothesis relies on the fact that Gal-9 has a immunomodulatory property through interaction with T cells. The cellular origin of serum Gal-9 in AIH patients is unknown, but is presumed to be hepatic stellate cells, macrophages, and/or Kupffer cells, all of which have known roles in liver fibrosis (30,31).

During this study (29) they compare serum Gal-9 levels in AIH patients, HCC patients, and healthy subjects. Thirst observation is a serum Gal-9 levels significantly higher in AIH patients compared with CHC patients ( $13.8 \pm 4.9$  ng/mL vs  $8.9 \pm 3.0$  ng/mL,  $P < .001$ ) or healthy subjects ( $13.8 \pm 4.9$  ng/mL vs  $5.0 \pm 1.3$  ng/mL,  $P < .001$ ). Second observation is a weak but significant correlations between Gal-9 and alanine aminotransferase (ALT) ( $r:0,280$  with  $p : 0,013$ ) or TB levels ( $r:0,356$  with  $p :0,001$ ).

Concerning correlation between Gal-9 and necro-inflammatory grades on histological analysis, they could observe an increase in Gal-9 levels proportional to the necro-inflammatory grade (  $11.1 \pm 4.5$  ng/mL for A1,  $15.1 \pm 4.9$  ng/mL for A2, and  $14.3 \pm 6.2$  ng/mL for A3) but the differences are not statistically significant .

Finally, they study circulating levels of Gal-9 before and after corticosteroid therapy in 57 AIH patients. Serum levels of Gal-9 is decreased by corticosteroid therapy and we can observe a significant difference in serum levels of Gal-9 before and after corticosteroid therapy in AIH patients ( $14.1 \pm 4.9$  ng/mL vs  $8.3 \pm 3.8$  ng/mL,  $P < .001$ ).

Other cytokines such as Mac-2 binding protein glycan isomer (M2BPGi) and C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) also show promoting use (32). CXCL10 also call IP10 seems to be a potentially useful serum marker of hepatic inflammation, strongly expressed by hepatocyte in AIH with correlation to ALT serum level. Indeed two studies show a correlation between their

serum level and AIH remission after treatment by AZATHIOPRINE or PREDNISONE (29,33). Moreover as observed in the previous study (29) M2BPGi and CXCL10 seems to be significantly correlated with Gal-9 level in AIH patient ( $r = 0.593$ ,  $p < 0.0000001$  for M2BPGi and  $r = 0.516$ ,  $p < 0.00001$  for CXCL10 ).

Yet the play of these cytokines in AIH follows up need to be more investigated. In our future study only a storage of serum and mononuclear cell will be performed along patient follow up and kept for future analysis. Mononuclear cell storage will allow us to study the genes of the cytokines and chemokines quoted above by quantitative PCR. Founding will be needed to perform further analysis of this cytokin in our population of AIH patient in remission or relapse after treatment stopped.

### **VII.2.1 Application of RITUXIMAB in refractory Autoimmune Hepatitis:**

The exact pathophysiological mechanisms by which RITUXIMAB acts in autoimmune hepatitis are not well known. The current hypothesis is that hepatic autoantigens are presented to B cells which triggers a dysregulated T cells response against them. This lead to activation of cytokines cascade involving TNF and Interferon source of hepatocyte injury and death (*Figure 5*) (34). Also we could observe a correlation between the elevation of intra-portal B cells level and the serum IgG rate in these patients. The biding of RITUXIMAB to CD20+ results in depletion of B cells and Th1 response increasing INF and TNF. It could also increase the activity of T-reg lymphocytes allowing the restoration of immune tolerance. Mouse models have shown that a decrease in B cells numbers affects CD4 activity in the immune response. Another control route is the blocking of the FcγRIIIa receptor present on the surface of monocytes, macrophages and Natural killer (CD8) implicated in hepatocyte lesions of AIH.

In our study, only 4 patients have been treated for refractory AIH, all of them responded with only one who experiment an important side effect (a urinary septic shock). Despite the small number of patients treated by RTX in our study, we observe a rate of 50% relapse with 2 patients relapse on 4, the first at 6 months and the second at 24 months after the last injection of RTX. Concerning the two patients in remission, last injection is realized 26 months and 12 months ago (last-minute update). There are a dozen studies in the literature describing the effectiveness of RITUXIMAB in achieving remission. One of the most relevant published by *Burak KW and al in Can J Gastroenterol 2013 (18)* evaluated the safety and efficacy of RITUXIMAB in a

small population of patients with refractory AIH. The number of patients was 6, with the primary endpoint being the reduction in the level of ASAT and IgG concentration evaluated at the 42nd and 72nd week of treatment. The results show a significant reduction in ASAT levels ( $p = 0.003$ ) and IgG concentration ( $p = 0.056$ ) in 4/6 patients. No serious adverse reactions, defined as opportunistic infections or injection reactions, have been shown.

Another study published by *Than NN and al in JHEP report of 2019 (34)* also prove the efficacy and security of RITUXIMAB in a population of 22 patients with refractory AIH treated during 42 months. This study is an international multicentric study. 71% patients were free from AIH flare-up during 24 months and 23% developed flare-up at 4, 21,22,23 and 24 months. This suggests that RITUXIMAB may have a potential to settle biochemical response in refractory AIH up to 18 months after last injection, allowing physician to establish next treatment strategy to maintain remission. Concerning side effects, one patient developed recurrent urinary tract infection and one papilloma virus related tongue cancer. The strong point of this study is its multicentric and international design. Indeed, other studies are mainly "case reports" or small trials not easily reproducible due to heterogeneous population feature with different definition of refractory hepatitis, different treatment history or multiple associated comorbidity (most of them having hemopathy with a marketing authorization for RITUXIMAB). Nowadays there is no multicentric large-controlled trial to validate this observation on security and safety of RITUXIMAB for AIH, but this would be needed. There is also no specific protocol for RITUXIMAB administration in AIH, nor for follow-up during and after cessation of treatment. Way of using RTX is variable in published data, and even in our 4 patients treated in Grenoble University Hospital. Indeed 3 patients received 2 injections using modality of administration indicated in hemopathy, while 1 patient was treated during 5 years with a total of 13 injections every 4 months. We hope that this new protocol will help to standardize patient follow-up based on CD27+ memory B cells as a criterion for recurrence and therefore for re-introduction of treatment.



## VIII. PROTOCOL HAI-FR-BIH

---

### VIII.1 RESUME DE LA RECHERCHE

<b>TITRE</b>	Etude des facteurs biologiques, histologiques et immunologiques prédisant la récurrence de l'hépatite auto-immune chez les patients sous traitement de 1 <sup>er</sup> ligne (IMUREL®) et de 3 <sup>ème</sup> ligne (MABTHERA®)
<b>TITRE COURT</b>	HAI-FR-BIH
<b>INVESTIGATEUR COORDONNATEUR / PRINCIPAL</b>	Pr ZARSKI JEAN PIERRE
<b>PROMOTEUR</b>	CHU GRENOBLE ALPES
<b>JUSTIFICATION / CONTEXTE</b>	<p>L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie inflammatoire chronique du foie pouvant survenir à tout âge. La physiopathologie est complexe et liée au dysfonctionnement de l'homéostasie immunitaire avec une augmentation de la réponse Th2 et Th1 (5,6) et une diminution des lymphocytes T régulateurs circulants (3) (4) . Cette pathologie affecte les personnes de tout âge, principalement les sujets jeunes et les femmes, de toutes origines ethniques.</p> <p>Il s'agit d'une maladie rare dont l'incidence est de 16 à 18 cas pour 100 000 personnes en Europe et augmente autant chez l'homme que chez la femme.</p> <p>Il existe 3 sous classes d'hépatites auto-immunes en fonction du profil sérologique :</p> <p>Selon l'EASL (<i>European Association for the Study of Liver</i>) la plus fréquente est l'HAI type 1 représentant 90% de l'ensemble des HAI. Elle se caractérise par la présence d'anticorps (Ac) antinucléaires (65%), anticorps anti muscle lisse type anti actine F, anticorps anti-SLA. Il s'agit principalement de femmes, de tout âge. Cette forme d'hépatite auto-immune survient généralement à l'âge adulte et est souvent cortico-sensible(35).</p> <p>L'hépatite auto-immune de type 2 représente 10% des HAI ; elle se caractérise par la présence d'anti-liver microsome ou LKM-1, rarement LKM-3 et anticorps anti-liver cytosol ou anti LC1. Elle survient principalement dans l'enfance. La</p>

maladie est généralement plus sévère et répond moins bien à l'administration de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs. (35)

Enfin l'hépatite auto-immune de type 3, très similaire à l'HAI de type 1, est caractérisé par la présence d'anti-SLA/P (seul anticorps spécifiques de l'HAI et facteur de mauvais pronostic) et souvent d'anti-Ro S52 (35).

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, immunologiques et histologiques.

❖ **Concernant les traitements de l'HAI :**

Le traitement de première intention repose sur l'administration de corticoïdes seuls ou en association avec l'IMUREL® (Azathioprine). En 2<sup>ème</sup> ligne sont généralement utilisés, sans haut niveau de preuve, les inhibiteurs de mTOR et les inhibiteurs de la calcineurine.

Enfin, en cas d'échec des deux premières lignes et de contre-indication à la transplantation hépatique, une alternative thérapeutique hors AMM est le MABTHERA® (Rituximab), un anticorps monoclonal anti CD20+, pour lequel existe actuellement une dizaine d'études dans la littérature décrivant son efficacité et sa sécurité dans l'obtention d'une rémission (18).

Actuellement, quatre patients atteints d'une hépatite auto-immune séronégative ont été traités par MABTHERA® entre 2015 et 2019 au CHU de Grenoble Alpes, avec obtention d'une rémission initiale, sans schéma précis de durée, arrêt ou reprise de traitement.

L'arrêt des traitements est possible chez les patients ayant maintenu une rémission clinique-biologique et histologique sous traitement pendant au moins 24 mois (2).

Cependant la **récidive de la maladie à l'arrêt du traitement est très fréquente**, est se définit par l'augmentation des ALAT à 3 fois la valeur normale ou une élévation modéré des ALAT et des IgG (*critère International Autoimmune Hepatitis Group*) (2).

On estime la **récidive à 46 % chez les adultes et à 80 % chez l'enfant** sur les plus grosses cohortes américaines selon l'AASLD (*American Association for study of Liver Disease*). Elle survient dans 50% des cas dans les trois premiers mois suivant l'arrêt du traitement et 90 % des cas dans les 28 premiers mois après arrêt du traitement (2).

❖ **Concernant les facteurs prédictifs de rechute :**

Il est actuellement décrit littérature, pour les patients sous traitement conventionnel, 2 types de facteurs prédictifs de rechute avant arrêt des traitements:

-Sur le plan biologique : le **taux d'ALAT > 50% de la limite supérieure de la normale avant l'arrêt du traitement ; un taux d'IgG > 12g/L avant arrêt du traitement (25)**

-Sur le plan histologique : le facteur prédictif de récurrence anciennement décrit et actuellement controversé est la persistance d'une activité inflammatoire avant arrêt de traitement défini par un HAI score supérieur à 3. Ce score histologique évalue la nécrose péri-portale/en pont, l'inflammation portale, la nécrose interlobulaire et enfin le degré de fibrose (36).

Un autre marqueur plus pertinent et étudié récemment depuis les années 2000 est la **présence de plasmocytes péri-portaux sur lame de biopsie hépatique avant arrêt du traitement (37)**. L'hypothèse physiologique est que ces plasmocytes seraient un stigmate d'une imprégnation non suffisante en corticoïdes ou autre immunosuppresseur permettant d'enrayer la réaction cytotoxique à l'origine des lésions d'HAI. Leur présence est donc un marqueur d'inflammation persistante avec un risque plus élevé de récurrence de l'HAI après arrêt du traitement. Actuellement, la sensibilité des plasmocytes sur la lame pour la récurrence est évaluée dans la littérature à 31% avec une spécificité de 93%, et un taux de prédictibilité de la rechute estimé à 50% (28).

Ces facteurs de risque ont fait l'objet d'une analyse préliminaire au sein d'une RNIPH nommé HAI-FR-BIO dont l'inclusion débute en mai 2020 avec fin de l'étude en octobre 2020.

❖ **Objectif de l'étude :**

Ce nouveau protocole complète la RNIPH HAI-FR-BIO avec une envergure monocentrique et prospective permettant l'étude d'un facteur immunologique décrit en 2016 dans la littérature et associé au risque de récurrence de maladie auto-immune après traitement par MABTHERA® : le taux de lymphocyte B mémoire CD27+.

En effet deux études récentes portant sur des maladies auto-immunes : la myasthénie (26) et la neuromyéélite optique (27) traitées par MABTHERA® ; ont montré une corrélation entre le taux sanguin de lymphocytes B mémoire CD27+

	<p>post-traitement et le risque de récurrence de la maladie. La mesure et la surveillance de ce taux permettraient donc de déterminer le timing de réintroduction du traitement par MABTHERA® pour éviter cette récurrence.</p> <p>L'objectif de cette étude est donc d'étudier les anciens et nouveaux facteurs prédictifs de récurrence d'hépatite auto immune à l'arrêt des traitements, afin de standardiser le suivi des patients, s'agissant d'une pathologie à haut risque de récurrence.</p>
<b>METHODOLOGIE</b>	Etude observationnelle, prospective (avec recueil de données rétrospectivement également), monocentrique
<b>OBJECTIF PRINCIPAL</b>	<p><b>L'objectif principal</b> est l'étude de la corrélation entre le taux d'ALAT mesuré en UI/L 1 mois (+/- 15 jours) avant arrêt du traitement et la récurrence de l'HAI après arrêt du traitement avec détermination d'un seuil d'ALAT en valeur absolue, dans deux groupes de patients:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Groupe 1 : sujets ayant reçu une 1<sup>er</sup> ligne de traitement par IMUREL® en monothérapie et actuellement en rémission (A) ou en récurrence (B) ;</li> <li>- Groupe 2 : sujets ayant une HAI réfractaire ayant reçu une 3<sup>ème</sup> ligne de traitement par MABTHERA® et actuellement en rémission (C) ou récurrence (D).</li> </ul>
<b>CRITERE DE JUGEMENT PRINCIPAL</b>	Taux d'ALAT mesuré en UI/L 1 mois avant l'arrêt du traitement, dans les deux groupes (1 et 2) de sujet suivis pour HAI.
<b>OBJECTIFS SECONDAIRES</b>	<p><b>Les objectifs secondaires</b> sont multiples.</p> <p>1/ Corrélation entre le taux d'ASAT mesuré en UI/L et d'IgG mesuré en g/L 1 mois avant l'arrêt du traitement et le risque de récurrence de l'HAI après arrêt des traitements, avec détermination d'un seuil d'ASAT et d'IgG, dans deux groupes de patients:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-groupe 1 : sujets ayant reçu une 1<sup>er</sup> ligne de traitement par IMUREL® en monothérapie et actuellement en rémission (A) ou en récurrence (B) ;</li> <li>- groupe 2 : sujets ayant une HAI réfractaire ayant reçu une 3<sup>ème</sup> ligne de traitement par MABTHERA® et actuellement en rémission (C) ou récurrence (D).</li> </ul> <p>2/Corrélation entre les marqueurs tissulaires mesurés sur biopsie hépatique réalisées avant l'arrêt des traitements et le risque de récurrence de l'HAI post arrêt des traitements, dans deux groupes de patients 1 et 2.</p>

	<p>3/ Corrélation entre le taux de lymphocytes B mémoires CD27+ mesuré après arrêt du traitement, dans le groupe 2 et le risque de récurrence de l'hépatite auto-immune après arrêt du traitement.</p>
<p><b>CRITERE(S) DE JUGEMENT SECONDAIRE(S)</b></p>	<p>Lors de l'analyse statistique, l'ensemble des critères de jugement sera mis en relation avec la présence ou non d'une récurrence de l'hépatite auto-immune après arrêt du traitement.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.       <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Taux d'ASAT, mesuré en UI/L, 1 mois avant arrêt du traitement et le risque de récurrence de l'HAI après arrêt du traitement de 1<sup>ère</sup> ligne par IMUREL® ou de troisième ligne par MABTHERA®</li> <li>b) Taux d'Immunoglobulines de type G, mesuré en g/L, 1 mois avant arrêt du traitement et le risque de récurrence de l'HAI après arrêt du traitement de 1<sup>ère</sup> ligne par IMUREL® ou de troisième ligne par MABTHERA®.</li> </ol> </li> <li>2. Examen Anato-mo-CytoPathologique de la biopsie hépatique réalisée avant l'arrêt des traitements par MABTHERA® et par IMUREL® de :       <ol style="list-style-type: none"> <li>a) L'activité inflammatoire de l'HAI mesuré notamment par la présence de nécrose parcellaire et lobulaire quantifié en utilisant les scores histologiques NP gradé de 0 à 3 et NL gradé de 0 à 2.</li> <li>b) Analyse semi quantitative en microscopie optique après coloration et immuno-marquage des plasmocytes (<i>score PL : 0 = absent, 1 = rare, 2 = modéré et 3 = nombreux</i>), des lymphocytes B mémoire CD 20 + et CD27+.</li> </ol> </li> <li>3. Taux de lymphocyte B mémoire CD 27+ sanguin (mesuré en % par rapport aux globules blancs) mesuré à 3, 6, 9 et 12 mois post arrêt des traitements.</li> </ol>
<p><b>CRITERES D'INCLUSION</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Homme ou femme de 18 à 75 ans suivis au CHUGA</li> <li>- Atteints d'Hépatite auto-immune séronégative (Anticorps anti-muscle lisse de type actine F négatifs, anti-SLA négatifs, anti-LKM1 négatifs, anti-LC1 négatifs) ou séropositive (Anticorps anti muscle lisse type actine F positif ou Anti SLA positif ou anti LKM1 positif ou anti LC1 positifs) Prouvée histologiquement (biopsie hépatique en faveur)</li> <li>- Ayant eu une interruption de traitement pour rémission d'HAI dans les 3 derniers mois</li> <li>- Ne s'étant pas opposé à l'étude après information claire, loyale et intelligible (Annexe 2a)</li> </ul> <p><u>Sous-groupe :</u></p> <p>Groupe 1 : Patients ayant reçu en 1<sup>er</sup> ligne de l'IMUREL® en monothérapie pour son HAI et actuellement en rémission (A) ou en récurrence (B).</p> <p>Groupe 2 : Patients étant en 3<sup>ème</sup> ligne ayant reçu du MABTHERA® pour son HAI et actuellement en rémission (C) ou en récurrence (D).</p> <p><u>Collection d'EICH :</u></p> <p>-Patients de plus de 40kg</p>

	-Ayant leur consentement pour la collection d'EICH CRB03 (Hépto-gastro-entérologie du CHUGA, annexe 2b).
<b>CRITERES DE NON INCLUSION</b>	-Patients atteints d'Overlap syndrome (syndrome de chevauchement entre hépatite auto immune et maladie cholestatique hépatique). -HAI réfractaire sous alternative de traitement autre que le MABTHERA®. -Transplantation hépatique dans le groupe 1. -Sujets sous tutelle, privés de liberté et/ou hospitalisés sous contrainte.
<b>DEROULEMENT DE LA RECHERCHE</b>	<p>Les patients seront recrutés à partir d'une base de donnée (<i>référentiel de l'ensemble des biopsies hépatiques étiquetée HAI effectué en HDJ d'HGE ou en service d'HGE depuis 2007</i>) répertoriant l'ensemble des hépatites auto immunes suivis sur le CHUGA.</p> <p>Les sujets respectant les critères d'inclusion et de non inclusion se verront proposer la participation au protocole lors d'une consultation de suivis habituel trimestrielle, en soin courant, avec l'investigateur principale</p> <p>Après signature des consentements, les participants seront revus en consultation par l'investigateur principale à la visite d'inclusion et tous les 3 mois pendant 12 mois (M3-M6-M9-M12, +/- 15 jours), dans le cadre des soins courants, avec réalisation d'un interrogatoire, un examen clinique standard et des prélèvements biologiques suivants:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Les principaux prélèvements permettant le suivi habituel de l'hépatite auto immune seront réalisés en pratique courante tous les 3 mois : Transaminases sériques ASAT/ALAT en UI/L, et un dosage pondéral des IgG en g/L.</li> <li>2) Un prélèvement composé de 2 tubes EDTA de 6 ml avec 1 tube sec de 7 ml contenant un de sérum séparateur, sera réalisé pour effectuer les dosages suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>○ En soins courants: -Immunophénotypage par cytométrie de flux pour étude des sous populations lymphocytaires T, NK, et B en particulier les lymphocytes B mémoire CD27+ (1 tube EDTA 6 ml).</li> <li>○ Hors soin courants : Immunophénotypage par cytométrie en flux pour exploration et caractérisation d'une sous population lymphocytaire : les T reg (<i>lymphocyte T régulateur</i>)</li> <li>○ Hors soins courants et avec stockage réalisé dans le service de gastro entérologie : -Stockage de sérum (1 tube sec avec séparateur de sérum 7ml) pour analyse des cytokines et chimiokines d'intérêt, tel que IP10(18), IFN-gamma, IL-12, IL-6, IL-10 et <b>galectine-9</b> (29). -Stockage des PBMC isolées (à parti de 1 tube EDTA 6 ml) et congelées à -80° pour exploration des gènes des cytokines et chimiokines ci-dessus par PCR</li> </ul> </li> </ol>

	<p>quantitative. Ces analyses seront réalisées dans un deuxième temps sous réserve d'un budget et des ressources humaines disponibles.</p> <p>3) A l'inclusion et en soin courant, une recherche des anticorps anti-tissu par immunofluorescence indirecte, la recherche des anticorps marqueurs du foie par immunodot sera réalisée pour les patients au profil sérologique non connu.</p> <p>Enfin nous réaliserons une relecture des lames de biopsie hépatique faites avant l'arrêt des traitements chez certains patients. Ces lames sont actuellement stockées dans le laboratoire d'anatomo-cytopathologie du CHUGA et seront relus avec la supervision du Pr N. Sturm responsable UF ACP.</p> <p>Sur ces lames, nous analyserons les critères suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quantification de la nécrose parcellaire et lobulaire</li> <li>- Description de la présence d'hépatite d'interface</li> <li>- Évaluation semi quantitative par immuno marquage des plasmocytes (CD38+ et MUM1), des lymphocytes B mémoire CD 20+ et CD27+. A noter que le marquage des lymphocytes B mémoires CD27+ nécessite l'utilisation d'un nouveau anticorps produit par <u>Abcam</u> (<i>Anti-CD27 antibody - Monoclonal de lapin clone [EPR8569] - réf. ab131254 - (dilution entre 1/100 et 1/250)</i>)</li> </ul>
<b>NOMBRE DE SUJETS</b>	<p>Nous avons évalué rétrospectivement le nombre de patients suivis pour hépatite auto immune de 2007 à 2019 sur le CHU de Grenoble : 173 patients. Le nombre actuel de patients répondants aux critères d'inclusions est de 24 dans cette cohorte. Sous réserve de nouveau patients diagnostiqué et incluable courant 2020-2021 sur le CHU de Grenoble, le nombre de sujet sera de 24.</p> <p>S'agissant d'une étude pilote, exploratrice, nous nous affranchissons d'un calcul précis du nombre de sujet nécessaire en se basant sur les guidelines CONSORT statement.</p>
<b>NOMBRE PREVU DE CENTRES</b>	<p>Etude monocentrique sur le CHU de Grenoble.</p>
<b>CALENDRIER PREVISIONNEL DE LA RECHERCHE</b>	<p>Durée de la période d'inclusion : 6 mois</p> <p>Durée de participation de chaque sujet : 1 ans</p> <p>Durée totale de la recherche : 26 mois</p>
<b>ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES</b>	<p>S'agissant d'une étude pilote, mono centrique et descriptive, l'analyse descriptive consistera dans un premier temps aux mesures de moyenne, écart type concernant les variables continues de distribution normale, ainsi que les médianes et interquartiles.</p> <p>Concernant les variables dichotomiques, nous les exprimerons en pourcentage et effectif.</p>

	<p>Le CJP analysant des variables continues fera l'objet d'un test Student, et nous emploierons un test de Wilcoxon-Mann-Whitney non paramétrique si les conditions d'applications du Student ne sont pas vérifiées.</p> <p>Les CJS numéro 1 et 3 étant des variables continues, ils feront l'objet d'un test de Student ou de Wilcoxon-Mann-Whitney en fonction de la validité des conditions d'application du Student.</p> <p>Le CJS numéro 2 intervient sur des variables dichotomiques avec utilisation d'un test du Chi2 ou de Fischer lorsque les critères de Cochran ne sont pas respectés.</p> <p>La condition d'application du test de Student est la normalité des paramètres analysés. Les conditions d'application suivant les critères de Cochran pour le test du Chi2 sont un effectif supérieur à 20 individus, et un effectif théorique dans la comparaison des variables supérieur à 5 individus pour chaque sous classe.</p> <p>Le logiciel employé est le logiciel développé par l'UGA r4web, basé sur l'environnement R.</p>
<p><b>RETOMBEES</b> <b>ATTENDUES</b></p>	<p>L'objectif de cette étude est de décrire des facteurs prédictifs de récurrence de l'HAI avant et après arrêt du traitement dans une population de sujets sous différentes lignes de traitement, s'agissant en effet d'une pathologie à haut risque de récurrence. Cette étude fait suite à une première RNIPH HAI-FR-BIO, ayant permis l'analyse de facteurs prédictifs de récurrence rétrospective (biologique et histologique) avant arrêt du traitement. Ce travail a donc pour but de vérifier ces premières analyses et secondairement de décrire des facteurs prédictifs immunologiques de récurrence après arrêt des traitements.</p>



## VIII.2 LISTES DES INTERVENANTS:

<b>Promoteur</b>	<p><b>CHU GRENOBLE ALPES</b>  Délégation de Recherche Clinique Innovation (DRCI) du CHU GRENOBLE ALPES, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9  Téléphone 04 76 76 59 57 / Mail : <a href="mailto:DRCI@chu-grenoble.fr">DRCI@chu-grenoble.fr</a></p>
<b>Investigateur</b>	<p><b>Professeur Jean-Pierre ZARSKI</b>  Service Hépato-Gastro-Entérologie du CHU de Grenoble-Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9  Tél : 04 76 76 74 93 - 06 77 42 28 99 / Mail : <a href="mailto:jpzarski@chu-grenoble.fr">jpzarski@chu-grenoble.fr</a></p>
<b>Investigateurs associées (laboratoire)</b>	<p><b>Docteur Marie Christine JACOB</b>  Laboratoire d'Immunologie du CHU de Grenoble-Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9  Tél : 04 76 76 63 90 / Mail : <a href="mailto:MCJacob@chu-grenoble.fr">MCJacob@chu-grenoble.fr</a></p> <p><b>Professeur Nathalie STURM</b>  Laboratoire d'Anatomo-CytoPathologie du CHU de Grenoble-Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9  Secrétariat : 04 76 76 63 66 / Mail : <a href="mailto:NSturm@chu-grenoble.fr">NSturm@chu-grenoble.fr</a></p> <p><b>Docteur CHANTAL DUMESTRE-PERARD, MCU-PH</b>  Laboratoire d'Immunologie, CHUGA, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9,  Secrétariat : +33 (0)4 76 76 54 16 +33 (0)4 76 76 50 15 / Mail : <a href="mailto:CDumestre-Perard@chu-grenoble.fr">CDumestre-Perard@chu-grenoble.fr</a></p> <p><b>Docteur GIOVANNA CLAVARINO PhD, MCU-PH</b>  Laboratoire d'Immunologie, CHU Grenoble Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9  Secrétariat. +33 (0)4 76 76 54 16 et +33 (0)4 79 76 63 31 / Mail : <a href="mailto:gclavarino@chu-grenoble.fr">gclavarino@chu-grenoble.fr</a></p>
<b>Contact associé :</b>	<p><b>Mme TEDJINI SABINE (interne)</b>  Service Hépato-Gastro-Entérologie du CHU de Grenoble-Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9  Tél : 07 86 41 19 33 / Mail : <a href="mailto:stedjini@chu-grenoble.fr">stedjini@chu-grenoble.fr</a></p>
<b>Méthodologie et Gestion des données : lieu du traitement de données</b>	<p><b>Professeur Jean Luc BOSSON</b>  Département de Méthodologie de l'Information de Santé (DMIS) du CHU de Grenoble-Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9  Tél : 04 76 76 50 47 / Mail : <a href="mailto:jlbosson@chu-grenoble.fr">jlbosson@chu-grenoble.fr</a></p>

## VIII.3 VALIDATION SCIENTIFIQUE



Délégation à la Recherche  
Clinique et à l'Innovation

Président du Conseil Scientifique  
Dr Thomas DECAENS

Responsable  
Dr Camille DUCKI  
cducki@chu-grenoble.fr

La Tronche, le 9 septembre 2020

**Objet : Etude des facteurs biologiques, histologiques et immunologiques prédisant la récurrence de l'hépatite auto immune chez les patients sous traitement de 1er ligne (IMUREL®) et de 3ème ligne (MABTHERA®) - HAI FR BIH**

Je soussigné, Dr Camille Ducki, Responsable de la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation au CHU de Grenoble, confirme les informations suivantes :

Madame Sabine TEDJINI actuellement interne au CHU Grenoble Alpes a contacté la cellule accueil de la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation du CHUGA afin de solliciter la promotion de l'étude citée en objet.

Dans ce cadre, le protocole a été rédigé et finalisé par ses soins, de même que les documents annexes (formulaire de consentement et cahier d'observation). Le dossier réglementaire est donc complet.

Ce dossier n'a pu être déposé en l'état au CPP, car les procédures en vigueur au CHUGA requièrent que le financement du projet soit garanti avant la sollicitation des autorités de santé.

Madame TEDJINI a donc constitué un dossier en vue de l'obtention d'un appel d'offre dont les résultats ne seront connus qu'en fin d'année.

Pour faire valoir ce que de droit,

Dr Camille DUCKI  
Responsable Délégation de la Recherche Clinique



## IX. APPENDICE:

Table 4 : Scale of lobular and piecemeal necrosis

Grade of piecemeal necrosis	Histological description	Grade of lobular necrosis	Histological description
<b>NP0</b>	None	<b>NL 0</b>	Less than one focus of necrosis per lobule
<b>NP 1</b>	Focal periportal necrosis in contact with a few portal spaces	<b>NL 1</b>	At least one focus of necrosis per lobule
<b>NP 2</b>	Diffuse periportal necrosis in contact with some portal spaces, or focal periportal necrosis in contact with all portal spaces	<b>NL 2</b>	Several foci of necrosis per lobule or confluent or bridge necrosis
<b>NP 3</b>	Diffuse periportal necrosis on contact with all portal spaces		

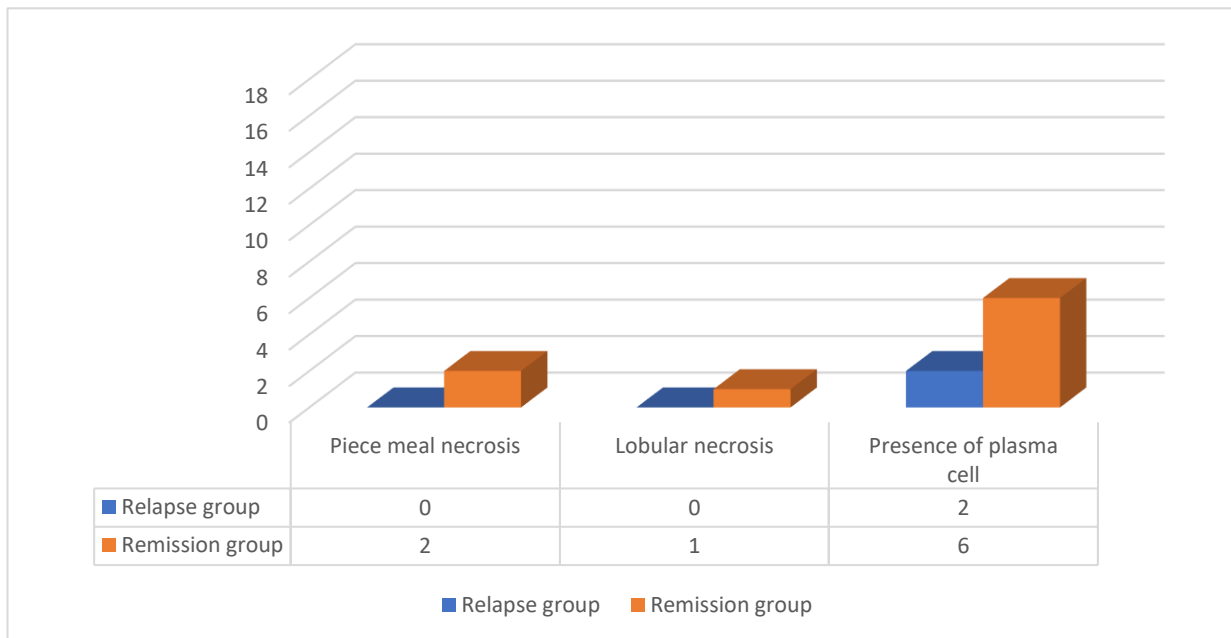
Table 5: Scale of plasma cell infiltration

Gradation of plasma cell infiltration		
<b>Absence of plasma cell</b>	No plasma cell viewed on HES staining, CD38 and MUM markage	PL 0
<b>Rare plasma cell</b>	< 5 plasma cell viewed on HES staining, CD38 and MUM markage	PL 1
<b>Few plasma cell</b>	>5 plasma cell viewed on HES staining, CD38 and MUM markage	PL 2
<b>Numerous plasma cell</b>	About 10 plasma cell, with interface hepatitis, most of the time crossing the bording blade	PL 3

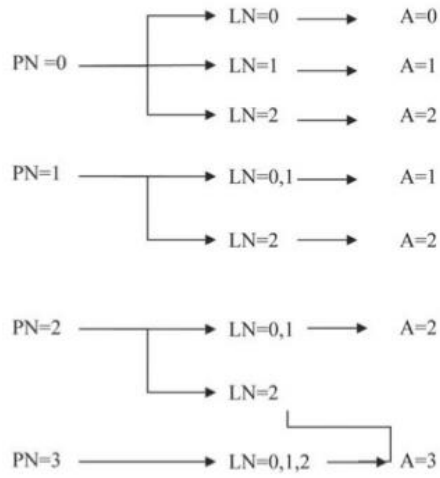
**Table 6 :Panel of fluorochrome used for exploration of lymphocyte T, NK, B , Treg and CD27+ memory B cell in flow cytometry (first line: Fluorochrome, second line identification markers)**

<b>Population T , and NK</b>	<b>FTIC</b>		<b>PE</b>		<b>V450</b>		<b>PERCPCy 5.5</b>		<b>PE Cy7</b>		<b>APC</b>		<b>APC-H7</b>			
	CD 3		CD16/CD56		HLA-DR		CD45		CD4		CD19		CD8			
<b>Numeration of CD27+ memory B cell</b>	<b>PerCP Cy5.5</b>			<b>PECy7</b>			<b>APC</b>									
	CD4			CD3			CD25									
<b>Exploration of Treg</b>	<b>FI</b>	<b>PE</b>	<b>PerCPCy5 .5</b>		<b>PE Cy7</b>		<b>APC</b>		<b>APC-H7</b>		<b>V450</b>		<b>V500</b>		<b>PE</b>	
	IgD	CD10	CD38		CD27		IgM		CD19		CD20		CD45		CD127	

**Figure 6 : Evaluation of presence of PM/ NL and PL in remission and relapse group**



**Figure 7: Metavir score activity**



*METAVIR. Hepatology 1994 ; 20:15-20.*

*Bedossa P et al.. Hepatology 1996, 24:289-93.*

**Figure 8 : Physiopathology of B cell implication in AIH**

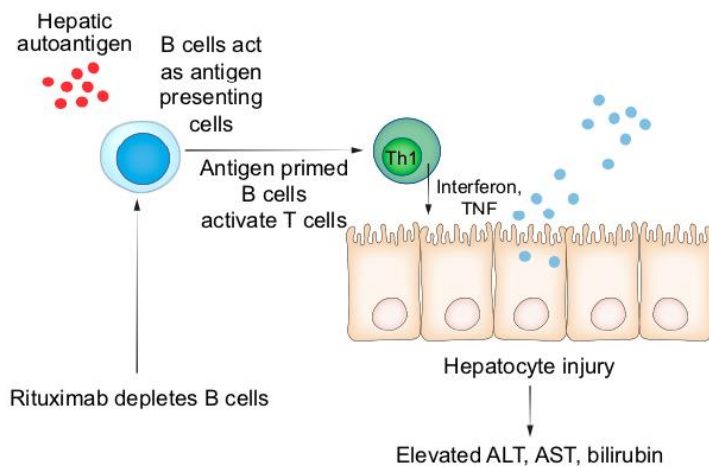
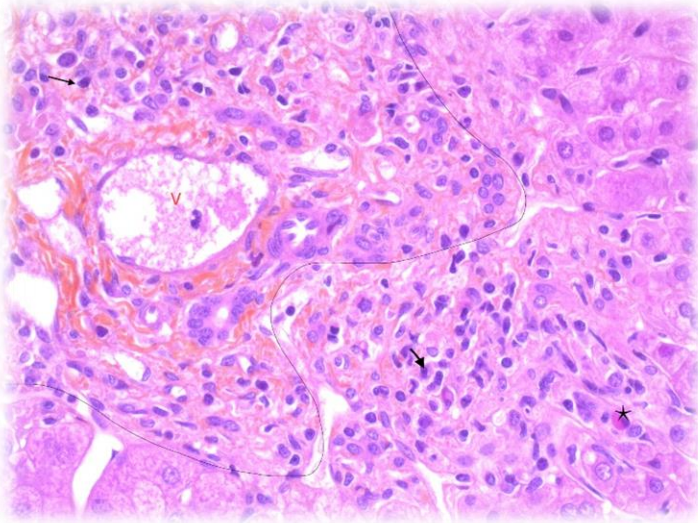
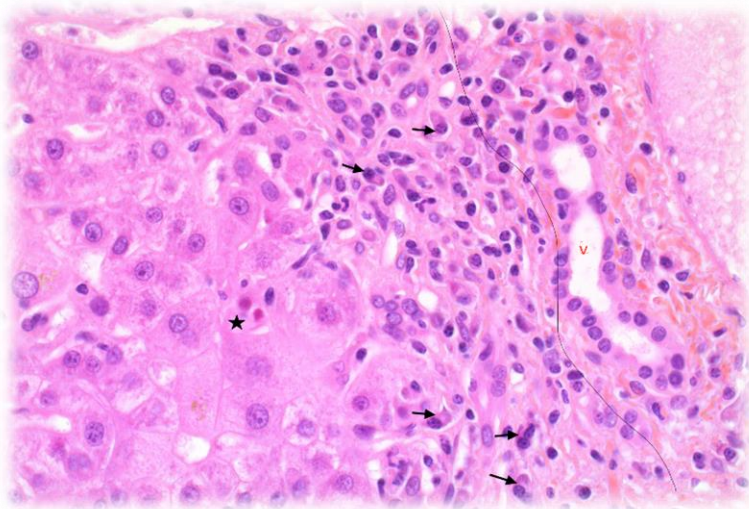
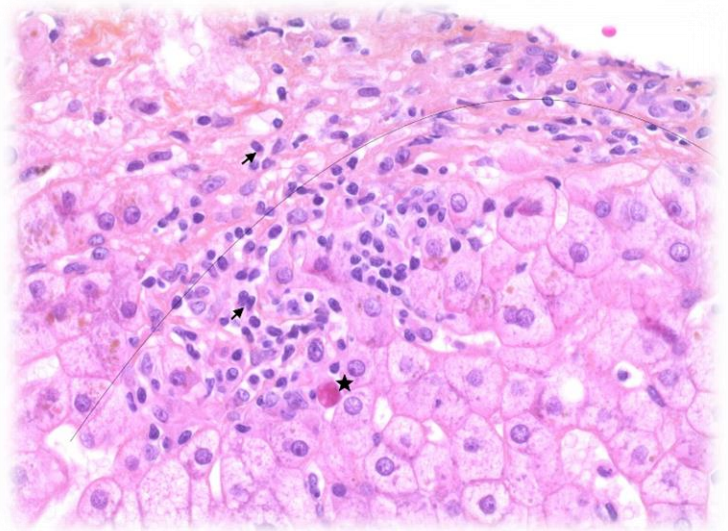


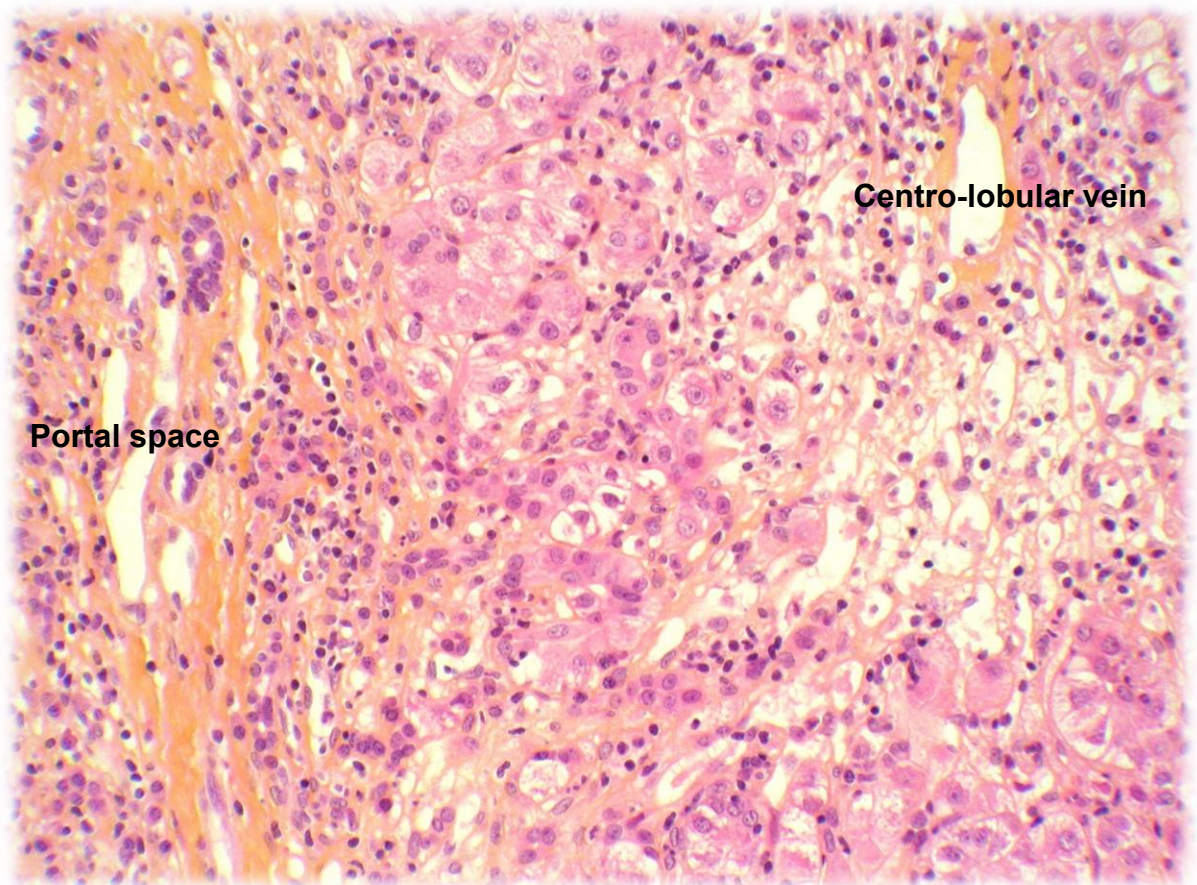
Figure 9 : Liver biopsy with sign of activity of AIH, HES staining .



**Legend :**  
-Arrow showing few plasma cell  
-Star marking apoptotic body  
-The line showing the bordering lamina  
-V: veinlet



**Figure 10 : Liver biopsy of AIH : Mononuclear infiltration in portal space and around the lobular central vein**



**Figure 11 : Liver biopsy with sign of activity of AIH, HES staining : lymphoplasmocytic infiltration crossing the bordering lamina, with apoptotic body .**





## X. BIBLIOGRAPHY:

---

1. Ngu JH, Bechly K, Chapman BA, Burt MJ, Barclay ML, Gearry RB, et al. Population-based epidemiology study of autoimmune hepatitis: a disease of older women? *J Gastroenterol Hepatol.* oct 2010;25(10):1681-6.
2. Mack CL, Adams D, Assis DN, Kerkar N, Manns MP, Mayo MJ, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis in adults and children: 2019 practice guidance and guidelines from the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology* [Internet]. [cité 29 mars 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <http://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.31065>
3. Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* juin 2011;8(6):320-9.
4. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev.* 1 avr 2014;13(4):435-40.
5. Floreani A, Restrepo-Jiménez P, Secchi MF, De Martin S, Leung PSC, Krawitt E, et al. Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 1 déc 2018;95:133-43.
6. Oo YH, Hubscher SG, Adams DH. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatol Int.* 1 juin 2010;4(2):475-93.
7. Czaja AJ. Behavior and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* mars 1999;30(3):394-401.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *J Hepatol.* 2015;63(4):971-1004.
9. Czaja AJ. Performance parameters of the conventional serological markers for autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci.* févr 2011;56(2):545-54.
10. Geller SA. Autoimmune hepatitis: Histopathology. *Clin Liver Dis.* 2014;3(2):19-23.
11. Vergani D, Longhi MS, Bogdanos DP, Ma Y, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis. *Semin Immunopathol.* 1 sept 2009;31(3):421-35.
12. Czaja AJ, Carpenter HA. Sensitivity, specificity, and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis. *Gastroenterology.* déc 1993;105(6):1824-32.
13. Balitzer D, Shafizadeh N, Peters MG, Ferrell LD, Alshak N, Kakar S. Autoimmune hepatitis: review of histologic features included in the simplified criteria proposed by the international autoimmune hepatitis group and proposal for new histologic criteria. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2017;30(5):773-83.

14. Hofer H, Oesterreicher C, Wrba F, Ferenci P, Penner E. Centrilobular necrosis in autoimmune hepatitis: a histological feature associated with acute clinical presentation. *J Clin Pathol.* mars 2006;59(3):246-9.
15. Zen Y, Notsumata K, Tanaka N, Nakanuma Y. Hepatic centrilobular zonal necrosis with positive antinuclear antibody: a unique subtype or early disease of autoimmune hepatitis? *Hum Pathol.* 1 nov 2007;38(11):1669-75.
16. Stravitz RT, Lefkowitz JH, Fontana RJ, Gershwin ME, Leung PSC, Sterling RK, et al. Autoimmune acute liver failure: proposed clinical and histological criteria. *Hepatology* Baltim Md. févr 2011;53(2):517-26.
17. Gleeson D, Heneghan MA, British Society of Gastroenterology. British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for management of autoimmune hepatitis. *Gut.* déc 2011;60(12):1611-29.
18. Burak KW, Swain MG, Santodomingo-Garzon T, Santodomingo-Garzon T, Lee SS, Urbanski SJ, et al. Rituximab for the treatment of patients with autoimmune hepatitis who are refractory or intolerant to standard therapy. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol.* 2013;27(5):273-80.
19. Barth E, Clawson J. A Case of Autoimmune Hepatitis Treated with Rituximab. *Case Rep Gastroenterol.* 23 nov 2010;4(3):502-9.
20. Dhaliwal HK, Hoeroldt BS, Dube AK, McFarlane E, Underwood JCE, Karajeh MA, et al. Long-Term Prognostic Significance of Persisting Histological Activity Despite Biochemical Remission in Autoimmune Hepatitis. *Am J Gastroenterol.* juill 2015;110(7):993-9.
21. Mieli-Vergani G, Vergani D, Baumann U, Czubkowski P, Debray D, Dezsofi A, et al. Diagnosis and Management of Pediatric Autoimmune Liver Disease: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018;66(2):345-60.
22. Relapse Following Treatment Withdrawal in Patients With Autoimmune Chronic Active Hepatitis - PubMed [Internet]. [cité 29 mars 2020]. Disponible sur: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/proxy.insermbiblio.inist.fr/6618435/?from\\_term=Relapse+Following+Treatment+Withdrawal+in+Patients+with+Autoimmune+Chronic+Active+Hepatitis](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/proxy.insermbiblio.inist.fr/6618435/?from_term=Relapse+Following+Treatment+Withdrawal+in+Patients+with+Autoimmune+Chronic+Active+Hepatitis)
23. van Gerven NMF, Verwer BJ, Witte BI, van Hoek B, Coenraad MJ, van Erpecum KJ, et al. Relapse is almost universal after withdrawal of immunosuppressive medication in patients with autoimmune hepatitis in remission. *J Hepatol.* janv 2013;58(1):141-7.
24. Kirstein MM, Metzler F, Geiger E, Heinrich E, Hallensleben M, Manns MP, et al.

Prediction of short- and long-term outcome in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology*. Baltimore, Md. nov 2015;62(5):1524-35.

25. Hartl J, Ehlken H, Weiler-Normann C, Sebode M, Kreuels B, Pannicke N, et al. Patient selection based on treatment duration and liver biochemistry increases success rates after treatment withdrawal in autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. mars 2015;62(3):642-6.

26. Lebrun C, Bourg V, Bresch S, Cohen M, Rosenthal-Allieri MA, Desnuelle C, et al. Therapeutic target of memory B cells depletion helps to tailor administration frequency of rituximab in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. sept 2016;298:79-81.

27. Only Follow-Up of Memory B Cells Helps Monitor Rituximab Administration to Patients With Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders - PubMed [Internet]. [cité 14 avr 2020]. Disponible sur: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/29881979/?from\\_single\\_result=Lebrun+et+al.%2C+Neurol+Ther%2C+2018&expanded\\_search\\_query=Lebrun+et+al.%2C+Neurol+Ther%2C+2018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/29881979/?from_single_result=Lebrun+et+al.%2C+Neurol+Ther%2C+2018&expanded_search_query=Lebrun+et+al.%2C+Neurol+Ther%2C+2018)

28. Czaja AJ, Carpenter HA. Histological features associated with relapse after corticosteroid withdrawal in type 1 autoimmune hepatitis. *Liver Int*. 2003;23(2):116-23.

29. Matsuoka N, Kozuru H, Koga T, Abiru S, Yamasaki K, Komori A, et al. Galectin-9 in autoimmune hepatitis: Correlation between serum levels of galectin-9 and M2BPGi in patients with autoimmune hepatitis. *Medicine (Baltimore)*. août 2019;98(35):e16924.

30. Wu C, Thalhamer T, Franca RF, Xiao S, Wang C, Hotta C, et al. Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. *Immunity*. 21 août 2014;41(2):270-82.

31. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm* [Internet]. 21 mai 2018 [cité 28 juill 2020];2018. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987346/>

32. Shirabe K, Bekki Y, Gantumur D, Araki K, Ishii N, Kuno A, et al. Mac-2 binding protein glycan isomer (M2BPGi) is a new serum biomarker for assessing liver fibrosis: more than a biomarker of liver fibrosis. *J Gastroenterol*. juill 2018;53(7):819-26.

33. Nagayama K, Enomoto N, Miyasaka Y, Kurosaki M, Chen CH, Sakamoto N, et al. Overexpression of interferon gamma-inducible protein 10 in the liver of patients with type I autoimmune hepatitis identified by suppression subtractive hybridization. *Am J Gastroenterol*. juill 2001;96(7):2211-7.

34. Than NN, Hodson J, Schmidt-Martin D, Taubert R, Wawman RE, Botter M, et al. Efficacy of rituximab in difficult-to-manage autoimmune hepatitis: Results from the

- International Autoimmune Hepatitis Group. *JHEP Rep Innov Hepatol*. déc 2019;1(6):437-45.
35. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1 oct 2015;63(4):971-1004.
36. Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology*. janv 2000;31(1):241-6.
37. Verma S, Gunuwan B, Mendler M, Govindrajan S, Redeker A. Factors predicting relapse and poor outcome in type I autoimmune hepatitis: role of cirrhosis development, patterns of transaminases during remission and plasma cell activity in the liver biopsy. *Am J Gastroenterol*. août 2004;99(8):1510-6.

## **REMERCIEMENT**

### **Aux membres du jury,**

Au Dr Giovanna Clavarino : un immense merci pour toute ton aide, tes idées pertinentes, ta bonne humeur et ta disponibilité. Ton implication dans ce travail de thèse a été primordiale. Au-delà même de ton domaine d'activité, tu as toujours été de bon conseil. Après mille et une corrections, ce protocole verra le jour en très grande partie grâce à toi et tes idées.

Au Pr Nathalie Sturm, merci de m'avoir consacré du temps et votre aide au cours des relectures des lames de biopsies hépatiques.

Au Dr Chantal Perard-Dumestre, merci pour votre aide dans la confection du sujet de thèse.

Au Dr Professeur Thomas Deceans, merci de m'avoir fait l'honneur d'être président du jury et d'avoir examiné cette thèse

Au Pr Jean Pierre ZARSKI, merci pour votre encadrement et tous vos conseils avisés au cours de cette thèse que vous avez récupéré en chemin. Partant d'un sujet ambigu sur une maladie rare, grâce à votre clarté et votre engagement, nous avons pu cibler un objectif de thèse concret et le mener à bien. Merci aussi pour votre patience pendant les multiples corrections des protocoles et du manuscrit.

### **A mes maîtres,**

Au Dr Justine Barthelon : merci pour ton aide au cours de cette thèse dans le recrutement des patients et dans les derniers moments : LA RELECTURE !! Mais surtout et avant tous, merci de m'avoir communiqué ta passion pour l'hépatologie au cours de ces semestres au CHU et à Chambéry. Tu es l'exemple du médecin que je voudrais devenir un jour !

A Pierre Audoin, un grand merci pour ta disponibilité et tes conseils pendant la rédaction de ces deux protocoles. En temps qu'ARC de biologie, ce n'était pas ton rôle de t'impliquer dans

cette recherche, alors merci pour le temps que tu m'as accordé et à fortiori, merci de m'avoir appris à utiliser Word.

Au Dr DURAND Aurélie, merci pour ton enseignement et ta disponibilité au cours de ces semestres au 7<sup>ème</sup> ciel et aux endoscopies. Je n'ai jamais eu l'occasion de te remercier convenablement pour ton aide et tes justes conseils alors je profite de ces quelques pages. Sans toi, ces stages n'auraient pas été les mêmes, ta pédagogie auprès des internes en particulier aux avis a été essentiel pour Olivier et moi. J'espère que beaucoup d'autres profiteront de tes connaissances.

Au Dr Laetitia Lecoq, un grand merci pour ta patience, ta disponibilité et ta formation à la ligature de varice œsophagienne hors pair.

Au Dr TURCRY Aude, merci pour ta relecture assidue de ce résumé en une après-midi ! Merci pour cette journée cadeaux qui me permet d'écrire ces quelques lignes.

Merci à l'équipe médicale et paramédicale de Chambéry de nous avoir supporté avec Laetitia Bastide sur ce dernier semestre, source de stress. Merci pour les connaissances et l'autonomisation.

Merci à l'équipe médicale du CHU de Grenoble pour toutes ces années d'enseignements. Merci aux infirmières, infirmiers et aide-soignants du 7<sup>ème</sup> toujours aussi courageux malgré les conditions de travail difficile...

Merci à l'équipe médicale et paramédical d'Annecy de m'accueillir prochainement !

Merci au Dr Rougon Marion pour toutes ces gardes mouvementés en réanimation !

### **A mes co-internes,**

Merci à Théophile Gerster présent dès les premiers moments de souffrance au 7<sup>ème</sup> B.

Merci à Sylvain Merle pour toutes ces RCP intense tenues dans les escaliers du 7<sup>ème</sup> C.

Merci à Laetitia Bastide de râler avec moi quelques soit le moment ou le sujet.

Merci à Olivier Msika pour tous les cafés que je ne rembourserais jamais. Merci d'avoir joué pour tous tes bons conseils pour la présentation de DES, O grand maître du power point !!

Merci à Olivier Hernandez d'avoir été la force tranquille aux avis, alors que je criais dans le bip.

Merci à Laurine Tricanelli de m'avoir repris cette fameuse astreinte/garde au SAU à J7 du premier semestre alors que je n'avais pas fini la CV à 21h au 7<sup>ème</sup> B.

Merci à Marion Olivari de m'avoir fourni ces fameuses diapos d'anapath sur l'hépatite auto immune sur lesquelles j'ai pu tout pomper.

Merci à tout le reste de la troupe, déjà docteur pour certain ou soon to be ! En espérant boire de nouveau des orgasmes à vos côtés au B8.

Merci à Elodie et Thibault pour toutes ces épaules d'agneau dégustés pendant le confinement et à toutes les autres qui viendrons !

### **A ma famille,**

Merci à mes parents et à mon frère pour leurs soutiens indéfectibles au cours de ces longues études, dans les moments les plus difficiles et à toutes heures de la journée... Je vous aime fort.

### **A mon conjoint,**

Merci à Romain Tailland pour m'avoir épaulé durant tout cet internat et non juste pendant ce travail de thèse. Merci pour ton soutien quotidien, ta patience avec mes sautes d'humeurs, et tout le réconfort que tu m'apporte avant et après chaque garde. Merci de me challenger, de me faire rire, de me dépayser à chaque occasion. Merci pour les étoiles dans les yeux. Mais surtout, merci d'avoir acheté un ordinateur pour ta thèse qui m'a finalement permis de rédiger la mienne. Je t'aime.

## **A mes amis,**

Merci à Océane Bénistant pour ton soutien au cours de ces longues années d'étude. Hâte de pouvoir enfin poser plus de 1 semaine de vacances d'affilée pour voyager à tes côtés ailleurs qu'en Russie.

Merci à Blandine Seblain pour sa disponibilité téléphonique, ses bons conseils sur les achats de vélo, vêtement beaucoup trop cher pour nos budgets d'interne. Merci pour toutes ces unités d'alcool partagé aux bars et en vacances. Promis je n'ai pas annulé le trail de la diagonale des fous pour que tu puisses lire ces quelques mots. A toute à l'heure chez Pascale.

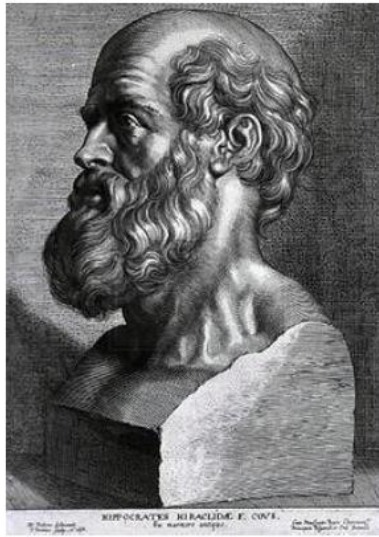
Merci à Léa Valentin et Quentin Renaud de m'avoir accueilli sur leur canapé étant SDF en début d'internat. Merci à Léa d'avoir fait couler chaque matin le café, de m'avoir préparé la soupe, de m'avoir forcé à manger plus qu'une pomme par jour. Merci pour ces beaux voyages remplis de surprise.

Merci à Mathieu Simonet et Marie Van Gout de m'avoir hébergé les soirs d'astreinte, de m'avoir perverti dans la bière tout au long de notre externat. Heureusement j'ai déménagé, et j'ai pu préserver quelques neurones pour cette thèse.

Merci à Pascal, de nous avoir accueilli toutes ces années à l'Absolu où nous avons vécu certains de nos meilleurs souvenirs avec Mathieu, Marie, Blandine, Albane...

PS : désolé pour l'orthographe personne n'as relu cette partie.





## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*